

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare

Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare XIX ciclo



***“Caratterizzazione degli effetti biologici del resveratrolo,
un potenziale nutraceutico per la prevenzione delle malattie
cronico-degenerative”***

Anno Accademico 2006/2007

Docente Guida:
Prof. Francesco Paolo Mancini

Candidata:
Dott.ssa Paola Iannelli

Coordinatore:
Prof. Carmelo Bruno Bruni

Indice

SUMMARY	V
SOMMARIO	1
1. 1. INTRODUZIONE	5
1. 2. GLI ANTIOSSIDANTI ALIMENTARI	8
<i>I Carotenoidi</i>	8
<i>I Polifenoli</i>	9
1. 3. ROS E INVECCHIAMENTO	13
<i>ROS e Trasduzione del Segnale</i>	14
<i>ROS e Apoptosi</i>	15
<i>ROS e Malattie Cronico-Degenerative</i>	17
1. 4. CATECHINE	18
1. 4.1 CATECHINE E SIGNALING CELLULARE	19
1. 4.2 CATECHINE E PREVENZIONE DEL TUMORE ALLA PELLE	19
1. 5. RESVERATROLO	21
1. 5.1 BIODISPONIBILITÀ DEL RESVERATROLO	22
1. 5.2 ATTIVITÀ ANTITUMORALE DEL RESVERATROLO	24
<i>Resveratrolo come fitoestrogeno</i>	24
<i>Resveratrolo induce arresto della crescita cellulare e apoptosi</i>	25
<i>Resveratrolo come inibitore della via di NF-kappaB</i>	27
<i>Resveratrolo e MAPKs</i>	27
1. 5.3 RESVERATROLO ED ATEROSCLEROSI	28
<i>Resveratrolo e lipoproteine</i>	28
<i>Resveratrolo e inibizione dell'ossidazione delle LDL</i>	29
<i>Resveratrolo e VSCM (Cellule Muscolari Lisce Vascolari)</i>	29
<i>Resveratrolo e inibizione dell'aggregazione piastrinica</i>	30
1. 6. MALATTIE CARDIOVASCOLARI	31
1. 6.1 EZIOPATOGENESI DELL' ATEROSCLEROSI	33
1. 6.2 IPOTESI OSSIDATIVA DELL' ATEROSCLEROSI	36

1. 7. PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) E METABOLISMO LIPIDICO	37
1. 7.1 LA FOSFORILAZIONE NELLA MODULAZIONE DELL' ATTIVITA' DEI PPARs	39
1. 7.2 FUNZIONE E DISTRIBUZIONE TISSUTALE DEI PPARs	44
1. 7.3 PPARs E ATEROSCLEROSI	45
1. 8. CARCINOGENESI	48
1. 8.1 CARCINOMA DELLA PROSTATA	50
<i>Cause del Tumore alla Prostata</i>	50
<i>Attività di Pyk2 nelle cellule epiteliali di prostata</i>	52
1. 9. LONGEVITÀ E p66shc	54
1. 9.1 PROTEINE ADATTATRICI SHC	54
1. 9.2 DOMINI MODULARI DI SHC	55
<i>Dominio SH2</i>	55
<i>Dominio PTB</i>	55
<i>Dominio CH1</i>	55
<i>Dominio CH2</i>	56
1. 9.3 SHC E LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE	56
1. 9.4 p66shc ROS E APOPTOSI	58
1. 9.5 SHC E RECETTORE DEGLI ESTROGENI	60
1. 9.6 p66shc ISCHEMIA ED ATEROSCLEROSI	63
1. 9.7 p66shc E TUMORIGENESI	64
2. SCOPO DEL LAVORO	65
3. MATERIALI E METODI	66
3. 1 Colture cellulari	66
3. 2 Dosaggio del GSH	66
3. 3 Estrazione di proteine nucleari per il saggio EMSA (Metodo di Osborne)	67
3. 4 Misurazioni spettrofotometriche	68
3. 5 Ibridazione degli oligonucleotidi senso ed antisenso	69
3. 6 Marcatura terminale degli oligonucleotidi	69
3. 7 Purificazione degli oligonucleotidi marcati	70
3. 8 Saggio di variazione della mobilità elettroforetica (EMSA)	70
3. 9 Inibizione del saggio EMSA con anticorpi	71

3. 10 Estrazione di proteine totali da cellule in coltura	71
3. 11 Immunoprecipitazione	72
3. 12 Western Blotting	73
3. 13 Conta delle cellule	75
4. RISULTATI I PARTE	76
4. 1 Effetto del DEM sui livelli intracellulari del Glutatione ridotto (GSH) in cellule RH7777	76
4. 2 Effetto dello stress ossidativo indotto da DEM sull' attività di legame di PPAR α al PPRE di ACO	77
4. 3 Inibizione del legame di PPAR α al PPRE di ACO utilizzando un anticorpo anti-PPAR α	79
4. 4 Effetto del resveratrolo in presenza di DEM sull' attività di legame di PPAR α al PPRE di ACO	82
4. 5 Effetto del resveratrolo in assenza di DEM sull'attività di legame di PPAR α al PPRE di ACO	84
4. 6 Effetto del resveratrolo sull'attività delle proteine chinasi Erk1/2	86
4. 7 Effetto del resveratrolo sui livelli della proteina PPAR α e PPAR α -P (Ser-21)	88
4. 8 Effetto del DEM e del resveratrolo sull' espressione proteica di ACO	89
4. 9 Effetto del DEM e del resveratrolo sui livelli dell' mRNA di ACO	90
4. 10 Effetto del resveratrolo sulla proliferazione e sulla vitalità delle cellule McA-RH7777	91
4. 11 Valutazione morfologica delle RH7777 trattate con resveratrolo	94
4. 12 Effetto del resveratrolo e del DEM sull' attività della chinasi pAkt/PKB	94
4. 13 Dosaggio della lattico deidrogenasi	95
5. RISULTATI II PARTE	97
5. 1 Effetto del resveratrolo sulla crescita e l'adesione di cheratinociti umani in coltura (HaCaT)	97
5. 2 Resveratrolo e p66shc: esperimenti di Dose Risposta e <i>Time Course</i> su cheratinociti (HaCaT)	99
5. 3 Effetto dell' inibitore di ERK1/2 sulla Fosforilazione in Ser36 di p66shc	102
5. 4 Effetto del Resveratrolo sulle chinasi AKT e Pyk2 in cheratinociti	104
5. 6 Motilità cellulare e Resveratrolo	105
5. 7 Epigallocatechina gallato e fosforilazione in Serina 36 di p66shc in cheratinociti	106

5. 8 Valutazione della fosforilazione di p66 shc in Ser36 su cellule EPN e EPN -PKM3 trattate con Resveratrolo	108
5. 9 Effetto del Resveratrolo sull' Attività di AKT in cellule di prostata	111
5. 10 Effetto dell' inibitore di ERK1/2 sulla fosforilazione in Ser36 di p66shc	113
5. 11 Epigallocatechina gallato e fosforilazione in Serina 36 di p66shc in EPN e EPN-PKM3	114
6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	118
7. BIBLIOGRAFIA	128
RINGRAZIAMENTI	VIII

SUMMARY

Epidemiological studies have shown that diet may be an important factor for the environmental protection against cardiovascular disease and cancer. In particular, it is important to consume large amounts of fruit and vegetables, as it is typical of the Mediterranean Diet. The main interest of biomedical research in the field of nutrition consists of defining the most active compounds in the diet and understanding the mechanisms of action at the molecular and cellular level.

A positive role has been attributed to grape polyphenols such as resveratrol, in terms of increased endogenous antioxidant defences, due to the regulation of genes coding for key enzymes of the antioxidant system. The polyphenols have also been recognized to have a specific inhibiting action for tumor growth, as in the case of the breast cancer. Such action is associated with the modulation of enzymes involved in carcinogenesis or with the inhibition of growth factors and cell proliferation. Resveratrol and partly epigallocatechin gallate (EGCG) from green tea have been the focus of this work. A special effort has been dedicated to study the antioxidant and anticarcinogen activity of resveratrol.

The work, wholly carried out in an experimental system of cultured eucaryotic cells, started from the analysis of the environmental interference on the cellular redox equilibrium and the influence of such perturbation on the activity of a transcriptional factor, PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α), a nuclear receptor involved in lipid metabolism and in major human diseases. It is plausible that reactive oxygen substances (ROS) might alter the DNA-binding domain of PPARs because these nuclear receptors contain two zinc finger motifs that can be easily oxidized thus altering the conformation of the DNA-binding domain and, consequently, the function of the transcription factor. Today it is possible to stimulate the activity of PPAR α by the therapeutic administration of PPARs agonists that have shown a powerful hypolipidemic action.

The possibility to influence the activity of PPAR α to preserve health, not by pharmacological intervention, but in a more natural way through dietary measures, led us to study the effects of resveratrol on the redox regulation of PPAR α , and subsequently on cell proliferation.

However, resveratrol has been recognized to have other biological activities related to its anti-atherogenic potential: it inhibits lipid accumulation, monocyte and lymphocyte infiltration, smooth muscle cells proliferation and migration, platelet aggregation and thrombus formation.

The starting hypothesis of the present work has been that oxidative stress could alter the activity of PPAR α . After measuring the intensity of the oxidative stress induced by the addition of

diethylmaleate (DEM) to a cultured rat hepatoma cell line, McArdle-RH7777 (RH7777), the DNA-binding capacity of PPAR α to the PPAR response element of the target gene acyl-CoA oxidase (ACO) has been evaluated. The results suggest that the activity of PPAR α is impaired by oxidative stress, and that the resveratrol partially preserves the DNA-binding activity of PPAR α in the presence of stress, although resveratrol itself is responsible for reducing the binding of PPAR α in the absence of oxidative stress.

It is well known that the resveratrol influences several kinases and it is also known that PPAR α is regulated by phosphorylation. Therefore, we have hypothesized that the inhibitory effect on the DNA-binding activity of PPAR α obtained after treatment of the cells with resveratrol alone was due to an inhibitory phosphorylation of PPAR α induced by resveratrol. It is also known that ERK1/2 kinases phosphorylate Ser6, Ser12 e Ser21 within the A/B domain of PPAR α . Results obtained by Western Blotting analysis indicated that the treatment of cells with resveratrol induces phosphorylation of PPAR at Ser21 and that the same treatment is also able of inducing phosphorylation of ERK1/2. These data suggest that resveratrol can influence the activity of PPAR α by interfering with the effects of oxidative stress on the receptor, and by stimulating the phosphorylation of the receptor (probably carried out by ERK1/2 kinases), as well.

In order to provide a broader understanding of the biological actions of resveratrol and in particular those more closely related to a possible anti-neoplastic activity the ability of resveratrol to regulate cell proliferation has been investigated.

Interestingly, we observed different effects of the resveratrol depending on concentrations in a cultured rat hepatoma cell line: when the concentration was lower or equal to 10 μ M, no effect of resveratrol was evident; differently, at a 50 μ M concentration a citostatic effect was observed, while a concentration of 100 μ M caused massive cell death. In order to obtain information about the mechanism of cell death induced by the highest concentration of resveratrol, the activity of the lactate dehydrogenase was tested in the conditioned medium from treated cells. The observation that no enzymatic activity was detectable in the conditioned medium supports the theory that high concentrations of resveratrol induce cell death by apoptosis. Furthermore, a Western Blotting analysis of Akt/PKB phosphorylation in cells treated with 100 μ M resveratrol for 1 hour, showed a marked reduction of the phosphorylated form, thus providing a potential explanation of the pro-apoptotic activity of resveratrol.

The anti-proliferative effect of resveratrol has been studied and confirmed also in keratinocytes and in epithelial prostate cells. Resveratrol has also an inhibitory activity on cell adhesion.

In the present work the hypothesis that resveratrol can induce apoptosis by activating p66shc has been evaluated. p66shc belongs to the family of proteins Shc, i.e., adaptor proteins involved in signal transduction pathways, in cell proliferation but also in the "survival signal". p66shc can be phosphorylated on serine 36; this phosphorylation is crucial for a proapoptotic function of p66shc after stress. p66shc is a redox enzyme, regulates mitochondrial metabolism and ROS production; in particular it has been shown that it is involved in the regulation of mitochondrial electron transfer chain and the release of cytochrome c.

Our experimental results clearly showed that the resveratrol induces phosphorylation of p66shc on Ser36 in a time and dose-dependent way, both in HaCaT cells (keratinocytes) and in the prostate epithelial cells (EPN and EPN-PKM3).

Since resveratrol activates ERK1/2, it is possible to observe a peak of phosphorylation of ERK1/2 that precedes the phosphorylation induced by resveratrol on p66shc by approximately 15 minutes. Thus, it has been hypothesized that ERK1/2 is involved in the phosphorylation of p66shc in response to resveratrol. Those experiments (ERK1/2 and p66shc phosphorylation) have been replicated in the presence of U0126, a specific ERK1/2 inhibitor. The lack of activation of p66shc and ERK1/2 in the presence of the inhibitor and resveratrol suggests that ERK1/2 is involved in the phosphorylation of p66shc on Ser36. By immunoblotting analysis it has been shown that treatment with 200 μ M resveratrol for 5 minutes reduces strongly the Akt/PKB phosphorylation.

Furthermore, by means of the wound healing assay on HaCat, it was found that resveratrol reduces cell motility. Although non-receptor kinase Proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) is involved in cell motility and adhesion, a resveratrol effect on Pyk2 activation was not observed.

Similar studies have been extended to the effects of EGCG, a flavonoid belonging to the family of catechins. EGCG has scavenger activities, a pro-apoptotic function, and it is considered an anti-aging molecule. The obtained results show that also 10 μ M EGCG induces a strong phosphorylation of p66shc on Ser36 that does not increase further at higher concentrations of EGCG. This activation of p66shc was found in the cells of the prostate but it is almost absent in keratinocytes. Moreover, EGCG induces a strong ERK1 / 2 activation both in prostate cells and in keratinocytes.

Sommario

Studi epidemiologici hanno dimostrato che l' alimentazione può costituire un importante fattore di protezione ambientale nei confronti delle malattie cardiovascolari e neoplastiche. In particolare, risulta importante la ricchezza nella dieta di prodotti vegetali, e quindi l' assunzione di quantità rilevanti di frutta e verdura come è, ad esempio, tipico della Dieta Mediterranea. La ricerca scientifica biomedica, nel settore della nutrizione e dell' alimentazione, si interessa fortemente a definire i composti più attivi della dieta ed a comprenderne i meccanismi d' azione a livello molecolare e cellulare.

E' stato attribuito un ruolo positivo ai polifenoli dell' uva come il resveratrolo, in termini di aumento delle difese endogene antiossidanti, grazie alla regolazione dell' espressione di geni codificanti per enzimi chiave del sistema antiossidante. Per i polifenoli è stata riconosciuta anche un' azione specifica di inibizione della crescita tumorale, come nel caso del tumore mammario, legata alla modulazione di enzimi coinvolti nella carcinogenesi o all' inibizione dell' attivazione di fattori di crescita e di proliferazione cellulare.

L' interesse alla base del presente lavoro è stato rivolto al resveratrolo ed in parte all' epigallocatechinagallato (EGCG) presente nel tè verde. In particolare si è studiata l' attività antiossidante e quella antitumorale del resveratrolo.

Il lavoro presentato, completamente svolto in un sistema sperimentale di cellule eucariotiche in coltura, è partito dall' analisi dell' interferenza ambientale sull' equilibrio redox e dall' influenza di tali condizioni sull' attività di un fattore trascrizionale, PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α), appartenente alla famiglia dei recettori nucleari, centrale nel metabolismo lipidico ed implicato in importanti patologie umane. Per i PPARs, risulta plausibile l' ipotesi che il dominio di legame al DNA possa essere alterato dalle sostanze reattive derivate dall' ossigeno (ROS) perchè contenente due strutture a dita di zinco, la cui facile ossidabilità può produrre alterazioni della capacità di legare il DNA. Oggi è possibile stimolare l' attività di PPAR α mediante la somministrazione terapeutica di agonisti dei PPARs che hanno dimostrato una potente azione ipolipidemizzante.

La possibilità di influenzare l' attività di PPAR α in maniera vantaggiosa per lo stato di salute, non con interventi farmacologici, ma in maniera più naturale attraverso la quotidiana alimentazione, ha stimolato lo studio degli effetti del resveratrolo, dapprima sulla regolazione redox di PPAR α e, successivamente, sulla proliferazione cellulare.

Il resveratrolo sembra avere un' attività anti-aterogena, inibendo l' accumulo di lipidi,

l' infiltrazione dei monociti e dei linfociti, la proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce, l' aggregazione piastrinica e la formazione di trombi.

L' ipotesi di partenza del presente lavoro è stata che lo stress ossidativo potesse alterare l' attività di PPAR α . Dopo aver misurato l' intensità dello stress ottenuto, in seguito a stimolazioni con il dietilmaleato (DEM), in cellule di epatoma di ratto McArdle-RH7777 in coltura (RH7777) è stata valutata la capacità di legare il DNA di PPAR α in corrispondenza del sito di risposta a PPAR del promotore del gene bersaglio acil CoA ossidasi (ACO). I risultati indicano che l' attività di PPAR α viene danneggiata dallo stress ossidativo e che il resveratrolo esercita un effetto protettivo in presenza di stress, ma induce anch' esso una parziale inibizione dell' attività di PPAR α in assenza di stress ossidativo.

E' noto che il resveratrolo influenza numerose chinasi intracellulari ed è altrettanto noto che PPAR α è un fattore regolato da fosforilazione, per cui è stato ipotizzato che l' effetto inibitorio sull' attività legante il DNA di PPAR α esercitato dal trattamento delle cellule col solo resveratrolo fosse dovuto ad una fosforilazione inibitoria di PPAR α indotta da resveratrolo. E' anche noto che le chinasi ERK1/2 fosforilano Ser 6, Ser12 e Ser21, nel dominio A/B di PPAR α .

I risultati ottenuti mediante Western Blotting hanno indicato che il livello di fosforilazione di PPAR α in Ser-21 aumenta in seguito a trattamento con resveratrolo e che lo stesso trattamento è in grado anche di stimolare la fosforilazione di ERK1/2.

Questi dati suggeriscono che il resveratrolo può influenzare l' attività di PPAR α sia interferendo con gli effetti dello stress ossidativo sul recettore, sia stimolando la fosforilazione del recettore.

Per fornire una visione più generale delle azioni biologiche del resveratrolo, in particolare di quelle più strettamente connesse ad una possibile attività antineoplastica, e delle possibili ricadute su altre patologie cronico-degenerative, sono state studiate le potenzialità del resveratrolo di regolare la proliferazione cellulare.

E' stato interessante osservare in cellule di epatoma in coltura effetti diversi del resveratrolo a seconda della dose: in, particolare a concentrazioni uguali od inferiori a 10 μ M resveratrolo, le cellule sembrano non risentire della presenza del composto e proliferare in maniera analoga alle cellule di controllo senza influenzare la crescita cellulare, invece alla concentrazione di 50 μ M resveratrolo si osserva un effetto citostatico ed a 100 μ M il resveratrolo induce un drastico effetto di morte cellulare. I risultati ottenuti dal saggio della lattico-deidrogenasi sul mezzo condizionato dalle cellule trattate col resveratrolo, suggeriscono che la morte cellulare indotta da resveratrolo sia dovuta ad apoptosi. Inoltre, la marcata riduzione della fosforilazione di AKT ad

un' ora di trattamento alla concentrazione di 100 μ M di resveratrolo, potrebbe contribuire all' attività pro-apoptotica del resveratrolo.

L' effetto antiproliferativo del resveratrolo è stato studiato e confermato anche in cheratinociti ed in cellule epiteliali di prostata. Il resveratrolo ha anche un' attività inibitoria sull' adesione cellulare.

Nel presente lavoro è stata avanzata e studiata l' ipotesi che il resveratrolo possa indurre apoptosi attivando p66shc. p66shc appartiene alla famiglia di proteine Shc, proteine adattatrici che prendono parte alla traduzione del segnale coinvolta nella proliferazione ma anche nel "signal survival".

La fosforilazione in serina 36 di p66shc risulta essere determinante per una corretta risposta apoptotica dopo stress. p66shc è considerato un enzima redox capace di controllare il metabolismo mitocondriale e la produzione dei ROS, in particolare è stato visto che media il trasporto degli elettroni sulla catena respiratoria mitocondriale con conseguente fuoriuscita del citocromo c. I risultati sperimentali ottenuti dimostrano con chiarezza che il resveratrolo fosforila la serina 36 di p66shc in maniera dose- e tempo-dipendente, sia nelle cellule HaCaT (cheratinociti), che nelle cellule di epitelio di prostata (EPN ed EPN-PKM3).

Poichè il resveratrolo attiva ERK1/2 con un picco della fosforilazione di ERK1/2 che precede di circa 15 minuti il picco di fosforilazione indotto dal resveratrolo su p66shc, si è ipotizzato il coinvolgimento di ERK1/2 nella fosforilazione di p66 indotta da resveratrolo. Gli esperimenti di fosforilazione di ERK1/2 e p66shc sono stati quindi replicati in presenza di U0126, un inibitore specifico di ERK1/2. La mancata fosforilazione di p66shc e di ERK1/2 in presenza dell' inibitore e del resveratrolo suggerisce che ERK1/2 sia coinvolto nella fosforilazione di p66shc in Ser36.

Mediante immunoblotting è stato anche dimostrato che 5 minuti di trattamento con 200 μ M di resveratrolo riducono marcatamente la fosforilazione di Akt/PKB.

Inoltre con saggi di motilità cellulare effettuati su HaCaT, si è riscontrato che il resveratrolo è anche in grado di ridurre la capacità di migrazione delle cellule.

Nonostante la chinasi non recettoriale *proline-rich tyrosine kinase-2* (Pyk2) risulta avere un importante ruolo per la motilità e l' adesività cellulare, non è stato riscontrato un effetto del resveratrolo sull' attivazione di Pyk2.

Simili studi sono stati estesi agli effetti dell'EGCG, un flavonoide appartenente alla famiglia delle catechine. L' EGCG ha attività di *scavenger*, una funzione pro-apoptotica ed è considerata una molecola anti-invecchiamento.

Dai risultati ottenuti emerge che anche l' EGCG induce una forte fosforilazione di p66shc in serina 36 già con 10 μ M di EGCG per poi raggiungere un plateau. Questa attivazione di p66shc si è riscontrata nelle cellule di prostata ma è quasi inesistente nei cheratinociti. Inoltre l' EGCG induce una forte attivazione di ERK1/2 sia nelle cellule di prostata che nei cheratinociti.

1. 1 INTRODUZIONE

Sin dai primi anni '50 del secolo scorso, gli studi pionieristici dello scienziato americano Ancel Keys (fig. 1) hanno messo in luce l'enorme potenziale di una corretta alimentazione nella prevenzione delle malattie cardiovascolari (MCV). Da allora, l'interesse per la scienza



Fig. 1 Una fotografia che ritrae Ancel Keys negli anni '60 e sulla quale è riportata la dedica ad uno dei suoi allievi in Italia.

dell'alimentazione è stato crescente e veniva corroborato dalla scoperta di nuove associazioni tra sana alimentazione e protezione nei confronti di altre patologie cronico-degenerative, prime fra tutte le malattie neoplastiche.

Una chiara e sintetica testimonianza dell'opera dello scienziato americano la forniscono in un recente articolo M.Mancini e J.Stamler, sicuramente due studiosi che nei rispettivi paesi, Italia e Stati Uniti, hanno maggiormente contribuito a diffondere e sviluppare i teoremi di Keys (Mancini Mario e Stamler Jeremiah, 2004). L'eredità di Keys è fondamentale racchiusa nel Seven Countries Study (SCS), da lui iniziato e coordinato, nel quale venne dimostrato inequivocabilmente mediante lo studio di popolazioni diverse che un introito alimentare elevato di grassi saturi causa un incremento del colesterolo ematico e del rischio di mortalità per MCV e che il livello del colesterolo ematico si correla al rischio di MCV (Keys Ancel, 1980). La figura 2 riporta il risultato più

significativo dello studio che getta le basi della moderna Scienza dell'Alimentazione. A distanza di decenni, le intuizioni di Keys che venivano convalidate da studi epidemiologici di popolazione, oggi sono convalidate ed approfondite a livello cellulare e molecolare.

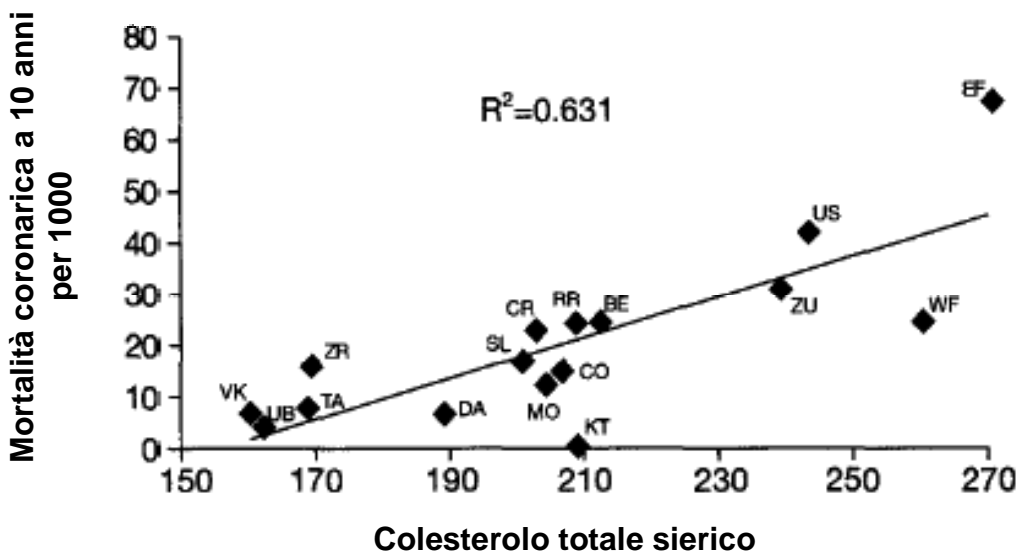


Fig. 2 – Seven Countries Study. Relazione tra livelli medi di colesterolo totale sierico e mortalità coronarica a 10 anni in 16 coorti. Calcolato dai dati pubblicati.

US: Ferrovieri americani, Stati Uniti d’America; EF: Finlandia orientale; WF: Finlandia occidentale; ZU: Zutfen, Olanda; CR: Crevalcore, Italia; MO: Montegiorgio, Italia; RR: ferrovieri di Roma, Italia; DA: Dalmazia, Croazia, ex-Iugoslavia; SL: Slavonia, Croazia, ex-Iugoslavia; VK: Velika Krsna, Serbia, ex-Iugoslavia; BE: Belgrado, Serbia, ex-Iugoslavia; KT: Creta, Grecia; CO: Corfù, Grecia; TA: Tanushimaru, Giappone; UB: Ushibuka, Giappone.

Dalle analisi dell’SCS è anche emerso che, oltre al colesterolo ematico, anche la pressione arteriosa, il fumo di sigaretta hanno una relazione continua, graduale, forte, indipendente e predittiva nei confronti della CHD. Fu anche evidenziata la relazione inversa tra grassi polinsaturi e colesterolo ematico ed anche tra introito di fibre alimentari e riduzione del peso corporeo negli obesi e colesterolemia. L’impatto di tali risultati sulle politiche sanitarie in tutto il mondo è stato notevole ed è sotto gli occhi di tutti. Ispirato dalle conclusioni del SCS e dai regimi dietetici delle coorti dei paesi mediterranei che partecipavano all’SCS, Ancel Keys identificò la Dieta Mediterranea come quella che naturalmente corrispondeva ai principi di sana alimentazione identificati nei suoi studi. Con il libro scritto insieme alla moglie Margaret nel 1975, “Eat Well and Stay Well, the Mediterranean Way” (Keys Ancel et al., 1975), Keys si pone anche come il “padre” della Dieta Mediterranea.

Si deve gratitudine a Keys perché la sua intuizione scientificamente dimostrata, scevra da sofismi e distorsioni, contribuisce a prolungare, giorno per giorno, la vita a migliaia di esseri umani.

Un’ulteriore pilastro nel riconoscimento dell’importanza dell’alimentazione nel proteggere la salute dell’uomo nasce dalle fondamentali osservazioni di Doll e Peto (Doll R e Peto R, 1981) che suggerivano che almeno il 35% di tutti i casi di tumore si possono prevenire con la dieta,

osservazioni successivamente confermate da studi epidemiologici che hanno dimostrato che le differenze nelle abitudini alimentari influenzano il rischio di diversi tipi di cancro (World Cancer Research Fund, 1997).

Ciò che ancora oggi lascia meravigliati anche gli esperti del settore è che gli studi hanno dimostrato che lo stesso tipo di alimentazione che è risultata protettiva per le malattie dell' apparato cardiovascolare è anche quella che fornisce la maggiore protezione nei confronti delle malattie neoplastiche. Probabilmente questa vantaggiosissima coincidenza nasconde il mirabile lavoro di milioni di anni di processo evolutivo. La fortuna di molte aree geografiche è che una dieta con tali caratteristiche è la Dieta Mediterranea, ovvero l'alimentazione tipica di molte popolazioni che vivono intorno al bacino mediterraneo, *in primis* quella dell'Italia Meridionale. Il concreto rischio, soprattutto per tali fortunate popolazioni, è il progressivo allontanamento dalle tradizioni mediterranee con conseguente e parallela perdita dei vantaggi in termini di prevenzione delle malattie cronic-degenerative.

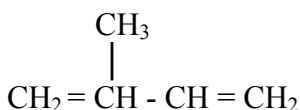
1. 2 GLI ANTIOSSIDANTI ALIMENTARI

Nell' ambito dei riconosciuti benefici che derivano allo stato di salute da una sana alimentazione si vanno via via evidenziando i componenti chimici che sono in gran parte responsabili degli effetti protettivi della dieta. L' importanza della dieta nella prevenzione di tumori ma anche di malattie del sistema vascolare è evidenziata dall' osservazione che l' incidenza di determinate malattie varia da Paese a Paese, dove diverse sono le abitudini alimentari.

Nel mondo occidentale i tumori del polmone, colon-retto ed i tumori dipendenti dagli ormoni (carcinoma della mammella, dell' endometrio, della prostata) sono molto più diffusi che nei paesi in via di sviluppo o nei quali si segue un' alimentazione ancora legata ai prodotti della terra e quindi ricca di frutta e verdura.

Il consumo di frutta e vegetali è stato associato ad un ridotto rischio di alcuni tipi di cancro. Studi effettuati sia *in vitro* che *in vivo* hanno dimostrato che alcuni componenti della dieta, tra cui la vitamina E, la vitamina C, l' acido retinoico, i carotenoidi come il licopene (potente antiossidante presente nel pomodoro), i polifenoli come l' idrossitirosole (presente nell' olio di oliva) ed il resveratrolo (presente nel vino rosso), la quercitina e ginesteina presenti nella soia, e le catechine presenti nel tè mostrano tutti un effetto inibitorio sull' insorgenza di cancro, suggerendo un effetto chemiopreventivo (Thomasset Sarah C *et al.* 2007).

I carotenoidi sono una famiglia di pigmenti gialli, arancioni e rossi presenti nei tessuti vegetali. Sono composti derivanti dalla condensazione testa-coda (con legami 1,4) di più unità di isoprene. Tutti i doppi legami presenti in un carotenoide possono essere in forma *cis* o *trans*.



I carotenoidi idrocarburici, ovvero formati solo da carbonio e idrogeno, sono chiamati caroteni (tetraterpeni), mentre quelli contenenti anche ossigeno vengono definiti xantofille. Diversi sono i carotenoidi isolati: il licopene, il β -carotene, l' α -carotene, il fitoene, il fitofluene e la luteina (fig. 3). Mentre carote, papaia mango, sono ricchi di β -carotene, i pomodori contengono concentrazioni particolarmente elevate di licopene.

I carotenoidi hanno la capacità di agire da *quencher* delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Tutti i carotenoidi in generale, ed in particolare il β -carotene essendo liposolubili si

localizzano nei lipidi della membrana cellulare fornendo uno schermo protettivo nei confronti dei radicali liberi.

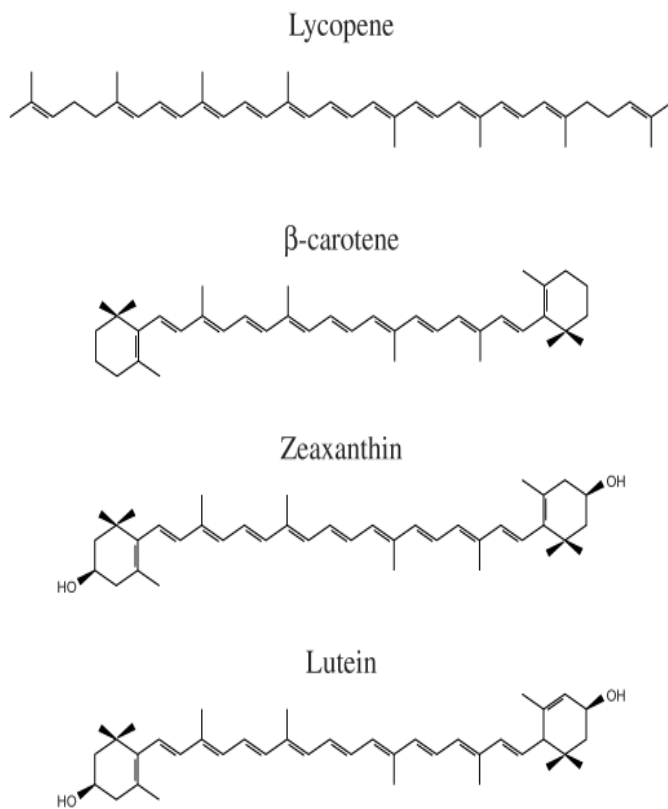


Fig 3 Le principali specie di carotenoidi

Diversi studi hanno dimostrato una minore incidenza di cancro al polmone, prostata, stomaco, nonché di malattie cardiovascolari in individui sottoposti a dieta ricca di carotenoidi; in particolare il consumo di cibi ricchi in licopene è stato associato ad una minore incidenza di cancro alla prostata (Giovannucci *et al.* 1995) e di infarto (Kohlmeier *et al.* 1997).

È stato visto che i carotenoidi in particolare il licopene e il β-carotene sono associati alle varie classi delle lipoproteine, in particolare il 75% alle lipoproteine a bassa densità (LDL) e il 25% alle lipoproteine ad alta densità (HDL) (Goulinet *et al.* 1997).

I polifenoli sono composti che posseggono uno o più anelli aromatici, con uno o più gruppi idrossilici e generalmente sono classificati come acidi fenolici, flavonoidi, stilbeni, coumarino e tannini. I polifenoli sono prodotti del metabolismo secondario delle piante, la cui funzione è quella di proteggere la pianta dagli attacchi patogeni dei parassiti e contribuiscono anche a dare colore alle piante.

I polifenoli presentano diverse strutture ma tutti presentano anelli aromatici, con uno o più sostituenti ossidrilici; grazie alla loro struttura sono in grado di chelare ioni metallici e hanno l'attività di *scavengers* di radicali liberi; sono anche in grado di inibire l'infiammazione, l'aggregazione piastrinica, esercitando quindi un'azione protettiva sul sistema vascolare.

I flavonoidi derivano dalla grande famiglia dei polifenoli; sono prodotti naturali ampiamente distribuiti nelle piante la cui struttura presenta tre anelli fenolici di cui due aromatici (A e B) uniti da uno eterociclico (C) comprendente tre atomi di carbonio ed uno di ossigeno (fig. 4) (Harborne JB. 1980).

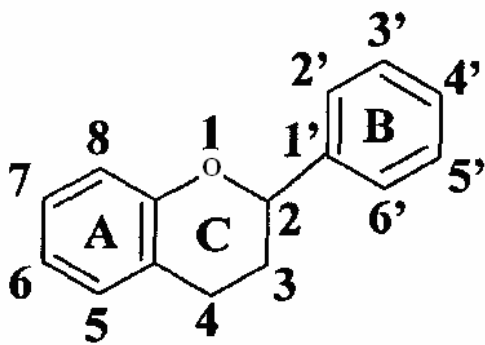


Fig. 4 Struttura generale dei flavonoidi: tre anelli fenolici di cui due aromatici (A e B) uniti da uno eterociclico (C) comprendente tre atomi di carbonio ed uno di ossigeno

I flavonoidi si suddividono a seconda della struttura dell'anello C in flavonoli (quercetina, miricetina), flavoni (luteolina e apigenina), flavanoli (catechina, epicatechine e epigallocatechina gallato), flavani, antocianidine e isoflavonoidi (fig. 5) (Liu RH. 2004).

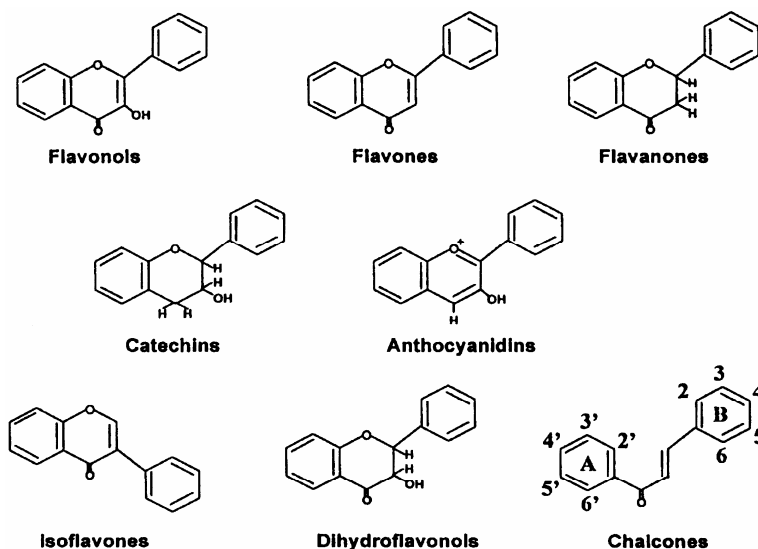


Fig. 5 Strutture dei vari flavonoidi

I flavonoidi rivestono un ruolo importante nelle strategie riproduttive delle piante, dando infatti colore ai fiori ed ai frutti e sembrano essere particolarmente utili all' uomo per i loro impieghi in medicina; assorbono fortemente le radiazioni ultraviolette e il loro accumulo nell'epidermide delle foglie ne suggerisce una funzione specifica di protezione dal danno che queste radiazioni causano al DNA delle cellule.

I flavonoidi svolgono numerose attività biologiche tra cui attività antibatterica, attività di inibizione o neutralizzazione di reazioni dannose provocate da diverse molecole, fra cui l' ossigeno, responsabile della formazione dei radicali liberi. Questi ultimi sono sostanze chimiche altamente instabili molto dannose per l' organismo in quanto possono accelerare i processi di invecchiamento cellulare, attivare processi infiammatori, avere effetti cancerogeni e favorire l' arteriosclerosi.

Le proprietà funzionali dei flavonoidi sono influenzate da un certo numero di caratteristiche strutturali:

- *la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3-OH dell'anello C*: i flavonoidi agliconi che hanno un 3-OH (quercetina, mirecittina) sono antiossidanti più potenti di quelli che hanno lo stesso gruppo sostituito (diosmentina, apigenina, esperetina e naringenina);
- *la presenza di un doppio legame tra C2 e C3*: aumenta la capacità antiossidante;
- *numero di gruppi ossidrilici (-OH) presenti sull'anello B*: l' attività antiossidante aumenta proporzionalmente all' aumentare dei gruppi ossidrilici.
- *la presenza di gruppi glicosidici*: determina un ingombro sterico che riduce la capacità antiossidante.

A causa del carattere acido dei gruppi ossidrilici e delle proprietà nucleofile degli anelli fenolici, i flavonoidi sono altamente reattivi.

I flavonoidi sembrano avere proprietà antivirali, antibatteriche, immunostimolanti, antiischemiche, antineoplastiche, antinfiammatorie, antiallergiche antilipoperossidanti e gastroprotettive. I flavonoidi inibiscono le attività di molti enzimi tra cui la lipoossigenasi, la ciclossigenasi, la monossigenasi, la xantinaossidasi, la NADH-ossidasi, la fosfolipasi A₂, alcune protein chinasi e fattori trascrizionali come NF-kB (Skottova N, D. Walterová *et al.* 2003).

L' aterosclerosi è una malattia multifattoriale che rappresenta la prima causa di morte nel mondo. Elevati livelli di LDL (lipoproteine a bassa densità) nel plasma e bassi livelli di HDL (lipoproteine ad alta densità) sono associati ad un alto rischio di aterosclerosi, in seguito all'ossidazione delle LDL. Le LDL sono particelle sferiche composte da grassi e proteine; il nucleo centrale contiene trigliceridi ed esteri del colesterolo, inoltre è stato visto che queste particelle

contengono anche antiossidanti tra cui la vitamina E. Le LDL rappresentano un grave pericolo per la parete arteriosa, soprattutto quando vengono modificate da un processo di ossidazione.

L'ossidazione delle LDL o perossidazione, è una reazione a catena originata dai radicali liberi. *In vitro* è stato dimostrato che l'ossidazione di queste lipoproteine avviene meno frequentemente in presenza di antiossidanti, per cui è i flavonoidi sembrano avere la capacità di bloccare l'ossidazione delle LDL, e l'aggregazione piastrinica, riducendo il rischio di aterosclerosi.

Molti studi epidemiologici, correlano un consumo moderato di vino rosso e di tè verde, ricchi in flavonoidi con un minor rischio di malattie cardiovascolari (G. Mojzisoà, M. Kuchta 2001).

Anche l'olio di oliva sembra ridurre l'ossidazione delle LDL; il suo effetto antiossidante sembra essere dovuto alla presenza di composti polifenolici come l'idrossitirosole. L'elevato contenuto di acidi grassi monoinsaturi ha un importante ruolo protettivo sulla salute: è stato provato che la sostituzione nell'alimentazione dei grassi saturi con grassi monoinsaturi o polinsaturi riduce i livelli di lipoproteine a bassa densità, che risultano, quindi, disponibili in quantità inferiori ai processi ossidativi (Penny M. *et al.* 2002). Studi sperimentali hanno mostrato che le lipoproteine a bassa densità ricche di acido oleico (l'acido grasso principale dell'olio di oliva) sono molto più resistenti all'ossidazione.

1. 3 ROS E INVECCHIAMENTO

A differenza delle popolazioni dell' antica Roma, la cui vita media non superava i 30 - 40 anni, i "romani moderni" vivono, circa il doppio. Tale notevole differenza non si può attribuire a variazioni di carattere genetico della specie umana, ma si può far risalire a cambiamenti di natura ambientale, quali il miglioramento delle condizioni di vita ed i progressi della medicina. Al contrario, la durata massima della vita è determinata geneticamente e non è cambiata nel corso della storia della nostra specie. L' invecchiamento può essere definito come il complesso di tutti i cambiamenti fisiologici, genetici e molecolari che si verificano con il passar del tempo. Le modificazioni età-dipendenti possono essere attribuite al naturale processo di crescita, a difetti genetici legati all' individuo, al rapporto tra genotipo e ambiente. Il nostro organismo è continuamente sottoposto a stress ossidativo, a causa di sostanze ossidanti (radicali liberi) che si generano in conseguenza a fattori ambientali (raggi UV o sostanze introdotte con la dieta) o che vengono prodotte all' interno delle cellule durante la respirazione cellulare.

I radicali liberi si formano in ogni istante della nostra vita e fin dal momento della nascita, in rapporto ai normali processi vitali della respirazione cellulare e ad altri fattori quali l' esercizio fisico eccessivo, il fumo di sigaretta attivo e passivo, l' inquinamento elettromagnetico, l' inquinamento atmosferico, un' infinita varietà di sostanze chimiche nell' aria e negli alimenti. Lo stress ossidativo induce forti danni a carico delle proteine, dei lipidi e del DNA, aumentando il rischio di tumori, malattie cardiovascolari e malattie degenerative in genere.

Una volta danneggiata, la cellula si difende dal danno attivando meccanismi di riparo o, se il danno è eccessivo, attivando un programma di morte programmata, apoptosi, il cui scopo è quello di eliminare definitivamente la cellula malata. È noto da tempo che, durante l' invecchiamento, si ha un aumento progressivo dei danni cellulari da stress ossidativo. Dal punto di vista molecolare l' aumento di stress ossidativo associato all' età può essere ricondotto a tre diversi fattori: un aumento della velocità con cui vengono prodotti metaboliti reattivi dell' ossigeno, un declino dei sistemi antiossidanti di difesa ed una diminuita efficienza nel degradare e riparare molecole danneggiate.

Denham Barman nel 1956 è stato il primo a proporre il concetto che i radicali liberi giocano un ruolo importante nel processo di invecchiamento.

I ROS (specie reattive dell'ossigeno) sono specie chimiche molto reattive, presenti nell' ambiente ed anche generate nell'organismo come sottoprodotti del metabolismo in particolare durante la respirazione mitocondriale. I ROS sono coinvolti nella patogenesi di in una serie di malattie, dai processi dell' infiammazione all' immunosoppressione, dal diabete al morbo di

Alzheimer, dalla cirrosi epatica all' aterosclerosi e a vari tipi di tumore (Lyras L. Halliwell B. *et al.* 1998). Le patologie da ROS conseguono allo «stress ossidativo», vale a dire alla perdita dell' equilibrio fra produzione di ROS e difese antiossidanti: le più gravi patologie che ne possono derivare sono l' aterosclerosi e vari tipi di tumori.

I radicali liberi sono specie chimiche con un elettrone spaiato nel loro orbitale più esterno e sono caratterizzati dal possedere un' elevata reattività e instabilità chimica.

Molto importanti dal punto di vista biologico risultano essere le specie radicaliche dell' ossigeno e dell' azoto come ad esempio l' anione superossido O_2^- , il radicale idrossilico OH^\cdot , l' ossido di azoto NO^\cdot e l' anione perossinitrito $ONOO^-$ che può derivare dalla combinazione dei radicali O_2^- e NO^\cdot . Tra le specie dell' ossigeno citate quella più attiva è il radicale OH^\cdot che reagisce a pochi angstrom dal punto in cui viene prodotto e la cui formazione può essere catalizzata da alcuni metalli di transizione a partire da H_2O_2 . Nonostante vi siano numerose sedi di formazione dei radicali liberi all' interno della cellula, sembra che i mitocondri costituiscano la fonte principale. Il radicale superossido viene prodotto soprattutto a livello dell' ubiquinone e dell' enzima NADH deidrogenasi.

La cellula ha sviluppato numerosi meccanismi di protezione per limitare la produzione di ossidanti ed eliminare quelli in eccesso. In particolare esistono enzimi antiossidanti che convertono le specie reattive dell' ossigeno in specie più ridotte. I tre maggiori enzimi antiossidanti sono la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), e la glutatione perossidasi (GPx).

Oltre agli antiossidanti endogeni i radicali liberi sono inattivati anche dagli antiossidanti esogeni o alimentari

ROS e Trasduzione del Segnale

Le cellule comunicano tra di loro e rispondono a stimoli biologici tramite meccanismi che nel loro complesso costituiscono il sistema di trasduzione dei segnali extracellulari. I ROS sembrano avere un' importante funzione in vari aspetti della trasduzione del segnale coinvolta nella proliferazione e nel differenziamento cellulare (Schmitz ML Dröge W *et al.* 2002). E' importante sottolineare che tale funzione di segnale intracellulare viene svolta dai ROS quando prodotti in concentrazione controllata e programmata; gli stessi ROS, invece quando prodotti in quantità eccessive, possono determinare morte cellulare.

Lerder e collaboratori hanno stimato che le risposte cellulari stimulate dai ROS possono essere suddivise in almeno cinque grandi categorie che includono:

1. la modulazione della secrezione e dell' azione delle citochine;
2. il trasporto ionico;

3. la trascrizione;
4. la neuromodulazione;
5. l' apoptosi.

Le specie reattive dell' ossigeno hanno un importante ruolo fisiologico come secondo messaggero; è stato visto che essi si generano anche in seguito al legame ligando/recettore di vari fattori di crescita e sono in grado di attivare serin/treonin chinasi, protein/tirosin fosfatasi (PTPs), (M. Valko *et. al.* 2007) e fattori di trascrizione nucleari, come NF-kB, coinvolto nella trascrizione dei geni che inducono differenziamento crescita e infiammazione cellulare (Floche L. *et. al.* 1997). È possibile che le variazioni dello stato redox indotte dai ROS determinano cambiamenti conformazionali delle proteine provocandone un aumento o una diminuzione dell' attività. Ad esempio, nel caso dei fattori di trascrizione, i ROS possono aumentarne o diminuirne il legame al DNA. Un esempio di fattore di trascrizione influenzato da meccanismi redox è PPAR α : è stato osservato che in condizioni di stress ossidativo PPAR α si lega meno al DNA (Iannelli P. *et al.* 2007). PPAR α è un fattore di trascrizione che regola geni coinvolti nel metabolismo lipidico ed è coinvolto in patologie come aterosclerosi e malattie cardiovascolari.

ROS ed apoptosi

Tradizionalmente, i mitocondri sono considerati come la centrale energetica della cellula, cioè il sito della fosforilazione ossidativa coinvolto nella produzione di ATP. È stato chiarito che i mitocondri partecipano anche ad altri due importanti processi strettamente correlati alla fosforilazione ossidativa ed al danno ossidativo: l' apoptosi e l' invecchiamento. L' apoptosi o morte cellulare programmata è un processo che coinvolge molte funzioni vitali come lo sviluppo dei tessuti, la cancerogenesi, la risposta immunitaria.

I mitocondri sono coinvolti nella produzione di ROS. Stress ossidativo e danno alle strutture cellulari possono portare alla morte cellulare per apoptosi oppure ad un deficit energetico della cellula e quindi all' invecchiamento.

I meccanismi molecolari che inducono la formazione di ossidanti e il loro ruolo nell' innescare l' apoptosi sono ancora poco chiari. Negli ultimi anni è stata analizzata la funzione della proteina p66shc nella regolazione dei ROS, dell' apoptosi mediata dai mitocondri e della durata della vita dei mammiferi.

L' apoptosi è essenziale per il mantenimento dell' omeostasi cellulare e serve ad eliminare cellule estranee o pericolose in modo rapido e sicuro. L' alterata regolazione dell' apoptosi è stata implicata in malattie autoimmuni, nella sindrome da immunodeficienza acquisita ed in altre infezioni virali e batteriche, così come in patologie neurodegenerative, cardiopatie e cancro

(Kadenbach B. *et al.* 2004). Un' alterata regolazione dell' apoptosi potrebbe inoltre contribuire al processo di invecchiamento. Studi sperimentali indicano che in *Caenorabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* i geni che controllano il metabolismo dei ROS determinano la durata della vita e che una diminuita produzione dei ROS potrebbe essere responsabile dell' elevata resistenza allo stress ossidativo e dell' aumentata longevità degli organismi.

Il macchinario apoptotico della cellula può generalmente agire attraverso due vie: una estrinseca che coinvolge il *signaling* a partire da recettori di morte presenti sulla superficie della membrana; una intrinseca centrata sui mitocondri (fig 6).

Una via principale che scatena l' apoptosi nelle cellule di mammifero è attivata dal recettore di membrana Fas, recettore di morte correlato al recettore del TNF (tumor necrosis factor). Sia i recettori di Fas che quelli del TNF possono attivare l' apoptosi. Il legame di un loro ligando determina la trimerizzazione del recettore con successivo reclutamento di proteine apoptotiche a livello del dominio intracellulare; l' accumulo di tali molecole consente l' attivazione delle caspasi apoptotiche a monte della via apoptotica che a loro volta determinano l' attivazione a cascata di caspasi a valle e quindi l' apoptosi.

Le caspasi sono enzimi appartenenti alla famiglia delle proteasi a cisteina ed acido aspartico. Una proteina proapoptotica è Bax-2; essa svolge un ruolo essenziale nell' apoptosi mitocondriale. Una volta attivata essa è in grado, insieme ad altre proteine mitocondriali, di formare un poro a livello della membrana mitocondriale, che permette il rilascio del citocromo c nel citoplasma ed il successivo legame di quest' ultimo al complesso multiproteico dell' apoptosoma (costituito da Apaf1, da ATP e dalla procaspasi 9). In tal modo si consente la dimerizzazione de Apaf1 in seguito ad idrolisi di ATP e l' attivazione della procaspasi 9 che, una volta rilasciata dal complesso, può innescare la cascata delle caspasi. Esistono anche proteine antiapoptotiche come Bcl-2 Bcl-xL; queste si trovano sulla membrana mitocondriale esterna, sito in cui si producono i radicali dell' ossigeno, e ciò ha portato ad ipotizzare che Bcl-2 fornisca un' attività antiossidante. La suscettibilità di una cellula all' apoptosi può essere proporzionale al rapporto Bax/bcl-2 (Chao DT Korsmeyer SJ. 1998).

Molti dati sperimentali indicano che i ROS possono indurre l' attivazione del processo apoptotico (HU. Simon 2000) e gli antiossidanti prevenirlo.

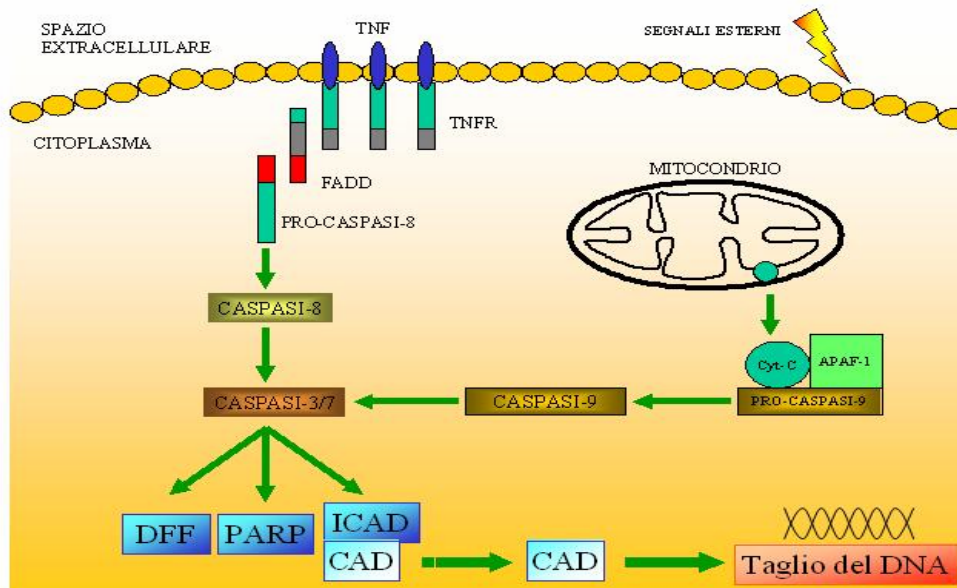


Fig. 6 Eventi molecolari che inducono apoptosi.

ROS e Malattie Cronico-Degenerative

I principali danni da radicali avvengono per interazione degli stessi con macromolecole fondamentali alla sopravvivenza cellulare quali DNA, proteine e acidi grassi (Valko *et al.* 2006). I ROS sono in grado di interagire con residui aminoacidici (in particolare cisteina, lisina, arginina e istidina) inducendo ossidazione delle proteine. I radicali liberi che interagiscono con il materiale genetico cellulare sono soprattutto OH^\cdot e ONOO^- in grado di attaccare facilmente le purine e le pirimidine del DNA danneggiandolo e portando ad alterazioni genetiche (Halliwell et Gutteridge 2000). I radicali possono inoltre reagire facilmente con gli acidi grassi polinsaturi che costituiscono la membrana cellulare e di cui è particolarmente ricco il tessuto cerebrale. Quando la membrana cellulare va incontro a perossidazione lipidica viene liberata una serie di aldeidi tra le quali particolarmente importante è la malondialdeide (MDA) (Burcham P. C. 1998). Oltre al ruolo favorente l' induzione di malattie cardiovascolari, cancro, infiammazione, aterosclerosi ed ischemia, lo stress ossidativo è causa anche di un secondo gruppo di malattie come il diabete mellito e disordini neurologici, derivanti per lo più da scompensi ossidativi dei mitocondri.

Anche il processo di invecchiamento è dovuto al danno di macromolecole cellulari in seguito all' azione dei radicali liberi (M. Valko *et al.* 2007). Studi epidemiologici indicano una stretta associazione tra una condizione di stress ossidativo cronico e carcinogenesi: per esempio un' infezione cronica di *Helicobacter pylori* determina stress ossidativo ed è associata ad un' alta incidenza di cancro gastrico; altrettanto dicasi per le radiazioni ultraviolette, che sembrano essere un fattore di rischio per i tumori della pelle e le radiazioni γ che sono causa di leucemie (Toyokuni S. 2006).

1. 4. CATECHINE

Le catechine appartengono alla famiglia dei flavonoidi. Esistono vari tipi di catechine presenti in basse concentrazioni nel tè verde e nel cacao. Queste includono (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epigallocatechina (EGC), (-)-epicatechina (EG) e (+)-catechine (fig. 7).

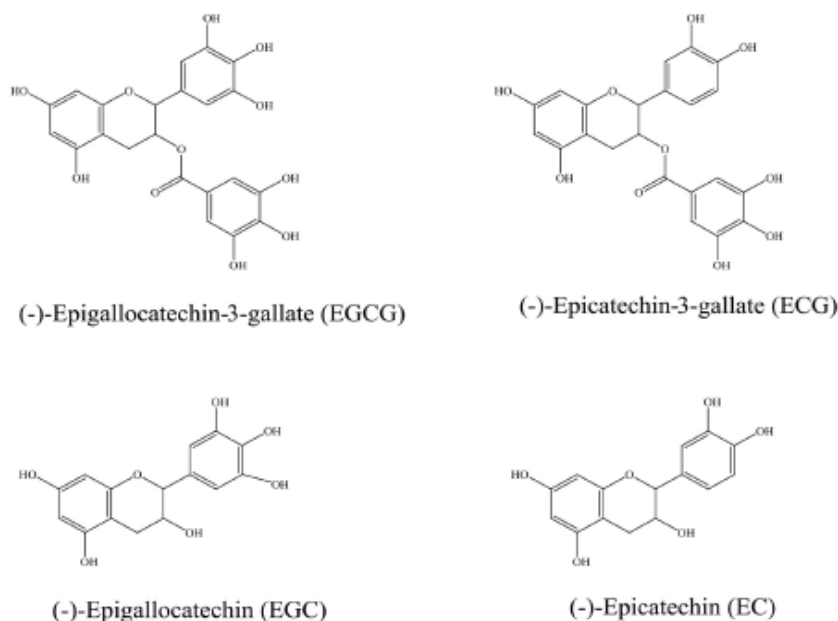


Fig. 7 Struttura delle catechine

La ricerca scientifica suggerisce che l' EGCG è la maggiore responsabile dei potenziali benefici attribuiti al tè verde. Molti studi si sono occupati di verificare l' assorbimento dell' EGCG *in vivo* nell' uomo e nel topo. Le catechine presenti nel plasma possono essere coniugate con acido glucuronico e con gruppi solfati ed hanno un' emivita breve di circa 173 minuti nell' intestino di topo, ma ancora più breve, 28 minuti, nel rene.

Come tutti i flavonoidi le catechine, ma soprattutto l' EGCG, hanno attività di *scavengers*, e sono considerate molecole anti-invecchiamento. Il possibile meccanismo d' azione dell' EGCG, è ancora poco conosciuto.

1. 4.1 CATECHINE E SIGNALING CELLULARE

Le catechine in particolare l' EGCG, sono in grado di indurre apoptosi e arresto del ciclo cellulare in alcuni tipi di cellule tra cui cellule del colon, di prostata, ed in cheratinociti epiteliali. Sono infatti in grado di attivare vari regolatori negativi del ciclo cellulare come p21 e p27, e di abbassare l' espressione delle cicline. Le cellule MCF-7 (carcinoma mammario) trattate con 30 μ M EGCG risultano essere nella fase G₀, dunque di arresto del ciclo cellulare associato ad inibizione dell' attività di CDK2 e CDK4 (Masuda M *et al.* 2001).

EGCG inibisce la funzione antiapoptotica delle proteine Bcl2, induce attivazione di caspasi 3 e la depolarizzazione della membrana mitocondriale con conseguente rilascio del citocromo c (Lambert JD *et al.* 2005).

Le catechine sembrano modulare anche l' attività delle MAPK inibendola, inoltre sono in grado di inibire l' attività di EGFR (epidermal growth factor receptor). L' espressione elevata di EGFR sembra essere implicata nell'indurre un fenotipo neoplastico.

In cellule LNCaP e PC3 derivanti da carcinoma di prostata, concentrazioni da 10 a 100 μ M di EGCG inibiscono l' espressione e l' attività della cicloossigenasi-2 (COX-2). Inoltre l' EGCG sembra inibire anche il recettore del VEGF (fattore di crescita endoteliale) la cui eccessiva attività è associata all' induzione di angiogenesi (Khan N. *et al.* 2006). L' EGCG è in grado di modulare anche la via di MAP chinasi.

1. 4.2 CATECHINE E PREVENZIONE DEL TUMORE ALLA PELLE

Negli ultimi anni si sono accumulati dati allarmanti sull' incidenza di disordini e malattie della pelle. L' esposizione a raggi solari (UVA, UVB) induce eritemi, iperplasie, melanogenesi e invecchiamento precoce della pelle. Queste alterazioni sono spesso coinvolte nello sviluppo di tumori alla pelle.

Le radiazioni UV sono potenti attivatori di reazioni fotochimiche, le quali inducono eccitazioni di elettroni con modificazioni chimiche delle molecole esposte, e formazione di specie reattive dell' ossigeno. Molti studi sia *in vivo* che *in vitro*, riportano effetti di prevenzione del tumore alla pelle da parte del tè verde; l' attività benefica viene attribuita ai polifenoli presenti nel tè in particolare alla presenza dell' EGCG.

Sia in Cina che in Giappone, dove il consumo di tè verde è molto alto, l' incidenza di alcuni tipi di cancro, in particolare quelli che interessano la pelle, è più bassa rispetto alle popolazioni che non fanno un gran consumo di tè verde. Pretrattamenti della pelle con una soluzione contenente

catechine, riducono drasticamente la comparsa di eritemi dopo esposizione ai raggi UV e il conseguente danno al DNA (fig. 8) (Nagle D.G. *et al* 2006).

In cellule HaCaT esposte a UV, si ha attivazione di c-Fos e di p38, che però vengono inibite in seguito a trattamenti con EGCG (Hsu S. *et al.* 2005).

Le EGCG possiedono proprietà antinfiammatorie responsabili infatti dell' inibizione del fattore di trascrizione NF-kB in varie linee cellulari tra cui cellule tumorali del colon. Il trattamento con EGCG di cheratinociti dell' epidermide umana inibisce l' attivazione di NF-kB in seguito a stimolo con UV; l' attività inibitoria delle EGCG presenta un andamento dose- e tempo-dipendente (Afaq F. *et al.* 2003).

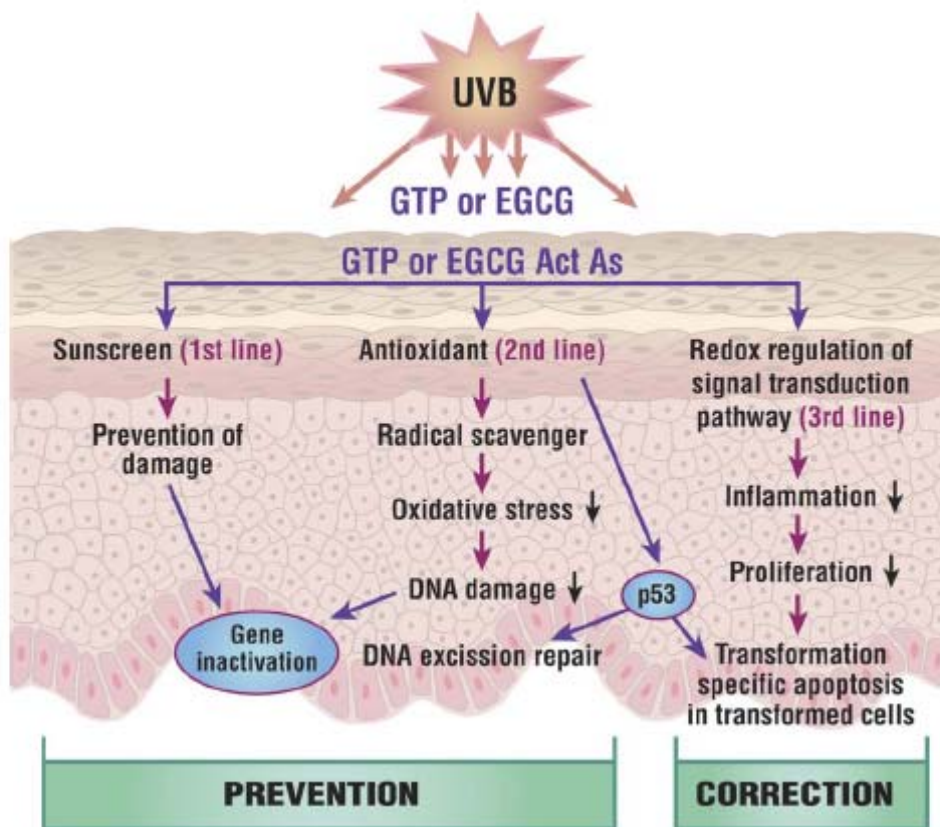


Fig. 8 Attività di prevenzione dai danni indotti da raggi UV da parte delle EGCG e degli altri polifenoli del tè verde (GTP).

1. 5. RESVERATROLO

Il Resveratrolo (3, 5, 4' triidrossistilbene) appartiene alla famiglia degli stilbeni. Gli stilbeni (C6-C2-C6) sono composti fenolici a basso peso molecolare, caratterizzati dalla presenza di due anelli aromatici uniti da un etano o da un ponte etenico (fig.9)

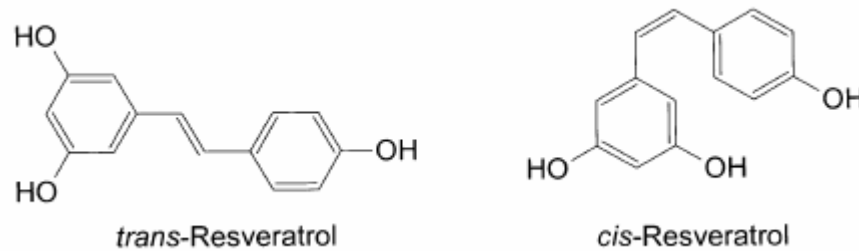


Fig. 9 Struttura chimica degli isomeri cis e trans-resveratrolo (3,4',-5-triidrossistilbene).

Essi sono ampiamente diffusi in alcune Briofite ed in piante superiori ove agiscono, in genere, da fitoalessine e da regolatori di crescita. Ad esempio l'acido lunularico è un diidrossistilbene, che agisce da inibitore di crescita in maniera analoga all'acido abscissico.

Il resveratrolo (*trans*-3,4',5 triidrossistilbene) è una fitoalessina naturale sintetizzata in risposta ad attacchi fungini, o ad agenti abiotici come esposizione ai raggi ultravioletti. Presente nella buccia degli acini di uva e nel vino rosso, il resveratrolo presenta un'ampia varietà di proprietà farmacologiche ed è stato chiamato in causa per spiegare il "Paradosso Francese", risalente a studi epidemiologici condotti negli anni '70 che hanno rivelato una inversa correlazione tra il consumo di vino rosso e le malattie cardiovascolari in Francia, un paese dove è notoriamente alto il consumo di grassi saturi. Altri studi di carattere clinico hanno evidenziato che il consumo moderato di vino rosso produce sull'uomo una riduzione dei fattori di rischio di aterosclerosi. Nei consumatori di vino rosso si assiste infatti, ad una riduzione dell'aggregazione piastrinica, ad un incremento dei livelli plasmatici del colesterolo-HDL (HDL, lipoproteina ad alta densità, responsabili dello smaltimento del colesterolo in eccesso nei tessuti periferici) e ad una più bassa ossidazione delle LDL (lipoproteine a bassa densità); questi eventi si associano ad una minore formazione di placche aterosclerotiche nei vasi sanguigni (Frankel EN, Waterhouse AL *et al.*, 1993; Frankel EN, Kanner J *et al.*, 1993) e quindi ad una riduzione degli eventi cardiovascolari il che rende il resveratrolo anche un agente cardioprotettivo.

Il resveratrolo, come molte fitoalessine, possiede numerose attività: inibizione della perossidazione lipidica e della aggregazione piastrinica, alterazione del metabolismo lipidico; possiede attività anti-infiammatorie e vasorilassanti, è un inibitore dei danni indotti dai radicali liberi, ed è un agonista dei recettori degli estrogeni.

Negli ultimi dieci anni è stato dimostrato che il resveratrolo, i flavonoidi (ginesteina, quercitina) e altri polifenoli inducono apoptosi in cellule cancerogene. (Surh YJ. *et al.* 2003).

Nel 1997, Jang e colleghi riportano che il resveratrolo possiede proprietà antitumorali riducendo la massa tumorale in ratti. Questi autori dimostrano che il resveratrolo blocca *in vivo* i tre stadi della carcinogenesi: inizio, promozione e progressione. Altri studi, in linee cellulari derivanti da tumori umani, hanno confermato che il resveratrolo è un agente chemiopreventivo.

1. 5.1 BIODISPONIBILITÀ DEL RESVERATROLO

La concentrazione di resveratrolo, sia nel vino rosso che negli altri alimenti è molto bassa, ragion per cui il potenziale effetto attribuito a questo composto è stato spesso criticato. Gli studi sulla biodisponibilità e sulla biotrasformazione del resveratrolo, e dei polifenoli in generale, sono quindi importanti per chiarire i presupposti indispensabili, ovvero se le concentrazioni che si raggiungono nell' organismo che assume resveratrolo per via orale siano sufficienti a spiegare gli effetti salutistici ad essi attribuiti; questi studi sono tuttora incompleti. L' assorbimento e il trasporto del resveratrolo sono stati studiati nei ratti e nei topi dopo somministrazione orale del resveratrolo; sono stati condotti studi anche su cellule umane di carcinoma del colon (Caco-2 cells), e su epatociti umani.

Essendo presente nel vino rosso soprattutto nella forma glicosidata trans e cis, il glu-resveratrolo può essere idrolizzato da glicosidasi nel tratto gastrointestinale umano a trans e cis-resvesratrolo. Nei ratti è stato dimostrato che il resveratrolo è assorbito nell' intestino in forma glucuronidata (Kuhnle G., *et al* 2000).

Per quanto riguarda la distribuzione tissutale, Vitrac e collaboratori (Vitrac *et. al.* 2003) hanno dimostrato che, a seguito di somministrazione orale nei topi o nei ratti di ¹⁴C-trans-resveratrolo, la radioattività del ¹⁴C-trans-resveratrolo si rileva in vari organi, quali fegato, reni ed, in minore misura, nel cervello, cuore, polmoni e testicoli; nel fegato di ratto il resveratrolo si accumula in forma coniugata, glucuronidata o solfatata. Anche studi *in vivo* di farmacocinetica hanno indicato che il resveratrolo mostra una forte affinità per il fegato (Bertelli AA. *et al* 1996).

Asensi e collaboratori (Asensi M. *et al.*, 2002) hanno dimostrato che il trans-resveratrolo è rapidamente metabolizzato dalle cellule parenchimali del fegato; epatociti di ratto incubati in presenza di 20 μM trans-resveratrolo metabolizzano circa l'80% di questo composto in appena 20 minuti. Poiché quest'organo è il maggiore sito per la glucuronidazione di xenobiotici, Aumont e collaboratori hanno concluso che il fegato può attivamente partecipare al metabolismo del resveratrolo attraverso la reazione di glucuronidazione (fig. 10). In vitro, nei microsomi di fegato umano è stato visto che il trans- e il cis-resveratrolo possono essere glucuronidati con la formazione di due monoglucuronidi, 3-O- e 4'-O- glucuronide, mentre nell'urina di ratto e nel siero di topo sono stati scoperti sia il trans-resveratrolo-3-glucuronide che il trans-resveratrolo-3-solfato (Yu C. *et al.*, 2002). La formazione del resveratrolo glucuronide è catalizzata dalla UDP-glucuroniltransferasi (UGT), che si distinguono in almeno due famiglie di enzimi (famiglia 1A e 2B) e trasferiscono acidi glucuronici da acidi UDP-glucuronici a vari accettori includendo gruppi idrossilici, carbossilici, aminici e tiolici e portando alla formazione di glucuronidi polari escreti poi nella bile o nell'urina (Radominska-Pandya, *et al.* 1999).

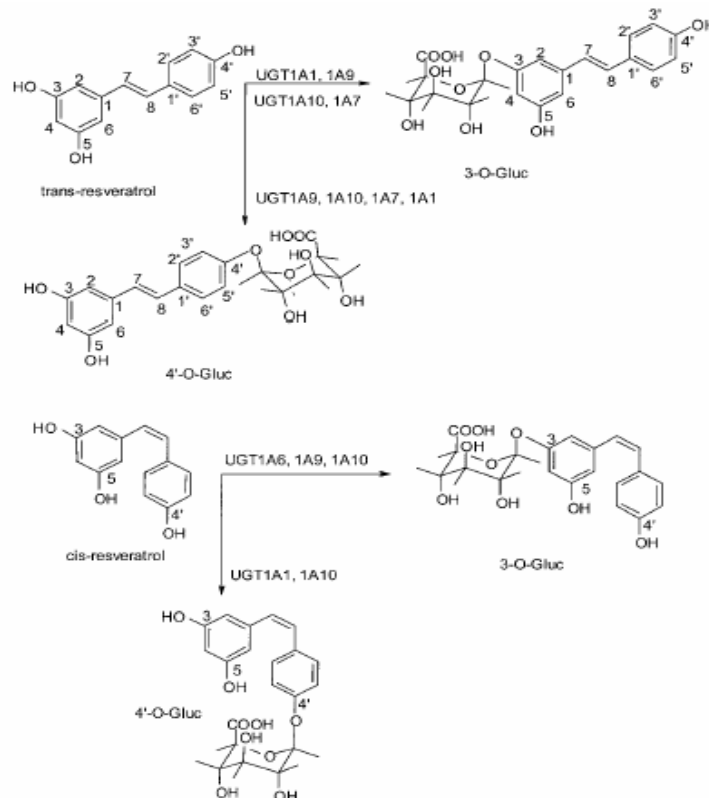


Fig. 10 Regio- e stereo-glucuronidazione di trans- e cis-resveratrolo nell'uomo: implicazione delle isoforme della UGT. (Aumont V. *et al.*, 2001).

Per stabilire l'emivita di questa molecola ed il tempo di massima concentrazione nel plasma sono stati condotti studi su animali alimentati con trans-resveratrolo puro. Questi studi sono stati

programmati somministrando per via intragastrica 20 mg/Kg animale di trans-resveratrolo (una dose che rappresenta per un uomo adulto circa 140 volte la quantità di resveratrolo presente in un litro di vino rosso); la concentrazione nel plasma ($42.8 \pm 4.4 \mu\text{M}$, 5 minuti dopo la somministrazione) decresce molto rapidamente a $0.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ (0.2 mg/l) in 60 min. Quando la stessa quantità di trans-resveratrolo è somministrata oralmente la concentrazione presente nel plasma dopo 5 minuti è nettamente più bassa (2–3 μM in topi e circa 1 μM in conigli o ratti) ed è seguita da un forte discesa (meno di 0.1 μM) in 60 min. (Asensi M. *et. al.*, 2002). Il rapido decremento della concentrazione plasmatica di resveratrolo potrebbe dipendere da vari fattori: dal suo metabolismo, dalla rapida captazione di specifici tessuti e/o organi; molti studi hanno dimostrato che il fegato può rimuovere la maggior parte del resveratrolo circolante.

1. 5.2 ATTIVITÀ ANTITUMORALE DEL RESVERATROLO

Gli agenti antitumorali sono in grado di attivare e di interagire con bersagli cellulari (DNA e proteine) capaci di inibire lo sviluppo del cancro bloccando la trasformazione, la proliferazione ed inducendo la morte di cellule tumorali. Dati epidemiologici hanno mostrato una stretta relazione tra dieta e vari tipi di cancro: molte sostanze presenti nella nostra dieta sembrano avere proprietà antitumorali e molte di esse sono state analizzate per valutare la loro capacità di inibire alcuni processi cellulari che inducono cancerogenesi.

Il resveratrolo sembra essere particolarmente interessante per la sua capacità di interagire con molti bersagli cellulari capaci di arrestare la crescita di cellule maligne inducendone l' apoptosi. In recenti studi si dimostra che il resveratrolo esercita attività antiproliferativa e antitumorale in diverse linee tumorali murine ed umane, in modelli di tumore della pelle, del colon, della mammella e della prostata sia *in vitro* che *in vivo*. Tuttavia l' efficacia di questa molecola è largamente dibattuta perché i suoi effetti sono diversi a seconda delle dosi, dei tempi del trattamento e del fenotipo cellulare (Signorelli P. *et al.* 2005).

Resveratrolo come fitoestrogeno

La produzione di estrogeni e androgeni regola il funzionamento di organi e tessuti. Quando la produzione ormonale viene modificata per qualche motivo, si può favorire la proliferazione e il differenziamento, ma aumenta anche il rischio di sviluppo di cancro. I tumori ormone-dipendente come quelli alla prostata e al seno possono essere prevenuti da un appropriata quantità di SERMs (selective estrogen receptor modulators).

Alcuni polifenoli assomigliano strutturalmente agli estrogeni. Il flavonoide quercitina e

L'isoflavonoide genesteina a seconda delle concentrazioni possono comportarsi come agonisti e antagonisti dei recettori degli estrogeni (ER). La somiglianza del resveratrolo ad un estrogeno sintetico, il dietilstilbestrolo, ha portato ad esaminare l'eventualità che anche tale composto avesse capacità fitoestrogenica; infatti si è visto che il resveratrolo a basse concentrazioni è un parziale agonista di ER, mentre a livelli più elevati, in presenza di 17- β estradiolo, esso antagonizza gli effetti proliferativi del 17- β estradiolo (Lu R, *et al.*, 1999). Kuwajerwala et al. riportano che in cellule tumorali di prostata androgeno-sensibili, il resveratrolo induce un effetto proliferativo a basse dosi, ma un effetto apoptotico a dosi più alte, inibendo la protein kinase B (PKB/Akt) proteina che induce la sopravvivenza e la cui funzione media la fosforilazione di molecole come Bad, caspasi-9 o l'inibizione del rilascio del citocromo c.

Il resveratrolo esibisce proprietà antitumorali anche in molte linee cellulari che non esprimono recettori per gli ormoni steroidei (Damianaki A *et al.* 2000), così come in cellule trattate con inibitori di ER (tamoxifen) (El-Mowafy AM *et al.* 2003). E' evidente un doppio meccanismo di azione del resveratrolo correlato alle concentrazioni utilizzate e alla presenza o assenza di altri agonisti o antagonisti.

Resveratrolo induce arresto della crescita cellulare e apoptosi

In diversi studi sono state riportate numerose proprietà farmacologiche del resveratrolo che suggeriscono un futuro potenziale impiego nella terapia anti-neoplastica (Jang M. *et al.* 1997). Il resveratrolo impedisce la formazione delle cellule cancerose, arresta la proliferazione delle cellule neoplastiche e agisce da antinfiammatorio. E' riportato che il trattamento con resveratrolo per 12-24 ore arresta la proliferazione di una varietà di linee cellulari umane di cancro. L'arresto del ciclo cellulare da parte del resveratrolo è stato associato alla diminuzione delle cicline D1 e D2 e dalle chinasi Cdk2, 4, e 6.

Sono state identificate anche altre proteine bersaglio del resveratrolo coinvolte nel blocco del ciclo cellulare, tra cui p53 e p21. p53 è un oncosoppressore presente in basse quantità in cellule che proliferano normalmente, ma in risposta a stress può aumentare ed è in grado di attivare la trascrizione di geni che inducono all'arresto del ciclo cellulare in G1, dopo l'attivazione di p21 inibitore di cicline. Sembra che il resveratrolo non solo induca l'espressione di p53 e p21 (Ahmad N. *et al.* 2001), ma che ne induca anche la fosforilazione e l'acetilazione. La regolazione di p53 dal resveratrolo sembra essere attivata da MAPKs, in particolare da ERKs e da p38 (Qing-Bai She *et al.* 2002).

Esperimenti in vitro dimostrano che il resveratrolo modula la DNA-polimerasi, la protein kinase D, cPKCs, la ribonucleasi riduttasi, l'attivazione delle COX1 e COX2, enzimi che

partecipano alle ultime tappe della biosintesi delle prostaglandine. Le prostaglandine sono conosciute come stimolatori della proliferazione cellulare e dell' angiogenesi (Wang D *et al.* 2004).

Un' altra importante attività biologica del resveratrolo è l' induzione dell' apoptosi. La cellula può andare in apoptosi se i livelli intracellulari dei fattori proapoptotici come quelli della famiglia Bcl2, sono superiori rispetto a quelli induttori della sopravvivenza ed alle proteine denominate inibitori di apoptosi (IAPs).

Polifenoli naturali, tra cui il resveratrolo, sono in grado di abbassare l' espressione di fattori antiapoptotici e di aumentare quella dei membri della famiglia dei proapoptotici determinando l' attivazione di una cascata apoptotica con conseguente rilascio del citocromo c. (Narayanan BA *et al.* 2002 Delmas D *et al.* 2003). Clement e collaboratori (Clement MV *et al.* 1998) hanno ipotizzato che il resveratrolo potrebbe interagire con il recettore Fas e questo con il suo ligando Fas-L attivando la caspasi 8, tipica caspasi apicale. Il resveratrolo è in grado di determinare la stimolazione dell' espressione del gene *bax*. La proteina proapoptotica Bax2 svolge un ruolo essenziale nell' apoptosi mitocondriale. Una volta attivata, può determinare la formazione di un poro a livello della membrana mitocondriale e permettere la fuoriuscita del citocromo c nel citoplasma.

È stato osservato che il resveratrolo abbassa i livelli di Akt attivo. Akt quando è attivo attenua l' attivazione della via apoptotica; infatti Akt fosforila BAD, proteina della famiglia Bcl-2, sulla serina 136. BAD fosforilata interagisce con le proteine 14-3-3, il che impedisce il legame di BAD con Bcl-2 proteina anti apoptotica, che in questo modo è libera di agire e di inibire l' apoptosi (fig. 11). I dati riportati in letteratura, consentono comunque, di affermare che il meccanismo apoptotico indotto dal resveratrolo dipende dal tipo cellulare preso in esame.

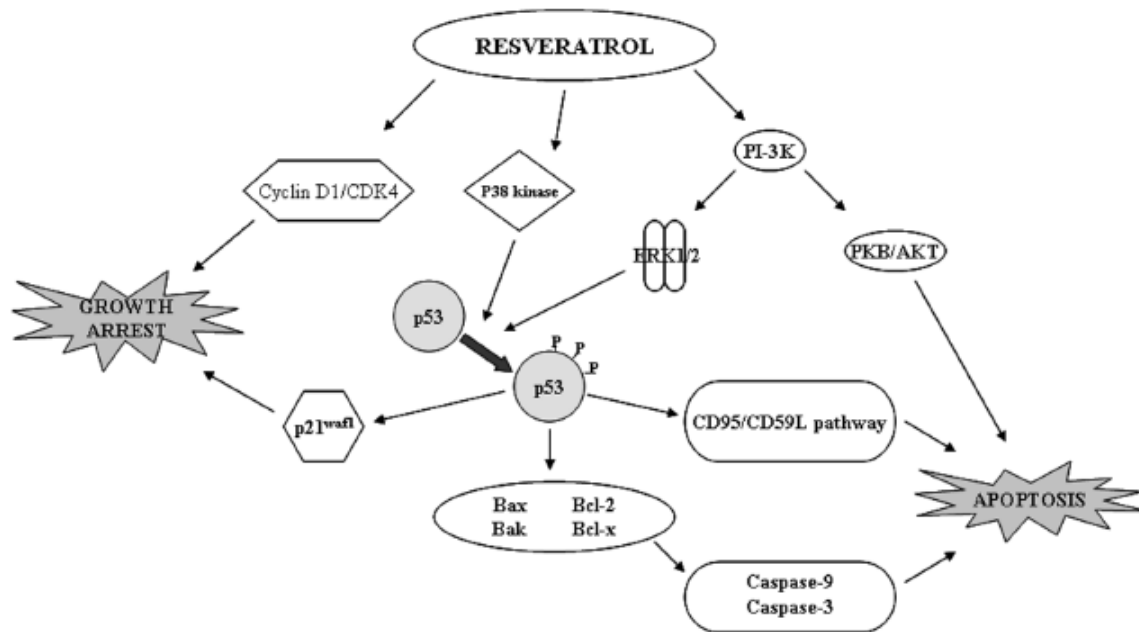


Fig. 11 Meccanismo molecolare dell' induzione di arresto della crescita ed apoptosi indotte dal resveratrolo.

Resveratrolo come inibitore della via di NF- κ B

Il resveratrolo è in grado di interferire con l' attivazione di NF- κ B, un fattore di trascrizione che regola l' espressione di vari geni coinvolti nell' infiammazione, nella proliferazione cellulare e nella cancerogenesi come la cicloossigenasi COX2, l' ossido nitrico sintasi (iNOS). L' ossido nitrico sintasi provvede a mantenere elevate le concentrazioni dell' ossido nitrico molecola in grado di esercitare effetti vasodilatatori, di inibire l' adesione e l' aggregazione piastrinica e di bloccare la crescita cellulare e la migrazione.

Recentemente è stato dimostrato che il resveratrolo è un attivatore delle sirtuine. Le sirtuine sono una classe di deacetilasi NAD-dipendenti, responsabili della risposta al danno al DNA, sono implicate nella modulazione trascrizionale del silenziamento di geni nei processi di invecchiamento e sopravvivenza cellulare. Il resveratrolo attiva la sirtuina umana 1 (SIRT1) analogo di SIR2 (Silencing Information Regulator) del lievito. Un gran numero di sirtuine sembrano essere coinvolte nel promuovere la longevità nei mammiferi (Signorelli P *et al.* 2005).

Resveratrolo e MAPKs

Il resveratrolo interferisce con la via del segnale di PI3K/AKT e di MAPK. In particolare è stato dimostrato che il resveratrolo interferisce con la via di MAPK attivandola o disattivandola a seconda delle concentrazioni usate. A basse concentrazioni di resveratrolo, da 1 pM a 10 μ M, si induce la fosforilazione di ERK1/2 in cellule umane di neuroblastoma; a concentrazioni più alte,

pari a 50-100 μM , si interferisce negativamente con la fosforilazione di MAPK (Miloso M, Bertelli A. *et al.* 1999). Altri lavori indicano invece che il trattamento con 100 μM resveratrolo di cellule SJSA1, derivate da un osteosarcoma umano, induce la fosforilazione di ERK1/2 (Thr202/Tyr204) e di p53 (Moussa Alkhalaf *et al.* 2006).

E' stato messo in evidenza come il resveratrolo in BAEC (bovine aortic endothelial cell) determini una rapida attivazione di MAPK sia a basse che a più alte concentrazioni da 0.5 nM a 100 μM (Klinge CM, *et al.* 2005).

1. 5.3 RESVERATROLO ED ATEROSCLEROSI

Tra i fattori di rischio delle malattie cardiovascolari si annoverano l' iperlipidemia, ed in particolare l' ipercolesterolemia, l' ipertensione, lo stile di vita, l' età, i fattori genetici. Nell' ambito dello stile di vita, la dieta è risultata un fattore di rischio importante; difatti una dieta altamente energetica, ricca di grassi saturi può causare iperlipidemia e favorire lo sviluppo della placca aterosclerotica.

Alcuni micronutrienti come vitamina E, β -carotene e composti polifenolici presenti nei vegetali, possono contrastare le malattie vascolari e gli effetti infiammatori associati. In Francia, la bassa incidenza di CHD stranamente associata ad una dieta ricca di grassi saturi è stata parzialmente attribuita al consumo di vino rosso, che contiene alti livelli di polifenoli; in particolare, tra i polifenoli del vino, il resveratrolo è stato quello maggiormente studiato. Per quanto riguarda la sua azione preventiva contro l' aterosclerosi l' effetto benefico di questa sostanza sembra essere dovuto alla sua attività antiossidante/antiradicalica che riduce l' ossidazione delle LDL; tuttavia, il resveratrolo può agire a molteplici livelli quali i segnali cellulari, le vie enzimatiche, da cui deriva l' attività anti-infiammatoria, l' inibizione dell' aggregazione piastrinica, l' inibizione dell' accumulo dei lipidi, dell' infiltrazione dei monociti e dei linfociti, della proliferazione delle cellule muscolari e della loro migrazione.

Resveratrolo e lipoproteine

Nei topi apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} la mancanza dell' apolipoproteina E (apoE) o del recettore delle LDL (LDLR), e la over-espressione del gene dell' apolipoproteina B (apoB) determinano l' incremento dei livelli delle VLDL e delle LDL, contribuendo alla promozione dell' aterosclerosi (Steinberg D., *et al.*, 1989). Studi condotti *in vivo* in topi geneticamente ipercolesterolemici (apoE^{-/-}

/LDLR-/-) e trattati con somministrazione orale di resveratrolo in associazione ad una dieta ad alto contenuto di grassi, hanno evidenziato che il polifenolo sopprime la formazione dell' ateroma nell' aorta e riduce la trombosi indotta con il laser nelle arterie carotidiche (Fukao H. *et al.* 2004).

Resveratrolo e inibizione dell' ossidazione delle LDL

La perossidazione lipidica è un processo di reazione a catena che può essere indotto da differenti sorgenti di radicali liberi (radiazioni ionizzanti, luce, UV). Un' importante azione antiossidante del resveratrolo è quella di inibizione dell' ossidazione delle LDL; quest' inibizione risulta protettiva perché la modificazione ossidativa delle LDL è considerata un evento primario nella patogenesi dell' aterosclerosi. Infatti diversi studi hanno riportato che le LDL ossidate (ox-LDL) possono stimolare l' aggregazione piastrinica (Aviram M. *et al.*1989), promuovere un' attività procoagulante sulla superficie dei monociti/macrofagi umani aumentando l' attività trombolastinica nel tessuto (Schuff-Werner P. *et al.*1989).

Vari sistemi enzimatici, presenti nelle cellule endoteliali e nei macrofagi, sono implicati nell' ossidazione delle LDL. Questi sistemi includono la NADPH-ossidasi, la ipoxantina/xantina ossidasi, la mieloperossidasi (MPO) e l' enzima ossido nitrico sintetasi (NOS) (Meyer J.W. *et al.* 2000; Carr A.C. *et al.* 2000). I prodotti di questi enzimi ossidano le LDL, le quali alterano le cellule endoteliali, stimolano la NADPH-ossidasi, il rilascio di citochine pro-infiammatorie e inibiscono l'enzima endoteliale ossido nitrico sintetasi (eNOS) implicata nell' attività vasorilassante (Parthasarathy, S. *et al.* 1989). Si è visto che il resveratrolo agisce su questi enzimi da *scavenger* dei ROS inibendo la cicloossigenasi COX-2 e quindi l' espressione del recettore scavenger (SR-A), ed inducendo l' attività vasorilassante di eNOS (Rankin S.M. *et al.*1991).

Resveratrolo e VSMC (Cellule Muscolari Lisce Vascolari)

Le VSMC contribuiscono alla patogenesi delle lesioni aterosclerotiche, poiché la loro migrazione e proliferazione sono eventi critici per il progressivo ispessimento nell' intima e sviluppo dell' ateroma nella parete vascolare (Ross R. 1999). Diversi studi hanno dimostrato che il resveratrolo può inibire la proliferazione delle VSMC (Araim O.*et al.* 2002; Mnjoyan Z.H. *et al.* 2003), indotta da diversi mitogeni quali siero, endotelina e PGDF. L' effetto antimitogeno del resveratrolo non è mediato dall' induzione dell' apoptosi, ma sembra essere prodotto dal blocco della transizione G1-S del ciclo cellulare (Zou J. *et al.* 1999; Haider U.G. *et al.* 2003) e della sintesi del DNA (Mnjoyan Z.H. *et al.* 2003). Questi risultati suggeriscono che il resveratrolo può contrastare selettivamente la proliferazione patologica delle VSMC nelle pareti arteriose *in vivo*.

Resveratrolo e inibizione dell'aggregazione piastrinica

Le piastrine contribuiscono allo sviluppo dell' aterosclerosi e delle CHD attraverso diversi meccanismi. I ROS funzionano come stimolatori dell' aggregazione delle piastrine agendo a diversi livelli. Possono agire come stimolatori dell' aggregazione delle piastrine inibendo NO, o stimolando il metabolismo dell' acido arachidonico o l' influsso del calcio (Pignatelli P. *et al.* 1998). Diversi studi hanno dimostrato che il resveratrolo ha azione antiossidante nelle piastrine ed una riduzione dei livelli di ROS si correla ad un' inibizione dell' attivazione delle piastrine (Olas B. *et al.* 1999).

1. 6. MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Sia nel mondo scientifico che nell' opinione pubblica un' attenzione particolare è rivolta alle malattie cardiovascolari in quanto rappresentano la prima causa di mortalità nel mondo occidentale. I fattori di rischio maggiori sono rappresentati da fattori diversi come iperlipidemia, ipertensione arteriosa, diabete ed obesità e la base anatomico-patologica comune è l' aterosclerosi. Nel 1833 Lobstein introdusse il termine di «arteriosclerosi» per indicare l' alterazione distrettuale o generalizzata dell' apparato vascolare tipica dell' età presenile e senile, caratterizzata da indurimento delle arterie (dal greco “*arthero*” arterie; “*sckleros*” indurimento). Il termine di «aterosclerosi» fu coniato successivamente da Marchand (1904), per descrivere una forma di arteriosclerosi caratterizzata da una alterazione delle tuniche intima e media delle arterie. Letteralmente «*athere*» è un termine dell'antica Grecia che significa “poltiglia”, spesso impiegato per definire una formazione cutanea contenente pus. In analogia alla lesione cutanea Halter (1940) definì «ateromi» le placche giallastre delle arterie. Il fenomeno di irrigidimento della placca da cui deriva il termine “*sckleros*” si deve ad un lento, inesorabile accumulo di calcio ed altre sostanze dannose per l'endotelio che, con il passare del tempo, rendono questa “poltiglia” sempre più “dura”. La definizione di aterosclerosi è stata stabilita per convenzione dall' OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) nel 1957 come: «una combinazione variabile di alterazioni intimali delle arterie consistenti nell'accumulo locale di lipidi, complessi di carboidrati, sangue e prodotti del sangue, tessuto fibroso e depositi di calcio, con alterazioni associate della tunica media». In passato l' endotelio era considerato una semplice membrana semipermeabile ed il processo di aterosclerosi era considerato solo un lento accumulo di componenti inerti (grassi) nel lume di un'arteria fino alla sua occlusione (fig. 12), con conseguente ischemia dei tessuti irrorati dal vaso occluso.

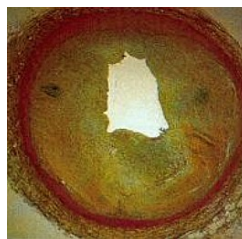


Fig. 12 Semi-occlusione aterosclerotica di un vaso arterioso.

L' aterosclerosi si manifesta soprattutto nelle arterie elastiche (aorta, carotide, iliaca) ed in alcune delle arterie muscolari medie e grandi (coronarie). La parete delle arterie è formata da tre strati concentrici: *tunica intima* o luminale, *tunica media* o intermedia, *tunica avventizia* o esterna.

Le componenti cellulari principali della tunica intima sono le cellule endoteliali, rare cellule muscolari lisce e tessuto elastico. La presenza della muscolatura liscia e del tessuto elastico nella tunica intima varia a seconda dell'età. È tipicamente durante l'età adulta che l'intima può divenire marcatamente spessa a causa dell'aterosclerosi.

Negli ultimi anni è stata rilevante la scoperta del ruolo cruciale delle cellule endoteliali nella patogenesi della aterosclerosi. Questa patologia è considerata una risposta dell'intima di tipo immuno/infiammatorio ad un danno tissutale, danno che nella stragrande maggioranza dei casi è dovuto ad una situazione di iperlipidemia in particolare di elevati livelli plasmatici di colesterolo.

Le fasi precoci della lesione consistono di eventi che si sviluppano sotto l'endotelio vascolare e non sono associate a morte cellulare, ma sono caratterizzate da una modulazione delle funzioni dell'endotelio stesso che si traduce in un aumento dell'adesività dei monociti circolanti alle pareti del vaso. L'endotelio rappresenta un organo vero e proprio con attività endocrina, autocrina e paracrina e non un semplice condotto passivo (Luscher TF *et al.* 1997; Gimbrone MA Jr. *et al.* 1997). In condizioni fisiologiche l'endotelio possiede numerose funzioni che garantiscono l'equilibrio vascolare. L'endotelio integro rappresenta una barriera altamente selettiva al passaggio delle sostanze circolanti contenute nel torrente ematico, mantiene l'equilibrio emostatico intravascolare grazie alle sue proprietà anticoagulanti e fibrinolitiche e contribuisce in modo determinante alla regolazione del tono vasale; esso produce, infatti, sostanze ad azione vasodilatante (come l'ossido nitrico, la prostaciclina, la bradichinina e i fattori iperpolarizzanti) e ad azione vasocostrittrice (angiotensina II, endotelina, trombossano), che in condizioni fisiologiche sono in equilibrio fra loro. L'ossido nitrico (NO) esercita anche un ruolo protettivo nei confronti della parete vasale, inibendo la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce, l'aggregazione piastrinica, l'adesione dei monociti circolanti, la flogosi e l'ossidazione.

Per contro, le sostanze ad azione vasocostrittrice, oltre a determinare lo spasmo vasale, sono in grado di promuovere infiammazione e danno vascolare. La "disfunzione endoteliale" si verifica in tutte le condizioni nelle quali le sostanze ad azione vasocostrittrice prevalgono con i propri effetti lesivi sulle sostanze ad azione vasodilatante. Come interfaccia tra il flusso sanguigno e la parete vascolare l'endotelio produce risposte a stimoli patologici come l'ipertensione, l'iperglicemia ed il fumo di tabacco (Plutzky J. MD. 2003).

Il coinvolgimento diretto del sistema immunitario nei vari stadi del processo aterogenico (Hansson, G. K. *et al.* 1989; Libby, P., and Hansson, G. K. *et al.* 1991) è stato negato per molti anni. Oggi sono stati rivalutati diversi studi e le cellule T sono indicate tra le più precoci cellule ad infiltrarsi a livello intimale durante le fasi iniziali del processo aterogenico, forse precedendo gli stessi monociti (Hansson, G. K. *et al.* 1988). In uno studio di tipo immunoistochimico, che ha

confrontato segmenti aortici di soggetti giovani con quelli di adulti più anziani, le cellule T predominano rispetto ai monociti-macrofagi in zone arteriose che precedono la formazione di placche (strie lipidiche) (Xie, Q. *et al.* 1992). A ciò si aggiunge la capacità di linfociti, cellule endoteliali, monociti-macrofagi e fibrocellule muscolari lisce di elaborare mediatori solubili come fattori di crescita e citochine capaci di modulare ed amplificare risposte immuni. Queste osservazioni suggeriscono un coinvolgimento del sistema immune nel processo aterogenetico che contribuisce a determinare uno stato di infiammazione cronica che, per la rottura della placca aterosclerotica, può determinare trombosi ed evolvere in un evento clinico acuto come l' infarto del miocardio o l' ictus cerebrale.

1. 6.1 EZIOPATOGENESI DELL' ATEROSCLEROSI

L' aterosclerosi è una patologia evolutiva e degenerativa per cui le sue prime manifestazioni cliniche sopraggiungono, in genere, tra i quaranta e i sessant' anni; i sintomi si avvertono solo quando si raggiunge uno stato avanzato. Sebbene le conseguenze si manifestino in età avanzata, gli studi dimostrano che questo processo può avere inizio molto precocemente, fin dall'età di 20 anni, come è stato dimostrato nei soldati americani morti durante la guerra di Corea, ai quali fu praticata l' autopsia. Per decenni l' aterosclerosi non dà alcun disturbo, ma, dopo i 50-60 anni, in alcuni soggetti, il processo è così avanzato da dar luogo alle complicanze della placca e quindi ad importanti manifestazioni cliniche.

L' evento critico che dà inizio al processo aterosclerotico consiste nella perdita dell' integrità strutturale dell' endotelio e delle sue funzioni. In condizioni normali la parete del vaso a contatto con il sangue (endotelio) è integra e levigata, come le mattonelle di un pavimento; condizioni patologiche come il diabete, insulti di tipo chimico (colesterolo trasportato dalle lipoproteine a bassa densità, LDL, lipoproteine LDL-modificate, glucosio) e fattori concomitanti di natura emodinamica (ipertensione e stress della parete) e biologica (virus, batteri, immunocomplessi circolanti, etc.) possono compromettere l' integrità dell' endotelio che diventa più permeabile alle sostanze contenute nel sangue, permettendo l' infiltrazione di vari composti che si depositano come impurità tra l' endotelio e la tunica media.

Alla formazione delle "placche" concorrono diversi fattori:

-le piastrine, elementi corpuscolati del sangue normalmente responsabili del riparo di lesioni dei vasi sanguigni, si aggregano nella zona della lesione;

-la parete alterata del vaso non produce più quelle importanti sostanze che lo mantengono dilatato e migliorano il flusso sanguigno, come le prostaglandine;

-il punto in cui lo strato superficiale (endotelio) è danneggiato ha la proprietà di attivare la coagulazione del sangue, favorendo la formazione di trombi (coaguli) che peggiorano l'ostruzione. La perdita dell'integrità dell'endotelio consente l'infiltrazione di lipidi; le LDL possono penetrare nell'endotelio per diffusione o per transendocitosi. Nella matrice subendoteliale le LDL subiscono reazioni di ossidazione (Ross R. *et al.* 1999) o modificazioni strutturali come il legame a proteoglicani che le rendono citotossiche per i tessuti circostanti. I monociti circolanti invadono lo spazio subendoteliale dell'arteria diventando macrofagi residenti ove agiscono come scavengers delle LDL ossidate riconosciute dal recettore scavenger dei macrofagi (Ross R. *et al.* 1993).

All'interno dei macrofagi le LDL ossidate vengono metabolizzate, i fosfolipidi vengono riciclati per la sintesi delle membrane e il colesterolo viene immagazzinato come colesterolo esterificato; a questi eventi si associa un progressivo assorbimento di lipidi nei macrofagi che provoca la trasformazione di queste cellule in "foam cells" o cellule schiumose (Hegel R.A. 1996).

L'assorbimento delle LDL ossidate nei macrofagi provoca il rilascio di fattori mitogenici e chemiotattici (il fattore di crescita delle piastrine PDGF (Ross R. *et al.* 1999), l'interleuchina-1, il fattore di necrosi tumorale TNF- α , il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) che determinano la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce (VSMC) dalla tunica media a quella intima (Kim S. *et al.* 2000); la proliferazione e la chemiotassi delle cellule muscolari lisce da origine ad una capsula fibrosa (***fibrous cap***) (Libby P. *et al.* 2000). Le LDL modificate stimolano la produzione di mediatori infiammatori come le citochinine che promuovono l'aggregazione delle "foam cell" e dei leucociti. Questi eventi generano le cosiddette "***fatty streaks***" o strie lipidiche (Libby P. *et al.* 2001) (fig.13). Le placche evolvono nel tempo; lo spessore delle "fatty streaks" tende ad aumentare e si forma una placca, che tende a restringere il calibro del vaso (stenosi), con riduzione della quantità di sangue che vi transita nel vaso stesso; come conseguenza si verifica una ridotta irrorazione degli organi e tessuti che vengono serviti dalla specifica arteria chiamata ischemia. Nella progressione del processo aterogenico sono coinvolte anche le piastrine; esse possono aderire al collagene esposto, essere attivate e rilasciare fattori di crescita come il PDGF che stimola la proliferazione delle VSMC; le piastrine attivate si aggregano nel punto della lesione promuovendo la coagulazione del sangue con la formazione di un trombo.

La turbolenza circolatoria che si viene a creare in corrispondenza dell'ostacolo determina l'aumento di deposito nella placca, di sostanze nocive che determinano l'ispessimento ulteriore della stessa fino alla completa occlusione del vaso. Inoltre c'è anche la pericolosa eventualità che

parti della placca possano staccarsi e creare emboli che, trascinati dalla corrente arteriosa, possono andare ad incastrarsi in vasi più piccoli, occludendoli.

Il restringimento del lume arterioso determina una condizione di ischemia, ovvero una disponibilità di ossigeno inferiore alle esigenze del distretto interessato. Superata una certa soglia l'ischemia determina necrosi del tessuto interessato con possibili e frequenti conseguenze funzionali gravissime a carico dell'organo interessato (p.es. infarto del miocardio). Le sedi maggiormente colpite dall'evento aterogenico sono rappresentate dalle arterie coronarie (angina ed infarto miocardio), dalle arterie cerebrali (ictus o altre manifestazioni più lievi di ischemia), dalle arterie renali (insufficienza renale), dalle arterie delle gambe (disturbo che si manifesta durante il cammino noto come "claudicatio intermittens"), dalle arterie retiniche (disturbi della vista).

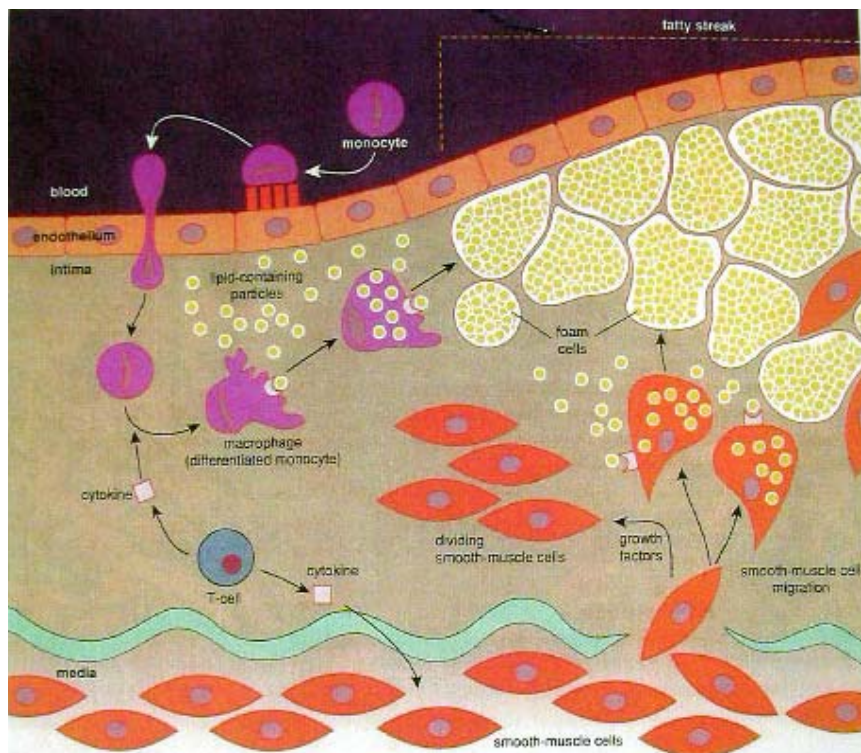


Fig. 13 Progressione dell'aterosclerosi.

1. 6.2 IPOTESI OSSIDATIVA DELL' ATEROSCLEROSI

L' ossidazione delle LDL è uno dei fattori che concorrono all' instaurarsi e all' aggravarsi della aterosclerosi (Steinberg D., *et al.*, 1989). L' ipotesi più attuale è che negli stati precoci dell' aterosclerosi si formi, al di sotto dell' endotelio del vaso, una forma di LDL minimamente modificate (minimally modified-LDL, mmLDL). Queste ultime vengono captate per mezzo del recettore classico delle LDL (*LDLR*) e provocherebbero, da parte dell' endotelio, la produzione di molecole di adesione dei monociti, di una proteina ad azione chemiotattica per i monociti (MCP-1) e di un fattore che stimola la formazione di colonie di macrofagi (M-CSF). Questa sequenza di eventi molecolari si traduce in un legame dei monociti all' endotelio e in una loro successiva migrazione nello spazio subendoteliale, dove l' M-CSF ne promuove la differenziazione in macrofagi. Questi ultimi possono modificare ulteriormente le mm-LDL in una forma più ossidata le *ox-LDL* le quali non sono più riconosciute dal recettore per le LDL, ma vengono invece captate dal recettore scavenger dei monociti-macrofagi, (Joseph L.Goldstein and Michael S.Brown) quando la captazione delle LDL avviene attraverso l' *LDLR*, la cellula è in grado e di regolare i livelli intracellulari di colesterolo per prevenirne accumuli eccessivi e dannosi; quando invece le LDL, perché ossidate, non sono riconosciute dall' *LDLR*, ma dal recettore scavenger, l' accumulo di colesterolo nei macrofagi procede in maniera incontrollata: questo fenomeno porta alla formazione delle cellule schiumose (foam cells) che sono alla base della formazione della placca ateromatosa. In sintesi come anche riportato in figura , l' ossidazione delle LDL è catalizzata dalle cellule endoteliali, dalle cellule muscolari lisce e dai macrofagi, e contribuisce alla aterosclerosi attraverso quattro meccanismi :

- I: richiamo dei monociti circolanti (per opera di un fattore chemiotattico che è presente solo nelle LDL ossidate e non nelle LDL native) e loro differenziazione in macrofagi;
- II: inibizione (esercitata dalle LDL ossidate) della motilità dei macrofagi residenti, e quindi della loro capacità di lasciare l' intima;
- III: aumento della captazione delle LDL ossidate da parte dei macrofagi residenti, il che porta alla formazione di cellule schiumose;
- IV: citotossicità delle LDL ossidate, che porta a perdita della integrità dell' endotelio.

Nelle arterie l' ossidazione delle LDL rappresenta un importante stimolo alla lesione della parete endoteliale (la cui integrità ostacola fortemente l' avvio del processo aterosclerotico), in particolare la perossidazione dei lipidi è la causa principale delle alterazioni strutturali delle LDL. A favorire tale ossidazione concorrono specie chimiche definite specie reattive dell' ossigeno (ROS).

1. 7. PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) E METABOLISMO LIPIDICO

I PPARs sono fattori trascrizionali che regolano l' espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico, delle lipoproteine e dell' omeostasi del glucosio (Wahli W *et al.* 1995). Occupano un ruolo cruciale anche nel differenziamento adipocitario e recentemente sta emergendo un loro potenziale coinvolgimento in alcuni processi neoplastici, soprattutto a carico dell' intestino e del fegato, nell' infiammazione e nello sviluppo dell' aterosclerosi, del diabete e più in generale di malattie cardiovascolari.

Sono fattori trascrizionali appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari che include i recettori dell' acido retinoico (RARs), i recettori degli ormoni tiroidei (TRs) e i recettori degli steroidi (Laudet V., *et al.* 1992 Lemberger T. *et al.* 1996).

Essi furono identificati nel 1990 nei roditori e denominati sulla base della loro capacità di essere attivati da sostanze chimiche esogene, funzionali, capaci di determinare un aumento di numero e dimensione dei perossisomi (organelli cellulari coinvolti nel metabolismo lipidico e nella detossificazione di vari xenobiotici, degradazione del perossido di idrogeno e metabolismo delle proteine e delle purine). Gli acidi grassi e i fibrati sono attivatori dei PPARs (Issemann I, *et al.* 1990)

Si conoscono tre sottotipi di PPARs: PPAR alfa, PPAR beta/delta e PPAR gamma, con diversa distribuzione tissutale e codificati da geni distinti.

Come tutti i recettori nucleari i PPARs presentano una struttura modulare consistente di 4 domini funzionali: dominio A/B, dominio C, dominio D e dominio E/F (fig.14).



Fig. 14 Rappresentazione schematica dei domini funzionali dei PPARs.

Il **dominio A/B**, in posizione amino-terminale, è di lunghezza variabile e poco conservato nei tre isotipi; esso contiene un dominio di attivazione indipendente da ligando (funzione di attivazione AF- 1) bersaglio della fosforilazione di PPAR (ad opera delle MAP-kinasi).

Il **dominio C** contiene il dominio DBD (DNA Binding Domain) di legame al DNA che è quello più conservato tra gli isotipi. Questo dominio è costituito da circa 66 aminoacidi e contiene due motivi *zinc-finger* (formati da un atomo di zinco al centro di un tetraedro di cisteine), strutturati in due α -

eliche perpendicolari, ripiegate a formare un grosso dominio globulare che riconosce la sequenza bersaglio PPRE nel promotore dei geni target (Escher and Whali 2000).

Il **dominio D** comprende una regione variabile la cosiddetta BDB, l' estensione carbossi-terminale (CTE) ed una regione a cerniera flessibile che connette i domini C ed E. Questo dominio contiene i siti di reclutamento dei cofattori.

Il **dominio E/F** o LBD (Ligand Binding Domain) è responsabile della specificità per il ligando e dell' attivazione del legame al PPRE (transattivazione ligando-dipendente o funzione AF-2 mediata dal reclutamento di cofattori) (Berger J. *et al.* 2002), che incrementa l' espressione dei geni target.

Oltre ai ligandi, altri fattori come il recettore RXR e i cofattori giocano un ruolo nell' attivazione della trascrizione. Il legame del ligando al dominio LBD facilita l' eterodimerizzazione dei PPARs con il recettore dell'acido 9-cis-retinoico (RXR) e l' eterodimero risultante si lega ad una specifica sequenza consenso di DNA, il PPRE (Elemento di Risposta ai Proliferatori dei Perossisomi), presente nella regione del promotore dei geni bersaglio. L' elemento di risposta è costituito da due emisiti di esanucleotidi (AGGTCA) ripetuti in tandem, spaziati da un nucleotide (motivo DR1) (Kliwer SA., *et al.*,1992). Il primo PPRE caratterizzato è stato trovato nel promotore del gene dell' acil-CoA ossidasi (ACO) (Dreyer C., *et al.*,1992). Al legame con il PPRE segue il reclutamento di cofattori o corepressori che interagiscono con i recettori nucleari solo nell' attivazione ligando-dipendente.

Il meccanismo di attivazione della trascrizione è illustrato in figura 15.

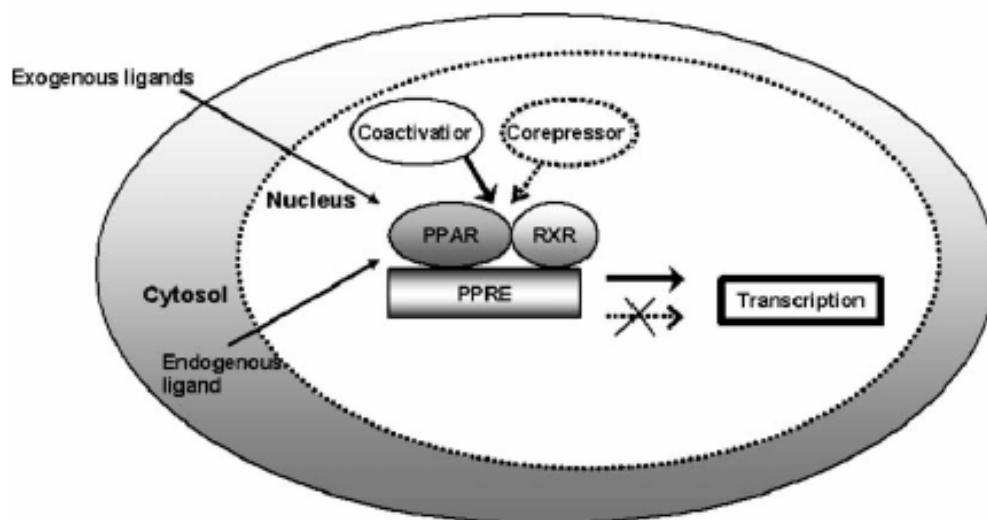


Fig 15. Meccanismo di attivazione della trascrizione operata dai PPARs: in uno stato non legato PPAR interagisce con un complesso di corepressori; l' attività deacetilasica associata ai corepressori inibisce la trascrizione genica. In seguito al legame con ligandi esogeni o endogeni (acidi grassi, PGs) PPAR eterodimerizza con RXR e recluta i coattivatori con attività istone acetilasica (Bhavani Prasad Kota, *et al.*, 2005).

Nello stato eterodimerico non associato a ligandi, PPAR può essere legato da corepressori come *NcoR* (*nuclear hormone receptor corepressor*) e *SMRT* (*Silencing Mediator for Retinoid and thyroid hormone receptors*) (Horlein AJ, *et al* 1995; Chen JD *et al.* 1995) aventi attività istone-deacetilasi. Lo stato deacetilato dell'istone inibisce la trascrizione (Xu L, *et al.*, 1999). Al contrario, coattivatori come *SRC-1* (*Steroid Receptor Co-activator 1*) e *PBP* (*PPAR Binding Protein*) con attività istone-acetilasi (Zhu Y, *et al.*, 1997) inducono il processo trascrizionale. (Jia Y, Qi C. 2004). Alcuni studi hanno dimostrato che *PBP* ha 6 siti di fosforilazione; due di questi siti sono fosforilati dalle proteine della famiglia delle *MAPK*; la fosforilazione dalla cascata *Raf/MEK/MAPK* esercita un effetto positivo sulla funzione del coattivatore (Chakrabarti R, Misra P. *et al.*, 2002).

1. 7.1 LA FOSFORILAZIONE NELLA MODULAZIONE DELL' ATTIVITA' DEI PPARs

I PPARs sono fosfoproteine per cui la regolazione della loro attività trascrizionale può avvenire anche attraverso eventi di fosforilazione/defosforilazione.

Alcuni studi hanno rivelato che alcune *MAPKs* (protein-chinasi attivate da mitogeni) come *ERK1*, *ERK2*, *p38-chinasi* e *JNKs* (attivate da insulina o da altri ligandi o da condizioni di stress come ipossia o ischemia) promuovono la fosforilazione dei PPARs. *ERK2* e *JNK* inibiscono l'attività trascrizionale di *PPAR γ* fosforilando un residuo di serina nel dominio A/B; al contrario, la fosforilazione del dominio C mediata dalla protein-chinasi A (*PKA*) e quella indotta da *p38-MAPK* sul dominio A/B determinano l'attivazione di *PPAR α* (fig. 16-17).

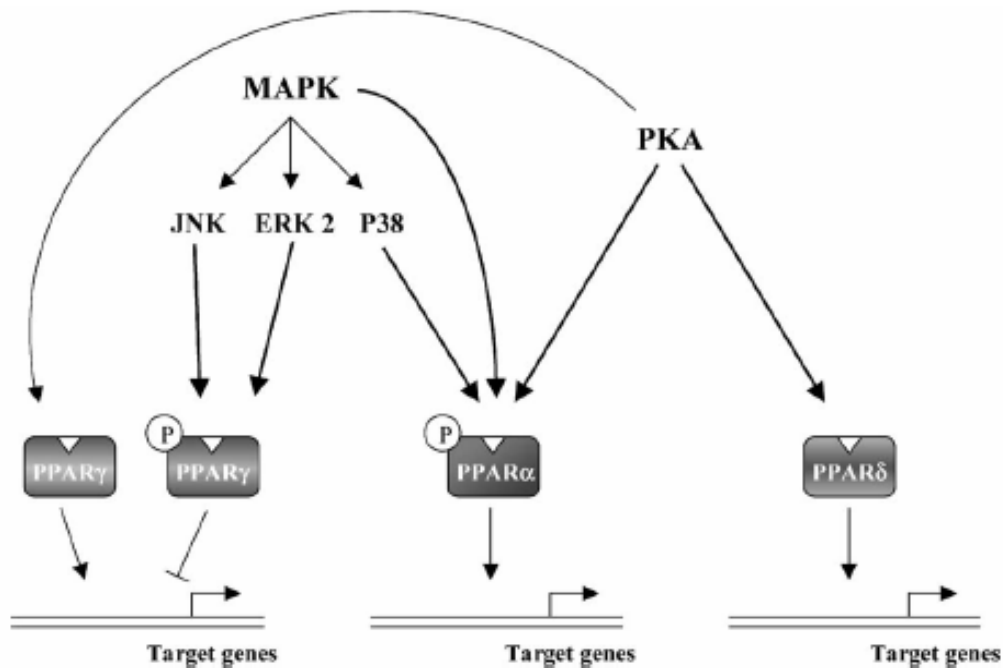


Fig. 16 Rappresentazione della via delle chinasi implicata nella fosforilazione e nella regolazione dell'attività trascrizionale dei PPARs.

A monte, la via delle MAPK è attivata dalla proteina chinasi C (PKC), a sua volta attivata dai proliferatori dei perossisomi; trattamenti di epatociti di ratto con Wy14,643 o clofibrato aumentano i livelli di PPAR α e di acil-coenzima A ossidasi, un gene regolato da PPAR α .

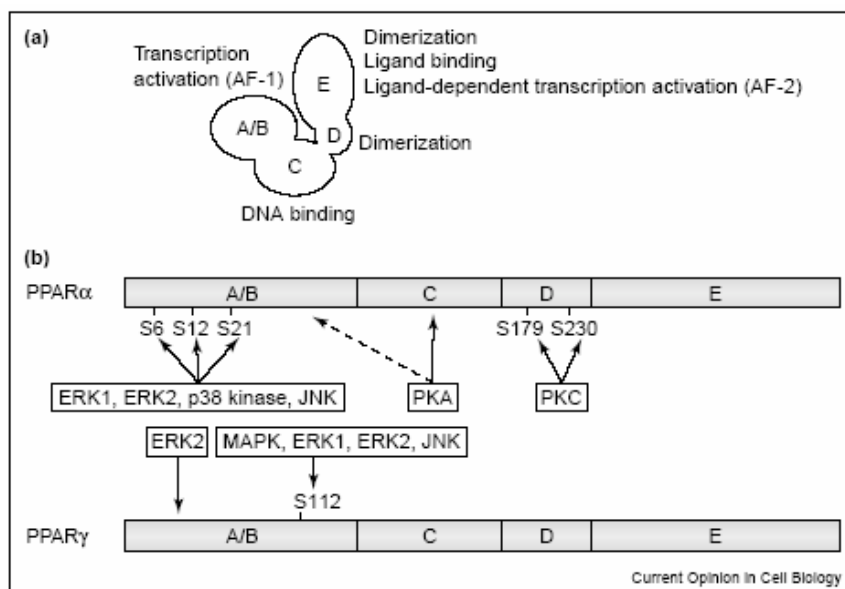


Fig. 17 Struttura (a) e siti di fosforilazione di PPAR alfa e gamma (b). La cascata di chinasi che fosforila differenti residui di PPAR alfa e gamma: ERK (extracellular-signal-regulated kinase); JNK (Jun NH₂-terminal kinase); MAPK, (mitogen-activated protein kinase); PKA (protein kinase A).

La fosforilazione può modulare l'attività dei PPARs attraverso numerosi meccanismi, sia diretti che indiretti (fig.18).

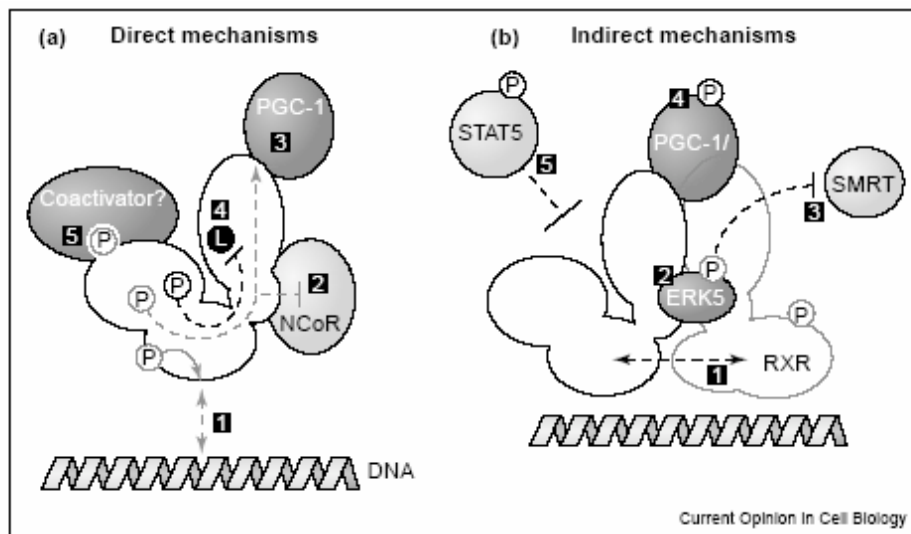


Fig. 18 Meccanismo attraverso cui la fosforilazione modula l'attività dei PPARs.

(a) **Meccanismi diretti.** 1: induzione del DNA binding; 2: inibizione dell'associazione con NCoR; 3: reclutamento selettivo di PGC-1 mediato dal dominio E; 4: inibizione del legame con il ligando; 5: reclutamento di cofattori sul dominio A/B

(b) **Meccanismi indiretti.** 1: controllo allosterico di PPAR attraverso RXR e/o il reclutamento di cofattori mediato da RXR 2: reclutamento di ERK5 fosforilato; 3: inibizione dell'associazione con SMRT; 4: modulazione dell'attività dei cofattori; 5: inibizione mediata da STAT5 (attraverso un meccanismo di fosforilazione sconosciuto).

La fosforilazione del dominio A/B dei PPARs può attivarne la trascrizione ligando-indipendente (AF-1). E' stato infatti dimostrato che la regione N-terminale di PPAR alfa o gamma fusa ad un dominio di legame al DNA, induce la trascrizione di un gene reporter (Juge-Aubry CE *et al.*, 1999 - Adams M, *et al.* 1997 - Werman A. *et al.* 1997 - Hi R *et al.* 1999). La fosforilazione del dominio A/B potrebbe anche creare un sito di reclutamento di coattivatori il cui legame potrebbe stabilizzare o strutturare il dominio (fig. 18). E' anche possibile che la funzione AF-1 sia attiva solo per specifici promotori, cofattori o tipi cellulari.

Esperimenti di trasfezione hanno suggerito che la fosforilazione del dominio A/B induce anche la dissociazione di corepressori come NCoR (Nuclear Receptor Corepressor) da PPAR alfa (Juge-Aubry *et al.* 1999); poichè il corepressore interagisce con il dominio C-terminale (Dowell P. *et al.* 1999), è probabile che cambiamenti conformazionali di un dominio influenzino anche gli altri (allosteria).

La fosforilazione del dominio A/B di PPAR alfa induce anche il reclutamento del coattivatore-1 (PGC-1) (Barger PM *et al.* 2001), che interagisce con il dominio E di PPAR alfa (Vega RB *et al.* 2000). Questo effetto non si estende ad altri coattivatori come SRC-1 e PBP.

Il *cross-talk* tra i domini sembra essere tipico anche di PPAR gamma, in cui la fosforilazione del dominio N-terminale (S112) fa diminuire la capacità del dominio E di legare il ligando (Shao D. *et al.* 1998) ed il polimorfismo Pro12/Ala in PPAR gamma-2 riduce il legame del recettore al DNA (Deeb SS, *et al.* 1998). La fosforilazione influenza quindi il legame dei recettori al DNA; ad esempio la fosforilazione di PKA del dominio C di PPAR alfa ne fa aumentare la capacità di legare il DNA (fig. 17-18). E' da sottolineare che l'attività di PKA aumenta nel fegato quando l'organismo è sottoposto a condizioni di stress, digiuno o esercizio fisico, condizioni per le quali anche i geni bersaglio di PPAR α come acil-CoA ossidasi, risultano essere sovraespressi (Winder *et al.* 1992; Kroetz *et al.* 1998) in modo da aumentare la disponibilità energetica stimolando la gluconeogenesi e la chetogenesi. Anche la fosforilazione di altri fattori di trascrizione come RXR, in maniera indiretta, può modulare l'attivazione genica modulata dai PPARs; ad esempio la fosforilazione di RXR ad opera di PKA influenza la funzione di PPAR. Inoltre la fosforilazione dei cofattori potrebbe essere un meccanismo indiretto di regolazione dell'attività dei PPARs; è stato dimostrato che la chinasi ERK5 può funzionare da coattivatore di PPAR gamma in cellule endoteliali. ERK5 fosforilata subisce un cambio conformazionale che la rende capace di interagire con il dominio D di PPAR gamma competendo con il corepressore SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors).

Una questione che rimane aperta è se l'attività dei PPARs sia regolata anche dalle fosfatasi. Questo campo è ancora inesplorato ma sarebbe interessante comprendere i meccanismi alla base di questo tipo di regolazione.

Tab. 1: Fosforilazioni dei vari isotipi dei PPARs ed effetti sull' attività trascrizionale.

	Kinase	Domain/residue phosphorylated	Stimuli involved	Effect on transcriptional activity	Physiological significance	Remarks	Ref
PPAR α	MAPK (ERK1 and ERK2)	A/B domain S12 and S21 (hPPAR α)	Insulin	Increases ligand-dependent transactivation. Also enhances PPAR γ activity. Decreases transactivation.	Links insulin resistance and altered lipid metabolism.	Insulin also enhances PPAR γ activity.	[6,46]
			Ciprofibrate, Wy-14, 643				[55]
	PKA	Mainly C	Cholera toxin, forskolin	Increases ligand-dependent transactivation.	Enhancement of β -oxidation and production of glucose and ketone bodies upon stress, fasting or exercise.	PPAR γ and PPAR β are also phosphorylated by PKA.	[12]
	ERK	A/B domain S6 and/or S12 and/or S21 mainly (mPPAR α)	Phenylephrin	Decreases transactivation.	Participates to the down-regulation of PPAR α during the hypertrophic process.		[15]
	p38 kinase and JNK	A/B domain S6 and/or S12 and/or S21 (mPPAR α)	Over-expression of p38 α	Increases ligand-dependent transactivation. No effect in the absence of ligand was detected.	Increased fatty acid β -oxidation in the heart during periods of stress.		[11]
PKC	D domain S179, S230 (hPPAR α)		Increases transactivation. Decreases transrepression.	Decreases PPAR inhibitory action on inflammation.		[56]	
PPAR γ	MAPK (ERK2)	A/B/C domain Not S112 (mPPAR γ 2)	Insulin	Increases transactivation.	Favors adipogenesis.		[10]
	MAPK (ERK1)	A/B domain S112 (mPPAR γ 2)	EGF, TPA, serum, insulin	Decreases transactivation. No effect on nuclear localization, affinity for RXR α or DNA binding.	Inhibits adipogenesis.		[7]
	MAPK (ERK2, JNK but not p38 kinase)	A/B domain S84 (hPPAR γ 1)	TNF α , EGF	Decreases both ligand-dependent and independent transactivation.	Inhibits adipogenesis.		[9]
	MAPK	A/B domain S82 (mPPAR γ 1)	EGF PDGF	Decreases transactivation. No effect on DNA binding.	Inhibits adipogenesis.		[8]

EGF, epidermal growth factor; JNK, Jun NH₂-terminal kinase; PDGF, platelet-derived growth factor; PKA, protein kinase A; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; TNF α , tumor necrosis factor α ; TPA, 12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate.

1. 7.2 FUNZIONE E DISTRIBUZIONE TISSUTALE DEI PPARs

La distribuzione tissutale dei PPARs nei mammiferi è stata ampiamente studiata sia nei roditori che nell' uomo (Kliwer SA *et al.* 1994; Braissant *et al.* 1996). PPAR α è stato scoperto nel 1990 da Issemann e Green (Issemann I, Prince R, and Green S.,1990); esso è altamente espresso nei tessuti con elevata attività catabolica degli acidi grassi come fegato, rene, cuore e tessuto adiposo. Nei roditori, i tessuti che esprimono alti livelli di PPAR α sono fegato, rene, cuore, mucosa dello stomaco, duodeno ed anche tessuto adiposo bruno, retina e muscolo scheletrico. Nell' uomo PPAR α è espresso principalmente nel fegato, ma si riscontrano livelli discreti anche nel muscolo scheletrico, nei miociti cardiaci, nel rene (soprattutto a livello delle cellule epiteliali del tubulo prossimale) e nell'intestino. Sono invece più bassi i livelli di PPAR α nel tessuto adiposo. Nel fegato PPAR α regola l' espressione dei geni coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi, come quelli della β -ossidazione mitocondriale e perossisomiale, della sintesi dei corpi chetonici e della ω -ossidazione microsomiale.

PPAR α regola anche l' espressione di geni codificanti proteine di trasporto degli acidi grassi ed enzimi, che contribuiscono al catabolismo degli acidi grassi come la lipoprotein lipasi, l' acil-CoA ossidasi(ACO), enzimi bifunzionali perossisomali (PBE o BIF) (Zhang B *et al* 1993), e cheto-acil CoA tiolasi, la proteina di trasporto degli acidi grassi nel fegato (FATP), l' acil-CoA sintetasi (ACS), la carnitina palmitoil- transferasi-I (CPT-I), la proteina microsomale CYP4A (Muerhoff AS *et al* 1992) e di diversi altri geni. Disfunzioni dell'attività di PPAR α sono responsabili di malattie del sistema vascolare proprio per la sua capacità di controllare l' espressione genica di proteine che intervengono nel metabolismo e nel trasporto dei lipidi. PPAR α attivato da fibrati sembra ridurre del 22% malattie cardiovascolari abbassando i livelli di trigliceridi nel sangue.

Nel 1992 Dreyer identificò PPAR β e PPAR γ . PPAR β ha una distribuzione ubiquitaria nei vari tessuti dei mammiferi, sia nei tessuti dell'embrione che in quelli dell'adulto; nell'embrione si osserva un più alto livello di espressione. La sua espressione è tuttavia maggiore nel cervello, nel cuore, nei reni e nei polmoni. PPAR γ è codificato da tre diverse isoforme di mRNA: PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3 che si generano attraverso meccanismi alternativi di splicing. Rispetto agli altri PPARs PPAR γ ha un ristretto profilo di espressione: livelli molto alti dell' mRNA sono stati riscontrati nel tessuto adiposo bianco e bruno, nel colon (Latruffe *et al.*, 2001) e nel muscolo scheletrico (Vidal-Puig, *et al.* 1996). Ma l' espressione va differenziata a seconda delle diverse isoforme: PPAR γ 1 è espresso nella maggior parte dei tessuti; PPAR γ 2 è l' isoforma che presenta una più spiccata tessuto-specificità in quanto si ritrova prevalentemente nel tessuto adiposo,

PPAR γ 3 è espresso nei macrofagi, in tessuto adiposo ed intestino. A differenza dei roditori, nell'uomo PPAR γ non è espresso né nella milza né nei linfociti T circolanti, mentre è espresso nei linfociti B trasformati e in linee cellulari mieloidi. Nel tessuto adiposo PPAR γ modula la differenziazione degli adipociti e stimola l'assorbimento e l'accumulo dei lipidi circolanti. Esperimenti in vivo hanno mostrato che l'attivazione di PPAR γ riduce la sintesi del fattore di necrosi tumorale TNF (una citochina in grado di indurre sia in vitro che in vivo insulino-resistenza), prodotto soprattutto al livello del tessuto adiposo; la sua riduzione, concorre a migliorare la sensibilità insulinica (Shibasaki M, et 2003). Inoltre PPAR γ è espresso in alcune cellule tumorali mammarie, polmonari e gastriche e di epatoma; alcuni studi hanno riportato che l'attivazione di PPAR γ con troglitazone o 15d-PGJ2 causa una marcata inibizione della crescita delle cellule tumorali (Okano et al., 2002) per apoptosi. Da ciò scaturisce l'importanza dell'uso dei proliferatori dei perossisomi come agenti terapeutici in varie forme di neoplasie.

1. 7.3 PPARs E ATEROSCLEROSI

La scoperta della presenza dei PPARs in diverse cellule coinvolte nella patogenesi dell'aterosclerosi, come macrofagi, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e soprattutto la loro presenza in lesioni aterosclerotiche ha stimolato numerosi studi sul loro coinvolgimento in tale patologia. Lo sviluppo dell'aterosclerosi è un processo a lungo termine che coinvolge il reclutamento e l'attivazione di differenti cellule come i macrofagi, i linfociti-T, le cellule muscolari lisce e la condizione nota come disfunzione endoteliale, tutti fattori che provocano una risposta infiammatoria locale (Ross R, *et al.* 1993).

Un notevole interesse clinico negli ultimi anni è stato rivolto all'utilizzo di agonisti dei PPARs per gli effetti benefici che ne risultano dall'attività regolatoria di questi recettori verso alcuni geni. Gli agonisti di PPAR α , i fibrati, sono potenti agenti ipolipidemizzanti, promuovono l'aumento dell'HDL-C plasmatico e la riduzione degli acidi grassi liberi, dei trigliceridi, dell'LDL-C; inoltre essi riducono l'infiammazione vascolare e la trombosi, promuovono la fibrinolisi e inibiscono la produzione di fattori vasocostrittori come l'endotelina-1, secreta dall'endotelio. L'azione benefica dei fibrati nella clinica, si è manifestata nel trattamento delle malattie cardiovascolari, in modo particolare di pazienti affetti da anomalie lipidiche (alti valori di trigliceridi, bassi valori di HDL-C), sovrappeso e diabete di tipo 2, tutte caratteristiche tipiche della sindrome metabolica. Gli agonisti di PPAR γ , i tiazolidinedioni, non solo hanno effetti benefici nell'omeostasi del glucosio, riducendo i livelli plasmatici del glucosio, ma anche nel metabolismo

lipidico aumentando l' HDL-C, promuovendo la diminuzione degli acidi grassi liberi ed il numero delle LDL (in particolare, il pioglitazone riduce i trigliceridi plasmatici); inoltre contrastano l' infiammazione vascolare e la vasocostrizione, inibiscono la chemiotassi dei monociti, la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce nella parete vascolare, e l' uso di glitazoni in vivo ed in vitro favoriscono la riduzione di MMP-9, metalloproteinasi coinvolti nella rottura della placca (Vergés B. 2004).

Alla luce di questi effetti risulta plausibile l' ipotesi che l' introduzione con la dieta di microcomponenti ad azione simil-farmacologica che attivano la trascrizione mediata da PPAR α e γ , potrebbero proteggere dalle malattie cardiovascolari che costituiscono la causa principale di morte nei Paesi avanzati. Tra l' altro questi effetti potrebbero rientrare tra le cause molecolari di alcuni dati epidemiologici che mostrano una correlazione inversa tra rischio di malattia cardiovascolare e consumo di alcuni cibi ad azione salutistica, come ad esempio il vino.

Uno dei maggiori effetti benefici degli attivatori dei PPARs è quello di ridurre i livelli di trigliceridi nel plasma. PPAR α controlla numerosi geni coinvolti nel metabolismo e nel trasporto inverso del colesterolo; il trattamento con fibrati, ad esempio, induce un aumento della trascrizione dei geni che codificano le apolipoproteine apoA-I e apoA-II, con conseguente aumento plasmatico di queste apoproteine e quindi delle lipoproteine HDL che le contengono (Staels B, *et al.* 1998). Nell' uomo e nel topo l' attivazione di PPAR α induce anche l' espressione dell'enzima LPL (lipoproteinlipasi) e inibisce l' espressione dell' apo C-III, con un aumento della lipolisi e conseguente riduzione dei trigliceridi circolanti. Ne consegue un aumento del catabolismo delle VLDL e dei chilomicroni con un rispettivo incremento delle pre-HDL (coinvolte nel processo *del trasporto* inverso del colesterolo). Inoltre l' attività di PPAR α aumenta l' espressione di SR-B1/CLA-1 e di ABCA-1, recettori delle HDL nei macrofagi umani (Chinetti G, *et al* 2001), promuovendo l'efflusso di colesterolo dalle cellule periferiche ed il suo assorbimento nel fegato (fig.19).

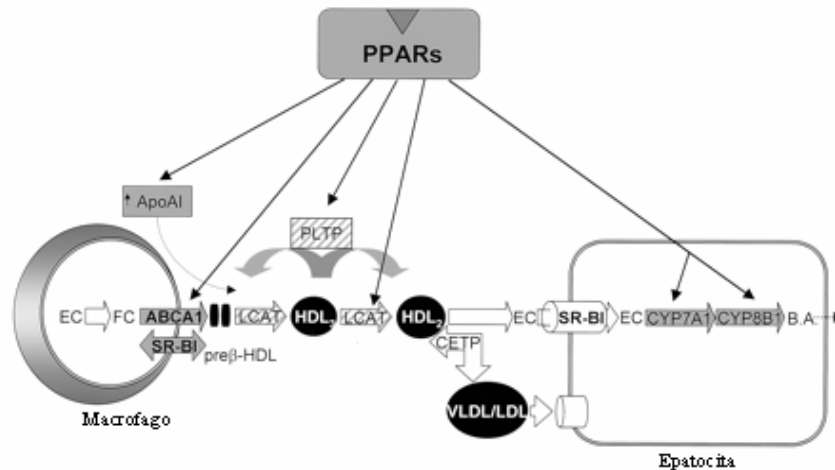


Fig. 19 I PPARs stimolano il trasporto inverso del colesterolo, modulando l'efflusso del colesterolo dai macrofagi, il trasporto del colesterolo nel plasma e la sintesi degli acidi biliari. L'efflusso del colesterolo via trasmembrana mediato da ABCA1 e, forse, da SR-B1 è stimolato da attivatori dei PPAR nei macrofagi umani. Il colesterolo acquisito dalle HDL nascenti, è successivamente esterificato dalla lecitina-colesterolo acil-transferasi (LCAT). Nei roditori si è osservato che i fibrati stimolano l'espressione e l'attività dell'enzima PLTP rimodellante le HDL. L' SR-B1 epatico media la captazione del colesterolo esterificato dalle HDL nel fegato, dove il colesterolo viene escreto nella bile sia direttamente sia dopo conversione in sali biliari. (I geni regolati dai PPARs in modo diretto o indiretto sono indicati in grigio, le frecce di colore bianco pieno indicano i geni umani mentre quelle tratteggiate geni di roditori). CETP (cholesteryl ester transfer protein); FC (colesterolo libero) ed EC (colesterolo esterificato)

Un altro effetto che consegue all'attivazione di PPAR α è la riduzione dell'attività della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP) con aumento del colesterolo HDL e diminuzione del colesterolo presente nelle LDL piccole e dense, probabilmente dovuto all'aumento del loro catabolismo. L'attività della CETP diminuisce in seguito a trattamento con fibrati, probabilmente come conseguenza della diminuzione dei livelli circolanti di lipoproteine plasmatiche ricche in trigliceridi (Staels B, Dallongeville J *et al.* 1998) e inoltre una diminuzione della suscettibilità delle LDL, delle VLDL e dei "remnants" all'ossidazione. Questo effetto si correla sia con la riduzione del substrato lipidico disponibile, sia con modificazioni della composizione in acidi grassi delle particelle lipoproteiche che le rendono più resistenti allo stress ossidativo.

1. 8. CARCINOGENESI

Il cancro è una delle cause di morte più frequente nei paesi sviluppati. L'alterazione a più stadi dell'informazione genetica originale è responsabile della carcinogenesi. Il tumore comprende una classe di malattie caratterizzata da un' incontrollata riproduzione delle cellule e dall' abilità di queste cellule di invadere altri tessuti. Questo tragico fenomeno può avvenire per crescita diretta nei tessuti adiacenti attraverso un' invasione dei tessuti stessi o tramite disseminazione a distanza, processo noto come metastasi. Per metastasi si definisce lo stadio in cui il cancro è distribuito tramite il flusso sanguigno o tramite il sistema linfatico.

I tumori (o neoplasie) sono l' insieme di una popolazione di cellule somatiche che ha preso origine quasi sempre da una sola cellula dell' organismo che ha subito una serie sequenziale di peculiari danni genomici (mutazioni) trasmissibile alla progenie (natura clonale della neoplasia). Il cancro, infatti, si origina grazie all' accumularsi di mutazioni, sia ereditate che acquisite, in differenti geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, dell' adesione, della motilità, del differenziamento e della morte cellulare.

Un' eccessiva produzione di specie reattive dell' ossigeno, ma anche dell' azoto, possono essere causa del danno e delle modificazioni del DNA. Le modificazioni del materiale genetico possono portare a mutazioni, delezioni, inserzioni o traslocazioni cromosomiche che determinano cambiamenti dell'informazione genetica.

Il processo metastatico consiste nella capacità delle cellule tumorali di formare nuovi foci neoplastici in distretti dell' organismo anche lontani da quelli in cui si è formato il tumore primario. La formazione di un nuovo sito metastatico è un processo multistadio in cui sono coinvolte molte interazioni cellula tumorale-ospite. Tali tappe includono la proliferazione delle cellule neoplastiche, i tre componenti dell' invasione (adesione, proteolisi e migrazione), l' angiogenesi, l' intravasazione nel circolo sanguigno o linfatico, l' adesione al letto capillare di un sito anatomico distante, l' extravasazione e la formazione di una nuova colonia cellulare (fig. 20).

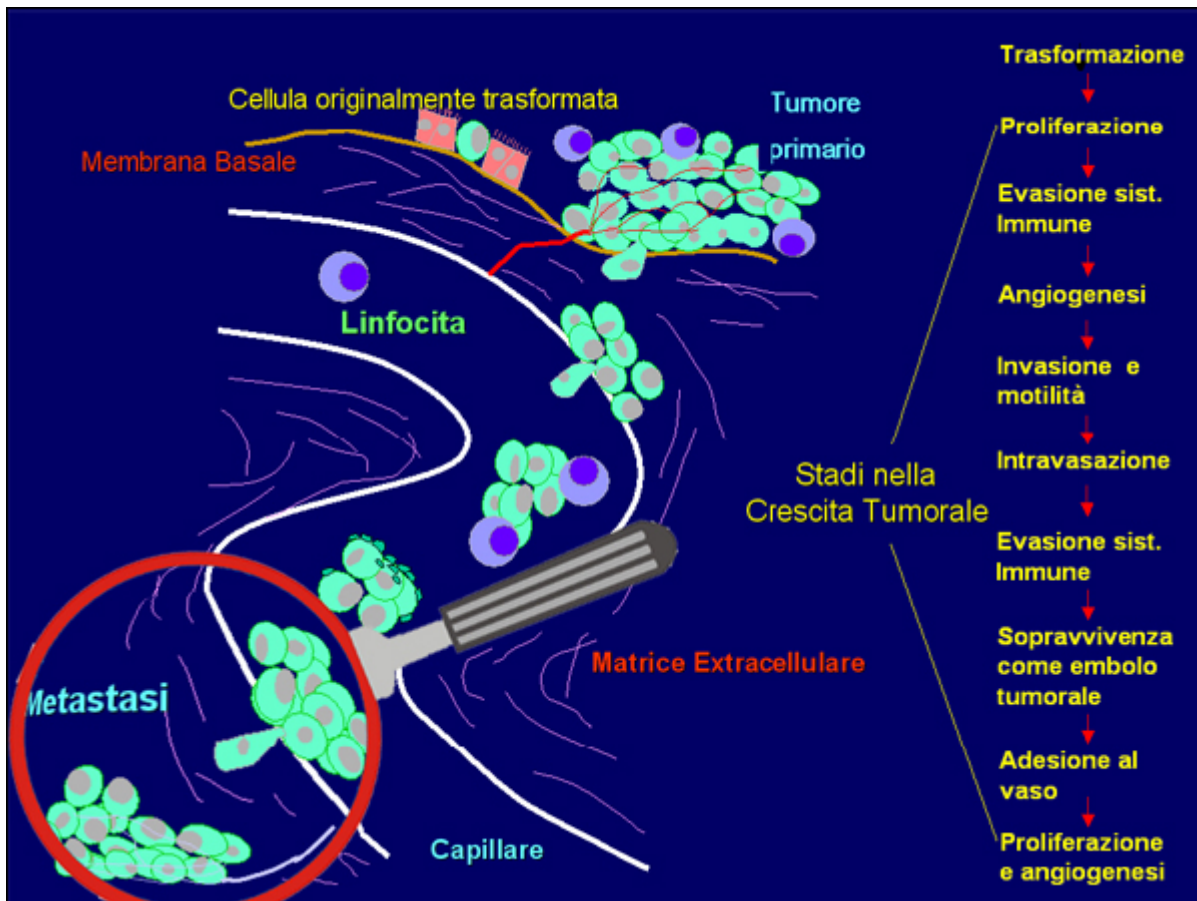


Fig. 20 Processo metastatico

Gli effetti primari provocati dalle mutazioni cancerogene sono i seguenti:

- 1 acquisizione dell'autonomia moltiplicativa per sopravvenuta incapacità a sottostare ai meccanismi regolatori della proliferazione cellulare;
- 2 assenza di inibizione dipendente dalla densità (le cellule normali si moltiplicano fino a una definita densità cellulare, raggiunta la quale diventano quiescenti);
- 3 ridotta capacità di adesione con altre cellule o componenti tissutali;
- 4 assenza di matrice extracellulare che favorisce l' invasione di tessuti normali adiacenti;
- 5 formazione di nuovi vasi sanguigni per fornire ossigeno e fattori nutritivi alle cellule tumorali;
- 6 riduzione o perdita della capacità differenziativa;
- 7 acquisizione della capacità di duplicazione illimitata per effetto dell' espressione della telomerasi;
- 8 riduzione o perdita della possibilità di andare incontro a morte cellulare programmata
- 9 perdita della cosiddetta *inibizione da contatto*.

1. 8.1 CARCINOMA DELLA PROSTATA

Il carcinoma della prostata è un tumore a carico della prostata, una ghiandola dell' apparato genitale maschile. La prostata è un organo dell' apparato genitale maschile che interviene nella produzione del liquido spermatico. È localizzata nella pelvi, al di sotto della vescica e anteriormente al retto; circonda parzialmente l' uretra. La prostata contiene molte piccole ghiandole che producono circa il venti per cento della parte liquida dello sperma.

Il tumore si sviluppa quando le cellule della prostata mutano e iniziano a moltiplicarsi al di fuori dei meccanismi di controllo. Queste cellule possono dare luogo a metastasi in altre parti del corpo, specialmente alle ossa e ai linfonodi. La frequenza del carcinoma prostatico nel mondo è particolarmente variabile. È meno comune nell' Asia meridionale ed orientale, più comune in Europa, con ampie differenze tra paese e paese, e ancora più comune negli Stati Uniti.

Il tumore alla prostata si sviluppa più frequentemente negli ultracinquantenni, è il secondo più comune tipo di tumore negli Stati Uniti, dove è responsabile del maggior numero di morti per tumore tra gli individui di sesso maschile, dopo il tumore dei polmoni (Parkin DM *et al* 2005). Molti fattori, compresa la genetica e la dieta, sono stati implicati nello sviluppo del carcinoma prostatico, ma ad oggi non è una malattia prevenibile.

Il tumore prostatico viene più spesso scoperto all' esame clinico o tramite esami ematici, come la misurazione del PSA (antigene prostatico specifico). Nel carcinoma prostatico le cellule dell' epitelio ghiandolare mutano in cellule cancerose. Per funzionare la prostata ha bisogno degli ormoni maschili, gli androgeni; gli androgeni includono il testosterone, prodotto nei testicoli, il diidroepiandrosterone, prodotto dalle ghiandole surrenali, ed il diidrotestosterone, prodotto dalla prostata stessa. Il normale epitelio prostatico è composto da cinque tipi cellulari: cellule staminali, cellule dell'epitelio basale, *transit amplifying cells*, cellule neuroendocrine e cellule secretorie epiteliali.

Cause del Tumore alla Prostata

Quando le normali cellule subiscono un danno oltre la normale capacità di riparazione, vengono eliminate per apoptosi. Le cellule tumorali, spesso portatrici di un danno a livello genomico, invece evitano l' apoptosi e continuano a moltiplicarsi in maniera incontrollata. Il tumore della prostata è classificato come adenocarcinoma, o tumore ghiandolare, ed ha inizio quando le normali cellule secernenti vanno incontro a mutazione. La regione dell' organo in cui il tumore è più frequente è la zona periferica. Inizialmente piccoli gruppi di cellule tumorali restano confinati localmente, condizione nota come carcinoma in situ o neoplasia prostatica intraepiteliale (PIN). Col

passare del tempo queste cellule iniziano a moltiplicarsi e a diffondersi nel tessuto prostatico circostante (lo stroma). È possibile che il tumore cresca abbastanza da invadere organi circostanti come le vescicole seminali o il retto; le cellule tumorali possono anche sviluppare la capacità di viaggiare nel flusso ematico e nel sistema linfatico. L' adenocarcinoma prostatico è considerato un tumore maligno per la sua potenziale invasività, ossia la capacità di dare luogo a metastasi, il che riguarda più comunemente le ossa, i linfonodi, il retto e la vescica.

Le cause specifiche di tumore della prostata sono sconosciute. Il rischio che un uomo sviluppi il tumore è correlato all' età, alla genetica, alla razza, alla dieta, allo stile di vita, all' assunzione di farmaci. Il fattore primario di rischio è l' età. Il tumore della prostata è raro negli uomini al di sotto dei 45 anni, ma diventa più comune con l' avanzare dell' età. Il corredo genetico di un uomo contribuisce al rischio di sviluppare il tumore. Ciò è suggerito da un aumento dell' incidenza riscontrato in certi gruppi razziali, nei gemelli identici, e in uomini portatori di certi geni. Negli Stati Uniti, il cancro della prostata colpisce più comunemente gli uomini di colore che i bianchi. Gli uomini con un fratello od un padre colpiti dal tumore corrono un rischio doppio del normale di svilupparlo anch' essi. Studi su gemelli condotti in Scandinavia suggeriscono che il quaranta per cento del rischio può essere attribuito a fattori ereditari. Tuttavia nessun gene preso singolarmente è responsabile del tumore, e si ritiene che siano diversi i geni alterati che contribuiscono allo sviluppo del tumore. Due geni (BRCA1 e BRCA2), che sono pure importanti fattori di rischio per il tumore dell' ovaio e della mammella, sono anche coinvolti nel tumore della prostata.

L' assunzione con la dieta di certi cibi, vitamine, e minerali possono contribuire al rischio. Gli uomini con maggiori livelli sierici di acido linolenico, un acido grasso polinsaturo, sono a maggior rischio di tumore della prostata. Tuttavia gli stessi studi dimostrano che gli uomini con livelli elevati di acidi grassi a catena lunga diminuiscono l' incidenza. Altri fattori dietetici in grado di aumentare il rischio includono un basso apporto di vitamina E (presente nei vegetali a foglie verdi), di licopene (presente nei pomodori), di acidi grassi omega-3 (presenti nei pesci a carne grassa come il salmone) e di selenio. Anche bassi livelli ematici di vitamina D possono aumentare il rischio di sviluppare un tumore alla prostata.

Alcuni studi hanno evidenziato che il resveratrolo è in grado di abbassare i livelli di PSA (Mitchell SH et al. 1999). Esistono anche dei legami tra tumore della prostata ed assunzione di farmaci, procedure e condizioni mediche. L' utilizzo giornaliero di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) come l' aspirina è associato ad una riduzione del rischio. Farmaci ipolipidemizzanti come le statine possono anch' essi ridurlo. Eiaculazioni più frequenti possono abbassare il rischio; uno studio mostrò che gli uomini che eiaculano cinque volte a settimana dai

venti a trent' anni di età, vedono ridotto il rischio di tumore. Un' infezione od un' infiammazione della prostata (prostatite) può aumentare le probabilità di tumore. In particolare, infezioni sessualmente trasmesse come la clamidia, la gonorrea, e la sifilide sembrano aumentare il rischio, così come l' obesità ed elevati livelli ematici di testosterone.

Il cancro alla prostata è comunque un evento a più tappe dove si verificano una serie di alterazioni genetiche che portano da una iniziale displasia, a una malattia metastatica in fase terminale. La motilità cellulare è controllata da un insieme di risposte cellulari che inducono la formazione di complessi proteici capaci di regolare l' adesione cellulare. Anomalie nell' espressione, nell' attività e nella struttura di queste proteine che controllano la motilità e l' adesione cellulare, possono contribuire allo sviluppo di un fenotipo maligno. In particolare cellule tumorali hanno un incremento della migrazione e una minore capacità di adesione.

Attività di Pyk2 nelle cellule epiteliali di prostata

Pyk2 è una tirosin-chinasi non recettoriale, citoplasmatica, ricca di residui di prolina, omologa a FAK (focal adhesion kinase) proteina coinvolta nel signaling di interazione tra una cellula e l' altra. Pyk2 sembra essere attivata da una varietà di stimoli ormonali, dall' aumento intracellulare del calcio, dall' attivazione di G protein-couple receptors (GPCRs), o da segnali di stress come raggi UV. L' attivazione di Pyk2 da parte di GPCRs stimola l' attivazione di ERK con un meccanismo che coinvolge l' autofosforilazione di Pyk2 che in questo modo recluta la tirosin-chinasi Src e il complesso Grb2/Sos con conseguente attivazione della via di Ras (fig. 21). Segnali di stress come le radiazioni UV o shock osmotico determinano una forte fosforilazione di Pyk2 con conseguente attivazione di alcune GTP-binding proteins e quindi attivazione della via di Jun chinasi (JNK).

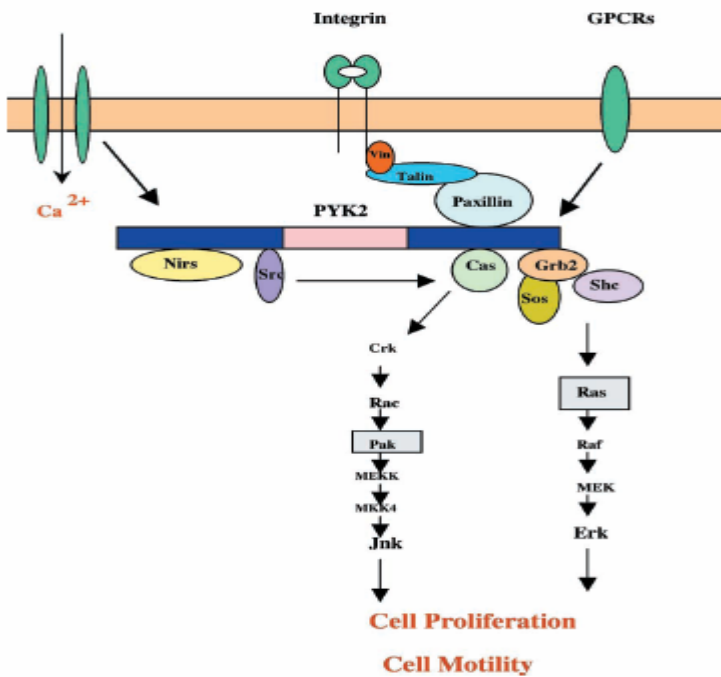


Fig. 21 Attivazione di Pyk2

In cellule endoteliali Pyk2 è associata a Crk-associated substrate p130 (Cas) tramite domini SH. Pyk2 pare essere associata anche a proteine come la paxillina che sono a loro volta associate a proteine del citoscheletro.

Alcuni studi hanno evidenziato come la lisofosfatidilcolina (LPC), composto delle lipoproteine a bassa densità, attivano Pyk2 e sono in grado di aumentare anche la fosforilazione in tiroxina delle proteine Shc proteine che prendono parte al complesso Pyk2/Shc/Grb2.

La lisofosfatidilcolina gioca un ruolo importante nei cambiamenti vascolari associati alla patofisiologia dell'aterosclerosi. LPC sembra danneggiare l'epitelio delle arterie.

È stato evidenziato che Pyk2 è espressa nelle cellule prostatiche umane normali di origine epiteliale e non in quelle di origine stromale. L'espressione di Pyk2 correla in modo inverso con l'acquisizione del fenotipo trasformato delle cellule prostatiche. Per tale motivo Pyk2 sembra comportarsi come un gene onco-soppressore nelle cellule di prostata, inoltre probabilmente svolge un ruolo chiave nei processi di crescita e differenziamento della ghiandola prostatica.

In particolare Pyk2 sembra partecipare al controllo dell'adesione e della motilità cellulare delle cellule epiteliali di prostata, aspetti importanti la cui alterazione può indurre carcinogenesi. È stato visto che cellule epiteliali esprimenti una forma di Pyk2 difettiva dell'attività chinasi, presentano una motilità aumentata in risposta allo stimolo del siero rispetto a cellule epiteliali di prostata che esprimono Pyk2 normalmente attivo. Inoltre è stato visto che la perdita dell'attività di Pyk2 induce cambiamenti nell'organizzazione del citoscheletro (De Amicis F. *et al.* 2006).

1. 9. LONGEVITÀ E p66shc

Sia in *Caenorabditis Elegans* che in *Drosophila Melanogaster* la durata della vita sembra essere controllata da alcuni geni la cui eliminazione determina l' allungamento della vita stessa. Anche nei mammiferi pare esistano dei geni la cui eliminazione induce un allungamento della vita, uno di questo è il gene che codifica per la proteina p66shc. La sperimentazione condotta sui topi ha dimostrato che l' eliminazione del gene p66shc allunga la vita degli animali del 30%. Sorge spontaneo chiedersi il perché specie diverse conservino nel proprio corredo genetico geni che limitano la durata della vita e che quindi inducono l' invecchiamento e perché l' evoluzione della specie abbia selezionato un gene apparentemente svantaggioso per l'individuo.

L' identificazione di p66shc rientra nel nuovo capitolo nella ricerca biomedica, ovvero lo studio dei geni dell' invecchiamento.

Il meccanismo mediante il quale p66shc influenza la durata della vita è ancora da scoprire. p66shc pare comunque controllare la risposta cellulare allo stress ossidativo. Allo scopo di studiare la funzione di p66shc è risultata determinante la generazione di topi p66shc^{-/-}, ottenuti mediante ricombinazione omologa. Questi topi mostrano un' elevata resistenza agli stress di tipo ossidativo *in vivo* e un aumento della durata della vita del 30% rispetto ai topi di controllo. Inoltre fibroblasti embrionali (MEFs) estratti dai topi p66shc^{-/-} risultano essere più resistenti alla morte apoptotica indotta da H₂O₂ e da UV rispetto a MEFs di controllo. Questi risultati stabiliscono quindi un nesso diretto tra lo stress ossidativo e l' invecchiamento e suggeriscono che i geni che regolano la risposta cellulare allo stress ossidativo determinano anche un allungamento della vita dei mammiferi.

1. 9.1 PROTEINE ADATTATRICI Shc

Le proteine Shc sono molecole adattatrici che prendono parte alla trasduzione del segnale coinvolta nella proliferazione ma anche nella trasmissione dei segnali di sopravvivenza. Le proteine della famiglia delle proteine adattatrici ShcA, cui appartiene anche p66shc, sono state inizialmente identificate come proteine contenenti un protooncogene SH2. Src homology 2 (SH2) è il dominio che determina l' interazione proteina-proteina formando complessi multiproteici durante varie vie di trasduzione del segnale. Il gene ShcA è stato identificato nel 1992. Esistono tre differenti isoforme di diverso peso molecolare 46, 52 e 66 kDa, tutte e tre contenenti dei domini funzionali un dominio SH2, un dominio PTB e uno CH1, dominio con residui conservati di tirosina che vengono fosforilati in risposta a vari stimoli (Ravichandran KS 2001). PTB e SH2 sono domini capaci di

legare proteine contenenti fosfotirosine come RTK (receptor tyrosine kinases); in seguito si hanno eventi di fosforilazione del dominio CH1 sui residui di tirosina Y239/240 e Y317.

p66shc ha un dominio CH2 all' N-terminale, aggiuntivo rispetto a p46 e p52shc. Tale dominio contiene un residuo di serina (fig. 22) che pare essere fosforilato in seguito a segnali di stress. (Migliaccio E et al. 1999). I diversi tipi di proteine Shc esibiscono diversi profili di espressione e diverse funzioni biologiche. Per esempio p52 e p46 sono espressi in vari tipi cellulari, mentre p66 è espressa soprattutto in cellule epiteliali (Migliaccio et al. 1997).

1. 9.2 DOMINI MODULARI DI SHC

Dominio SH2

SH2 è un dominio di circa 100 aminoacidi, conservato in molti eucarioti, e localizzato nella proteina Shc al C-terminale della proteina; è stato inizialmente caratterizzato come il dominio responsabile per il reclutamento e l' attivazione del recettore per l'EGF (epidermal growth factor), mediati dalla fosforilazione in tirosina di Shc (Pelicci G. et al. 1992).

Il dominio SH2 di Shc interagisce con la catena ζ del recettore delle cellule T (TCR- ζ) probabilmente formando un complesso tra le fosfotirosine di SH2 e residui peptidici della catena ζ del recettore contenenti leucine e isoleucine (Ravichandran K.S. et al., 1993).

È stata identificata un' interazione tra le fosfotirosine di Shc-SH2 e mPAL, una nuova proteina espressa in cellule proliferanti (Schmandt R. et al. 1999). Il significato biologico dell'interazione Shc e mPAL rimane da chiarire.

Dominio PTB

Il dominio PTB si trova all' N-terminale di Shc e anch' esso interagisce con altre proteine grazie a residui di fosfotirosine. La regione di legame del dominio PTB pare trovarsi tra gli aminoacidi 46-207 di p52Shc (Trub T. et al.1995).

Dominio CH1

Il dominio CH1 di Shc si trova tra i domini PTB e SH2, tra gli aminoacidi 52 e 167 (Lunzi L. et al., 2000). Queste regioni sono dette di omologia al collagene (CH), e contengono un alto numero di glicine e proline (Pelicci G. et al., 1992). Questo dominio di p52Shc contiene tre tirosine critiche Y239, Y249 e Y317 che se fosforilate legano un gran numero di recettori cellulari.

Studi di Gotoh N. (et al. 1997) suggeriscono che Y239/Y240 sono importanti per l' attivazione di c-Myc, invece Y317 attiva MAPK legandosi a Grb2-Sos.

Dominio CH2

p66 ShcA contiene un secondo dominio CH denominato CH2. Questo dominio è presente anche in alcune isoforme di ShcB e C, ma non nelle isoforme Shc di *Drosophila*. Pelicci e colleghi propongono una teoria evolutiva per CH2 dominio che potrebbe essere acquisito recentemente.

CH2 possiede delle serine la cui fosforilazione sembra avere un ruolo nella risposta allo stress ossidativo. È riportato inoltre che l' overespressione del dominio CH2 potrebbe funzionare come un dominante negativo, inibendo l' attivazione di *c-fos* (fig. 22) (Migliaccio E. et al. 1997).

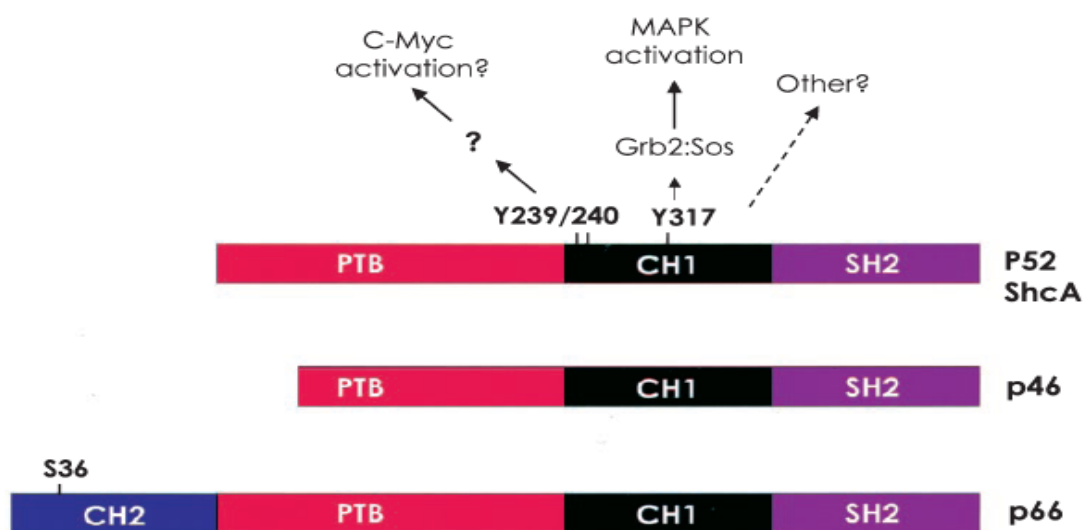


Fig.22 Organizzazione schematica delle tre isoforme di ShcA.

1. 9.3 SHC E LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Le proteine adattatrici Shc sono coinvolte in una varietà di processi cellulari che includono l'attivazione di Ras, il metabolismo fosfolipidico, la trascrizione e la riorganizzazione citoscheletrica. p52 e p46 sono coinvolte nei meccanismi che regolano la proliferazione cellulare. Esse sono substrati citoplasmatici di tirosine chinasi (TKs) attivate, e sono implicate nella trasmissione del segnale di attivazione dalle TKs a Ras. In seguito alla fosforilazione di specifici residui di tirosina, p53 p52/p46shc formano un complesso stabile con le TKs cellulari mediante il dominio SH2 o il dominio PTB. p46/p52shc fosforilate sono anche in grado di associare l' adattatore proteico Grb2 e di formare un complesso stabile con SOS, una proteina ubiquitariamente espressa che funziona da fattore di scambio per il proto-oncogene Ras. Il reclutamento di SOS alla membrana è in grado di convertire Ras nella forma attiva (fig. 23) e di attivare la cascata delle MAPK chinasi.

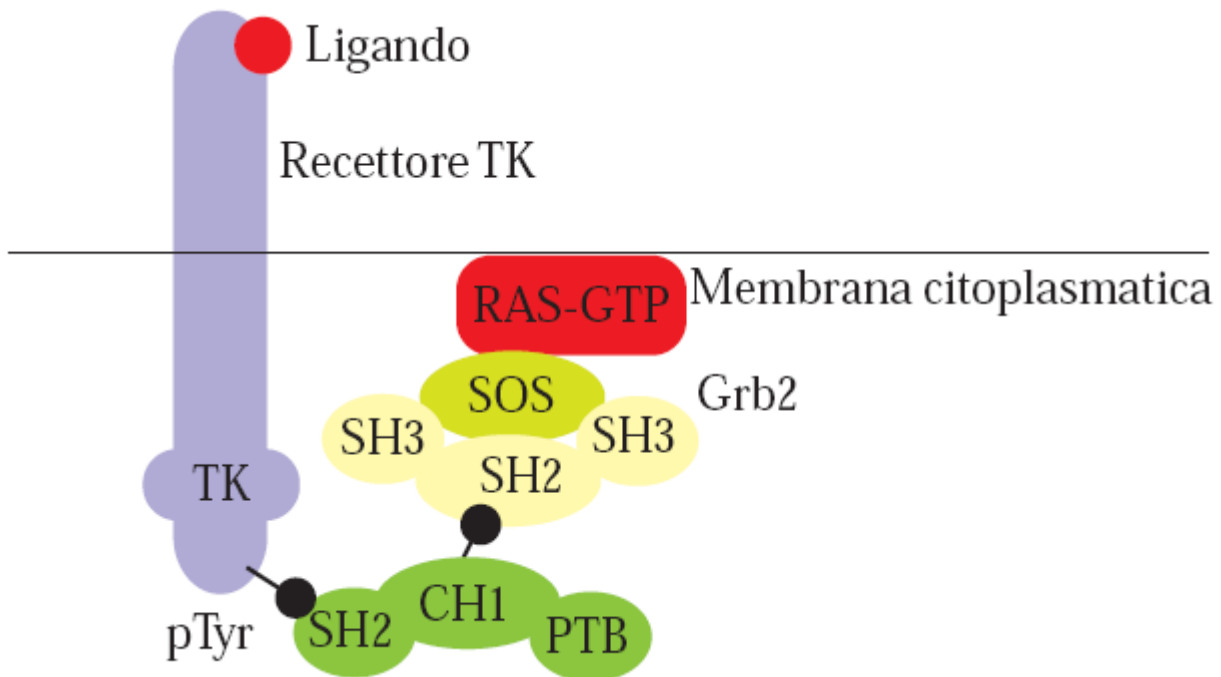


Fig. 23 Schema dell' attivazione del pathway delle MAP-chinasi per induzione di un recettore con attività tirosinichinasica (RTKs).

Il legame del ligando al recettore determina la dimerizzazione e l' autofosforilazione del recettore. Shc lega la tirosina fosforilata del recettore attivato e viene fosforilata.

La tirosina fosforilata di Shc può funzionare come un sito di legame per il dominio CH2 di Grb2. Grb2, che è localizzato nel citoplasma, è legato, costitutivamente, attraverso il dominio SH3 al C-terminale di SOS. A seguito di stimolazione con il ligando, Grb2 interagisce attraverso il suo dominio SH2 con la tirosina fosforilata del recettore attivato.

La traslocazione di Grb2-SOS dal citosol alla membrana porta SOS in prossimità della proteina Ras inattiva, associata alla membrana. SOS attiva Ras determinando la sostituzione di GDP con GTP. Ras legato a GTP porta all' attivazione del pathway delle MAP-chinasi

Alcuni studi hanno dimostrato che Shc ha un ruolo anche nella trasduzione dei segnali di sopravvivenza, regolando l' espressione di Bcl-2 (Lord JD. *et al.*1998). L' iperfosforilazione di Shc è stata identificata in molti tipi di tumori e linee cellulari tumorali tra cui cellule di prostata tumorali; pare inoltre che la proliferazione di cellule trasformate venga inibita dall' overespressione della proteina Shc dominante negativo (Agarwal R. 2000).

Shc è stata chiamata in causa anche nella organizzazione del citoscheletro in diverse cellule. In topi knockout per Shc si ha una riduzione della fibronectina dei fibroblasti embrionali (Lai KM and Pawson T. 2000).

1. 9.4 p66shc ROS E APOPTOSI

Alcuni studi hanno indicato che in risposta a segnali di stress, come un trattamento con H_2O_2 , la frazione citosolica di p66shc associata con una proteina heat-shock viene traslocata nel mitocondrio e media una risposta apoptotica (fig. 24) (Orsini F. et al. 2006).

p66shc in risposta a vari segnali di stress come H_2O_2 o dopo esposizione a raggi UV o a sostanze chimiche come il Taxol, ma anche in risposta a stimoli con EGF, insulina TPA, e endotelina-1, viene fosforilato sulla serina 36 che si trova sul dominio CH2 (Migliaccio E. et al. 1999; Yang CP and Horwitz SB, 2000). Pare inoltre che la fosforilazione in serina 36 di p66shc risulta essere determinante per una corretta risposta apoptotica dopo stress come H_2O_2 o raggi UV. Fibroblasti di topi knockout per p66shc, così come cellule trasfettate con un p66shc che contiene una mutazione: serina 36 sostituita con una alanina, hanno una maggiore resistenza all'apoptosi stimolata da una serie di stimoli come H_2O_2 , radiazioni UV, deprivazione di fattori di crescita; questi dati hanno suggerito una attività pro-apoptotica di p66shc (Pacini S. 2004).

L' eccessiva generazione di ROS a livello mitocondriale si verifica in seguito alla attivazione dell' onco-soppressore p53, proteina che gioca un ruolo fondamentale nell' arresto del ciclo cellulare, e nell' apoptosi. L' attività di p66shc sul metabolismo dei ROS sembra essere legata anche a p53 (Trinei M, Pelicci PG 2002).

p66shc è considerato un enzima redox capace di controllare il metabolismo mitocondriale e la produzione dei ROS, in particolare è stato visto che media il trasporto degli elettroni sulla catena respiratoria mitocondriale con conseguente fuoriuscita del citocromo c (M. Giorgio et al. 2005). La fosforilazione in serina 36 di p66shc è oggetto di vari studi con risultati contrastanti e poco chiari che ci danno una indicazione della complessità dei vari pathway che possono essere attivati in seguito a questa importante fosforilazione.

Siyuan Le e colleghi (2001) riportano che in seguito a radiazioni ultraviolette le chinasi responsabili della fosforilazione in serina 36 sono le JNKs, chiamate anche "stress-activated protein kinases" sono infatti le chinasi responsabili della trasmissione dei segnali extracellulari di stress. Queste chinasi sono attivate da radiazioni UV, da ipossia, agenti apoptotici. Pinton e colleghi inibendo la protein Kinase C β , dimostrano che p66 viene fosforilata in serina 36 proprio da questa chinasi in seguito alla stimolazione di H_2O_2 ; la fosforilazione di p66 shc induce tramite Pin1 la traslocazione di p66shc nello spazio intermembrana del mitocondrio dove troverà la proteina heat-shock mtHsp 70. L' interazione di p66shc con la mtHsp 70 è probabilmente mediata dalla defosforilazione di p66shc indotta dalla fosfatasi PP2A. All' interno del mitocondrio, p66shc

interagisce con il citocromo c inducendo la formazione di ROS, con conseguente aumento della permeabilità mitocondriale dunque apoptosi.

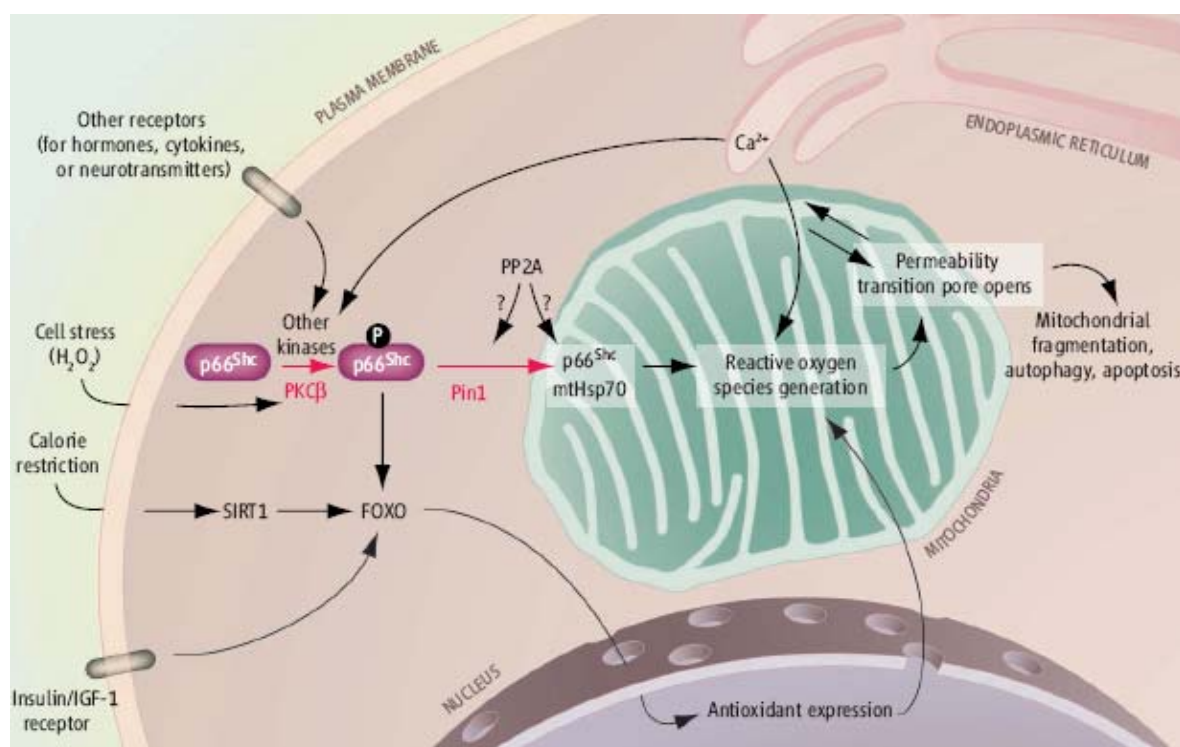


Fig. 24 Pathway di p66shc descritto da Pinton P. et al. 2007

Altri studi, invece, mettono in stretta relazione la fosforilazione di p66shc in serina 36 con ERK in seguito a stimolazione con di perossido di idrogeno, ma anche con siero. Esperimenti di coimmunoprecipitazione suggeriscono un' interazione fisica di p66shc con ERK1 in seguito a stimolo di perossido di idrogeno (Hu Y. et al. 2005).

In letteratura è riportato che p66shc modula l'attività di FOXO3a. FOXO3a controlla il ciclo cellulare, l' apoptosi e la risposta a stress ossidativi; FOXO3a appartiene ai membri di fattori trascrizionali forkhead, capaci di regolare la produzione di proteine antiossidanti (Catalasi SOD) e proapoptotiche (Tran H. et al 2003). L' attività di FOXO3a dipende dallo stato di fosforilazione della Thr32: la forma non fosforilata si trova nel nucleo ed è trascrizionalmente attiva, la forma fosforilata rimane inattiva nel citosol (Van Der Heide LP. et al. 2004). Il perossido di idrogeno sembra inattivare FOXO3a nel citoplasma, e la fosforilazione della Thr32 sembra essere effettuata da Akt chinasi che però richiede la fosforilazione della serina 36 di p66shc in risposta a stress ossidativi, infatti la fosforilazione di FOXO3a è drammaticamente ridotta in cellule p66 shc $-/-$. In cellule p66 shc $-/-$ FOXO3a, chiamato anche FKHL1, è costitutivamente attivo e induce alti livelli di catalasi che riduce la concentrazione di ROS. (Remoto S. and Finkel T. 2002). Inoltre p27 gene

bersaglio di FOXO3a è inibito da H₂O₂ in correlazione con la inattivazione di FOXO3a e la fosforilazione della serina 36 di p66shc. Quale è il significato biologico della riduzione dell' espressione di p27 in risposta allo stress ossidativo? p27 è un regolatore negativo della progressione del ciclo cellulare. p27 può avere un ruolo proapoptotico o antiapoptotico, ciò varia a seconda delle cellule e degli stimoli usati per indurre apoptosi (Katayose Y. et al. 1997; Hiromura K. et al 1999; Dijkers PF. et al 2000). Comunque studi condotti su MEFs p27^{-/-} comparati con le cellule di controllo indicano un ruolo proapoptotico di p27 in risposta a stimolo con perossido di idrogeno.

In letteratura sono riportati dati contrastanti anche riguardo l' effetto di p66shc ed ERK. È stato osservato che la fosforilazione indotta dall' EGF, in serina 36 di p66shc precede la fosforilazione delle tirosine di p66shc, e che solo la frazione non fosforilata di p66shc è associata con il recettore per l' EGF; inoltre la fosforilazione in serina 36 indotta dall' EGF pare regolare negativamente la via di MAPK (Okada S, Kao AW 1997). Al contrario la fosforilazione in serina 36 indotta da TPA pare attivare ERK; la stimolazione con TPA induce una fosforilazione anche in serina 138 di p66shc (Faisal A. *et al.* 2002).

L' endotelina-1 pare indurre fosforilazione in serina 36 di p66shc tramite attivazione di MAPK/ERK chinasi; in seguito a questo stimolo p66shc fosforilata in ser36 risulta essere associata con una famiglia di proteine le 14-3-3, che riconoscono residui di fosfoserine che si trovano in motivi altamente conservati. (Foschi M *et al.* 2001).

Le 14-3-3 sembrano essere implicate anch' esse in processi di regolazione apoptotica e controllo del ciclo cellulare. (Fu H. *et al.* 2000)

1. 9.5 SHC E RECETTORE DEGLI ESTROGENI

Alcuni studi hanno dimostrato come l' estradiolo induce una rapida fosforilazione di p52 p46 shc e una interazione con ER α (estrogen receptor α).

I recettori ERs (Estrogen Receptors) sono membri della superfamiglia dei recettori per gli ormoni steroidei. La via del segnale da essi attivata gioca un importante ruolo nello sviluppo delle normali funzioni del tratto riproduttivo, delle caratteristiche sessuali secondarie e del comportamento riproduttivo femminile (Muramatsu M. *et al.* 2000). La loro attivazione è indotta dal legame con gli estrogeni, ormoni di natura steroidea il cui precursore è il colesterolo.

L' estrone, l' estriolo e il 17- β -estradiolo sono gli estrogeni naturali. Gli estrogeni sono prodotti e secreti principalmente dalle ovaie, nelle donne prima della menopausa, e dal tessuto

adiposo negli uomini e nelle donne dopo la menopausa. E' attualmente noto che il segnale di trasduzione estrogenico è mediato da almeno due recettori: ER α e ER β (Kuiper GG, *et al.*, 1996; Katzenellenbogen BS, *et al.*, 1997). ER α (595 a.a.) e ER β (530 a.a.) presentano cinque domini funzionali: A/B, C, D, E, e F che esercitano 4 importanti funzioni: legame al ligando, dimerizzazione, legame al DNA e attivazione trascrizionale (Grandine K. *et al.* 1997). Essi mostrano un elevato grado di omologia aminoacidica all' interno del dominio di legame al DNA (DBD), una moderata conservazione aminoacidica all' estremità carbossi-terminale, dominio di legame con il ligando (LBD) ed una considerevole divergenza all' estremità ammino-terminale (fig. 25).

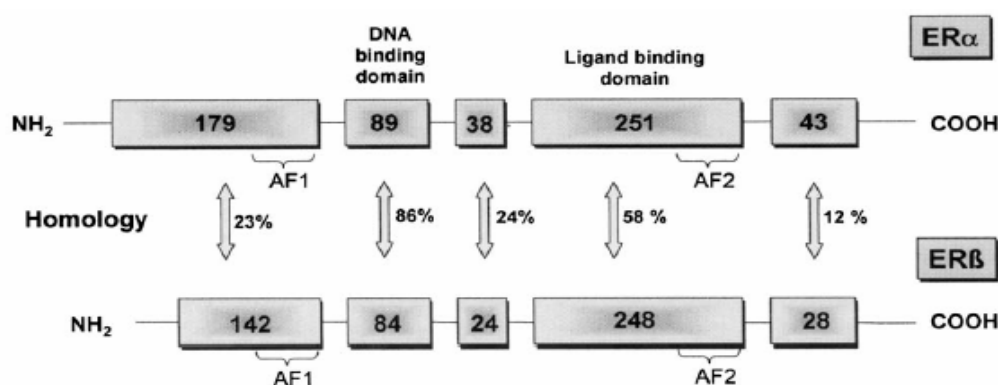


Fig. 25 Domini strutturali dei due recettori estrogenici ER α e ER β . ER α comprende 595 aminoacidi e ER β 530. Le percentuali (numeri tra parentesi) si riferiscono al tasso di omologia aminoacidica tra i due recettori.

In assenza dell' ormone, il recettore ER è sequestrato e mantenuto in uno stato inattivo dall' associazione con co-repressori in un complesso multiproteico inibitorio (Webb P, *et al.*, 1999). Il legame con gli estrogeni induce un cambiamento conformazionale di attivazione; i recettori si dissociano dal complesso inibitorio e l' ER viene fosforilato (Lieberman BA, 1997). Vi sono almeno cinque siti di fosforilazione nell' ER, quattro su serine in posizione aminoacidica 104, 106, 118 e 167 del dominio AB ed un altro in corrispondenza della tirosina in posizione 537 di LBD (fig. 26).

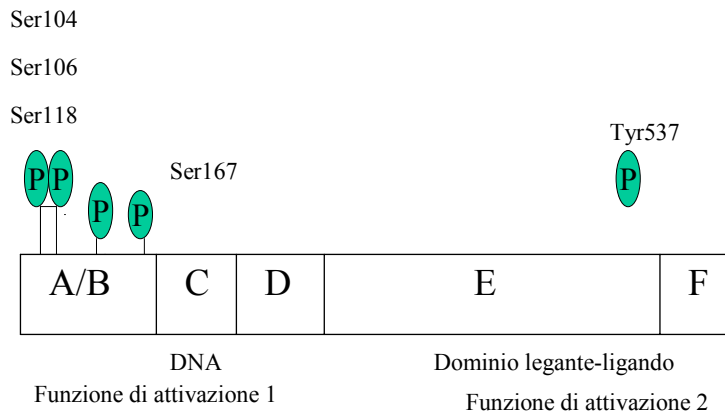


Fig. 26 Siti di fosforilazione e siti per il ligando ed il legame al DNA in ER α . La funzione di attivazione 1 è nel dominio A/B e la funzione di attivazione 2 è nel dominio E.

Diversi studi hanno dimostrato che la sovraesposizione delle cellule agli estrogeni altera il normale equilibrio di crescita. Livelli di estrogeni elevati sono spesso associati a maggiore proliferazione cellulare. Uno dei fattori di rischio per lo sviluppo del tumore al seno, così come di altri tumori ormone-dipendenti, sembra essere la sovraesposizione agli estrogeni endogeni che legandosi ai recettori possono causare la divisione e la replicazione incontrollata della cellula (Diel P. 2002).

È stato dimostrato con esperimenti di immunoprecipitazione che le forme p46/52Shc fosforilate in tirosina coprecipitano con ER α in seguito a stimolo con estradiolo E2 in cellule MCF-7. In particolare si forma un complesso proteico ER α -Shc-MAPK sotto la membrana cellulare che coinvolge l' IGF-1R (Insulin-like growth factor-1 receptor) (fig.27). L' attivazione di questa via potrebbe portare a inibizione dell' apoptosi e induzione della proliferazione cellulare incontrollata propria dei tumori per cui p46/52shc potrebbero mediare gli effetti degli estrogeni nel regolare la crescita cellulare (Zhang Z. *et al.* 2004). Questi risultati mirano capire quali sono le possibili vie di traduzione attivate nei tumori ormone-dipendenti cioè dovuti ad una continua attivazione dei recettori ER α ed ER β in seguito a stimolazione con estrogeni.

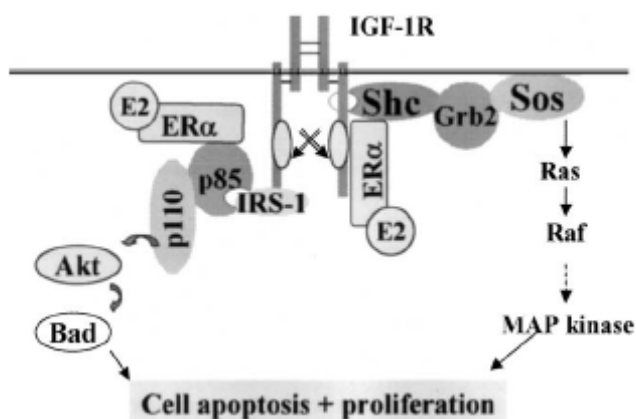


Fig. 27 Formazione del complesso proteico $ER\alpha$ -Shc-MAPK

1. 9.6 p66shc ISCHEMIA ED ATEROSCLEROSI

Topi p66shc^{-/-} sembrano essere più resistenti al danno ossidativo indotto dall' ischemia rispetto ai topi wild-type. Nei topi p66shc^{-/-} sono stati riscontrati livelli più bassi di ROS dopo induzione di ischemia, e un ridotto danno ai tessuti muscolari e vascolari, con ridotte zone di necrosi rispetto ai topi normali. La mutazione di p66shc induce resistenza al danno ischemico.

Nei topi wild-type invece in seguito a ischemia si è trovata un'alterazione della mobilità elettroforetica di p66shc probabilmente dovuta alla fosforilazione in serina 36 in seguito all' aumento della produzione dei ROS nei tessuti interessati dal danno.

p66shc pare avere un ruolo importante nei pathways di morte cellulare attivati da ischemia (Zaccagnini G. *et al.* 2004).

p66shc pare avere un ruolo importante anche nell' aterosclerosi, in topi p66shc^{-/-} con ipercolesterolemia sono stati riscontrati ridotte aree di lesioni dell' aorta, ridotta ossidazione della parete delle arterie, una significativa riduzione di apoptosi nelle varie lesioni provocate dall' aterosclerosi, livelli sierici più bassi dei prodotti dall' ossidazione degli acidi grassi polinsaturi. L' assenza di p66shc potrebbe contribuire alla protezione di meccanismi multipli di aterogenesi indotti da una dieta ricca di grassi (Napoli C. *et al.* 2003).

p66shc pare essere implicato in varie malattie degenerative, rappresenta dunque un possibile bersaglio molecolare terapeutico.

1. 9.7 p66shc E TUMORIGENESI

In cellule di carcinoma umano, p66shc potrebbe essere coinvolto nella regolazione della loro proliferazione. In linee cellulari di cancro alle ovaie è stata trovata una correlazione positiva tra p66shc e Erb- β , dunque questa correlata espressione potrebbe risultare un marker per identificare cellule cancerogene. (Xie and Hung 1996). È stato dimostrato che ormoni steroidei inclusi estrogeni e androgeni aumentano i livelli della proteina p66shc in cellule di carcinoma umano (Lee MS. *et al.* 2004). Dunque i livelli di p66shc in cellule tumorali umane, sono alterati da vari trattamenti terapeutici a cui vengono spesso sottoposti i pazienti soprattutto in seguito a terapia ormonale. Sono stati effettuati studi anche su diverse linee cellule tumorali in vitro, in molte delle quali è stata riscontrata una overespressione di p66shc (Jackson JG. *et al.* 2000).

Livelli significativamente alti sono stati riscontrati in cellule tumorali di prostata (PCa). Sembra inoltre che cellule di prostata trasfettate con cDNA capace di esprimere p66shc, hanno un ciclo proliferativo più veloce rispetto a cellule di controllo. Cellule knock-down per p66shc, ottenute con il silenziamento del gene, hanno una riduzione del ciclo proliferativo. Questi studi mettono in diretta correlazione l' espressione di p66shc con la regolazione della proliferazione cellulare, a cui non partecipano le altre due isoforme p52/p46shc (Veeramani S. *et al.* 2005).

I meccanismi con cui p66shc è coinvolto nella regolazione del ciclo proliferativo sono ancora oggetto di numerosi studi; comunque in cellule overesprementi p66shc si ha una attivazione di ERK/MAPKs, in cellule knock-down per p66shc si nota una inibizione del pathway ERK/MAPK. In altre linee cellulari tumorali p66shc potrebbe essere inattivato ed avere un ruolo antiapoptotico, in particolare è stato riscontrato in cellule di melanoma umano che p66shc si lega a MIA (Melanoma Inhibitory Activity) proteina che ha un ruolo importante nella progressione e nella induzione di metastasi in melanomi maligni. Il legame di p66shc a MIA sembra inibire l'effetto proapoptotico di p66shc (Kasuno K. *et al.* 2007).

2. SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo del lavoro sperimentale presentato è stato l'analisi degli effetti molecolari e cellulari degli antiossidanti alimentari su alcune colture cellulari.

In particolare è stata studiata l'azione antiossidante del resveratrolo in cellule di epatoma di ratto (RH7777). Si è verificato se condizioni di stress ossidativo influenzassero il legame del fattore trascrizionale PPAR α al DNA, e se il resveratrolo potesse modificare l'attività di legame al DNA di PPAR α attraverso la regolazione delle chinasi ERK 1/2.

Si è voluto indagare se le influenze dello stress ossidativo e del resveratrolo sull'attività di legame di PPAR α fossero in grado di modulare l'espressione del gene bersaglio perossisomiale *Aco* e i livelli proteici di PPAR α .

È stato anche studiato l'effetto del resveratrolo e della epigallocatechina gallato su eventi cellulari collegati alla crescita neoplastica in cellule di prostata e in cheratinociti in coltura.

In dettaglio si è valutato l'effetto del resveratrolo e dell'EGCG sulla proliferazione cellulare e sulla attivazione della proteina p66shc, proteina che risulta essere determinante per una corretta risposta apoptotica dopo stress ossidativo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

Le cellule McArdle-RH7777 (RH7777) costituiscono una linea cellulare che è stata originariamente prodotta nel 1974 da J. Becker e deriva dalla generazione n. 115 (propagata in ratti maschi del ceppo buffalo) dell'epatoma trapiantabile Morris 7777, indotto somministrando il carcinogeno acido N-2 fluorenilftalamico ad un ratto femmina della linea buffalo.

Le cellule EPN (Epitelio di Prostata Normale) sono cellule epiteliali non trasformate di prostata e le cellule EPN-PKM3 sono state ottenute dalla trasfezione delle EPN con un plasmide contenente PKM, un mutante negativo di Pyk2.

La linea cellulare HaCaT è stata originata da cheratinociti umani della cute immortalizzati.

Le cellule RH7777 sono state coltivate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ad alto glucosio, completato con 10% siero bovino fetale, 10% siero di cavallo (GIBCO Invitrogen Italia s.r.l.), e con 50 unità/ml penicillina, 50 µg/ml streptomina e 2 mM glutammina.

Le EPN e le EPN-PKM3 sono state coltivate in KSFM (Keratinocyte serum-free medium) complementato con Bovine Pituitary Extract, 3% siero bovino fetale (GIBCO Invitrogen Italia s.r.l.). Le cellule HaCaT sono state coltivate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ad alto glucosio, completato con 10% siero bovino fetale, (GIBCO Invitrogen Italia s.r.l.), e con 50 unità/ml penicillina, 50 µg/ml streptomina e 2 mM glutammina.

Tutte le cellule sono state coltivate in atmosfera sterile umidificata a 37°C al 5% di CO₂.

Tutti i trattamenti, tranne quelli non specificati, sono stati effettuati dopo 24 ore dal piastramento. Le cellule in coltura sono state trattate con dietilmaleato 1 mM (DEM), con trans-resveratrolo (SIGMA ALDRICH cod. R5010), epigallocatechina gallato (EGCG) (SIGMA ALDRICH cod. E4143) a varie dosi e tempi, uno specifico inibitore di MEK1/2 U0126 (50 µM) (Promega V112A).

3.2 Dosaggio del GSH

Le cellule adese alle piastre vengono lavate in PBS freddo per tre volte e successivamente vengono raccolte in 1 ml di PBS per piastra, trasferite in tubi da 1,5 ml e centrifugate a 4000 g per 10 min. Dopo aver aspirato il sovrantante, ad ogni pellet si aggiungono 100 µl di Acido Perclorico al 3% che si lascia agire per 15' a 4°C per lisare le cellule. I campioni vengono poi centrifugati a 2000

rpm per 10' a 4°C. Il surnatante viene neutralizzato con 0.1 ml di NaH₂PO₄ 0.1 M e con EDTA 0.5 M, pH 7.5. Dopo la neutralizzazione viene aggiunto acido nitrobenzoico alla concentrazione finale di 600 µM, un' unità di glutatione reduttasi e 0,21 mM NADPH. Il GSH reagisce con l'acido nitrobenzoico formando un prodotto colorato e un disolfuro misto che, a sua volta, reagisce con ulteriori quantità di GSH per liberare altri ioni e GSSG. Il GSSG è ridotto a GSH ad opera della glutatione reduttasi e ricomincia il ciclo. Misurando le variazioni di lettura dell'acido nitrobenzoico a 412 nm si ha una misura dei livelli di GSH nelle cellule. I livelli di GSH misurati vengono normalizzati rispetto ai mg di proteine. Infatti il pellet ottenuto dalla lisi in acido perclorico viene risospeso in NaOH 1M per solubilizzare le proteine che vengono successivamente quantizzate con il dosaggio Bradford.

3. 3 Estrazione di proteine nucleari per il saggio EMSA (Metodo di Osborne)

Per minimizzare la degradazione delle proteine e soprattutto per preservare la struttura attiva dei recettori nucleari tutti i passaggi dell' estrazione sono stati eseguiti in camera fredda e sono state utilizzate soluzioni a 4° C.

Prima dell' estrazione le cellule sono state lavate 2 volte con 5 ml di PBS freddo, raccolte con lo scraper, trasferite in un tubo di polistirene da 15 ml a fondo conico, centrifugate per 5' a 1000 g a 4°C. Il pellet cellulare è stato poi risospeso in 50 µl di un tampone (10 mM Hepes pH 7,9; 0,1 % NP-40; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT; 10 µg/ml Aprotinina, 10 µg/ml Leupeptina e 2 mM PMSF) adatto a lisare la membrana plasmatica. Il campione è stato incubato per 10 min. a 4°C e successivamente centrifugato a 4° C a 13.000 g per 10 min; la centrifugazione consente la separazione dei nuclei. Al surnatante, contenente le proteine citoplasmatiche, si aggiunge un volume di una soluzione contenente 20 mM Hepes pH 7,9; 40 % Glicerolo; 0,2 mM EDTA; 100 mM KCl; 10 µg /ml Aprotinina, 10 µg / ml Leupeptina e 2 mM PMSF.

Il pellet, contenente i nuclei è, invece, risospeso in una soluzione (20 mM Hepes pH 7,9; 25 % Glicerolo, Aprotinina; 0,2 mM EDTA; 1,5 mM MgCl; 420 mM NaCl; 0,5 mM DTT; 10 µg/ml; 10 µg/ml Leupeptina e 2 mM PMSF) che consente la lisi della membrana nucleare. Dopo incubazione di 10 min. a 4°C la miscela è centrifugata a 13000 g a 4°C per 10 min.; il surnatante, contenente le proteine nucleari. è trasferito in un tubo pulito.

Tale saggio è stato effettuato utilizzando il Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milano) e seguendo le indicazioni del produttore. In breve, a 1 ml di reagente BIO-RAD

diluito 1:5 (200µl di BIO-RAD e 800 µl di dH₂O) sono stati aggiunti 2 µl di estratto proteico. Dopo l'incubazione a RT per 5 min i campioni, posti in cuvette di polistirene, vengono letti allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. La concentrazione proteica è stata calcolata sulla base di una curva standard precedentemente allestita. Gli estratti nucleari, suddivisi in aliquote 100 µg, sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -80°.

3. 4 Misurazioni spettrofotometriche

La spettrofotometria consente di rilevare la concentrazione di una sostanza in base alla sua capacità di assorbire luce. La quantità di luce assorbita da una molecola è espressa come “assorbanza” o “densità ottica” (O.D.) e lo strumento attraverso il quale si effettua tale misurazione è lo “spettrofotometro”. In questo lavoro sono state effettuate le determinazioni spettrofotometriche delle concentrazioni di DNA, proteine ed aldeidi.

La materia può interagire con la radiazione elettromagnetica causandone deviazione o assorbimento di energia per transizioni tra livelli energetici degli atomi e delle molecole colpite dalla radiazione stessa. Lo spettrofotometro consente le misure di assorbimento molecolare nel visibile e nell'ultravioletto. Esso consiste essenzialmente di una sorgente luminosa, un monocromatore (che seleziona la lunghezza d'onda), un contenitore trasparente del campione, un rilevatore di luce ed un misuratore per determinare il segnale in uscita del rilevatore; si può così misurare il cambiamento subito da un fascio di luce che colpisce un campione.

Il dosaggio Bradford è un metodo molto diffuso perchè semplice, rapido, economico e sensibile. Esso si basa sull'azione del Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG) che si lega specificatamente a residui di arginina, triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina, ma particolarmente con i residui di arginina (8 volte più che con gli altri residui elencati); di conseguenza le determinazioni possono risultare falsate se si misura un campione in cui la concentrazione relativa di arginina si discosti sensibilmente da quella dello standard utilizzato. In tal caso è preferibile utilizzare uno standard che abbia una composizione percentuale in arginina simile a quella del campione da analizzare. Il CBBG si lega a questi residui in forma anionica, con assorbanza massima a 595 nm (Il colorante nella soluzione madre si trova in forma cationica ed ha un massimo di assorbanza a 470 nm). Fissandosi sulle proteine il Coomassie brilliant blue ne modifica lo spettro di assorbimento; l'intensità della colorazione, rilevata allo spettrofotometro a 595 nm, per la legge di Lambert-Beer deve risultare proporzionale alla concentrazione di proteine presenti nel campione. Dal valore di

assorbanza si può risalire alla concentrazione incognita di ciascun campione interpolando il valore di assorbanza su una curva standard di BSA (albumina sierica bovina), in alternativa vengono utilizzati altri standard come l'immunoglobulina G (IgG), o l' ovoalbumina.

Nel nostro caso abbiamo costruito una retta di taratura utilizzando una soluzione a titolo noto di Albumina Serica Bovina (BSA). I campioni sono stati diluiti e saggiati con il reattivo Bio-rad e l' assorbanza determinata per ciascuno di essi è stata trasformata in un valore di concentrazione.

Nel caso dell' acido nucleico, è stata diluita un' aliquota di ciascun campione purificato ed è stato determinato attraverso la lettura spettrofotometrica il valore di assorbanza a 260 nm. Un opportuno calcolo è stato eseguito per ottenere il valore di concentrazione. Tenendo conto che 40 µg di RNA generano un valore di 1 O.D. allora è stato possibile trasformare i valori di O.D. in µg di RNA per ml di soluzione.

3. 5 Ibridazione degli oligonucleotidi senso ed antisenso

Gli esperimenti di EMSA (Electromobility Shift Assay) sono stati condotti utilizzando come sonda un oligonucleotide a doppio filamento di 24 paia di basi contenente l'elemento di risposta ai PPARs del gene dell' acil-CoA ossidasi (ACO) ed avente la seguente sequenza:

- PPRE ACO: 5'-GAACGTGACCTTTGTCCTGGTCCC-3' (Osumi 1987)

1,6 µg di oligo senso ed 1,6 µg di oligo antisenso sono stati ibridati (annealing) in una soluzione (10X Annealing Buffer) composta da 670 mM Tris- HCl, 130 mM MgCl, 1,3 mM spermidina, 13 mM EDTA pH 8,0 e 67 mM DTT ed incubando sequenzialmente per 2' a 88°C, per 10' a 65°C, per 10' a 37°C ed infine per 5' a 25°C.

Lo stesso protocollo è stato utilizzato per l' elemento di risposta (RE) a Sp1 la cui sequenza è contenuta nel seguente oligonucleotide da noi utilizzato:

Sp1 RE: 5'- ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3'

3. 6 Marcatura terminale degli oligonucleotidi

Gli oligonucleotidi annilati sono stati marcati con una reazione di chinasi. 10 ng/µl di oligonucleotide a doppia elica sono stati incubati per 1h a 37°C con 4 µl di ³²P-γdATP (Redivue, 370 MBq/ml, 10

mCi/ ml), 0,5µl di T4-polinucleotide chinasi (10 U/ml), 2 µl di 10X buffer chinasi, 1µl 100 mM DTT in un volume finale di 20 µl.

3. 7 Purificazione degli oligonucleotidi marcati

Gli oligonucleotidi marcati sono stati purificati con cromatografia per gel-filtrazione. 10 g di resina Sephadex G-50 vengono risospesi in 160 ml di dH₂O ed autoclavata per 30' a 120°C. La colonna cromatografica è stata preparata utilizzando resina G-50 reidratata ed impaccata in una siringa da 1 ml che porta sul fondo una piccola quantità di lanavetro. L' impaccamento ottimale è stato ottenuto con centrifugazione per 5' a 800 g. La resina consiste di un polimero con legami trasversali che formano pori di un determinato diametro. Le molecole più grandi migrano più velocemente di quelle piccole, in quanto sono troppo grandi per entrare nei pori della resina e quindi devono attraversare uno spazio minore per raggiungere il fondo della colonna. Le molecole più piccole entrano nei pori e di conseguenza impiegano più tempo (aumento del tempo di ritenzione) per arrivare al fondo della colonna. Una volta caricato il probe marcato, centrifugando per 5' a 800 g, vengono eluiti per primi dalla colonna gli oligonucleotidi marcati, mentre il ³²P-γdATP presente in eccesso nella reazione di marcatura e che quindi non si è legato all'oligonucleotide, rimane nei pori della resina. 2 µl di eluato sono utilizzati per la conta allo scintillatore secondo il metodo Cerenkov, stimando un' efficienza di rilevamento delle disintegrazioni atomiche del 50%. E' possibile quindi calcolare il numero di conte per minuto (cpm) per ng di oligonucleotide e quindi il numero di ng corrispondenti alle 50.000 cpm che si utilizzano per il saggio EMSA.

3. 8 Saggio di variazione della mobilità elettroforetica (EMSA)

L' oligonucleotide a doppia elica marcato è stato incubato con le proteine nucleari in un tampone (Li, Mendelson 1998) contenente 20 mM Hepes pH 7,6; 75 mM KCl; 0,2 mM EDTA pH 8,0; 20% glicerolo per permettere il legame tra DNA e proteine. Precedentemente, 10 µg di estratti nucleari sono stati incubati per 20' a 4°C con una miscela di reazione contenente 10 µl di Binding Buffer 2X, 1µl di poli-dI/ dC (1µg/µl) e dH₂O fino ad un volume finale di 20µl. Il Poli-dI/ dC è un polimero sintetico che si lega in maniera aspecifica alle proteine e riduce quindi la probabilità di formazione di altri legami aspecifici tra le proteine stesse e l' oligo marcato. Successivamente sono stati

aggiunti 50.000 cpm di oligo marcato con eventuale aggiunta di oligonucleotide non marcato in eccesso (ACO 100X) per l' esperimento di competizione specifica. Dopo 20' di incubazione a 25°C, alla miscela di reazione sono stati aggiunti 5 µl di Ficoll 25% per addensare il campione che è quindi stato caricato su di un gel verticale di poliacrilammide al 6%. La migrazione viene effettuata in 0,25X TBE, a 4°C, a 200V (voltaggio costante) per circa 4 ore. Il gel viene poi trasferito su carta Wathman, essiccato per un'ora su Gel-dryer ed esposto ad una lastra autoradiografica a -80°C per intervalli di tempo variabili (12, 24 ore).

3. 9 Inibizione del saggio EMSA con anticorpi

Per tale saggio, è stato utilizzato un anticorpo (anti-PPAR α H98 Santa Cruz 200µg/100µl) contro PPAR α di ratto che riconosce nello specifico i primi 98 amminoacidi all' N-terminale. Il legame dell'anticorpo a questa regione dovrebbe determinare un' inibizione del legame di PPAR α al PPRE, essendo il dominio di legame al DNA di PPAR α molto vicino alla regione riconosciuta da questo anticorpo.

DOMINI DI PPARα (ratto)	a.a.
DNA BINDING	102 – 166
ZINC FINGER	102 – 122
ZINC FINGER	139 – 161
LIGAND-BINDING DOMAIN	281 – 468

10 µg, 5 µg, 2 µg di estratti nucleari sono stati incubati con 2 µl di anti-PPAR α a 4°C per 60' e 120' nella stessa miscela di reazione utilizzata anche per il Band Shift. Da questo passaggio in poi il protocollo seguito è uguale a quello dell' EMSA

3. 10 Estrazione di proteine totali da cellule in coltura

Dopo 3 lavaggi con 4 ml di PBS (Phosphate-Buffered Saline), si aggiungono 150 µl di tampone di lisi J.S. ad ogni piastra da 100 mm. Il tampone di lisi (J.S. Lysis Buffer) contiene 2 mM MgCl₂, 200 mM NaCl , 70 mM HEPES pH 7, 5,7 mM EGTA, 1,3% Triton, e 1,3% glicerolo. A 10 ml di

tampone prima dell'uso si aggiungono una pasticca di Protease inhibitor cocktail-complete Mini (Roche), 0.5 mM di Sodio Ortovanadato, 20 mM di sodio pirofosfato, 100 mM Sodio Fluoruro, Le cellule si raccolgono con lo scraper e si trasferiscono in tubi da 1,5 ml. Il campione viene quindi incubato in ghiaccio per 30 min., per completare la lisi della cellula e dei nuclei, e sottoposto a centrifugazione a 13000 rpm per 10 min a 4°C.

Il surnatante costituisce la miscela delle proteine totali cellulari risospese nel tampone, sulla quale viene effettuato il dosaggio delle proteine totali utilizzando il saggio Bradford. Dopo la quantizzazione l'estratto è diluito con un volume di tampone di carica 2X (4% SDS, 20% glicerolo, 10% 2-mercaptoetanololo, 0.004% blue di bromofenolo in 0.125 M tris HCl), aliquotato e conservato a -80° C.

3. 11 Immunoprecipitazione

L'immunoprecipitazione è una tecnica che permette di isolare una proteina da un estratto proteico totale, utilizzando uno specifico anticorpo. E' stato utilizzato un anticorpo che riconosce le tre isoforme di SHC, p66, p52, p46 (polyclonal Immunological Science cat. AB-10199).

Per ogni campione 5 mg di proteina A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare cat. 17-0780-01) vengono risospesi in 500 µl di tampone HNTG (20mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton-X-100, 5% glicerolo), e incubati con l'anti-Shc (5µl per campione) per 1 h a 4°C in modo da far avvenire il legame dell'anticorpo alla resina. I campioni vengono quindi sottoposti a 3 cicli di lavaggio mediante ripetute centrifugazioni (13000 rpm per 1 min) e risospensioni del sedimento in nuovo HNTG per allontanare l'anticorpo in eccesso. 1 mg di estratto totale viene aggiunto al complesso resina- anticorpo ed il tutto viene incubato O.N. a 4°C. I campioni vengono lavati per 3 volte con HNTG in modo da eliminare le proteine in eccesso, la resina viene quindi risospesa in 30 µl di tampone di carica 2X e poi incubati a 70°C per 30 minuti. Durante l'incubazione si rompono i legami resina-anticorpo-proteina, per cui centrifugando (13000 rpm per 1 min) separiamo la resina dal sovrinatante che conterrà le tre isoforme di Shc e le immunoglobuline utilizzate. Il campione viene quindi analizzato mediante Western Blotting.

3. 12 Western Blotting

Il Western Blotting è una delle tecniche d'elezione per separare le proteine ed analizzarle, sia quantitativamente che qualitativamente; esso sfrutta l'interazione specifica antigene-anticorpo, in questo caso, per valutare gli effetti sui livelli proteici dei trattamenti eseguiti sulle cellule in coltura. A tal fine, estratti proteici di cellule opportunamente trattate, sono stati separati elettroforeticamente, trasferiti su membrana e incubati con l'anticorpo specifico.

Un western blotting consiste nei seguenti passaggi:

SDS PAGE: L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE) ha come scopo quello di separare le proteine esclusivamente in base al peso molecolare. Nell' SDS-PAGE le proteine vengono esposte al detergente sodio dodecil solfato o SDS ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3^-\text{Na}^+$) che, legandosi alle regioni idrofobiche delle proteine, ne determina la denaturazione. Inoltre, si aggiunge un agente riducente, il β -mercaptoetanolo che rompe eventuali ponti disolfuro sia intra- che inter-catena. Il risultato finale è che le proteine trattate con SDS e β -mercaptoetanolo conservano solo la struttura primaria e si comportano come se avessero la stessa forma (ripiegamento casuale) e lo stesso rapporto carica-massa; le cariche negative dell' SDS legato alle proteine, infatti, annullano la carica intrinseca della proteina nativa. Il gel di acrilammide è stato preparato con:

- gel di corsa: 12%, 10% e 7% di Acrilammide-Bis (Sigma cat. num.: A-3574): 29% acrilammide, 1% bis-acrilammide), 375 mM Tris HCl pH 8.0, 0.1 % SDS, 0.1 % APS, 0.1 % TEMED.
- gel di impaccamento: 4% Acrilammide-Bis, 125 mM Tris HCl pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.1 % APS, 0.1 % TEMED.

Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato il SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard Invitrogen cat. No.LC5925), contenente 10 proteine che coprono l'intervallo di peso molecolare da 4 a 250 kDa.

Trasferimento delle proteine su filtro ad opera di un campo elettrico. Dopo la separazione le proteine sono state trasferite dal gel su una membrana di PVDF attraverso "elettroblotting" che consiste nell'associare il trasferimento per capillarità a quello per elettroforesi; esso si ottiene utilizzando un apparato specifico per il trasferimento (in questo caso il trans-blot transfer Biorad), nel quale si assemblano correttamente dal basso verso l'alto due fogli di carta Whatman, il gel, il filtro PVDF ed altri due fogli di carta Whatman; tutti i componenti devono essere bagnati in un buffer di trasferimento composto da 39 mM glicina, 48 mM Tris base, 48 mM SDS e 20% metanolo. Il trasferimento è effettuato per 3 h a 50 V corrispondenti a 100 mA. Le proteine legate alla membrana diventano quindi disponibili per varie interazioni ligando-proteina.

Blocco dei siti di legame aspecifici: Dopo il trasferimento, i potenziali siti di legame non specifico con l' anticorpo presenti sulla membrana vengono bloccati con un tampone cosiddetto di blocco. Il filtro PVDF viene incubato per 12-24 ore a 4°C con 20 ml di Blocking Buffer (20 mM Tris-HCl a pH 7.5-150 mM NaCl, 0.05%Tween-20, 5%latte in polvere o 5% BSA).

Incubazione con anticorpi primario e secondario: L' incubazione degli anticorpi primario e secondario/coniugato seguono il blocco. Il filtro, viene incubato con 6 ml di tampone di incubazione (composto da 20 mM Tris-HCl a pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20, 5%latte in polvere o 5% BSA) in cui viene opportunamente diluito l' anticorpo primario; il tempo di incubazione varia in relazione all'anticorpo utilizzato. Nel nostro caso sono state utilizzate le seguenti diluizioni:

- anti- β actina (SIGMA cat. Num. A5441, diluizione 1:10000, incubazione di 1 h);
- anti-PPAR alpha (Santa Cruz cat. H98X diluizione 1: 2000; incubazione di 1 h).
- anti-fosfo PPAR alpha (Calbiochem cat. diluizione 1: 2000; incubazione di 1 h)
- anti-Aco (da Stephan Alexon, diluizione 1:10000, incubazione di 1h);
- anti-Erk 1/2(Santa Cruz cat. sc-94-G, diluizione 1:1000, incubazione di 1h);
- anti-fosfo Erk 1/2 (Cell Signaling cat.#9101S, diluizione 1:1000, incubazione O.N. 4°C);
- anti-Akt (diluizione 1:1000, incubazione O.N.);
- anti fosfo Akt/PKB (Cell Signaling cat. diluizione 1:1000 incubazione O.N. 4°C).
- anti fosfo p66shc seina 36 (Calbiochem cat. 566807, diluizione 1:1000 incubazione O.N. 4°C)
- anti SHC (BD-Transduction Laboratories cat. 610878 Diluizione 1:1000 incubazione 1h)
- anti fosfo-PYK2 [pY402] (Biosource International cat. #44-618 diluizione 1:1000 incubazione O.N. 4°C)

Successivamente si effettuano 4 lavaggi con tampone di lavaggio (20 mM Tris-HCl a pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1%Tween-20); il filtro viene poi incubato per 1h su piastra basculante con un anticorpo secondario "HRP- linked" (Kit RPN2124 Amersham) le cui condizioni di incubazione sono:

- anti-mouse (diluizione 1:3000, incubazione di 1h);
- anti-rabbit (diluizione 1:3000; incubazione di 1 h).

Rivelazione: La membrana PVDF viene incubata con un substrato della perossidasi che consente la rivelazione della proteina di interesse per chemiluminescenza (Kit di rivelazione: ECL Western Blot Detection Reagents, Amersham).

3. 13 Conta delle cellule

La conta delle cellule è stata eseguita con metodica manuale, con l'ausilio di un apposito emocitometro (camera di Bürker), che consente il conteggio delle cellule al microscopio in spazi a volume noto. Una piccola quantità di sospensione cellulare è trasferita per capillarità nell'intercapedine che separa il vetrino portaoggetti dal vetrino coprioggetti.

Ciascun quadrato dell'emocitometro, con il coprioggetto in posizione, ha un volume di 0.1 mm^3 o di 10^{-4} cm^3 . Essendo 1 cm^3 equivalente ad 1 ml, la concentrazione di cellule per ml sarà determinata con il seguente calcolo:

$$\text{Cellule per ml} = \text{conteggio medio per quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

Partendo dalla prima camera sono state contate le cellule nel quadrato centrale da 1 mm e nei 4 quadrati da 1 mm agli angoli.

4. RISULTATI I PARTE

4.1 Effetto del DEM sui livelli intracellulari del Glutatione ridotto (GSH) in cellule RH7777

Mediante la stimolazione delle cellule RH7777 con il dietilmaleato (DEM) è stato indotto stress ossidativo. Per verificare l'effetto del DEM sulla concentrazione intracellulare di GSH nel nostro sistema sperimentale, abbiamo misurato i livelli di GSH nelle cellule RH7777 trattate per 15, 30, 60 e 120 minuti con 1 mM DEM. Il saggio colorimetrico del GSH ci ha permesso di ottenere i risultati riportati in figura 1.

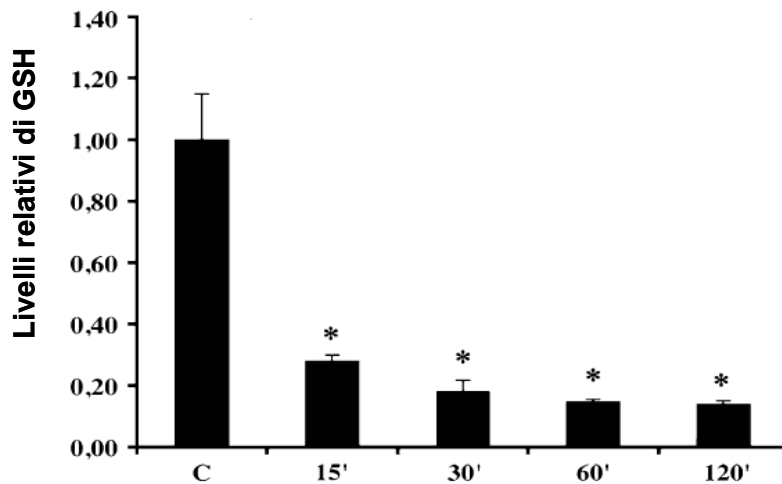


Fig. 1 Livelli di GSH in cellule McA-RH7777, prima e dopo somministrazioni, a vari tempi, di 1 mM DEM (n=3). La barra di errore rappresentano la deviazione standard (SD). L'asterisco indica una $p < 0.01$ (test di Dunnett).

Questi risultati dimostrano che la diminuzione del GSH è rapida e consistente, raggiungendo un valore del 30% dopo appena 15 minuti di trattamento ($p < 0.01$). I livelli di GSH continuano a ridursi fino a 120 minuti di trattamento, ma in maniera molto meno marcata, raggiungendo un valore pari a circa il 15% rispetto alle cellule di controllo ($p < 0.01$).

4. 2 Effetto dello stress ossidativo indotto da DEM sull' attività di legame di PPAR α al PPRE di ACO

Avendo dimostrato che il DEM è in grado di ridurre i livelli intracellulari di GSH, il che è noto alterare l' equilibrio redox intracellulare determinando stress ossidativo, attraverso la metodica dell' EMSA è stato verificato se il trattamento con 1mM DEM in cellule di epatoma di ratto McA-RH7777, alterasse la capacità del recettore PPAR α negli estratti proteici nucleari di legare il PPRE del gene bersaglio dell' acil coenzima A ossidasi (ACO); in tal modo possiamo misurare l' effetto dello stress ossidativo sull' attività di legame al DNA dei PPARs e quindi sulla regolazione dell' espressione genica. Per la validità della metodica sono necessari una serie di controlli tra i quali una prova della specificità del legame DNA-proteina, legame che è evidenziato dalla presenza di bande di DNA radioattive con ridotta mobilità elettroforetica. Il controllo di specificità è fornito dalla competizione tra l' oligonucleotide marcato contenente il PPRE di ACO ed un eccesso molare di 100 volte dello stesso oligonucleotide non marcato. La specificità della competizione e quindi l' assenza negli estratti nucleari di altri fattori che interferissero con il legame specifico PPAR α /DNA dovrebbe essere dettata da una riduzione netta o ancor meglio la scomparsa della banda radioattiva ritardata per spiazzamento del frammento di DNA radioattivo da parte dell' eccesso di quello non radioattivo (fig. 2). Un ulteriore controllo consiste in una competizione aspecifica tra l' oligonucleotide contenente il PPRE di ACO ed un oligonucleotide aspecifico, cioè che non contiene il PPRE, ma ad esempio un elemento di risposta per un altro fattore di trascrizione come Sp1, usato sempre ad una concentrazione 100X rispetto alla concentrazione dell' oligonucleotide marcato. Il risultato atteso è che la banda ritardata risulti della stessa intensità anche in presenza dell' eccesso molare di 100 volte dell' oligonucleotide aspecifico non marcato.

Abbiamo quindi stimolato le cellule con DEM alla concentrazione di 1mM per 15', 30', 60', 120'. In figura 2 è riportato un saggio EMSA rappresentativo di più esperimenti simili, in cui sono stati usati 10 μ g di estratti nucleari da cellule McA RH7777. Il saggio è stato effettuato in duplicato per tutti i punti sperimentali. Come si può osservare nella figura 2 si verifica una riduzione dell' interazione DNA-proteine già dopo 15 min. Tale effetto è massimo a 30 minuti e tende invece a ridursi ai tempi più lunghi di 60 e 120 min. Dal grafico di quantizzazione (fig. 3) si può apprezzare che a 15 e 30 minuti il legame DNA-proteina è di circa il 60% rispetto al controllo mentre a 60', 120' esso tende a ripristinarsi (80% rispetto al controllo). Il controllo della specificità di legame con Sp1 è riportato nei grafici successivi.

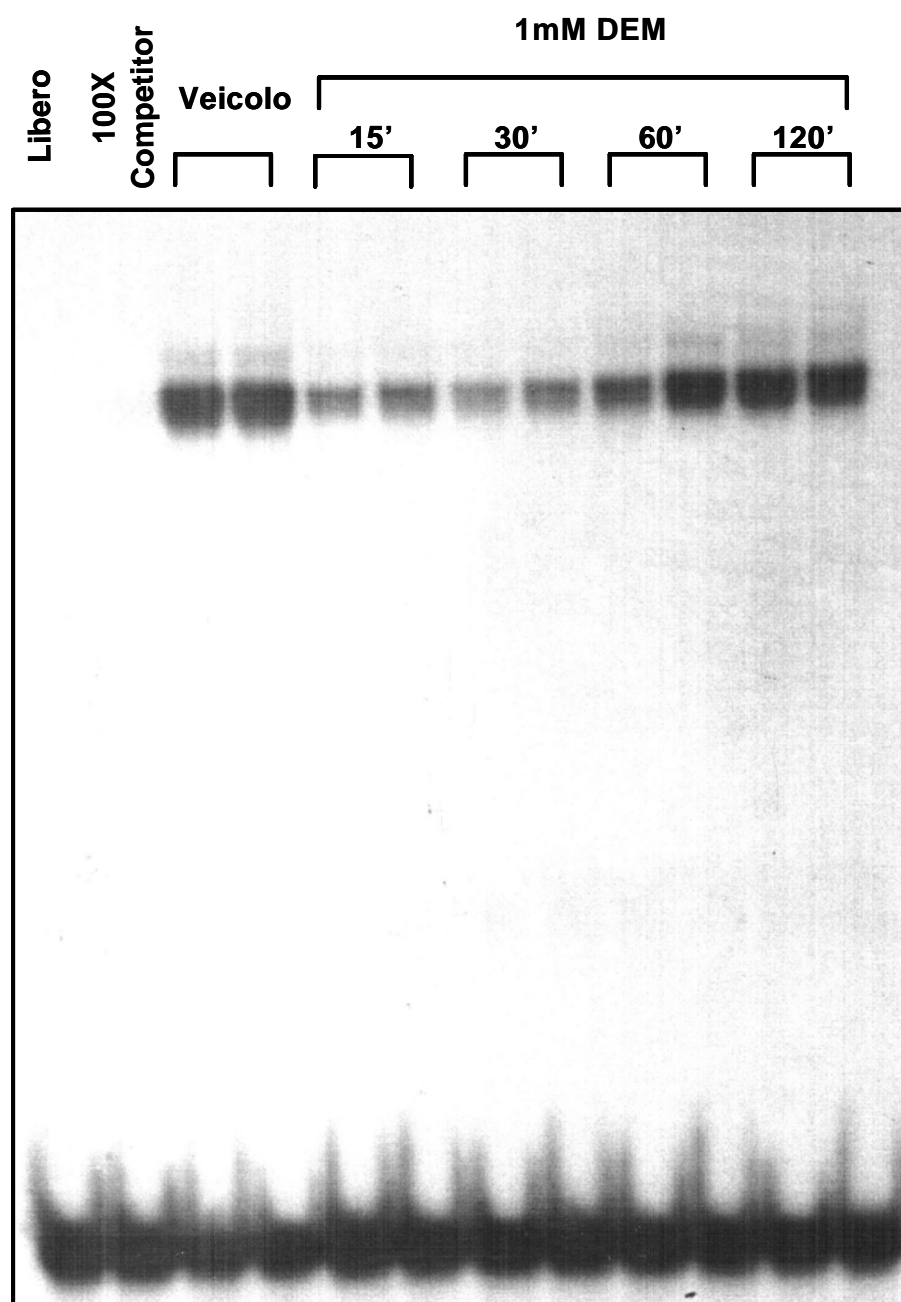


Fig. 2 Saggio EMSA su cellule di epatoma di ratto (McA RH7777). Effetto del DEM sul DNA- Binding di PPAR α

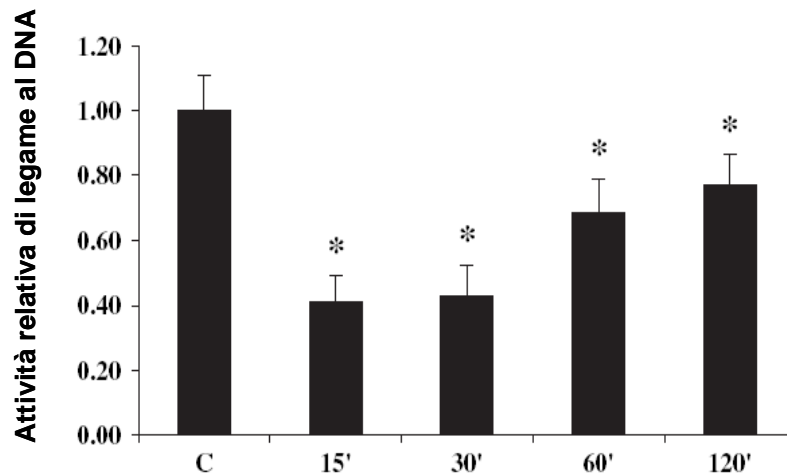


Fig. 3 Quantizzazione densitometrica del saggio EMSA (n=3). L'asterisco indica una $p < 0.01$ (test di Dunnett).

4. 3 Inibizione del legame di PPAR α al PPRE di ACO utilizzando un anticorpo anti-PPAR α

Per dimostrare che la proteina legante il PPRES marcato di ACO fosse PPAR α è stato effettuato un ulteriore controllo utilizzando un anticorpo anti-PPAR α la cui interazione specifica con il fattore trascrizionale dovrebbe interferire con il legame DNA-proteina come prova convincente che le proteine in questione sono rappresentate da PPAR α . Sono quindi stati effettuati saggi EMSA in presenza dell'anticorpo anti PPAR α , utilizzando concentrazioni decrescenti di estratto proteico per massimizzare l'effetto inibitorio dell'anticorpo in base ad un rapporto stechiometrico più adeguato. I risultati, presentati nella figura 4A e 4B, mostrano che l' anticorpo anti PPAR α è effettivamente in grado di inibire il legame delle proteine dell' estratto al PPRES di ACO e tale inibizione è tanto maggiore a dosi decrescenti di estratto proteico, a dimostrazione che la proteina che determina variazione della migrazione elettroforetica è riconosciuta da PPAR α ed è quindi, con alta probabilità PPAR α .

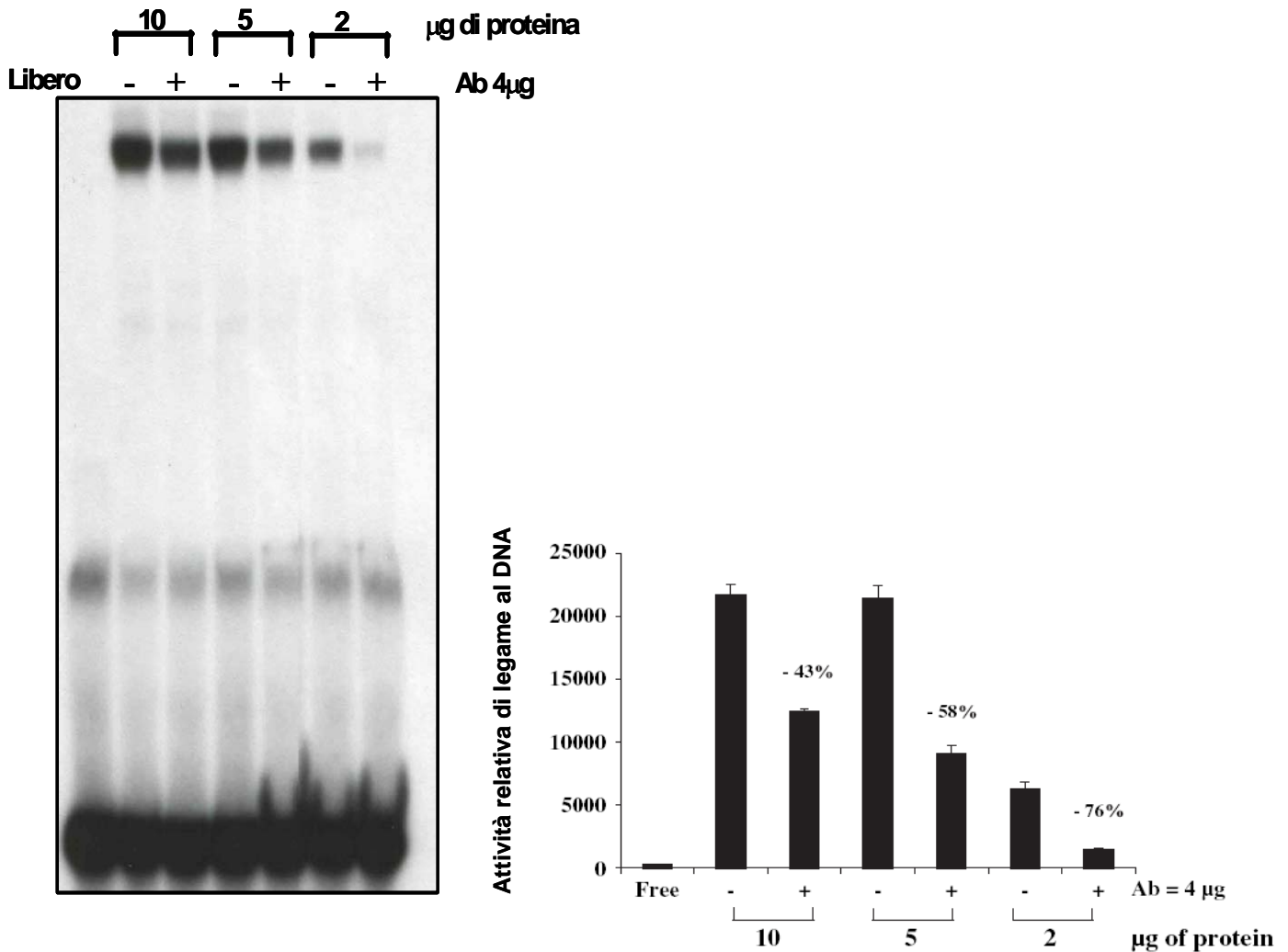


Fig. 4 **A** Inibizione del legame di PPAR α al PPRE di ACO utilizzando Anti-PPAR α . **B** Quantizzazione densitometrica del saggio EMSA (n=3)

Per controllare la specificità del precedente esperimento è stata analizzata la capacità dello stesso anticorpo di interferire con il legame delle stesse proteine nucleari ad un elemento di risposta al fattore trascrizionale Sp1. Il risultato ottenuto, mostrato in figura 5 dimostra che l' anticorpo anti-PPAR α non interferisce con il legame delle proteine nucleari all' elemento di risposta di Sp1, e che quindi, molto probabilmente, le proteine che legano l' elemento di risposta di ACO sono effettivamente PPAR α .

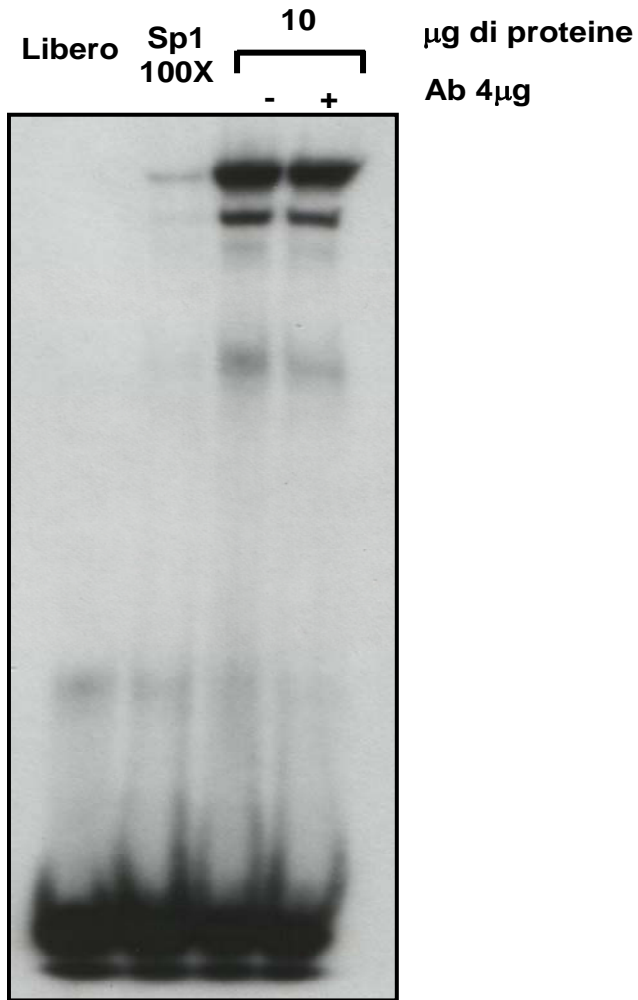
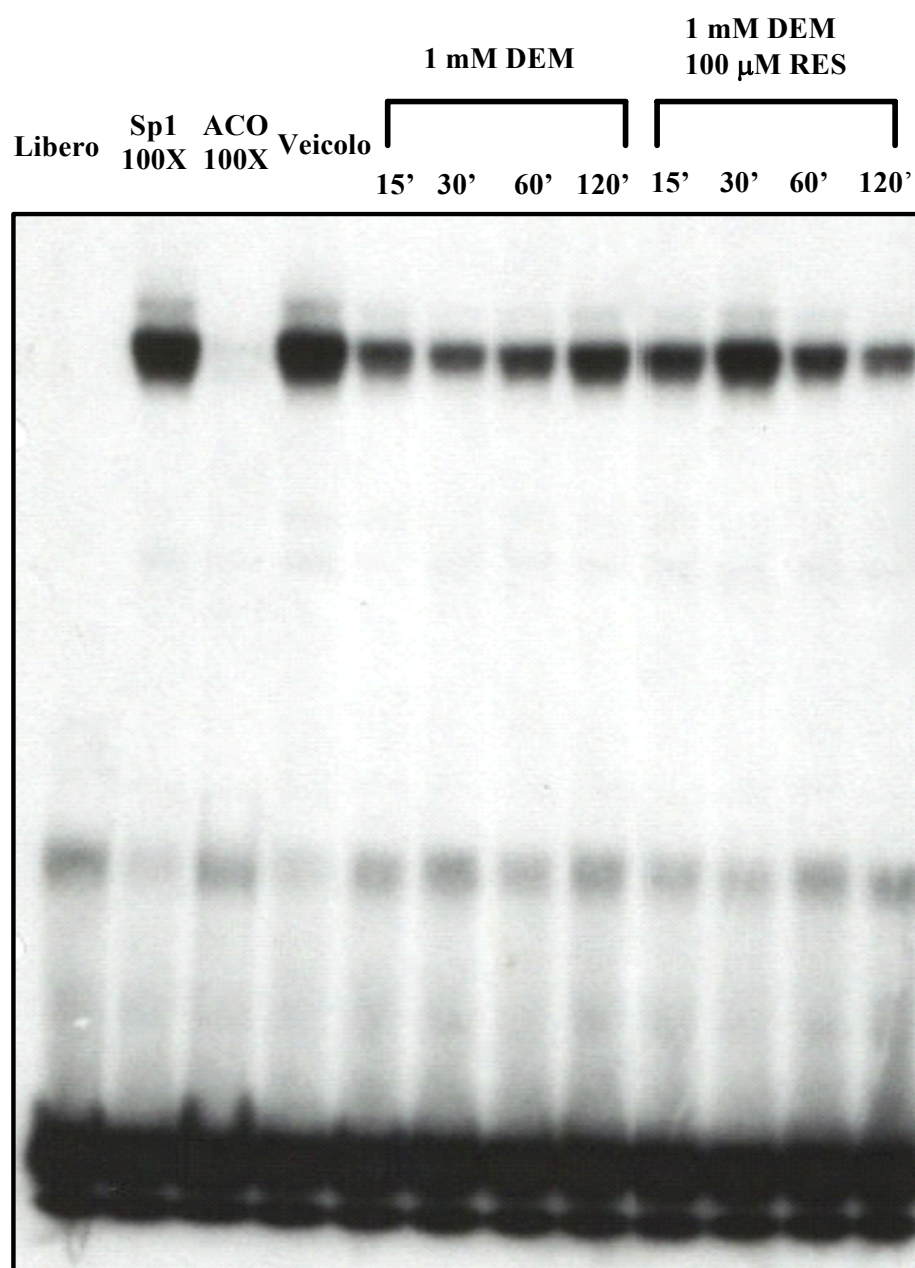


Fig 5 anti-PPAR α non interferisce con il legame delle proteine nucleari all' elemento di risposta Sp1

4. 4 Effetto del resveratrolo in presenza di DEM sull' attività di legame di PPAR α al PPRE di ACO

Per studiare se il resveratrolo in qualità di antiossidante fosse capace di prevenire l' inibizione dell' attività di legame di PPAR α al DNA, probabilmente dovuta a stress ossidativo, subito prima di iniziare il trattamento con 1 mM DEM, le cellule sono state pretrattate con 100 μ M resveratrolo. In figura 6 si possono osservare i risultati di questi trattamenti: il DEM induce una riduzione dell' attività di legame al DNA a 15 e 30 minuti di incubazione (come precedentemente dimostrato); nelle cellule incubate con resveratrolo, invece, si verifica un parziale ripristino dell' attività di legame a 15 e 30 minuti ($p < 0.001$ test di Bonferroni) . Tuttavia, a tempi più lunghi, 60 e 120 minuti, di trattamento con resveratrolo (combinato a quello con DEM) prevale un effetto inibitorio del legame tra il fattore trascrizionale e il DNA ($p < 0.001$ test di Bonferroni). Anche in questo caso è stato utilizzato un eccesso molare pari a 100 volte di un competitore aspecifico non radioattivo e un oligonucleotide che è riconosciuto dal fattore trascrizionale Sp1. La media delle quantizzazioni densitometrica di tre esperimenti simili viene riportata in grafico (fig. 6B).



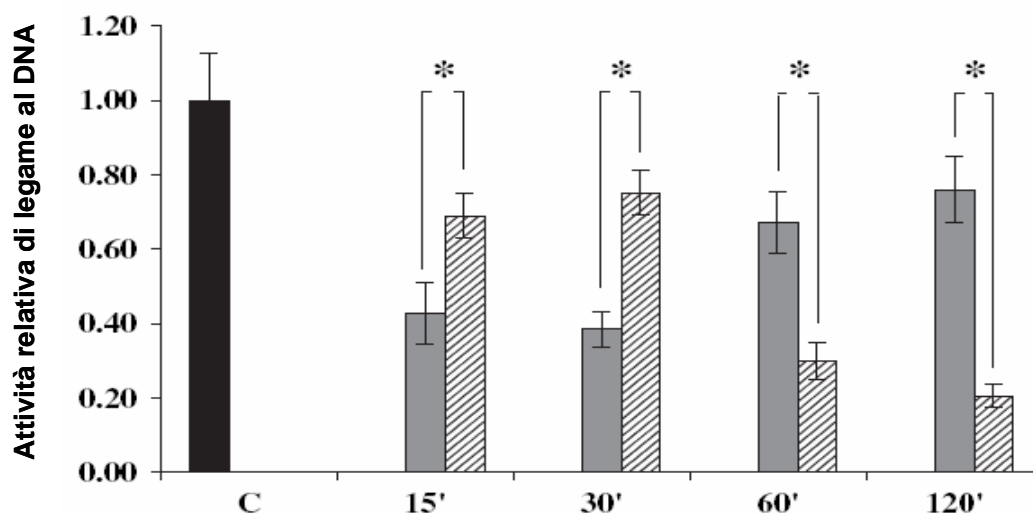


Fig 6A Saggio EMSA su cellule di epatoma di ratto (McA RH7777). Effetto del DEM e del Resv sul DNA-Binding di PPAR α . **B** Quantizzazione densitometrica del saggio EMSA (n = 3). p < 0.001 test di Bonferroni.

4. 5 Effetto del resveratrolo in assenza di DEM sull'attività di legame di PPAR α al PPRE di ACO

Per provare se la diminuzione del legame di PPAR α al DNA che si osservava a 60 e 120 minuti di trattamento combinato con DEM e resveratrolo fosse dovuta all' azione combinata dei due composti o esclusivamente al resveratrolo le cellule sono state trattate solo con 100 μ M resveratrolo per 15 e 120 minuti (fig. 7).

I risultati dimostrano che l' attività di legame diminuisce del 30% in cellule stimulate per 15 minuti con il resveratrolo e del 60% circa in cellule stimulate per 120 min.

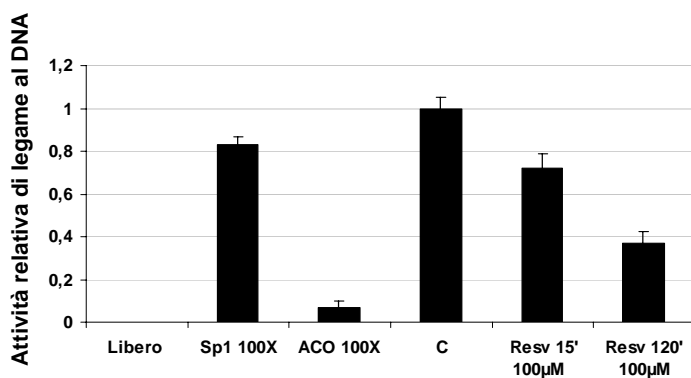
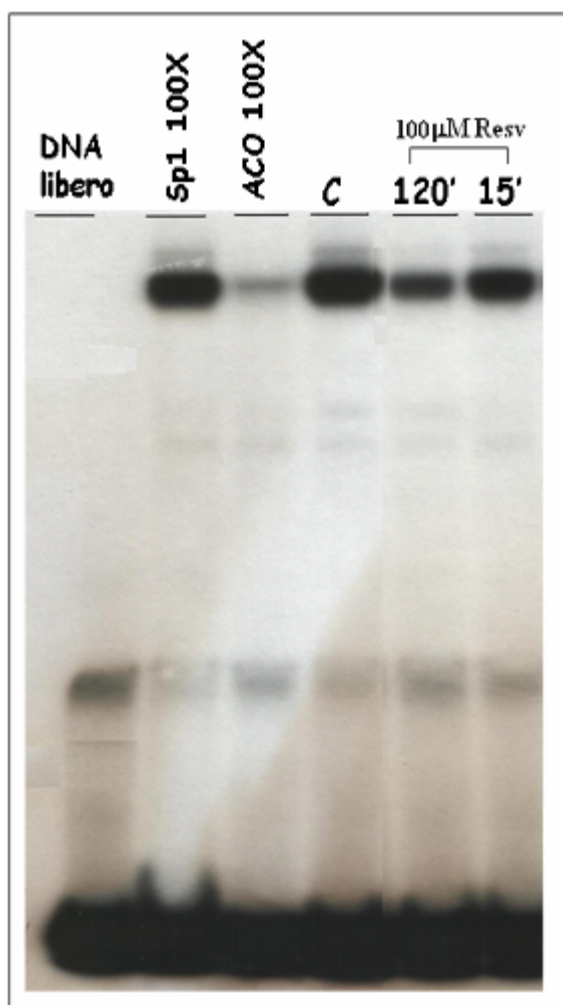


Fig. 7 Effetto del resveratrolo sull'attività di legame di PPAR α al PPRE di ACO e quantizzazione densitometrica (n=3).

4. 6 Effetto del resveratrolo sull'attività delle proteine chinasi Erk1/2

I risultati dei saggi EMSA mostrano chiaramente un effetto inibitorio dell' attività del legame di PPAR α al PPRE di ACO, sia ad opera dello stress ossidativo, sia ad opera del resveratrolo; tuttavia mentre è abbastanza semplice ipotizzare il meccanismo attraverso cui lo stress ossidativo ha questo effetto, non lo è altrettanto per quanto riguarda i meccanismi indotti dal resveratrolo che non riguardino direttamente l' equilibrio redox. Dalla letteratura è noto che il resveratrolo influenza la trasduzione del segnale attraverso la modulazione di alcune chinasi; è quindi possibile che l' inibizione dell' attività di legame di PPAR α sia mediata dall' attivazione e/o inibizione ad opera del resveratrolo, di alcune chinasi che fosforilano PPAR α .

E' stato precedentemente dimostrato che le proteine ERK1/2 catalizzano la fosforilazione di alcuni residui, principalmente di Ser 6 e/o Ser 12 e/o Ser 21, nel dominio A/B di PPAR α ; questo evento fa diminuire la funzione di transattivazione AF-1 ligando-indipendente mentre fa aumentare la transattivazione ligando-dipendente AF-2, probabilmente attraverso un cross-talk tra i domini N- e C- terminale.

E' noto anche che PKA fosforila PPAR α , benchè l' azione di PKA è diretta principalmente al dominio C; a questo evento segue un incremento della transattivazione mediata da AF-2 che determina un aumento della β -ossidazione e produzione di glucosio e corpi chetonici in condizioni di stress, digiuno o attività fisica. In questo caso è stato valutato l' effetto del resveratrolo e dello stress ossidativo sulla via che coinvolge ERK1/2 (componenti delle MAPK) in cellule RH7777, attraverso western blot.

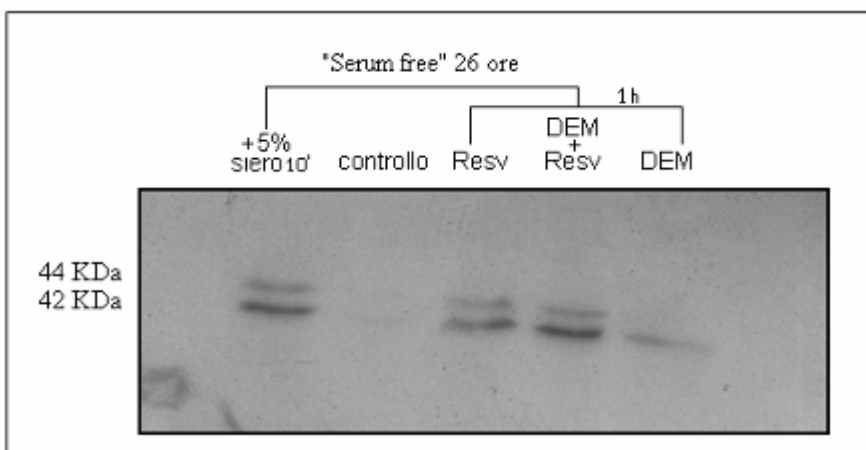


Fig. 8 Western Blot anti-pERK 1/2

I risultati in figura 8 e le relative quantizzazioni in figura 9 dimostrano chiaramente che il resveratrolo ad una concentrazione 100 μ M influenza la fosforilazione di ERK1/2 in cellule di epatoma RH7777, determinando un forte incremento dei livelli delle proteine ERK1/2 fosforilate e quindi della loro attività.

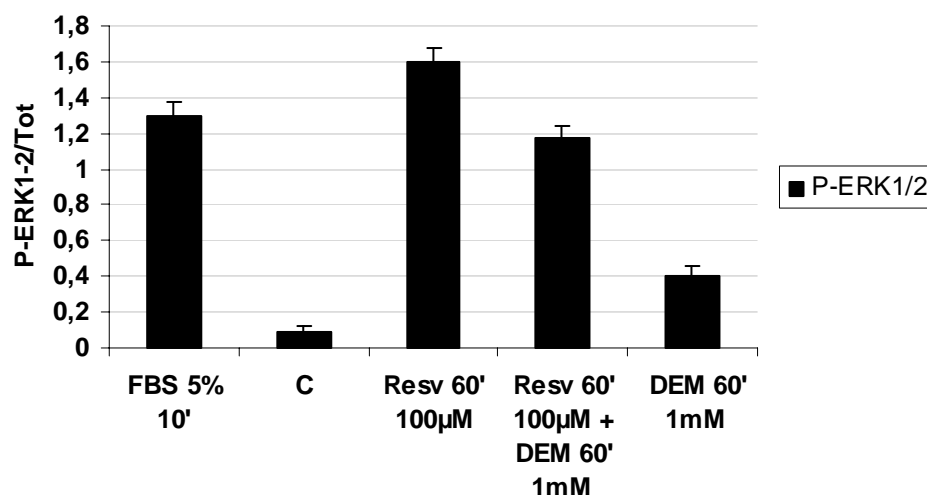


Fig. 9 Quantizzazione densitometrica del Western Blot anti-pERK 1/2 ; I dati sono stati normalizzati per la proteina totale i cui livelli non erano alterati dal trattamento (dato non mostrato) (n=3).

I trattamenti sono stati effettuati in condizioni di assenza di siero, in quanto il siero, contenendo fattori che inducono la fosforilazione delle proteine ERKs, nasconderebbe l'effetto di altri fattori sulla fosforilazione di ERK; difatti, nel controllo positivo (presenza di siero al 5% aggiunto 10 minuti prima dell'estrazione proteica) i livelli di ERKs sono più alti (circa 10 volte) rispetto al controllo.

I dati dimostrano anche che lo stress ossidativo non influenza marcatamente l'attività chinasi di ERKs, avvalorando l'ipotesi che l'inibizione dell'attività di legame al DNA, probabilmente dovuta al "pathway" ERK1/2, non sia data dalla combinazione resveratrolo-DEM, ma sia principalmente un effetto della sola stimolazione con il resveratrolo.

4.7 Effetto del resveratrolo sui livelli della proteina PPAR α e PPAR α -P (Ser-21)

Essendo PPAR α un fattore trascrizionale attivato da ligandi e da modificazioni post-traduzionali, ed alla luce dei precedenti risultati, è possibile che il resveratrolo influenzi anche i livelli di fosforilazione di PPAR α ; per valutare questa ipotesi è stato eseguito un esperimento di Western blot. A tal fine, estratti proteici di cellule RH7777, trattate per diversi tempi con 100 μ M trans-resveratrolo, sono stati separati elettroforeticamente, trasferiti su membrana e cimentati con anticorpi anti-actina ed anti-PPAR-P (Ser-21).

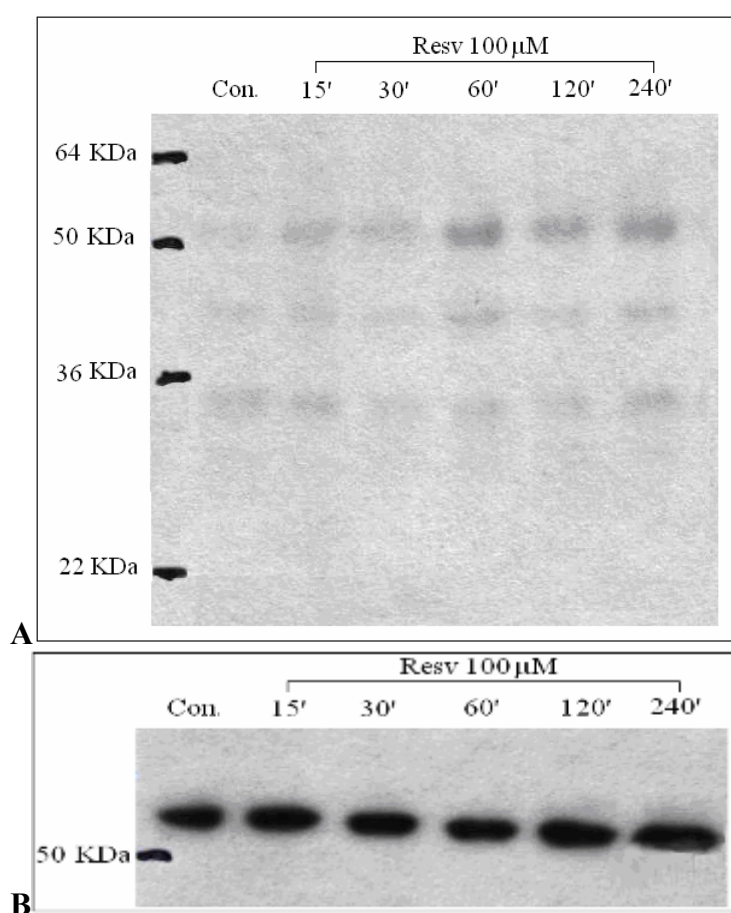


Fig. 10 Effetto del trattamento con 100 μ M trans-resveratrolo sulla fosforilazione in Ser 21 di PPAR α (A) e sulla proteina totale (B) in cellule McA-RH7777.

I risultati ottenuti dimostrano che il trattamento con 100 μ M trans-resveratrolo determina un aumento dei livelli di PPAR α fosforilato in Serina 21 a tempi di circa 15', mentre i livelli della proteina totale rimangono invariati; poiché tale fosforilazione inibisce la transattivazione di PPAR α , e poiché dai risultati precedenti dimostrano che il resveratrolo attiva ERK1/2, è probabile

che le chinasi ERKs siano responsabili dell' effetto del resveratrolo sulla fosforilazione del recettore nucleare e quindi anche della ridotta attività di legame al DNA di PPAR α .

4. 8 Effetto del DEM e del resveratrolo sull' espressione proteica di ACO

Per valutare se la riduzione dell' attività di legame di PPAR α al PPRE di ACO, osservata in seguito al trattamento delle cellule RH7777 con DEM e resveratrolo, determinasse una diminuzione dei livelli della proteina codificata del gene bersaglio, è stato eseguito un esperimento di Western blot. A tal fine, estratti proteici totali da cellule RH7777, trattate per diversi tempi con DEM e per 120 minuti con resveratrolo, sono stati separati elettroforeticamente, trasferiti su membrana e cimentati con un anticorpo anti-ACO. I risultati ottenuti dimostrano che non si verifica la diminuzione dei livelli della proteina ACO dopo i trattamenti con resveratrolo.

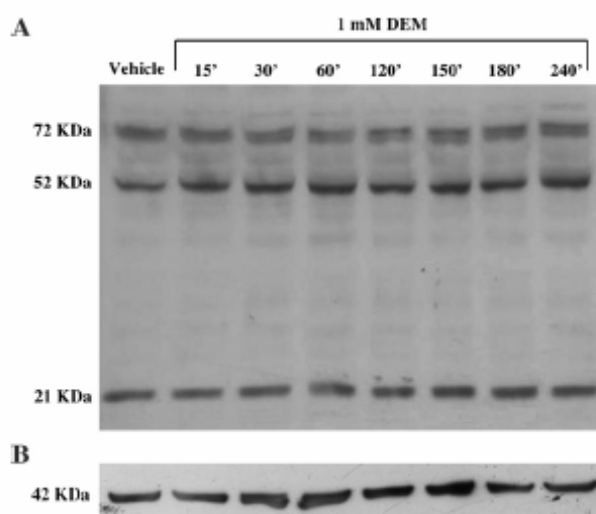


Fig 11 Effetto dei trattamenti di DEM e resveratrolo sui livelli della proteina ACO. Le tre bande visualizzate rappresentano i tre componenti del polipeptide, la più piccola probabilmente deriva da una forma più grande mediante taglio proteolitico .

4.9 Effetto del DEM e del resveratrolo sui livelli dell' mRNA di ACO

La diminuzione dell' attività di legame indotta sia dal DEM che dal resveratrolo non si correla ad una diminuzione dei livelli della proteina Acil CoA ossidasi; per stabilire se esistesse un effetto del resveratrolo a livello dell' mRNA di ACO, sono stati valutati i livelli di tale mRNA in seguito a trattamento con solo DEM, solo resveratrolo e DEM + resveratrolo. I risultati in figura 12 mostrano che non sussistono importanti differenze tra i livelli di mRNA nelle cellule trattate.

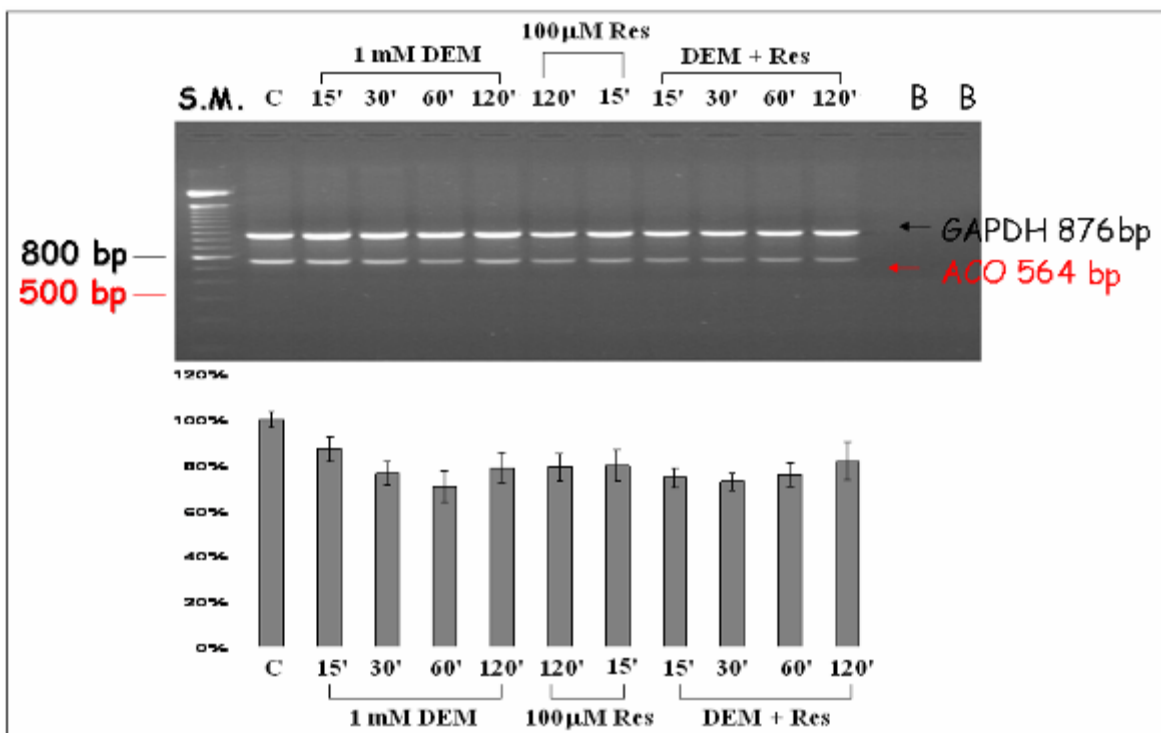


Fig. 12 Livelli di mRNA di ACO in cellule RH7777 valutati dopo RT-PCR e visualizzazione dei prodotti di amplificazione dopo separazione elettroforetica su gel di agarosio colorato con bromuro di etidio e sottoposto a transilluminazione con luce UV. Nel pannello inferiore è riportata la quantizzazione densitometrica delle bande (normalizzazione con i livelli di mRNA di GAPDH, n=3).

4. 10 Effetto del resveratrolo sulla proliferazione e sulla vitalità delle cellule McA-RH7777

Per valutare se il resveratrolo fosse in grado di influenzare la velocità del ciclo cellulare e la vitalità delle cellule RH7777 in coltura, 50.000 cellule RH7777 sono state seminate in piastre dal diametro di 5,4 cm. La capacità del resveratrolo di esercitare i suddetti effetti è stata valutata sia rispetto a diverse concentrazioni della sostanza, sia rispetto al momento di aggiunta della sostanza, sia infine rispetto alle modalità di somministrazione. Per quest' ultimo aspetto il trattamento con resveratrolo è stato effettuato in un' unica somministrazione all' inizio delle 96 ore di trattamento, oppure in tre somministrazioni ripetute ogni 24 ore durante le 72 ore di trattamento. Nella figura 13 sono riportati i risultati dell' esperimento con dosi crescenti di resveratrolo somministrato in un' unica soluzione, dopo 24 ore dal piastraggio, quando cioè le cellule sono perfettamente adese ed hanno assunto la normale morfologia.

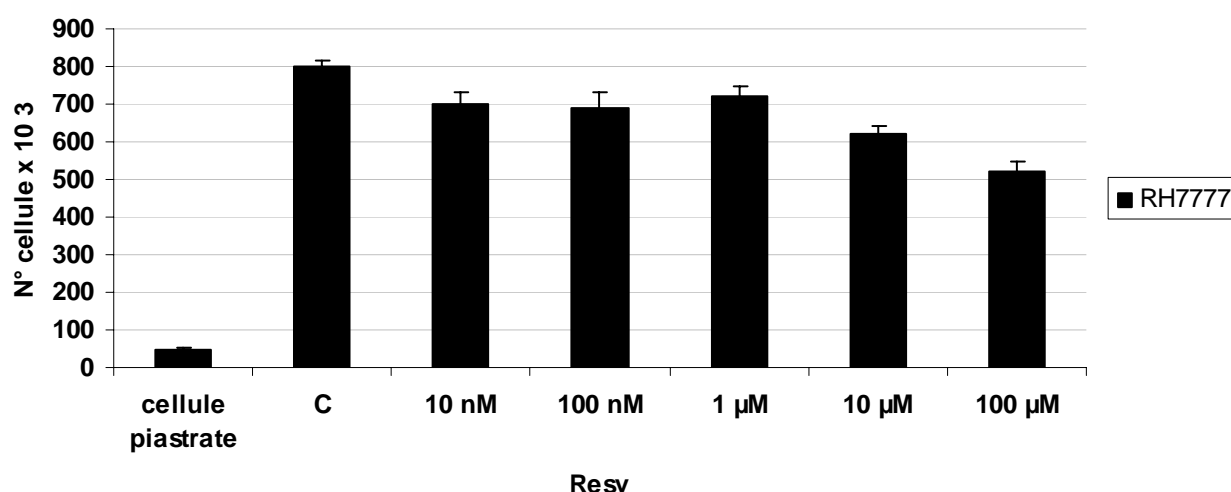


Fig 13. 50000 cellule RH7777 trattate per 96 ore con concentrazioni diverse di resveratrolo, aggiunto in un' unica somministrazione dopo 24 ore dal piastramento.

Come si può osservare, alle dosi di 10 nM, 100 nM, 1 µM, 100 µM resveratrolo e dopo 96 ore di trattamento, c'è solo una lieve diminuzione del numero di cellule il cui valore minimo è si raggiunge alla massima dose di resveratrolo (100 µM); tale valore, pari a circa 500.000 cellule, essendo superiore alla metà di 800.000 (cellule del controllo), non risulta nemmeno pari ad una divisione mitotica in meno rispetto al controllo stesso. In esperimenti indipendenti il resveratrolo è stato aggiunto al momento del piastraggio e le cellule sono state contate all' emocitometro dopo 96 ore. In quest' ultimo caso il resveratrolo è somministrato quando cioè le cellule sono ancora risospese nel mezzo di coltura, non hanno ancora messo in atto i meccanismi di adesione e non

hanno quindi raggiunto ancora il loro normale stato di crescita. In questo caso si può osservare nella figura 14 un effetto dose-risposta delle dosi crescenti di resveratrolo che già alla dose di 1 μM portano, dopo 4 giorni di coltura, quasi ad un dimezzamento del numero di cellule rispetto al controllo.

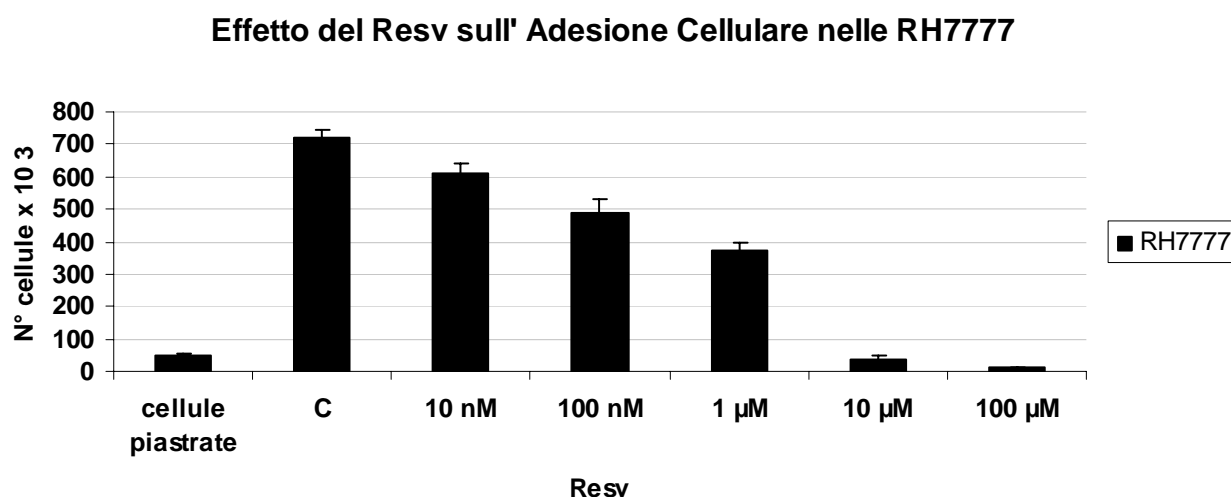


Fig. 14 50000 cellule RH7777 trattate per 96 ore con concentrazioni diverse di resveratrolo somministrate al momento del piastraggio.

A dosi più elevate, 10 e 100 μM , dopo 4 giorni di coltura, delle 50.000 cellule piastrate ne rimangono adese alla piastra pochissime. Come mostrato in figura 13 e 14 abbiamo osservato un effetto dose-risposta nel senso di una diminuzione del numero di cellule all' aumentare delle dosi della sostanza in esame, con una maggiore sensibilità per quelle cellule stimolate al momento del piastraggio. Molto probabilmente queste sostanze vanno ad interferire con i fenomeni di adesione e comunicazione tra cellule.

Ulteriori esperimenti sono stati condotti piastrando le cellule 24 ore prima della stimolazione ed aggiungendo lo stimolo in nuovo mezzo ogni 24 ore per 3 giorni. Ciò al fine di verificare se, per valutare correttamente un effetto a tempi lunghi del resveratrolo, non fosse necessario aggiungerlo ripetutamente considerando che la sostanza non abbia un' emivita abbastanza lunga da consentire trattamenti di più giorni con un' unica somministrazione. La conta all' emocitometro è stata effettuata sempre a 96 ore dal piastraggio.

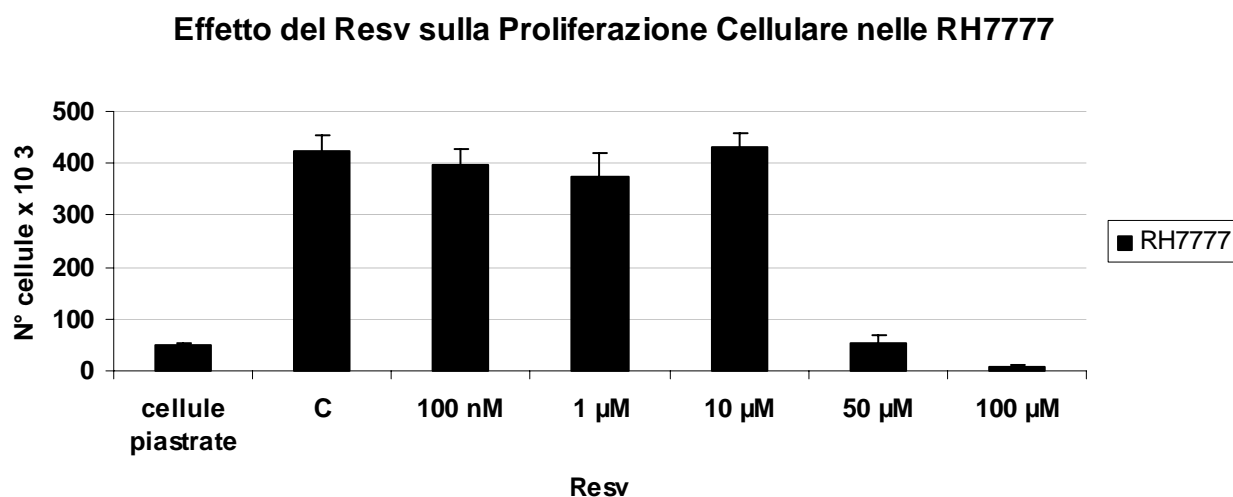


Fig. 15 50000 cellule RH7777 trattate per 72 ore con concentrazioni diverse di resveratrolo con stimolazioni quotidiane.

In effetti, come mostrato nella figura 15, i risultati sono molto diversi da quelli ottenuti con l' unica somministrazione. Con tale procedura si osserva un effetto soglia del resveratrolo, che si dimostra attivo a partire dalla dose di 50 µM. Mentre, infatti, a dosi inferiori il numero di cellule contate dopo 3 giorni di trattamento con Resveratrolo non si discosta significativamente dal campione di controllo, a 50 µM di Resveratrolo si registra lo stesso numero di cellule piastrate all' inizio dell' esperimento, il che potrebbe rappresentare il risultato di un effetto citostatico della dose di polifenolo utilizzata. Alla dose ancora più alta, 100 µM, le originarie 50.000 cellule sono solo poche migliaia.

4. 11 Valutazione morfologica delle RH7777 trattate con resveratrolo

L'arresto della crescita cellulare e la morte cellulare riscontrata con dosi di resveratrolo da 50 μ M a 100 μ M sono accompagnate nelle fasi precoci del trattamento anche da un cambiamento della morfologia delle cellule che perdono la caratteristica forma poligonale con prolungamenti citoplasmatici (fig. 16) e divengono più piccole, fusate e dotate di citoplasma meno omogeneo e più granuloso rispetto alle cellule di controllo.

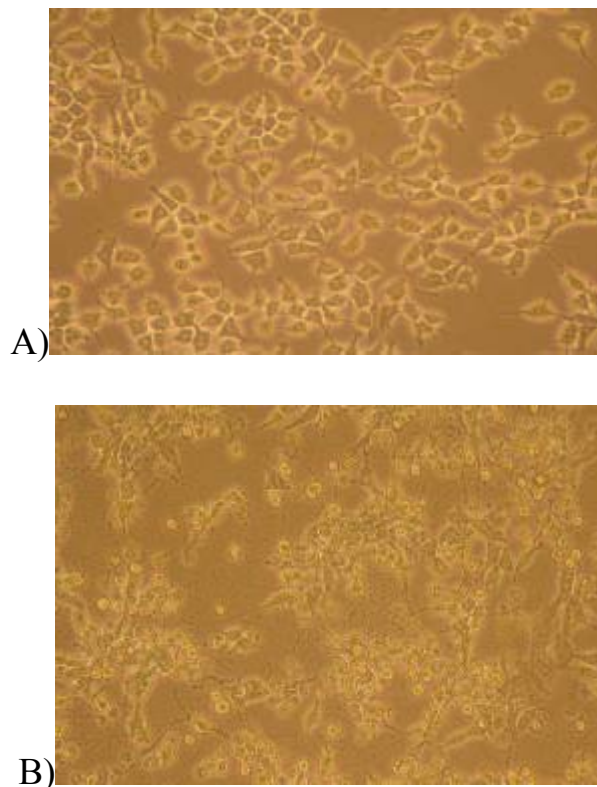


Fig. 16 Morfologia delle cellule McArdle RH7777 senza (A) e con trattamento con 100 μ M resveratrolo (B).

4. 12 Effetto del resveratrolo e del DEM sull' attività della chinasi pAkt/PKB

Per cercare di chiarire i meccanismi molecolari degli effetti del resveratrolo sulla proliferazione e sulla vitalità cellulare è stata analizzata un' importante chinasi pAkt/PKB coinvolta in vie di trasduzione del segnale che influenzano l' equilibrio sopravvivenza/apoptosi cellulare. A tal fine è stata utilizzata la metodica del Western Blot per analizzare in maniera specifica i livelli della proteina attiva (livello di fosforilazione) in seguito ai trattamenti. Prima del trattamento con resveratrolo le cellule sono state coltivate in assenza di siero per 26 ore e poi stimolate per 1 ora con dosi variabili del polifenolo. La stimolazione è stata effettuata su cellule al 60-70% di

confluenza. I risultati mostrano una diminuzione di oltre il 50% rispetto al controllo della fosforilazione di Akt/PKB a seguito del trattamento delle cellule con 100 μ M resveratrolo; 10 nM di resveratrolo, al contrario, produce un lieve aumento (fig. 17). Per di più si evince che lo stress ossidativo indotto da Dietilmaleato (DEM) 1 mM non influenza i livelli di fosforilazione di Akt. Il trattamento congiunto con DEM 1 mM sembra bloccare l'effetto del resveratrolo (probabilmente perché il resveratrolo viene inattivato dall'aumento di radicali). La funzione di Akt è quella di attenuare l'attivazione della via apoptotica per cui questi risultati indicherebbero che 100 μ M resveratrolo potrebbe indurre l'apoptosi riducendo l'azione antiapoptotica di Akt.

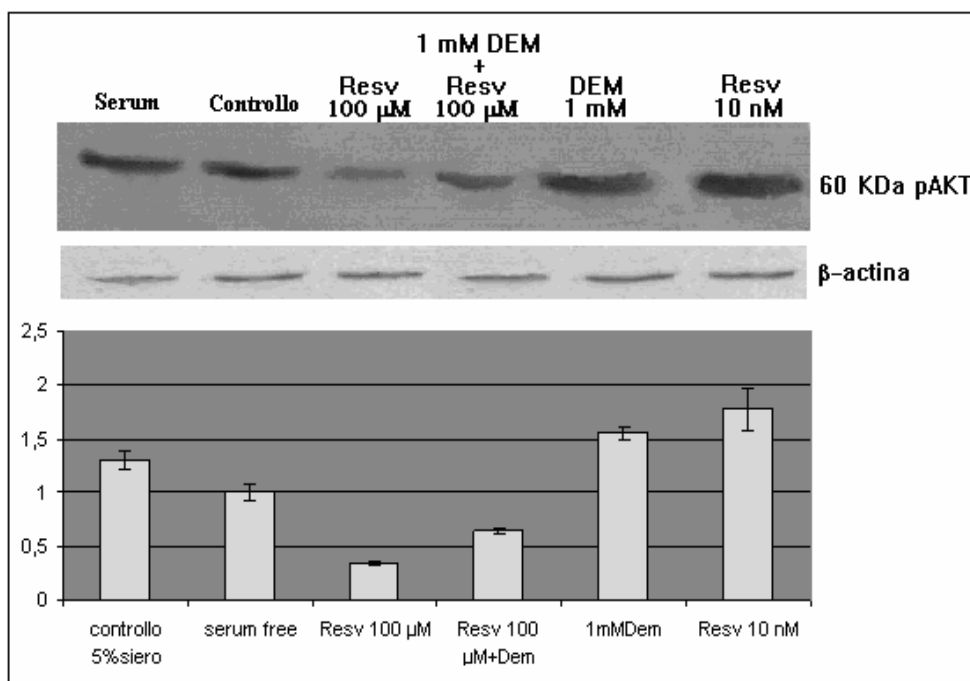


Fig. 17: Western anti-pAkt (pPKB).

4. 13 Dosaggio della lattico deidrogenasi

Per ottenere informazioni sul meccanismo di morte cellulare indotta dal resveratrolo nelle cellule RH7777, è stato effettuato un saggio di attività enzimatica sul mezzo condizionato dalle cellule trattate col resveratrolo. In tal modo, dosando un enzima intracellulare, se si riscontra attività nel mezzo di coltura, si ha la prova che l'enzima è stato rilasciato all'esterno della cellula per lisi della cellula stessa o quanto meno per grave danno alla membrana cellulare, evento precedente alla necrosi cellulare. L'enzima dosato è la lattico-deidrogenasi ed i dati ottenuti sono rappresentati nella figura 18 e confermano che il resveratrolo non compromette la struttura e l'integrità della

membrana plasmatica; infatti i livelli di lattico-deidrogenasi misurati a tutte le concentrazioni di resveratrolo sono trascurabili e non differiscono da quelli dei campioni di controllo. Il campione identificato con la dicitura Triton è stato usato come controllo positivo del saggio in quanto, prima di raccogliere il mezzo per il dosaggio enzimatico, le cellule sono state trattate col detergente Triton X-100, potente detergente che lisa le cellule e permette quindi il rilascio nel mezzo di coltura del contenuto citoplasmatico. Questo dato è a sostegno dell' ipotesi che la morte cellulare dovuta al 100 μ M trans-resveratrolo non sia determinata da un fenomeno di necrosi cellulare, ma sia invece da ricondurre ad un evento di natura apoptotica.

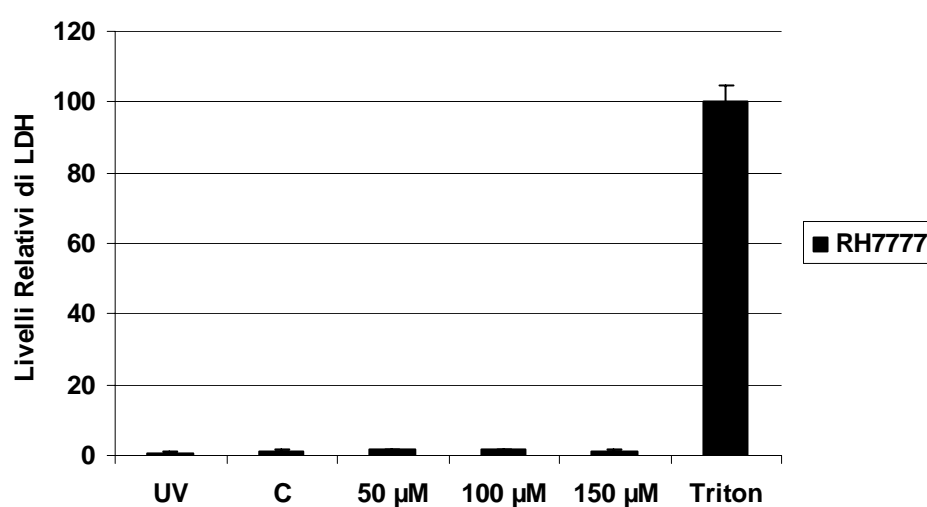


Fig. 18 Dosaggio della lattico-deidrogenasi in cellule RH7777.

5. RISULTATI II PARTE

5.1 Effetto del resveratrolo sulla crescita e l'adesione di cheratinociti umani in coltura (HaCaT)

Per valutare gli effetti del resveratrolo sulla crescita di cheratinociti umani (HaCaT) in coltura sono state effettuate curve di crescita in presenza ed assenza di resveratrolo. I risultati ottenuti, e mostrati nella Figura 1, dimostrano che le cellule HaCaT subiscono una inibizione della proliferazione in seguito a stimolo con resveratrolo. Ogni punto sperimentale rappresentato nella Figura 1 rappresenta il valore medio di tre esperimenti di conta cellulare; per tutte le curve di crescita sono state piastrate 50.000 cellule e per ogni condizione sperimentale abbiamo 4 piastre in modo tale da poter contare le cellule ogni 24 ore, e cioè ai tempi 0, 24, 48 e 72 ore. Abbiamo effettuato 5 curve di crescita: la prima si riferisce alla curva di controllo in cui le cellule crescono in mezzo normale; la seconda si riferisce alle cellule trattate con 100 μM resveratrolo aggiunto ripetutamente alle cellule, dopo averle lavate, ai tempi 0, 24 e 48 ore (indicata nelle leggenda del grafico come Resv 100 $\mu\text{Mol/L}$ +); la terza si riferisce alle cellule trattate con 200 μM resveratrolo aggiunto ripetutamente alle cellule, dopo averle lavate, ai tempi 0, 24 e 48 ore (indicata nelle leggenda del grafico come Resv 200 $\mu\text{Mol/L}$ +); la quarta si riferisce alle cellule trattate con 100 μM resveratrolo aggiunto solo al tempo 0 e rimosso mediante lavaggio delle cellule dopo 24 ore; la quinta si riferisce alle cellule trattate con 200 μM resveratrolo aggiunto solo al tempo 0 e rimosso mediante lavaggio delle cellule dopo 24 ore. Dal grafico possiamo vedere chiaramente che le HaCaT subiscono un'inibizione della proliferazione dopo stimolo con resveratrolo. Tale inibizione risulta maggiore in presenza di 200 $\mu\text{Mol/L}$ di resveratrolo aggiunto ogni 24 ore: infatti il numero di cellule da 50.000, dopo 72 ore, scende a 6.000 cellule, mentre nella piastra di controllo ci sono circa 200.000 cellule. Nelle piastre dove si aggiunge il resveratrolo solo per le 24 ore iniziali di trattamento, si nota invece una leggera ripresa della crescita cellulare sia in seguito al trattamento con 100 che con 200 $\mu\text{Mol/L}$; per esempio, dopo 24 ore di trattamento con 100 μM resveratrolo, le cellule da 50.000 scendono a circa a 10.000, ma a 72 ore risalgono a circa 25.000 cellule.

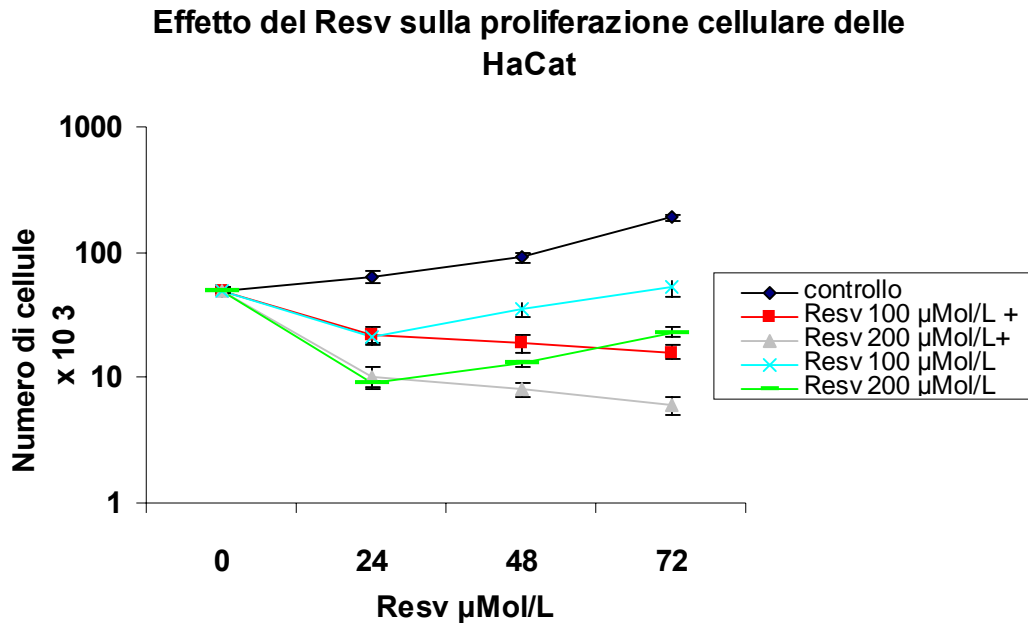


Fig. 1 Conta cellulare. Le HaCaT sono trattate con resveratrolo a due concentrazioni: 100 $\mu\text{Mol/L}$, 200 $\mu\text{Mol/L}$ (il giorno dopo le piastre vengono lavate eliminando il resveratrolo), per i punti Resv 100 e 200 $\mu\text{Mol/L} +$ si aggiunge lo stimolo ogni 24 ore. Sono riportati in grafico la media di tre esperimenti ($n = 3$). Le barre di errore rappresentano la deviazione standard (SD).

Per valutare l'effetto del resveratrolo sull'adesione cellulare, le cellule appena piastrate, vengono stimulate con 100 e 200 $\mu\text{Mol/L}$ resveratrolo, prima che avvenga l'adesione alla piastra. Dal grafico riportato in fig. 2 si vede chiaramente che il resveratrolo ad una concentrazione pari a 100 $\mu\text{Mol/L}$ inibisce del 45%, rispetto al controllo, la capacità di aderire delle HaCaT, e a 200 $\mu\text{Mol/L}$ il resveratrolo inibisce del 75% l'adesione delle cellule HaCaT.

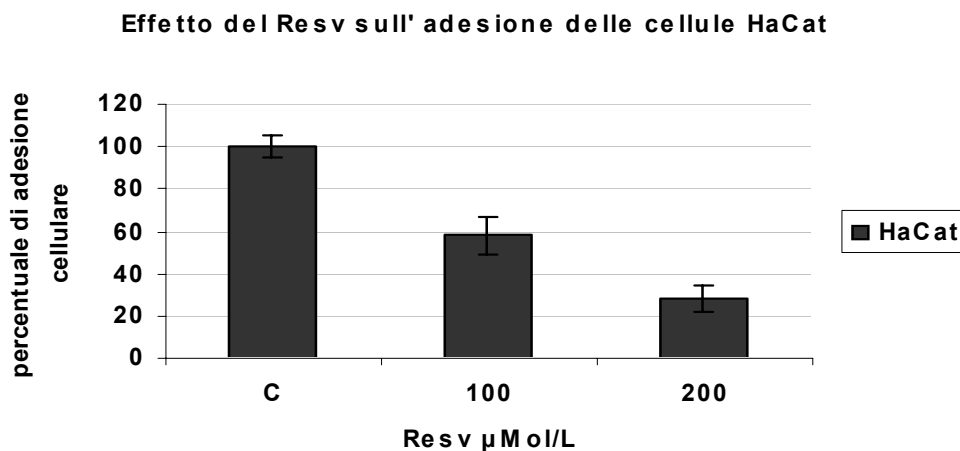


Fig. 2 HaCaT trattate con 100 e 200 $\mu\text{Mol/L}$ resveratrolo prima dell'adesione alla piastra. Sono riportati in grafico la media di tre esperimenti ($n = 3$). Le barre di errore rappresentano la deviazione standard (SD).

5. 2 Resveratrolo e p66shc: esperimenti di Dose Risposta e *Time Course* su cheratinociti (HaCaT)

Dopo aver valutato l'effetto inibitorio del resveratrolo sulla crescita e l'adesione delle cellule HaCaT, si è cercato di identificare possibili meccanismi molecolari alla base di tale attività. E' stato dimostrato che il resveratrolo induce apoptosi in cellule in coltura e tra i vari meccanismi che inducono apoptosi, recentemente è emerso il ruolo della proteina p66shc. Infatti, p66shc, in seguito alla fosforilazione della Serina36, induce fuoriuscita del citocromo c dal mitocondrio con conseguente apoptosi.

Sono dunque stati eseguiti esperimenti di dose risposta per valutare l'effetto del resveratrolo sull'attività di p66shc. Cellule HaCaT, private per 24 ore di FBS, sono state stimulate con concentrazioni crescenti di resveratrolo (1, 10, 100, 200 e 400 $\mu\text{Mol/L}$) per un tempo fisso di 30'. I lisati cellulari vengono immunoprecipitati con un anticorpo policlonale che riconosce le tre isoforme di shc (p66shc p52shc e p46shc). I campioni vengono poi separati elettroforeticamente su gel al 10%, e trasferiti su filtro che viene successivamente incubato con un anticorpo che riconosce la forma fosforilata di p66shc in Serina 36. Sono stati eseguiti esperimenti di dose risposta (fig.3) e di *time course* (fig 4).

Dai risultati riportati in figura 3A si osserva che esiste una buona relazione tra le dosi di resveratrolo impiegate ed il livello di fosforilazione di Ser34 di p66shc: il resveratrolo aumenta i livelli della fosforilazione di p66shc in serina 36 che raggiunge un picco massimo a 200 $\mu\text{Mol/L}$ per poi scendere a livelli più bassi a 400 $\mu\text{Mol/L}$. Come controllo positivo dell'esperimento è stata usata la stimolazione delle cellule con FBS al 10% per 15' ottenendo una forte fosforilazione di p66shc in Ser36 pari a circa 10 volte il valore del controllo. E' interessante che l'aggiunta di 200 $\mu\text{Mol/L}$ resveratrolo per 30' alla stimolazione con FBS 10% per 15' determina un ulteriore incremento della fosforilazione di p66shc in Ser 36 rispetto al solo FBS. In fig. 3A e C viene riportato anche l'effetto del resveratrolo sull'attivazione di ERK1/2 in un esperimento di dose risposta. I lisati ottenuti da cellule stimulate a concentrazioni crescenti di resveratrolo vengono analizzati per western blotting per valutare la fosforilazione di ERK1/2, usando un anticorpo contro la forma fosforilata di ERK1/2 (Thr202/Tyr204). La fosforilazione di ERK1/2 raggiunge il livello più alto a concentrazioni di 200 $\mu\text{Mol/L}$ di resveratrolo, una dose che risulta avere gli effetti massimali sia sulla fosforilazione di p66shc che di ERK1/2.

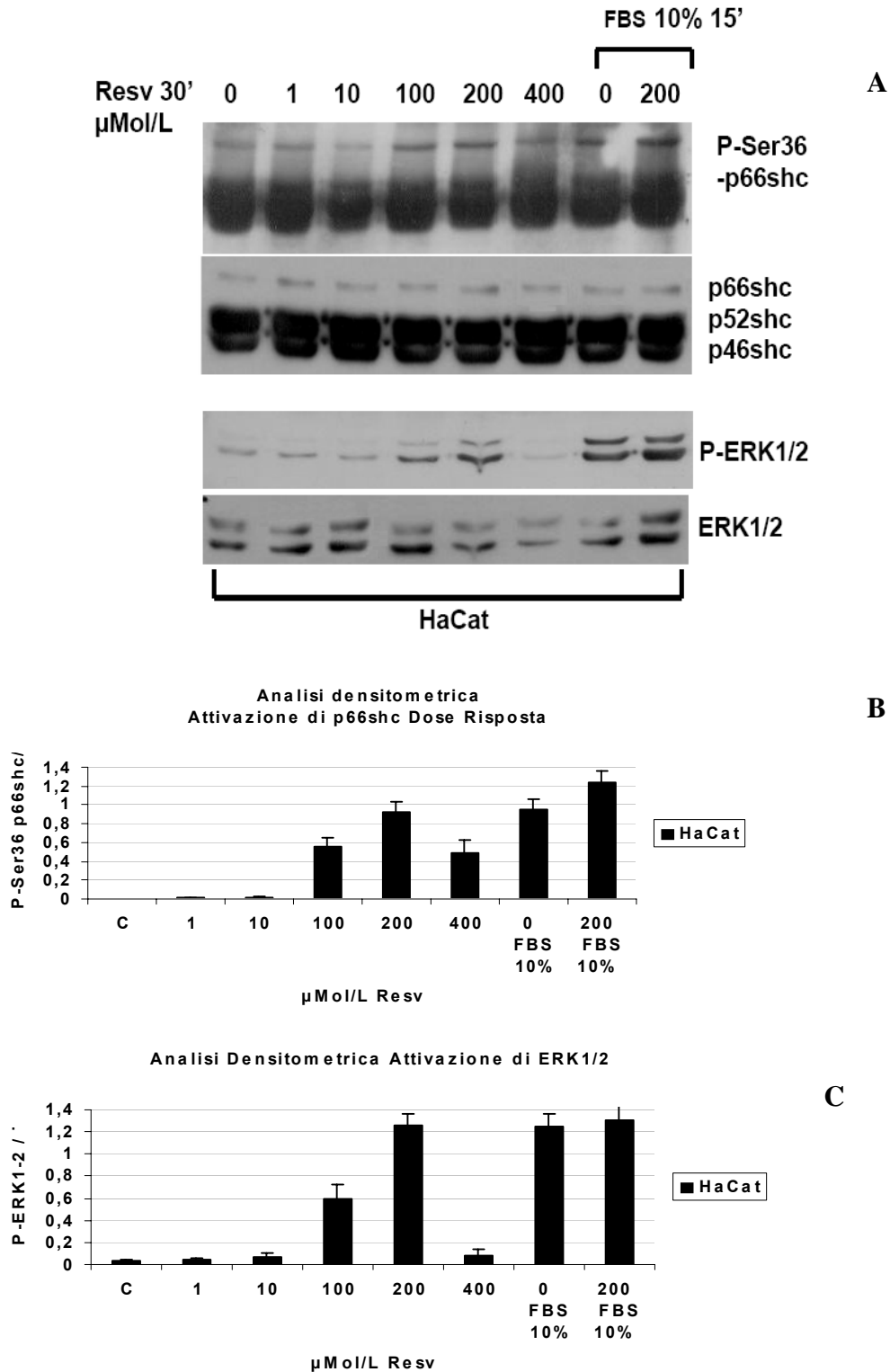
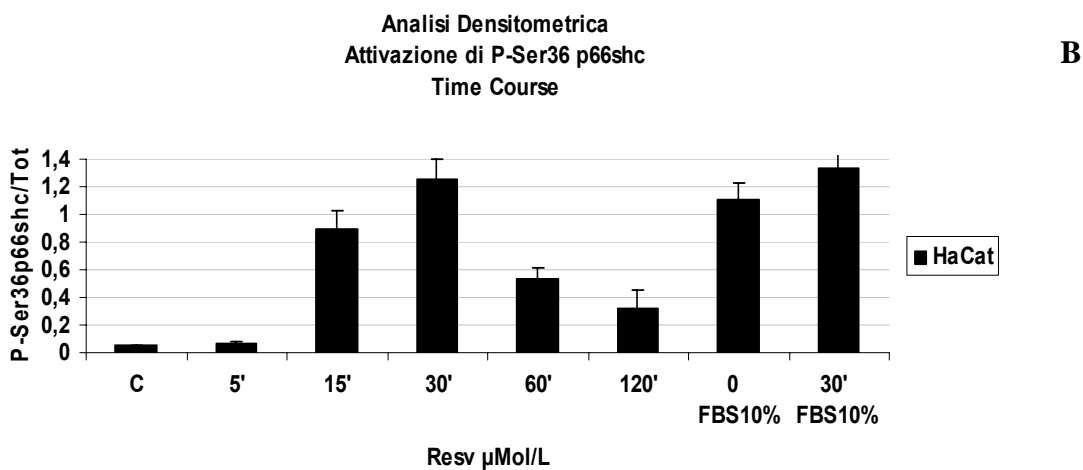
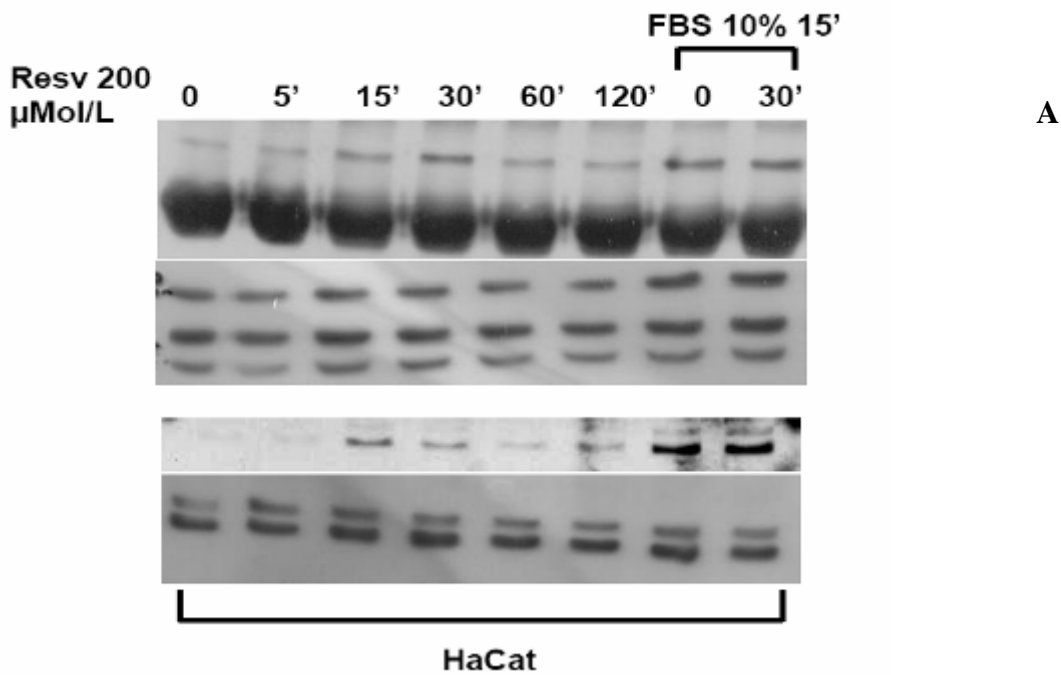


Fig. 3A Immunoprecipitazione su cellule HaCat trattate con resveratrolo a dosi diverse, di p66shc e western blotting con anti P-Ser36 p66sh; western blotting con anti P-ERK1/2. **B-C** Densitometria degli esperimenti di dose risposta. Sono riportati in grafico la media di tre esperimenti, i valori sono stati normalizzati per i livelli di proteina totale di p66Shc. Le barre di errore rappresentano la deviazione Standard (SD) (n = 3).

L'esperimento di *time-course* (fig. 4A) mette in evidenza che il picco massimo di fosforilazione della Serina 36 di p66shc è a 30' di trattamento con resveratrolo alla concentrazione di 200 $\mu\text{Mol/L}$; a tempi più lunghi (120 min.) la fosforilazione ritorna a livelli più bassi. La fosforilazione di ERK1/2 è invece massima a 15' di resveratrolo concentrato 200 $\mu\text{Mol/L}$. Dunque, il picco della fosforilazione di ERK1/2 precede nei tempi quello di p66shc. In figura 4B e C è riportata l'analisi densitometrica degli esperimenti di Time Course sia per P-ERK1/2 sia per P-Ser36p66shc. I dati ottenuti suggeriscono che il resveratrolo direttamente o indirettamente induca fosforilazione di ERK1/2 che successivamente potrebbe determinare la fosforilazione di p66shc in Ser36.



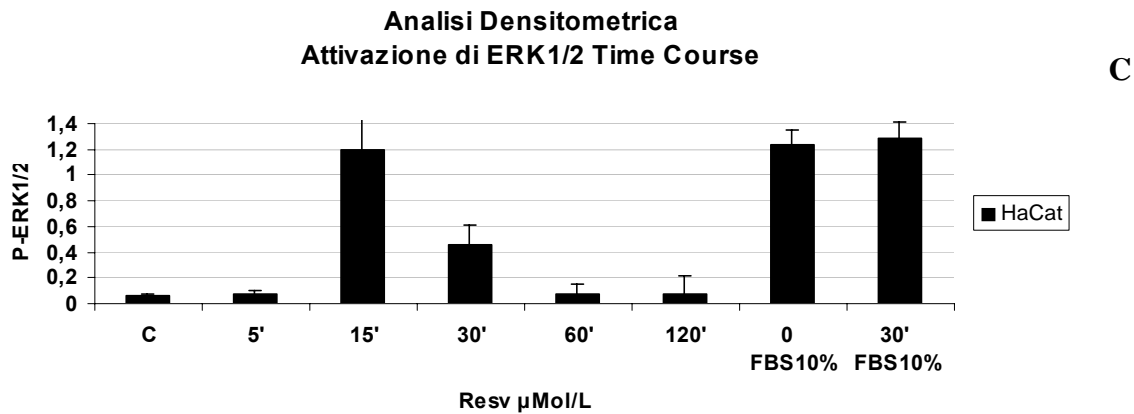
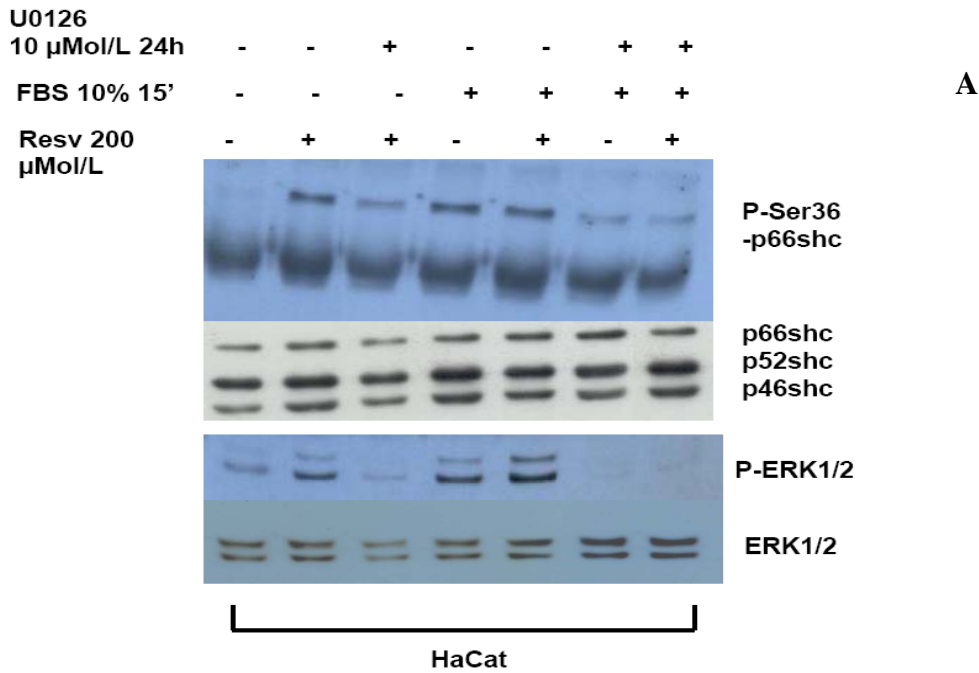


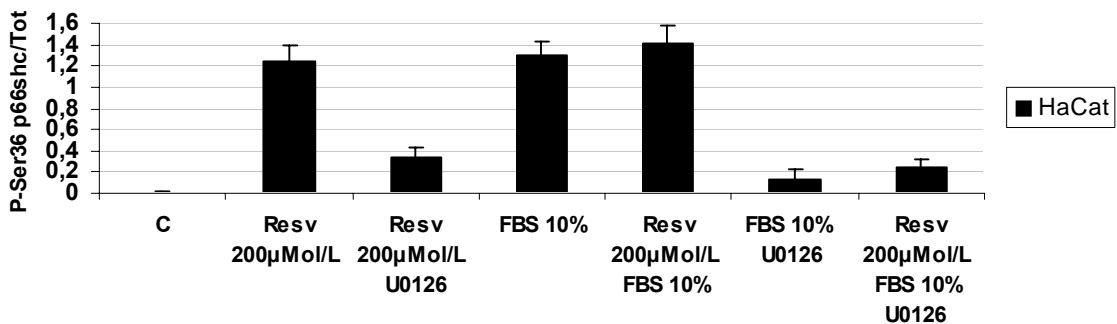
Fig.4A Immunoprecipitazione su cellule HaCat trattate con resveratrolo a tempi diversi, di p66shc e western blotting con anti P-Ser36 p66sh; western blotting con anti P-ERK1/2. **B-C** Densitometria degli esperimenti di *time-course*. Sono riportati in grafico la media di tre esperimenti, i valori sono stati normalizzati per i livelli di proteina totale di p66Shc. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard (SD) (n = 3).

5. 3 Effetto dell' inibitore di ERK1/2 sulla fosforilazione in Ser36 di p66shc

Per verificare l' ipotesi che l' attivazione di ERK1/2 potesse fosforilare p66shc in Ser36 abbiamo effettuato esperimenti di immunoprecipitazione di pShc in cellule HaCaT utilizzando come stimoli, oltre al resveratrolo ed all' FBS, anche U0126, un inibitore specifico di ERK1/2. Le cellule vengono pretrattate per 24 ore con 10 $\mu\text{Mol/L}$ di U0126 e poi stimolate con resveratrolo 200 $\mu\text{Mol/L}$ per 30'. Dall'immunoprecipitazione riportata in figura 5A si può vedere come, in presenza di inibitore, la fosforilazione in Ser36 indotta dal resveratrolo si riduca del 75% rispetto alla condizione di assenza dell'inibitore. Inoltre, l'inibitore di ERK1/2 è in grado di ridurre anche la fosforilazione di p66shc indotta da FBS e dalla combinazione di FBS e resveratrolo. E' particolarmente interessante notare che l'attivazione di ERK1/2 da resveratrolo, da FBS e dalla combinazione di FBS e resveratrolo, in presenza ed assenza dell'inibitore di ERK, segua una andamento del tutto analogo alla fosforilazione della Ser 36 di p66shc.



Effetto di U0126 su P-Ser36 p66shc
Analisi Densitometrica



Effetto di U0126 sulla Attivazione di ERK1/2 indotta dal Resv
Analisi Densitometrica

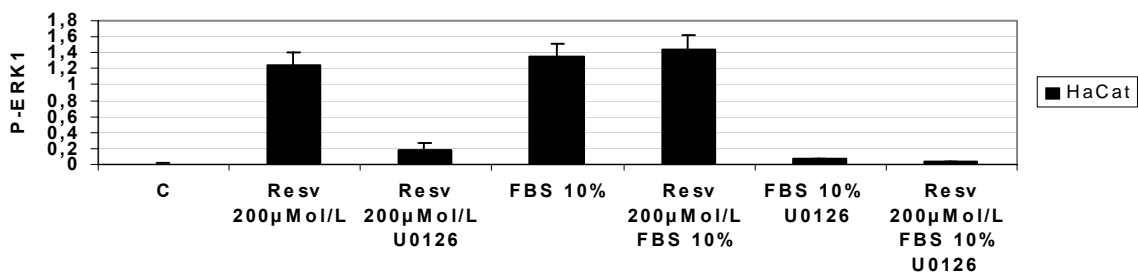


Fig. 5A Immunoprecipitazione su cellule HaCat trattate con resveratrolo e inibitore specifico di ERK1/2 (U0126) di p66shc e western blotting con anti P-Ser36 p66shc; western blotting con anti P-ERK1/2. **B-C** Densitometria degli esperimenti con U0126. Sono riportati in grafico la media di tre esperimenti (n = 3), i valori sono stati normalizzati per i livelli di proteina totale di p66Shc e di ERK1/2. Le barre di errore rappresentano la deviazione Standard (SD).

5. 4 Effetto del Resveratrolo sulle chinasi AKT e Pyk2 in cheratinociti

Abbiamo voluto valutare l'effetto del resveratrolo su α AKT, chinasi che ha un ruolo centrale nella regolazione della sopravvivenza cellulare. Un' elevata attività di AKT sembra essere responsabile dell'aumento della sopravvivenza delle cellule tumorali. Come si può notare dall' immunoblotting per P-AKT riportato in figura 6, il resveratrolo annulla completamente i livelli di fosforilazione di AKT (densitometria fig.6B). Ciò suggerisce un effetto inibitorio della sopravvivenza cellulare, accompagnato dall'effetto apoptotico suggerito dai dati di fosforilazione di p66shc in Ser36.

Pyk2 partecipa a vie di traduzione che regolano l'adesione e la motilità cellulare, ma l' attivazione di Pyk2 sembra incrementare anche i markers del differenziamento nei cheratinociti. Sono dunque stati effettuati esperimenti di western blotting per valutare l' attivazione di Pyk2 in presenza di resveratrolo alla concentrazione di 200 μ Mol/L per tempi diversi. Sostanzialmente l'attività di Pyk2 non viene influenzata dal resveratrolo.

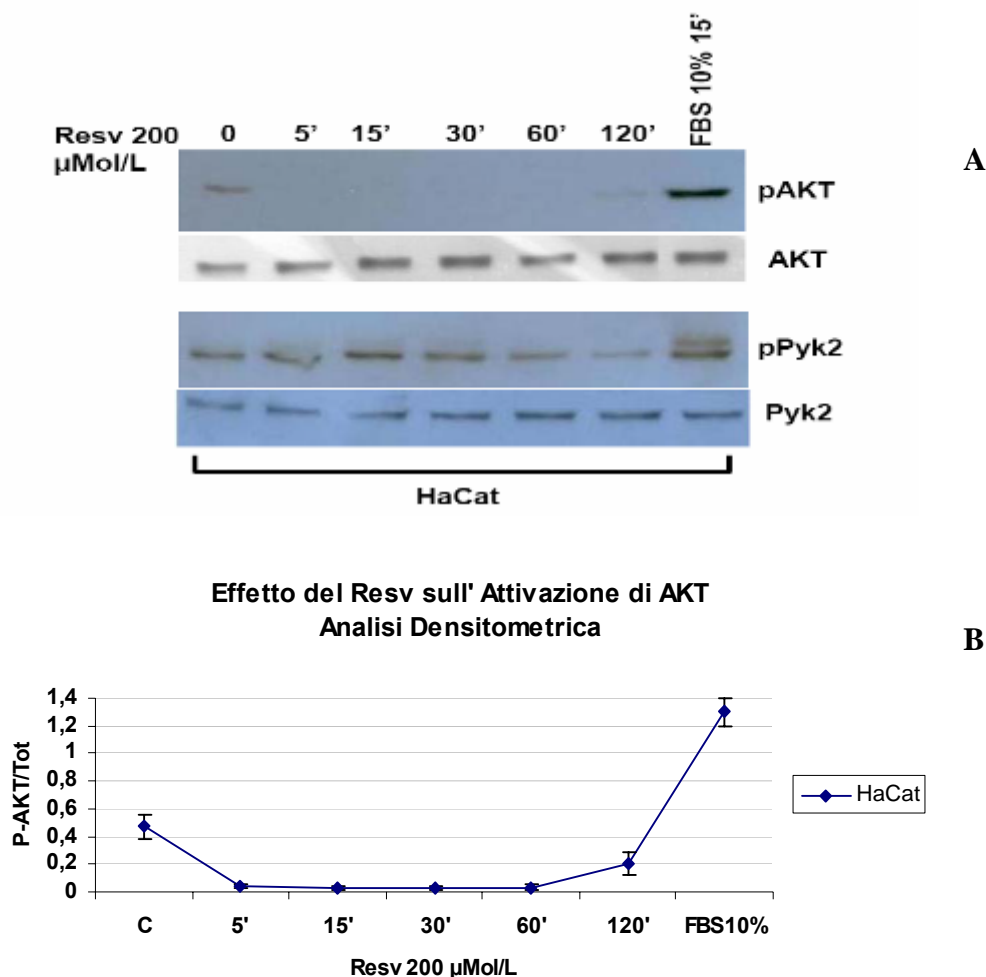


Fig. 6A Immunoblotting con anti pAKT e pPYK2 su estratti proteici di HaCat stimulate con resveratrolo a tempi diversi. **B** Densitometria del wester blotting contro pAKT. Le barre di errore rappresentano la deviazione Standard (SD) (n = 3).

5. 6 Motilità cellulare e Resveratrolo

Il resveratrolo sembra avere un effetto anche sulla motilità cellulare. Abbiamo tenuto in osservazione piastre contenenti un monostrato confluyente di cellule HaCaT incubate in presenza ed assenza di 200 $\mu\text{Mol/L}$ resveratrolo dopo aver praticato un' interruzione della continuit  del monostrato strisciando su di esso una pipetta sterile. I risultati ottenuti dimostrano chiaramente (fig. 7) che dopo 48 ore nella piastra di controllo si pu  apprezzare riduzione dell'area priva di cellule, rispetto alla piastra trattata con 200 $\mu\text{Mol/L}$ resveratrolo. Dopo 120 ore nella piastra di controllo le cellule hanno ricoperto quasi del tutto l'area denudata a differenza della piastra con lo stimolo dove   possibile osservare ancora lo spazio acellulare realizzato con la pipetta. Questo esperimento suggerisce che il resveratrolo possa inibire la motilit  cellulare.

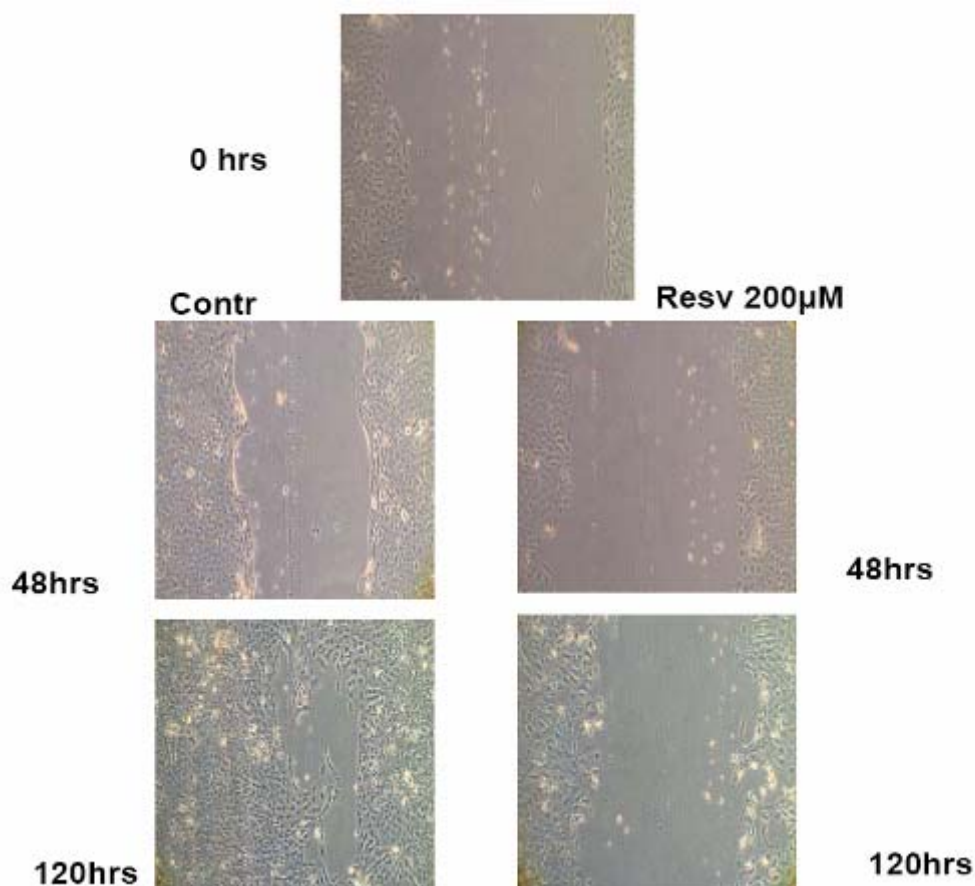
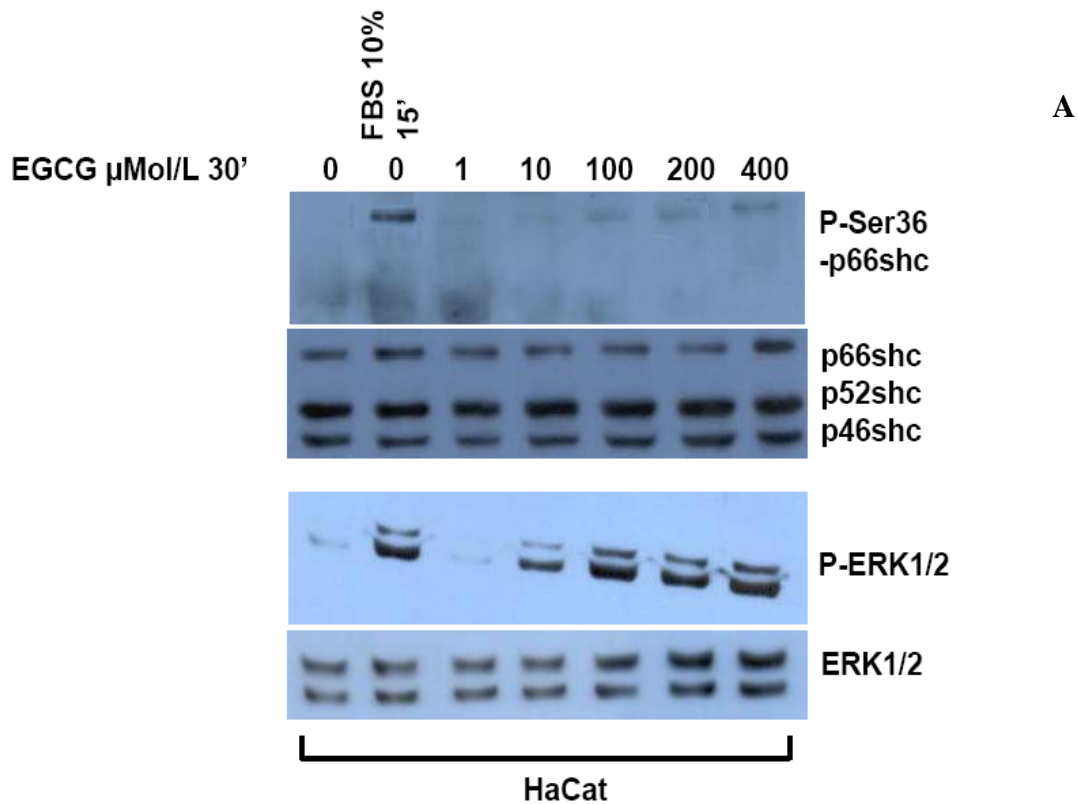


Fig. 7 Effetto del Resv 200 $\mu\text{Mol/L}$ sulla motilit  cellulare. Nella piastra con il resveratrolo le cellule ai margini dell'area acellulare dimostrano una capacit  di proliferazione e movimento verso la superficie denudata estremamente ridotta rispetto alla piastra di controllo.

5. 7 Epigallocatechina gallato e fosforilazione in Serina 36 di p66shc in cheratinociti

L'interesse per gli antiossidanti alimentari ha spinto alla valutazione dell' effetto dell'epigallocatechina gallato (EGCG), flavonoide presente nel tè verde e nel cacao, sull'attività di p66shc. Le cellule HaCaT, deprivate del siero per 24 ore, sono state stimulate, con dosi crescenti di EGCG per 30 minuti. Le relative proteine sono state estratte, immunoprecipitate con un anticorpo contro le tre isoforme di shc e trasferite elettricamente su filtro. Il filtro con gli immunoprecipitati è stato analizzato on un anticorpo anti-P-Ser36 p66shc; il risultato ottenuto non dimostra l' aumento dei livelli di fosforilazione osservato nelle cellule HaCaT trattate con il resveratrolo, nonostante il western blotting contro P-ERK1/2, eseguito sugli estratti proteici delle stesse cellule nelle stesse condizioni sperimentali, ci rivela una notevole attività di ERK1/2 indotta già da 10 µMol/L EGCG. I livelli di fosforilazione di ERK1/2 rimangono alti al crescere delle dosi di EGCG fino a 400 µMol/L, massima concentrazione da noi usata (Fig.8A-B).



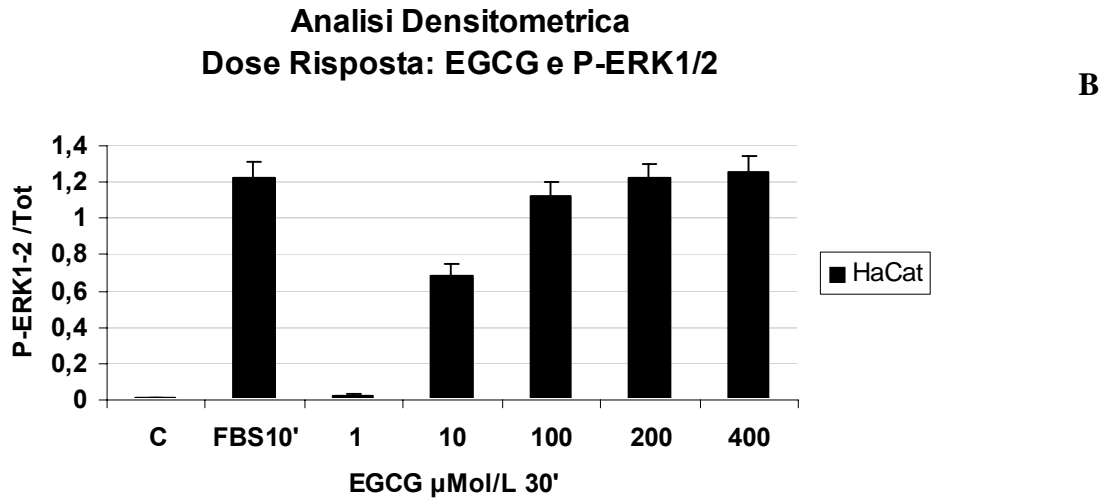


Fig. 8A Primo pannello dall'alto: immunoprecipitazione su cellule HaCaT trattate con EGCG a dosi diverse, di p66shc e western blotting con anti P-Ser36 p66sh; secondo pannello dall'alto: western blotting con anticorpo contro le tre isoforme di shc, su estratti totali di HaCaT trattate con dosi crescenti di EGCG; terzo pannello dall'alto: western blotting con anti P-ERK1/2; quarto pannello dall'alto: western blotting con anticorpo anti ERK1/2. **B** Analisi Densitometrica del wester blotting contro P-ERK1/2 Sono riportati in grafico la media di tre esperimenti ($n = 3$); i valori sono stati normalizzati per i livelli di proteina totale di ERK1/2. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard (SD).

5. 8 Valutazione della fosforilazione di p66 shc in Ser36 su cellule EPN e EPN -PKM3 trattate con Resveratrolo

Abbiamo effettuato esperimenti paralleli a quelli eseguiti sulle cellule HaCat sull'altro modello sperimentale utilizzato nel presente studio, ovvero il modello di epitelio prostatico normale costituito dalle cellule EPN in coltura e dalle cellule EPN-PKM3 (PKM3) ottenute trasfettando le EPN con un plasmide PKM (Pyk2 Kinase-negative mutant) con una mutazione della chinasi Pyk2 (Kisslinger et al. 2004).

Dopo immunoprecipitazione delle tre isoforme di shc (p66shc p52shc e p46shc) su cellule di prostata EPN e EPN – PKM3, si è valutato l'effetto del resveratrolo sulla fosforilazione di p66shc in Serina 36 mediante esperimenti di dose-risposta (fig.9A - B) e di *time course* (fig 10A - B). Dai risultati riportati in figura 9A - B si osserva che esiste una discreta dose-dipendenza: il resveratrolo aumenta i livelli della fosforilazione di p66shc in serina 36 determinando un picco massimo di fosforilazione a 200 µMol/L sia nelle EPN che nelle PKM3.

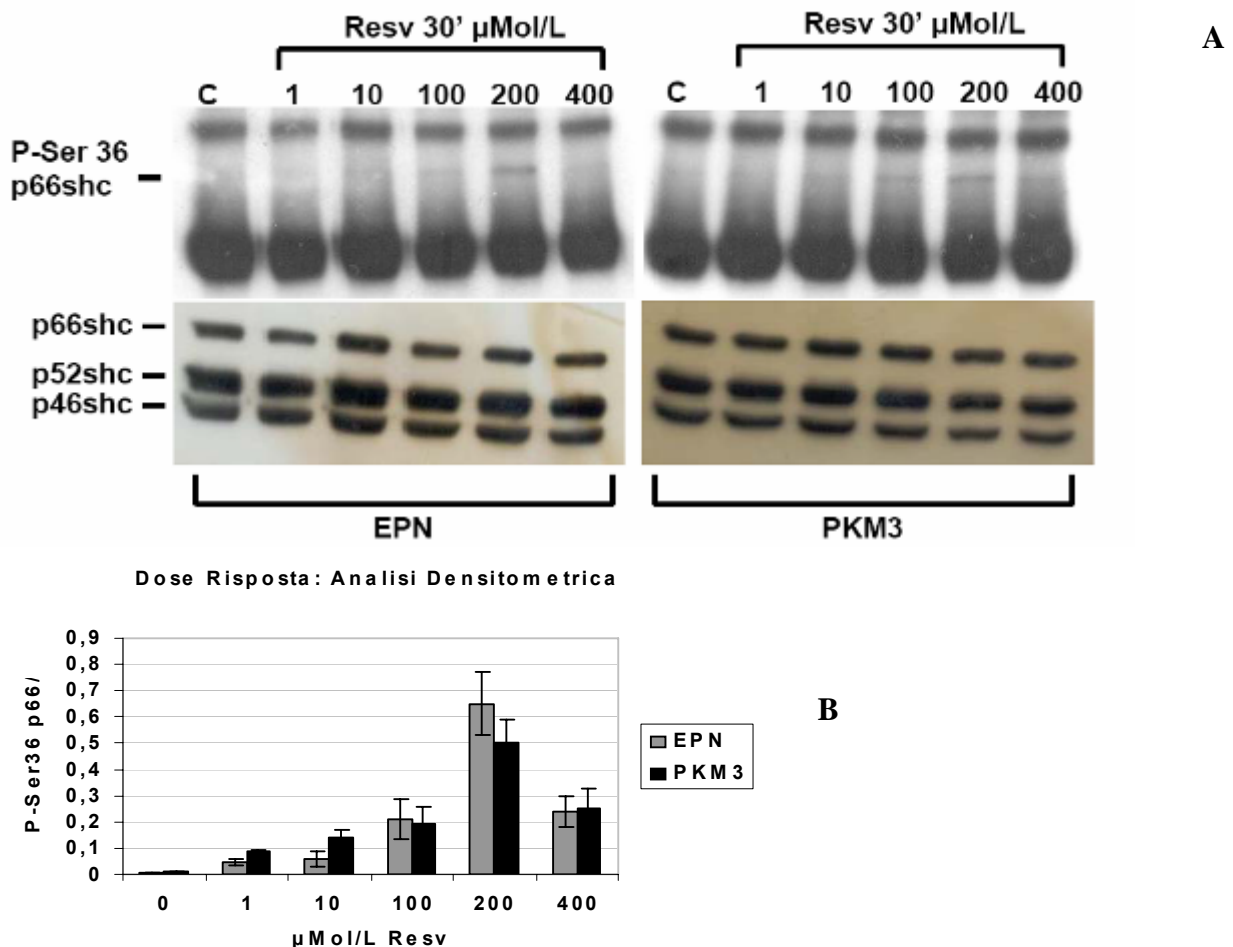


Fig 9A Immunoprecipitazione su EPN trattate con resveratrolo a dosi diverse, di p66shc e western blotting con anti P-Ser36 p66shc. **B** Analisi Densitometrica. Sono riportati in grafico la media di tre esperimenti, i valori sono stati normalizzati per i livelli di proteina totale di p66Shc. Le barre di errore rappresentano la deviazione Standard (SD).

L'esperimento di *time-course* (fig. 10) mette in evidenza che il picco massimo di fosforilazione della Serina 36 di p66shc si ottiene dopo stimolazione di 30' di resveratrolo alla concentrazione di 200 $\mu\text{Mol/L}$, per poi tornare a livelli basali a 120'. Ciò accade in entrambe le linee cellulari, sebbene dalla quantizzazione densitometrica (fig. 10B) rivela che probabilmente i livelli di fosforilazione nelle EPN raggiungono un picco più alto rispetto alle PKM3.

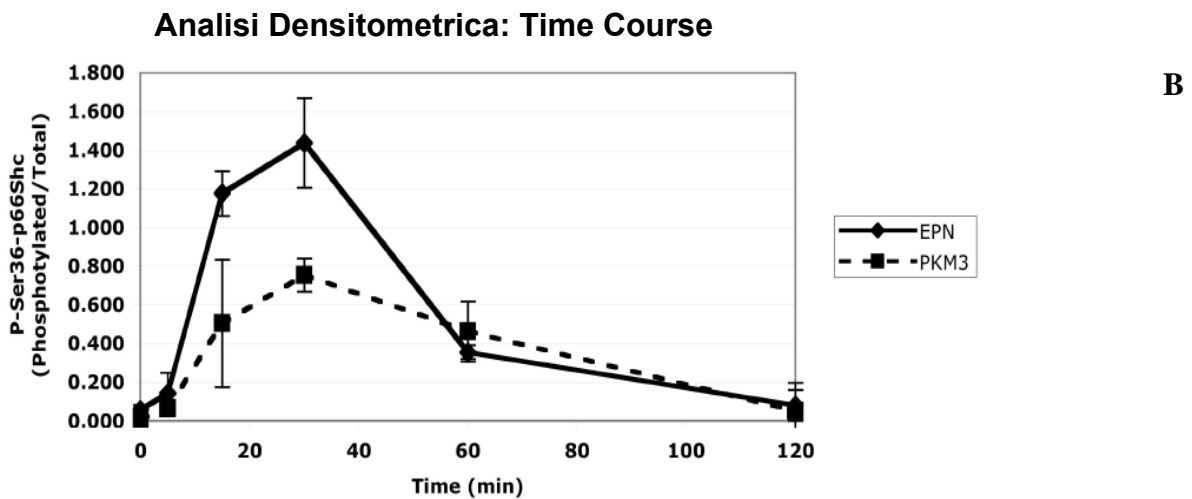
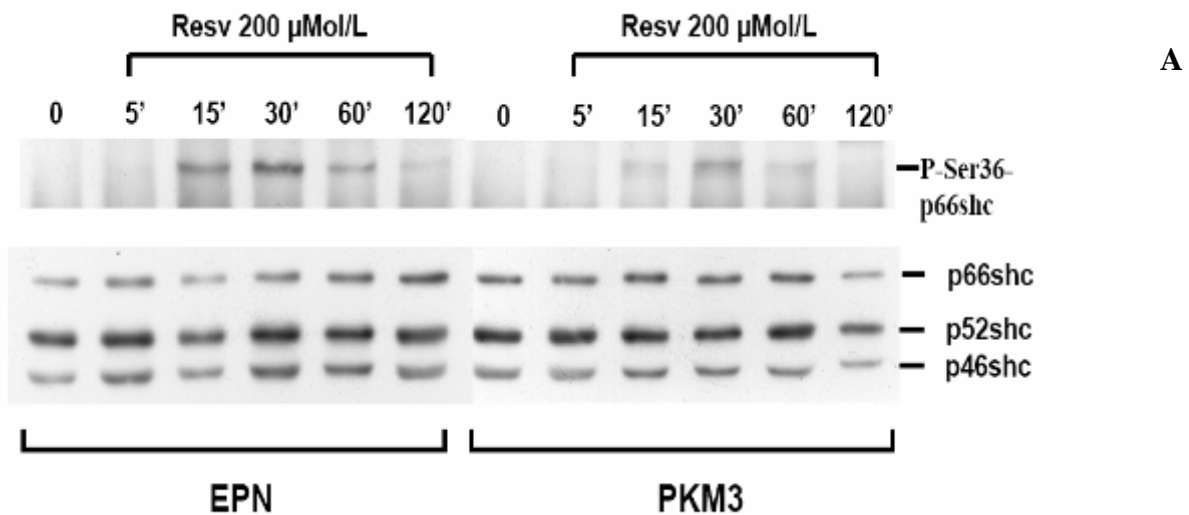


Fig. 10A Immunoprecipitazione e valutazione della fosforilazione in Ser36 di p66shc utilizzando l'anticorpo che riconosce la forma fosforilata di p66shc in Ser36. I livelli di fosforilazione sono normalizzati utilizzando un anticorpo contro le tre isoforme di Shc. **B** Analisi Densitometrica dell'esperimento di *time-course*. Sono riportati in grafico la media di tre esperimenti, i valori sono stati normalizzati per i livelli di proteina totale di p66Shc. Le barre di errore rappresentano la deviazione Standard (SD).

Successivamente si è voluta valutare l'effetto della stimolazione combinata con resveratrolo ed FBS. L'FBS è stato usato come controllo positivo.

In figura 11A si può osservare che la serina 36 viene fosforilata, sia nelle EPN che nelle PKM3, da FBS usato al 3% per 15', si conferma la stimolazione indotta da resveratrolo, ma non si osserva un effetto addizionale della combinazione 3% FBS + 200 µMol/L resveratrolo rispetto al solo 3% FBS. Il resveratrolo (200 µMol/L) inoltre sembra attivare la chinasi ERK1/2 (fig. 11B) seppure a livelli più bassi rispetto i livelli di attivazione indotti da FBS.

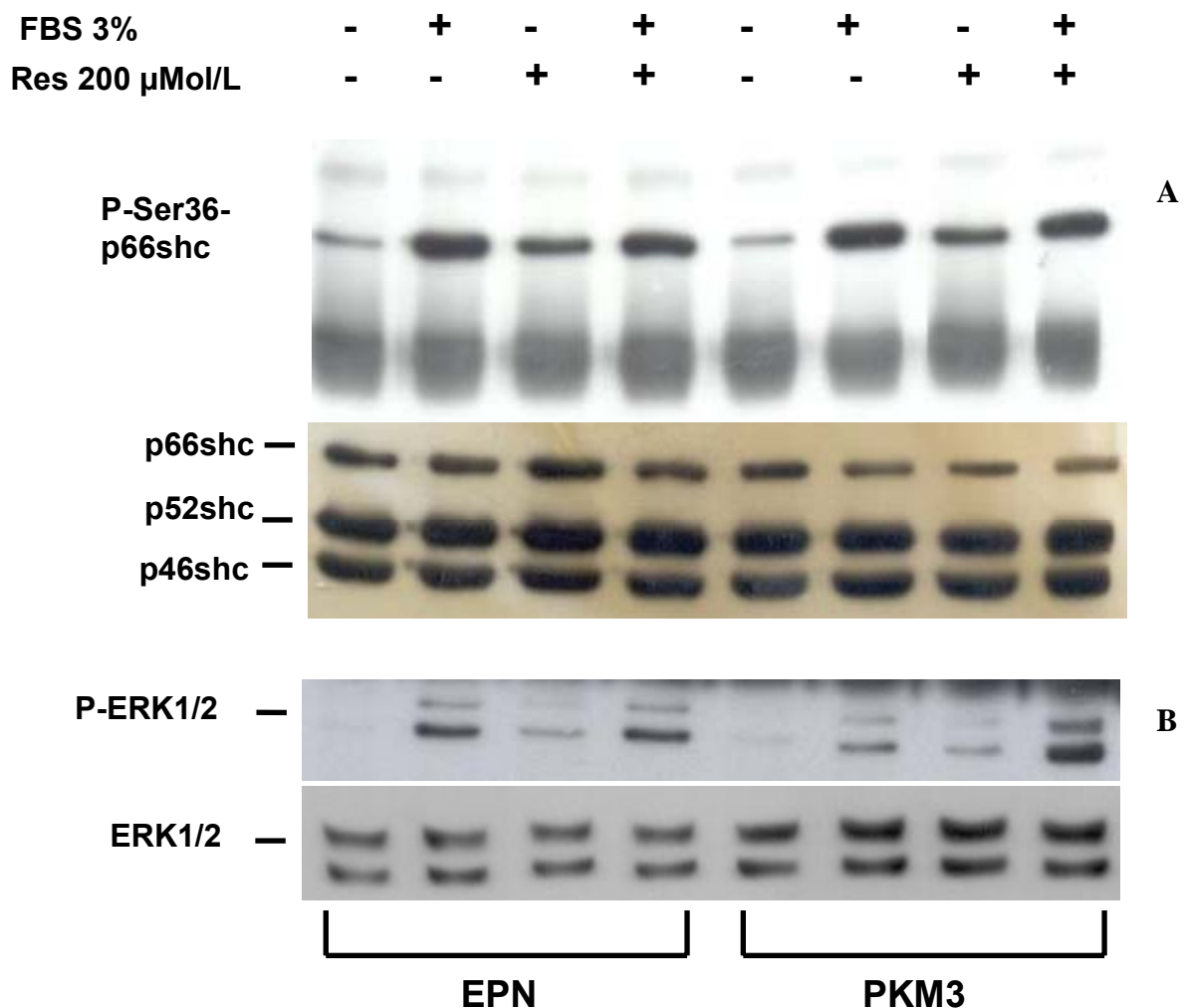


Fig. 11A Immunoprecipitazione di p66shc western blotting per valutare P- Ser36-p66shc su EPN e PKM3 stimolate con FBS al 3% per 15' e con Resv 200 µMol/L per 30'. Viene riportata anche la normalizzazione dell' immunoblotting. Il pannello **B** riporta un western che valuta l'attivazione di ERK1/2.

5. 9 Effetto del Resveratrolo sull' Attività di AKT in cellule di prostata

Dopo aver valutato l'attività del resveratrolo sulla fosforilazione di p66shc in P-Ser36, e di ERK1/2, è stato valutato l'effetto del resveratrolo sulla fosforilazione di α AKT.

In figura 12A è riportato un western blotting che evidenzia lo stato di fosforilazione di AKT in cellule EPN e PKM3 in seguito a trattamento con dosi crescenti di resveratrolo, da 1 a 400 μ Mol/L. Sia nelle EPN che nelle PKM3 la fosforilazione di AKT diminuisce all'aumentare delle dosi, in particolare si verifica un forte decremento già a 100 μ M/L di resveratrolo ed i livelli di fosforilazione permangono bassi anche a 200 e 400 μ M/L.

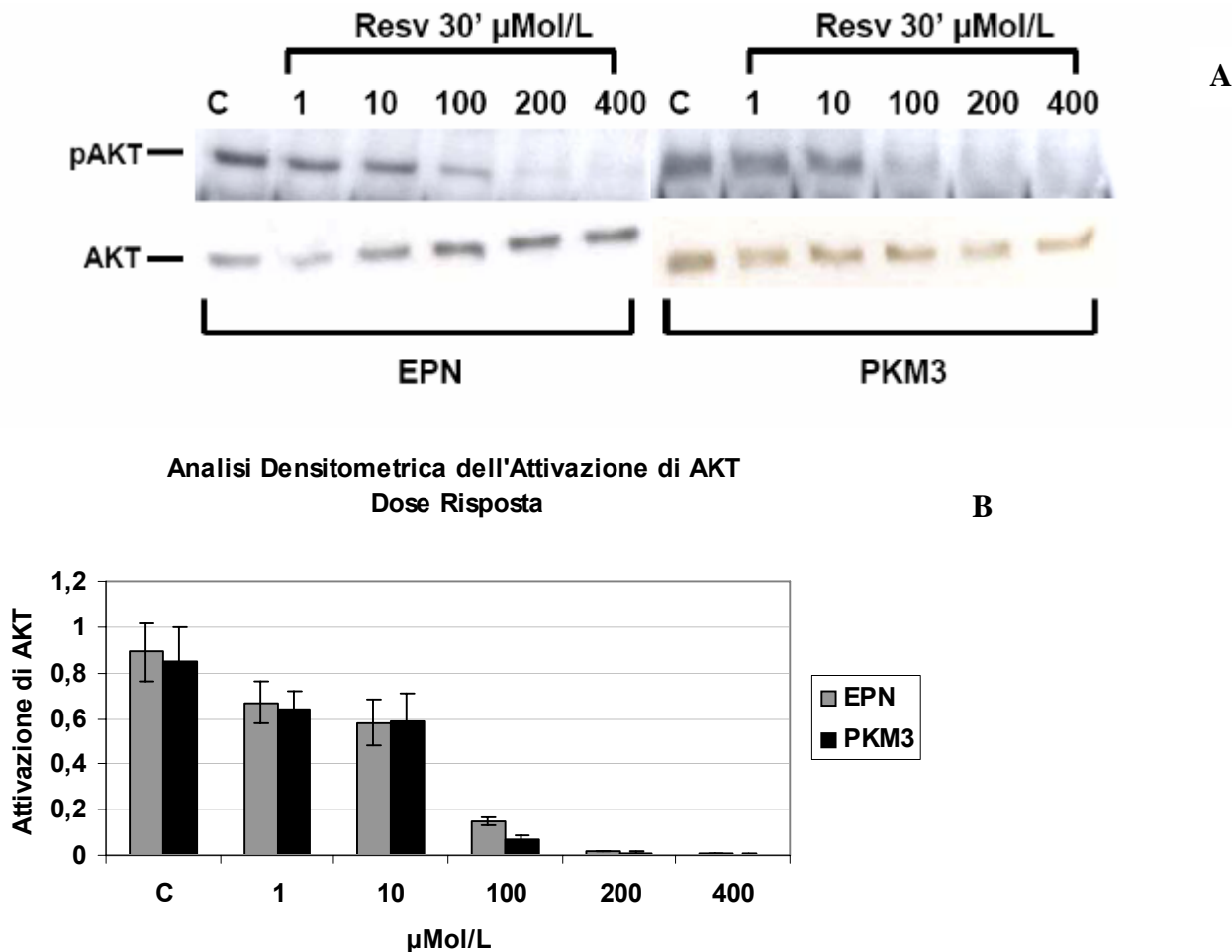


Fig. 12A Western blotting per pAKT. Si valuta la riduzione della attivazione di AKT su cellule trattate con resv a concentrazioni crescenti (dose risposta). **B** Analisi densitometrica del western. I valori sono normalizzati rispetto alla proteina totale AKT. Le barre di errore rappresentano la deviazione Standard (SD) (n = 3).

Per caratterizzare meglio il fenomeno sono stati effettuati esperimenti di *time course*. In figura 11A viene riportato un western blotting per la forma fosforilata di AKT eseguito con estratti di cellule trattate con una concentrazione fissa di resveratrolo, 200 $\mu\text{M/L}$, ma a tempi variabili, 5', 15', 30', 60' 120'.

Dall'analisi densitometrica (fig 13B) risulta che il resveratrolo riduce i livelli di fosforilazione di AKT, già a 15' di trattamento.

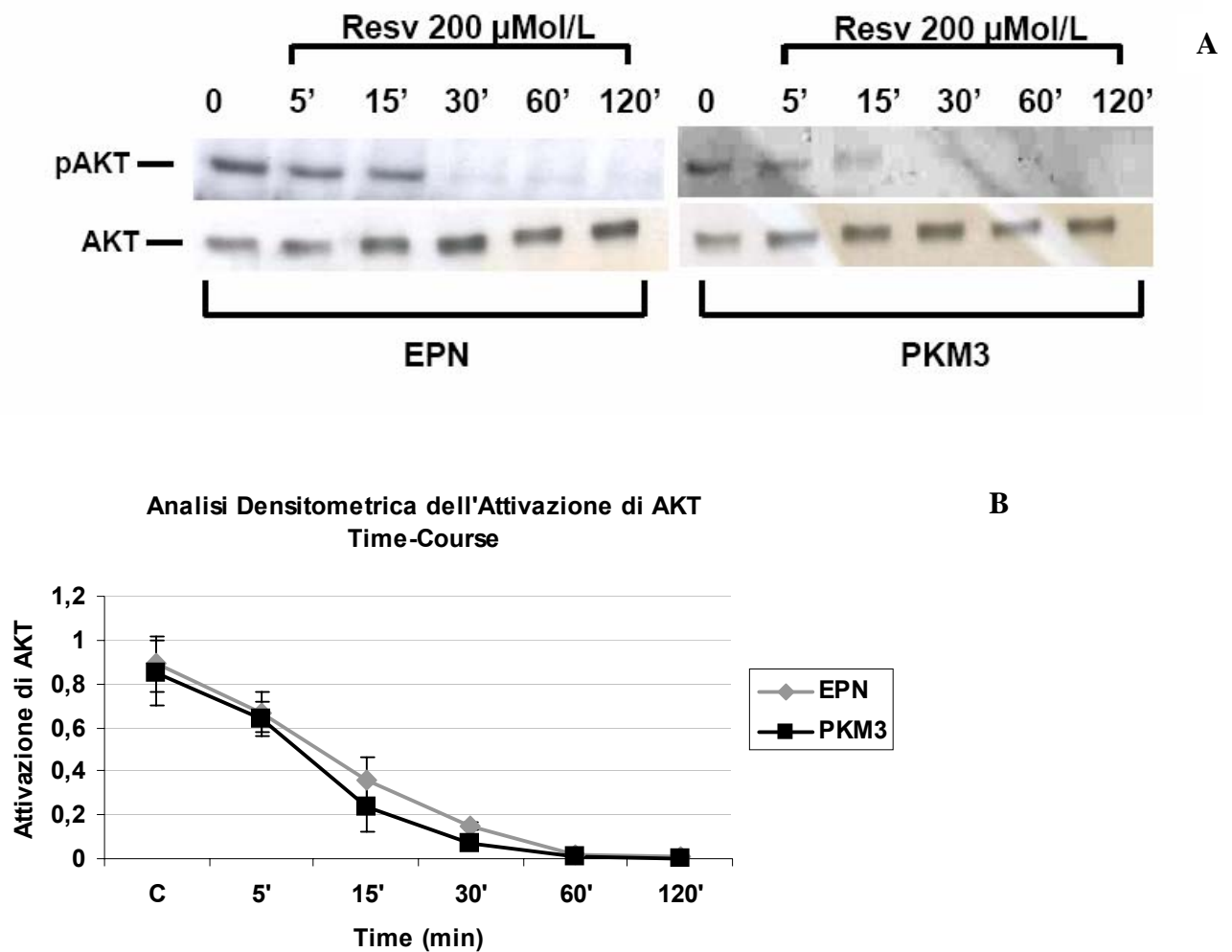


Fig. 13 **A** Western blotting contro pAKT su EPN e PKM3 trattate con resv a 200 $\mu\text{M/L}$ e a tempi variabili. **B** Analisi densitometrica del western. I valori sono normalizzati rispetto alla proteina totale AKT. Le barre di errore rappresentano la deviazione Standard (SD) (n = 3).

5. 10 Effetto dell' inibitore di ERK1/2 sulla fosforilazione in Ser36 di p66shc

Per valutare se la fosforilazione in Ser36 di p66shc indotta dal resveratrolo fosse controllata a monte dall'attività chinastica di ERK1/2, sono stati condotti esperimenti in cui le cellule, EPN e PKM3, deprivate per 24 ore del siero, vengono preincubate con U0126 10 μ Mol/L per 24 ore e poi stimulate con 200 μ Mol/L resveratrolo per 30 minuti. L'inibitore di ERK1/2 sembra ridurre i livelli di fosforilazione di p66shc in Ser36 sia dopo stimolazione con resveratrolo che dopo stimolazione con FBS o FBS e resveratrolo.

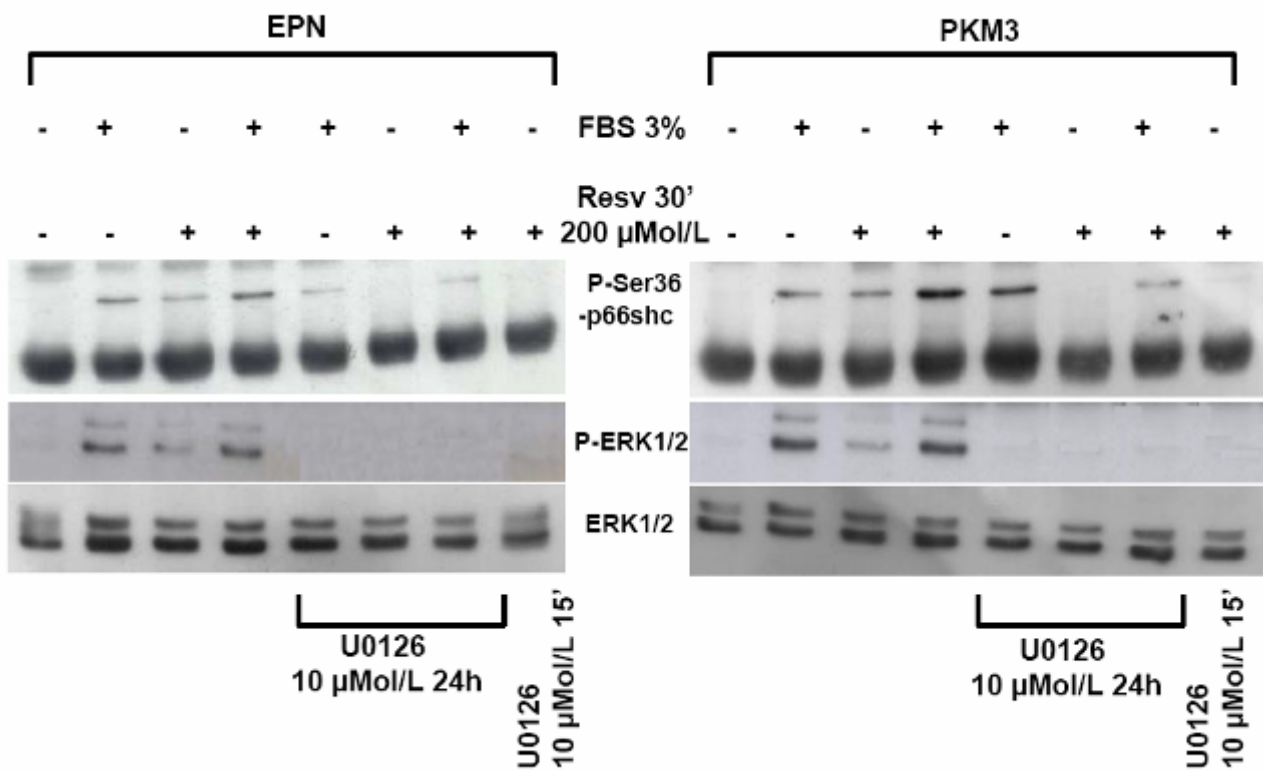
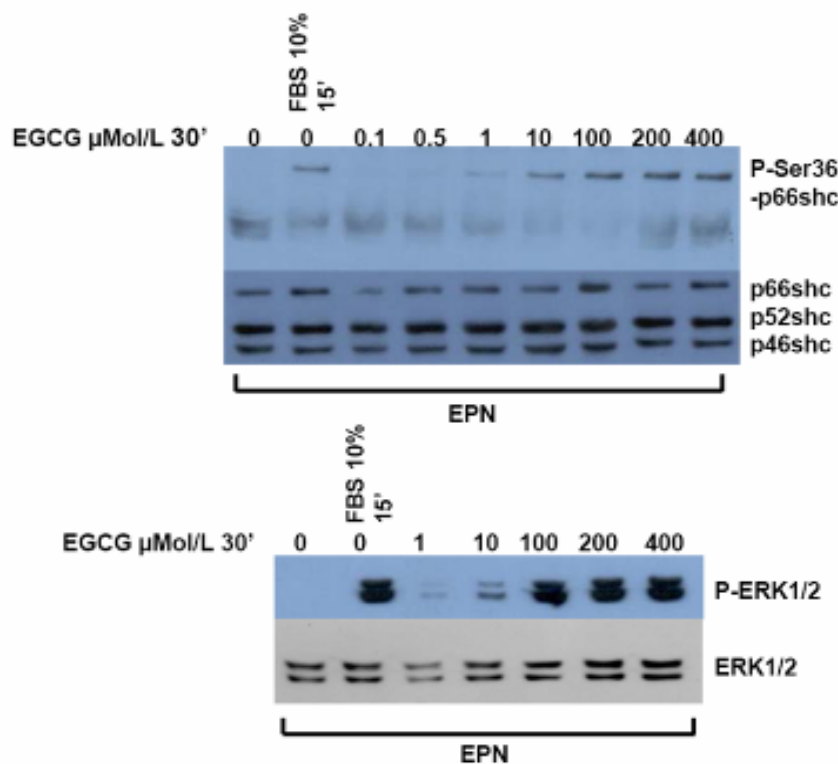


Fig 14 Immunoprecipitazione e Immunoblotting per P-Ser36p66shc in presenza di U0126 10 μ Mol/L 24h resveratrolo 200 μ Mol/L 30' e FBS 3% 15'. L'esperimento è normalizzato per p66 p52 p46 dato non riportato. Immunoblotting per P-ERK1/2 e normalizzazione.

5. 11 Epigallocatechina gallato e fosforilazione in Serina 36 di p66shc in EPN e EPN-PKM3

I risultati ottenuti sui cheratinociti e quelli ottenuti sulle cellule di prostata stimulate con il resveratrolo indicano che tale sostanza provoca risposte analoghe sia nel modello sperimentale di epitelio prostatico che di epitelio cutaneo. Per valutare se anche la EGCG avesse effetti simili nelle cellule di prostata ed in quelle cutanee, le cellule di prostata sono state sottoposte ad esperimenti di Dose Risposta (fig. 15-16A) e *time course* (fig 17-18) utilizzando come stimolo l' EGCG. L' EGCG induce una forte attivazione di p66shc: infatti già a 10 $\mu\text{Mol/L}$ si ha fosforilazione della Ser36 che raggiunge livelli massimi a 200 $\mu\text{Mol/L}$; questi livelli permangono elevati anche a 400 $\mu\text{Mol/L}$. Lo stesso andamento si verifica anche per l'attivazione di ERK1/2, sia nelle EPN che nelle EPN-PKM3 (fig 15-16B).



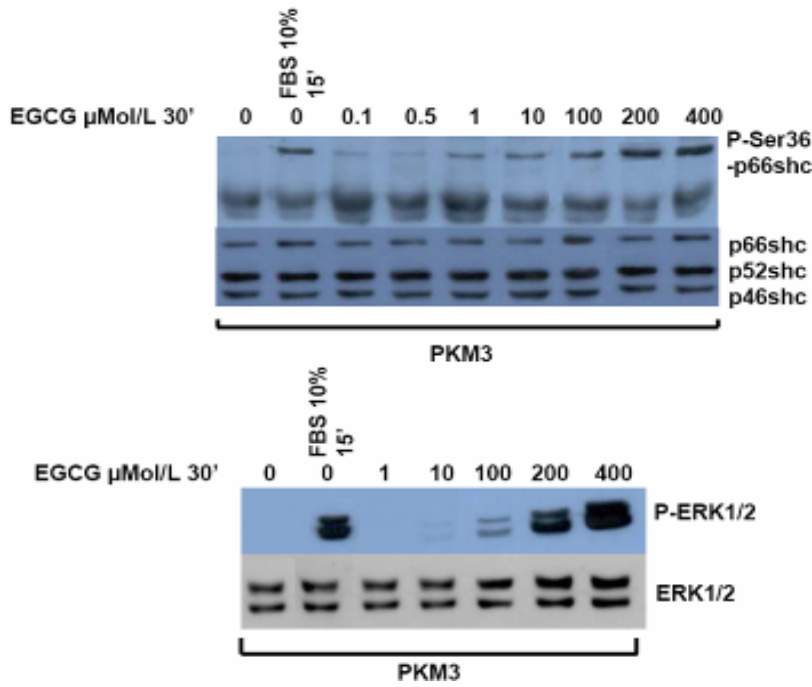


Fig.15 Immunoprecipitazione su EPN e EPN-PKM3 trattate con EGCG a dosi diverse, di p66shc e western blotting con anti P-Ser36 p66shc; western blotting con anti P-ERK1/2 su estratti proteici.

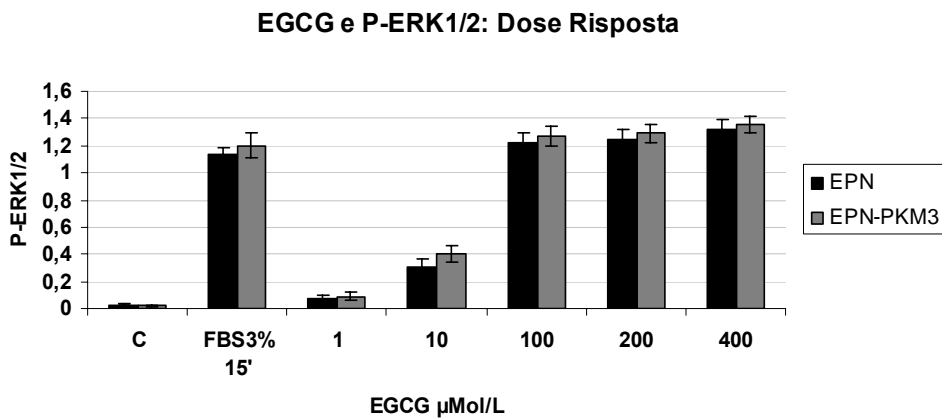
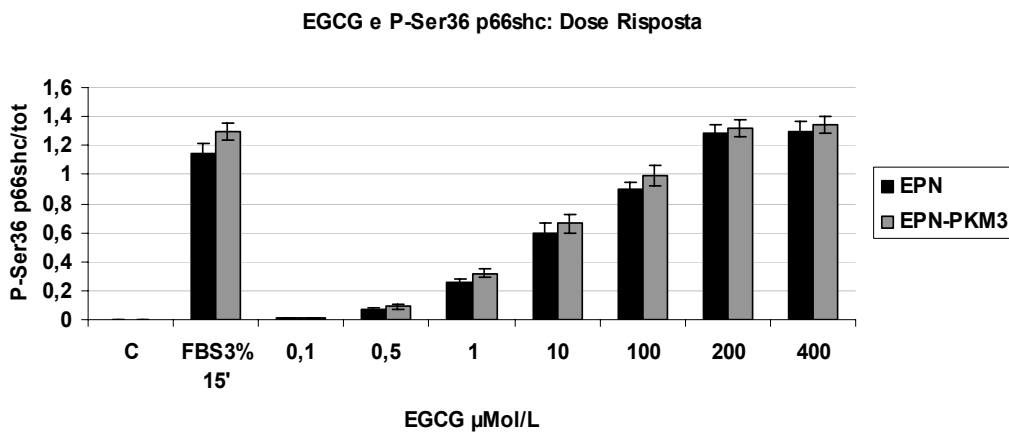
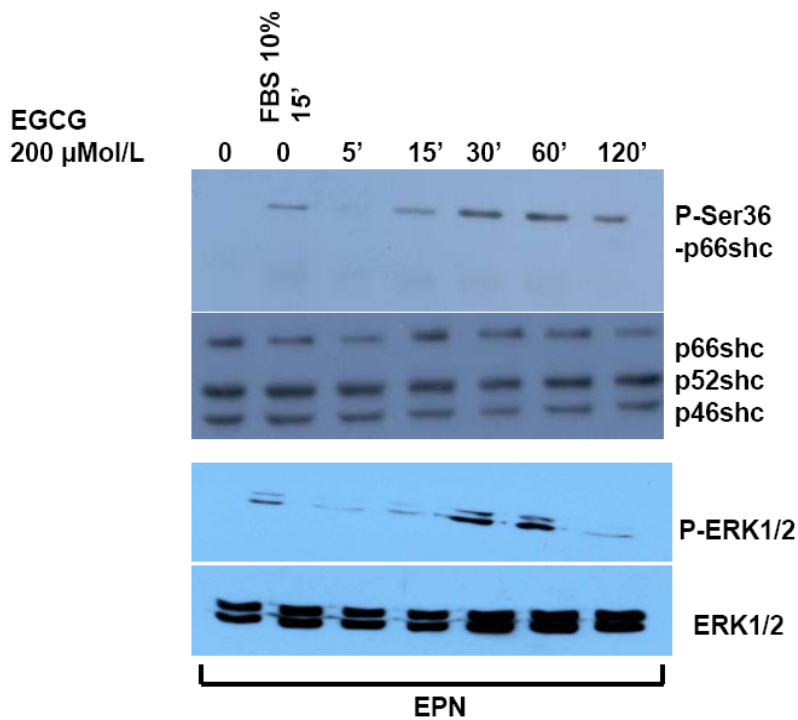


Fig. 16 Analisi Densitometrica. **A** Effetto del Dose Risposta di EGCG su P-Ser36p66shc. **B** Effetto del Dose Risposta di EGCG su P-ERK1/2. Sono riportati in grafico la media di tre esperimenti, i valori sono stati normalizzati per i livelli di proteina totale di p66Shc e di ERK1/2. Le barre di errore rappresentano la deviazione Standard (SD).

Per definire la cinetica dell'incremento della fosforilazione in Ser 36 di p66shc, sono stati condotti esperimenti di *time course* mantenendo costante la concentrazione di 200 $\mu\text{Mol/L}$ di EGCG ma variando i tempi della stimolazione. I risultati ottenuti mostrano un picco massimo di fosforilazione in Ser36 di p66shc a 30 e 60 minuti di trattamento. Un simile andamento è stato riscontrato anche per la fosforilazione di ERK1/2 in seguito a trattamento con 200 $\mu\text{Mol/L}$ di resveratrolo (fig 17-18). Dall'analisi densitometrica per P-ERK1/2 si evince che la fosforilazione indotta da 200 $\mu\text{Mol/L}$ di EGCG a 30 e 60 minuti è più alta di circa il 40% rispetto a quella indotta dal controllo positivo (FBS 3% per 15').



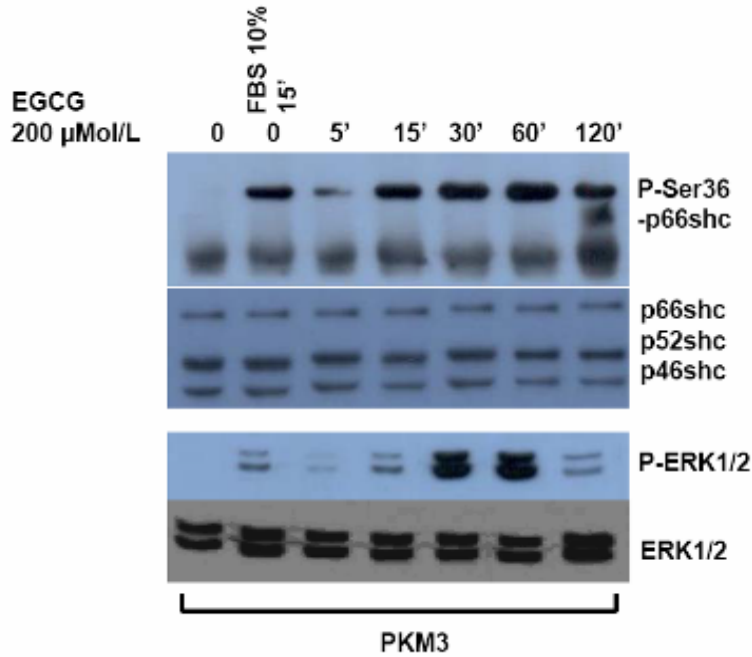
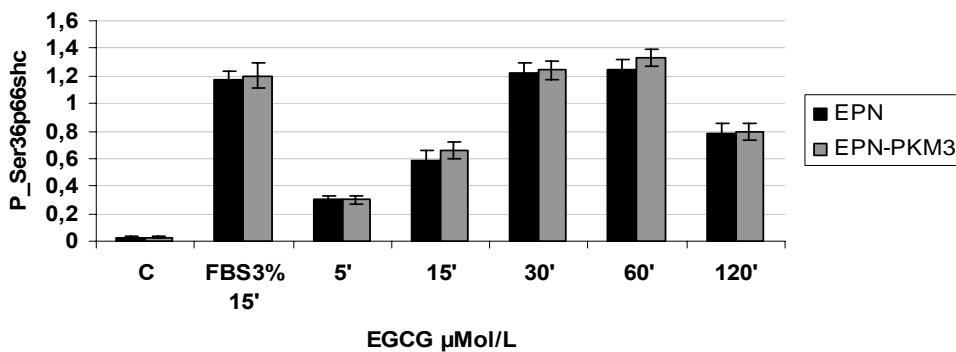


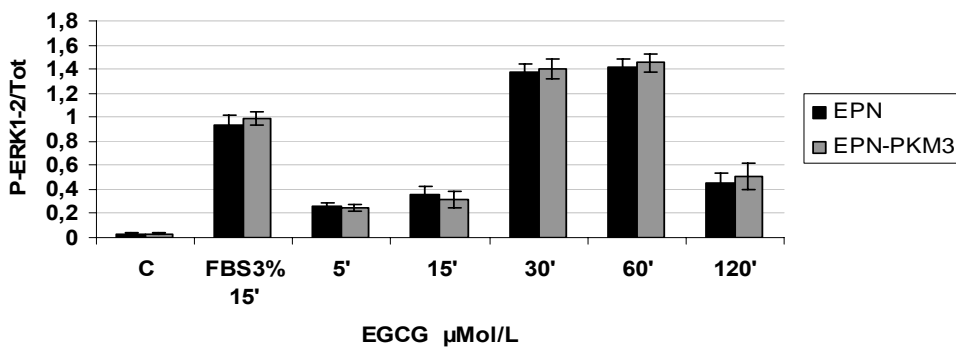
Fig. 17 Immunoprecipitazione su EPN e EPN-PKM3 trattate con EGCG a 200 µMol/L per tempi diversi, di p66shc e western blotting con anti P-Ser36 p66shc; western blotting con anti P-ERK1/2 su estratti proteici.

EGCG e P-Ser36 p66shc: Time Course



A

EGCG e P-ERK1/2: Time Course



B

Fig 18 Analisi Densitometrica **A** Effetto del EGCG su P-Ser36p66shc a tempi diversi. **B** Effetto del di EGCG a tempi diversi su P-ERK1/2. Sono riportati in grafico la media di tre esperimenti, i valori sono stati normalizzati per i livelli di proteina totale di p66Shc e di ERK1/2. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard (SD).

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli studi presentati si pongono nel contesto delle ricerche molecolari in campo alimentare e nutrizionistico che da alcuni decenni stanno assumendo rilievo sempre crescente mano a mano che il binomio alimentazione e salute sta diventando sempre più evidente. Un grande merito in tal senso va riconosciuto agli studi pionieristici condotti dallo scienziato americano Ancel Keys sin dalla metà degli anni '50 che hanno definitivamente dimostrato un legame diretto tra malattie cardiovascolari ed alimentazione e che hanno gettato le basi per la comprensione dei meccanismi di interazione tra patrimonio genetico ed ambiente. La regolazione dell'attività di fattori trascrizionali ad opera di sostanze di origine alimentare costituisce uno degli esempi più importanti di interazione geni-ambiente. I modelli sperimentali cellulari costituiscono uno strumento indispensabile per analizzare nuove ipotesi o per approfondire a livello molecolare i meccanismi che sottendono fenomeni osservati in modelli animali o postulati sulla base di osservazioni clinico-epidemiologiche.

La possibilità di preservare lo stato di buona salute o addirittura di curare malattie attraverso una sana alimentazione è ovviamente una prospettiva auspicabile e da perseguire. In parte tale possibilità è già oggi una realtà, almeno nel campo della prevenzione cardiovascolare. Grazie infatti ad un' enorme mole di studi, è oggi ampiamente dimostrato che la Dieta Mediterranea, riduce significativamente il rischio di sviluppare gravi malattie quali l' infarto miocardico o l' ictus cerebrale, le cause di gran lunga più frequenti di morte nel mondo. E' altrettanto importante ricordare che, a distanza di un paio di decenni, le stesse correlazioni tra alimentazione e malattie cardiovascolari si sono andate identificando anche tra alimentazione e cancro. Queste significative acquisizioni sono il frutto soprattutto delle acute e brillanti deduzioni in campo clinico-epidemiologico degli ultimi cinquant' anni, ovvero di quegli studi su ampi strati di popolazione che mettono in correlazione le variabili caratterizzanti un campione di popolazione con caratteristiche fenotipiche o con alterazioni e malattie tipiche dello stesso campione.

Tuttavia, tali studi non permettono di capire i meccanismi molecolari e cellulari coinvolti. La comprensione a questo livello è invece fondamentale per dare validità generale alle osservazioni, per individuare possibili variazioni delle risposte di individui o di sottogruppi di popolazione, per comprendere il peso del patrimonio genetico in tali risposte, per sviluppare nuove strategie terapeutiche ed applicazioni biotecnologiche, come quelle offerte da una nuova classe di sostanze definite oggi come "nutraceuticals" ovvero sostanze nutrizionali ad azione

farmacologica. Il resveratrolo costituisce un esempio paradigmatico di tali questioni. La caratteristica più nota e più considerata del resveratrolo è quella di essere un antiossidante. L'attività antiossidante del resveratrolo è stata chiamata in causa per spiegare, almeno in parte, l'effetto protettivo sulle malattie cardiovascolari da parte di un moderato consumo di vino rosso, osservato, in particolare, in alcuni gruppi di popolazione residenti in Francia. Si ipotizza inoltre che il resveratrolo, possa avere effetti benefici anche nei confronti delle malattie neoplastiche, ovvero l'altro gruppo di patologie che, subito dopo quelle cardiovascolari, primeggia tra le cause di mortalità nel mondo. Sebbene l'interesse destato da questo polifenolo è molto cresciuto negli ultimi anni, e con esso il numero di studi a riguardo, molti punti e molte correlazioni sul meccanismo d'azione del resveratrolo rimangono ancora poco chiari.

Solo recentemente si sta scoprendo che tale molecola ha tutta una serie di altri potenziali effetti biologici che potrebbero essere parzialmente o completamente indipendenti dall'attività antiossidante. Si parla oggi di effetti pleiotropici del resveratrolo e ci si deve dunque interrogare delle conseguenze complessive sulla salute e sulle patologie dell'uomo in seguito all'assunzione del resveratrolo con l'alimentazione, o, in un futuro, come supplemento e quindi in dosi più elevate.

Le malattie cronic-degenerative sono malattie multifattoriali, dovute a fattori genetici ed ambientali e nella cui patogenesi è ormai dimostrato che lo stress ossidativo abbia un ruolo importante. Da tali considerazioni scaturiscono alcuni collegamenti di rilievo che hanno ispirato gli studi presentati in questo lavoro. L'alimentazione, attraverso i cibi naturalmente ricchi di antiossidanti, può fornire una valida difesa contro i danni dello stress ossidativo; il resveratrolo è un antiossidante alimentare dagli effetti pleiotropici; il resveratrolo potrebbe essere uno dei mediatori molecolari dell'interazione geni-ambiente. Se da una parte si è posta l'attenzione sul resveratrolo come stimolo di natura ambientale, dall'altra si è preso in considerazione PPAR α come fattore in grado di mediare una delle risposte del genoma agli stimoli ambientali, in generale, e nutrizionali, in particolare. Si è quindi ipotizzato che il resveratrolo, grazie alle sue capacità di *scavenger*, potesse modulare l'attività dei PPARs, fattori trascrizionali potenzialmente sensibili allo stress ossidativo perchè dotati di un dominio di legame al DNA che contiene due strutture a dita di zinco, basate ciascuna sulla coordinazione tra un atomo di zinco e quattro cisteine, un aminoacido facilmente ossidabile. L'importanza dei PPARs in molti eventi della biologia cellulare e conseguentemente anche in molti meccanismi patologici è emersa grazie agli studi degli ultimi quindici anni che hanno dimostrato il loro ruolo centrale

nell'omeostasi metabolica e in alcuni processi differenziativi. In effetti, i dati sperimentali riportati in questo lavoro, dimostrano che l'attività di legame al DNA bersaglio da parte di PPAR α è influenzata negativamente dallo stress ossidativo indotto da DEM, un agente che causa una deplezione del glutathione ridotto intracellulare. Ma è anche emerso che un pretrattamento con resveratrolo prima dell'aggiunta alle cellule del DEM, aveva un duplice effetto: a tempi brevi, quando cioè l'effetto inibitorio del DEM è più marcato, il resveratrolo dimostra di antagonizzare significativamente, anche se parzialmente, l'azione del DEM; a tempi più lunghi, quando l'effetto del DEM è quasi del tutto smorzato, la compresenza del resveratrolo determina addirittura una diminuzione dell'attività legante il DNA, ad un livello inferiore rispetto a quello del solo DEM. Ci si è quindi trovati di fronte all'esigenza di perseguire due obiettivi: da una parte approfondire lo studio dell'azione antagonizzante del resveratrolo nei confronti del DEM e dall'altra cercare di chiarire l'effetto inibitorio del resveratrolo sull'attività di PPAR α . Per quanto riguarda il primo obiettivo, è stata ritenuta importante una più ampia caratterizzazione della risposta del sistema sperimentale allo stress ossidativo ed a tal fine sono stati condotti esperimenti che misurassero i livelli intracellulare del glutathione ridotto (GSH) dopo trattamento con DEM. Le misurazioni colorimetriche del GSH in seguito a trattamento col DEM hanno confermato una drastica riduzione del glutathione ridotto già dopo solo 15 min. di trattamento bloccando una via di detossificazione del perossido d'idrogeno con conseguente incremento dei livelli intracellulari di ROS.

Alcuni dati non mostrati in questo lavoro di tesi, hanno dimostrato che in cellule trattate con ferro-ascorbato, un composto con potenziale ossidante molto più elevato rispetto al DEM, si ha una riduzione del GSH, inoltre anche il ferro-ascorbato interferisce con il legame PPAR α -PPRE e quindi la sensibilità di PPAR α allo stress ossidativo è generica e non specificamente dipendente dal tipo di induttore.

È importante, considerare anche i risultati che dimostrano che nonostante il resveratrolo sia in grado di contrastare efficacemente lo stress ossidativo indotto, tuttavia lo stesso resveratrolo, somministrato da solo alle cellule, riduce il legame tra PPAR α e PPRE. Ciò dimostra, ancora una volta, che l'azione esercitata dal resveratrolo è di tipo complesso e tale complessità si rispecchia anche sull'effetto del resveratrolo sull'attività legante il DNA di PPAR α . L'azione antiossidante del resveratrolo è ben nota dalla letteratura, così come è anche evidente nel nostro sistema sperimentale. È quindi lecito ipotizzare che il resveratrolo sia in grado di contrastare l'effetto del DEM sull'attività legante il DNA di PPAR α grazie alla sua capacità antiossidante; tuttavia esiste anche una notevole raccolta di dati pubblicati che dimostrano la capacità del resveratrolo di influenzare numerosi chinasi intracellulari come la

PKC e la PKA, ed è altrettanto noto che PPAR α è un fattore regolato da fosforilazione, a volte in maniera attivante, a volte inibente. Di conseguenza, il resveratrolo potrebbe da una parte preservare l'attività di PPAR α nei confronti del danno ossidativo, ma dall'altra inibirla attraverso specifici eventi di fosforilazione, in particolare nel dominio A/B all'estremità N-terminale (funzione di transattivazione ligando-indipendente AF-1) e all'estremità C-terminale (funzione di transattivazione ligando-dipendente AF-2); la fosforilazione nella regione N-terminale che influenza la transattivazione indipendente da ligando, tuttavia, produce variazioni conformazionali che permettono *cross talk* tra i due domini, influenzano così anche l'attività dipendente da ligando. Abbiamo pensato di valutare tramite Western Blotting se il resveratrolo, alle dosi precedentemente utilizzate di 100 μ M ed efficaci nel modificare l'attività legante il DNA di PPAR α , fosse anche in grado di influenzare la fosforilazione in Ser-21 di PPAR α , indotta dalle proteine ERK1/2; è infatti noto che tali proteine catalizzano la fosforilazione di alcuni residui, principalmente di Ser 6 e/o Ser12 e/o Ser 21, nel dominio A/B di PPAR α ; questo evento fa diminuire la funzione di transattivazione AF-1 ligando indipendente (e si verifica nella down-regolazione di PPAR α durante i processi ipertrofici) mentre fa aumentare (Ser12 e/o Ser 21) la transattivazione dipendente da ligando, probabilmente mediante cross-talk tra i due domini N- e C- terminale.

I risultati hanno indicato che in effetti il livello di fosforilazione della Ser-21 aumenta in seguito al trattamento con resveratrolo. Tali risultati lasciano ancora non spiegato il motivo per cui il resveratrolo non sembra avere nessun effetto sui livelli della proteina ACO e sui livelli di mRNA di ACO. Tuttavia, è stato recentemente dimostrato che mentre l'espressione costitutiva dei geni mitocondriali, bersaglio di PPAR α , è dipendente da questo fattore trascrizionale, quella costitutiva dei geni della ω -ossidazione perossisomiale è invece indipendente da PPAR α ; difatti i topi che non esprimono PPAR α hanno normali livelli di ACO (ACO è l'enzima Acil-CoA ossidasi, un enzima perossisomiale con attività idratasica, 3-idrossiacil-CoA deidrogenasica e tiolasica); tuttavia PPAR α può indurre iperespressione sia dei geni della β -ossidazione mitocondriale, che quelli della ω -ossidazione perossomiale in presenza di induttori, in quanto il ligando sintetico Wy-14,643 (proliferatore dei perossisomi) fa aumentare, solo nei topi che esprimono PPAR α , sia gli enzimi mitocondriali che quelli perossisomiali.

E' probabile che nel nostro caso i livelli della proteina ACO siano dovuti all'espressione costitutiva perossisomiale non dipendente da PPAR α ; il resveratrolo potrebbe operare riducendo l'espressione genica di ACO, solo in condizioni di induzione di PPAR α , ad esempio, in seguito ad uno stimolo con fibrati.

In conclusione, i risultati ottenuti suggeriscono che il resveratrolo è in grado di modificare l'attività di PPAR α , ma che tale azione è più complessa rispetto all'ipotesi iniziale di semplice protezione nei confronti dello stress ossidativo. Dalla letteratura e dai dati presentati è possibile ipotizzare meccanismi diversificati del resveratrolo sull'attività del recettore nucleare studiato che vanno dalla protezione nei confronti del danno ossidativo, alla regolazione della fosforilazione, all'influenza sui livelli di espressione della proteina stessa. Questi elementi portano a sottolineare l'importanza di evitare semplificazioni quando si cerca di definire i meccanismi molecolari di fenomeni che pur sembrano evidenti a livello clinico-epidemiologico, come l'effetto protettivo sull'apparato cardiovascolare del vino e dei suoi microcomponenti. Sostanze come il resveratrolo necessitano quindi di studi che ne definiscano le molteplici attività. In questa logica sono state condotte le ulteriori sperimentazioni sugli effetti del resveratrolo in cellule in coltura, con attenzione particolare alle attività connesse ai meccanismi che regolano la proliferazione cellulare e la crescita tumorale.

Con tali presupposti, sono stati progettati una prima serie di esperimenti tesi a caratterizzare l'effetto del resveratrolo sulla proliferazione di cellule di epatoma di ratto in coltura, le RH7777. I risultati più significativi possono riassumersi nell'identificazione di tre diversi effetti del resveratrolo a tre diverse concentrazioni del composto alle quali sono state sottoposte le cellule per circa tre giorni. In particolare, a concentrazioni uguali od inferiori a 10 μ M resveratrolo, le cellule sembrano non risentire della presenza del composto e proliferare in maniera analoga alle cellule di controllo; viceversa, a 50 μ M resveratrolo si osserva un effetto citostatico, suggerito dal numero di cellule che rimane invariato all'inizio ed al termine dell'esperimento; viceversa, a 100 μ M resveratrolo si osserva un drastico effetto di morte cellulare, non rimanendo nessuna cellula vitale al termine del trattamento. E' anche interessante sottolineare i risultati di due esperimenti correlati: il primo dimostra che il resveratrolo, *in vitro*, così come *in vivo*, ha una breve emivita e quindi, in trattamenti prolungati nell'arco di più giorni, è necessario ripetere la somministrazione quotidianamente. Infatti i risultati prima descritti sono stati ottenuti con questa modalità. Se invece il resveratrolo viene somministrato in un'unica soluzione, all'inizio del trattamento, il suo effetto si riduce drasticamente. L'altro dato interessante riguarda il risultato della somministrazione del resveratrolo in un'unica soluzione, ma al momento del piastaggio delle cellule, quando queste non sono ancora adese alla superficie della piastra. In tal caso, anche se somministrato una sola volta all'inizio del trattamento, il resveratrolo inibisce l'adesione cellulare e quindi la crescita a dosi anche inferiori a quelle efficaci nelle somministrazioni ripetute a cellule adese. Tali risultati suggeriscono che il

resveratrolo potrebbe essere in grado di bloccare i meccanismi preposti al processo di adesione cellulare.

Per ottenere informazioni sul meccanismo di morte cellulare indotta dalle più alte concentrazioni di resveratrolo utilizzate nelle cellule RH7777, è stato effettuato un saggio di attività enzimatica (dosaggio della lattico-deidrogenasi) sul mezzo condizionato dalle cellule trattate col resveratrolo. Il risultato ottenuto lascia presupporre che la morte cellulare indotta da resveratrolo sia dovuta ad apoptosi perchè non rileva nel mezzo di coltura tracce dell' enzima citoplasmatico che testimonierebbero un danneggiamento parziale o completo della membrana cellulare che è invece tipico dei processi di morte cellulare per necrosi. Con l' intento di identificare il meccanismo con cui il resveratrolo stimoli il processo apoptotico suggerito da tali evidenze, è stata effettuata un' analisi mediante Western Blotting dei livelli di fosforilazione/attivazione della proteina chinasi Akt/PKB evidenziandone una marcata riduzione ad un' ora di trattamento con resveratrolo alla concentrazione di 100 μ M. Tale dato potrebbe fornire una spiegazione alla supposta attività pro-apoptotica del resveratrolo nel sistema utilizzato, in quanto è noto che l' attivazione di AKT mediante fosforilazione è un forte segnale di sopravvivenza cellulare e, viceversa, l' inattivazione della chinasi, come quella osservata in seguito a stimolazione col resveratrolo, potrebbe indirizzare alla cellula un segnale di morte programmata.

Lo studio degli effetti del resveratrolo sulla proliferazione e l' apoptosi cellulare è stato esteso anche ad altri modelli sperimentali, in particolare linee cellulari umane in coltura di cheratinociti e cellule epiteliali di prostata. Con alcuni semplici esperimenti di conta cellulare si è evidenziato che in cellule HaCaT (cheratinociti umani), il resveratrolo è in grado di inibire la proliferazione cellulare, e probabilmente anche l' adesione cellulare. Infatti gli esperimenti effettuati mostrano chiaramente che a concentrazioni pari a 100 e 200 μ M di resveratrolo, mantenute con aggiunta di resveratrolo ogni 24 ore, si ha una forte riduzione del numero di cellule. Il numero di cellule si riduce particolarmente se la concentrazione di resveratrolo è pari a 200 μ M di resveratrolo. Il resveratrolo ha anche un' attività inibitoria sull' adesione cellulare, infatti aggiungendo 100 e 200 μ M di resveratrolo alle cellule prima che queste aderiscano alla piastra si ha una forte riduzione del numero di cellule, maggiore di quella che si ottiene quando il resveratrolo si aggiunge a cellule già perfettamente adese. Ciò indica che il resveratrolo oltre ad inibire la crescita cellulare, inibisce anche l' adesione delle cellule alla piastra. L' inibizione della crescita cellulare indotta dal resveratrolo è un fenomeno da tempo studiato importante soprattutto per inibire la crescita di cellule tumorali ed infatti si pensa al resveratrolo come una possibile sostanza chemiopreventiva, ovvero capace di prevenire i tumori. Gli eventi molecolari

alla base di questo fenomeno sono probabilmente legati all' induzione di apoptosi, ed infatti il resveratrolo sembra attivare i membri proapoptotici della famiglia Bcl2.

L' ipotesi innovativa valutata in questo studio è invece che il resveratrolo possa indurre apoptosi attivando p66shc. p66shc è una proteina che appartiene alla famiglia delle proteine Shc, proteine adattatrici che prendono parte alla trasduzione del segnale coinvolta nella proliferazione ma anche nelle vie che inducono la sopravvivenza cellulare. La fosforilazione in serina 36 di p66shc risulta essere determinante per una corretta risposta apoptotica dopo stress. p66shc è considerato un enzima redox capace di controllare il metabolismo mitocondriale e la produzione dei ROS. In particolare è stato visto che p66shc può interferire con il trasporto degli elettroni sulla catena respiratoria mitocondriale con conseguente fuoriuscita del citocromo c.

La fosforilazione in serina 36 di p66shc è oggetto di vari studi con risultati contrastanti e poco chiari il che fornisce un' indicazione della complessità dei vari *pathway* che possono essere attivati in seguito a questa importante fosforilazione.

I risultati ottenuti in tal senso indicano chiaramente che il resveratrolo induce la fosforilazione di p66shc proprio in serina 36. Abbiamo eseguito esperimenti di dose-risposta e di *time course* per studiare in dettaglio la fosforilazione in serina 36 di p66shc. Dopo aver stimolato cellule HaCaT, ma anche cellule di epitelio di prostata (EPN) con resveratrolo a tempi e concentrazioni diverse, abbiamo immunoprecipitato le tre isoforme di shc (p46, p52, p66) dagli estratti cellulari e osservato la fosforilazione delle serina 36 con un immunoblotting degli immunoprecipitati utilizzando un anticorpo che riconosce in modo specifico la fosforilazione in questione. Dai risultati si evince chiaramente che la fosforilazione della serina 36 di p66shc raggiunge un picco quando le cellule sono stimolate con 200 μ M resveratrolo per 30 minuti; il livello della fosforilazione si abbassa a concentrazioni più alte e a tempi più lunghi.

Questi dati assumono una particolare rilevanza in considerazione del fatto che la maggior parte degli studi riportati in letteratura per valutare la fosforilazione di p66shc sono stati condotti sulla proteina prodotta da un gene esogeno introdotto nella cellula in seguito a trasfezione; viceversa, le analisi condotte nel presente studio si riferiscono alla valutazione del livello di attivazione della proteina endogena, risultando quindi maggiormente aderenti ad una situazione reale e meno artificiosa.

Sugli stessi estratti cellulari preparati dalle cellule HaCaT abbiamo valutato l' effetto del resveratrolo sull' attivazione di ERK1/2. I risultati ottenuti dimostrano che l' attivazione di ERK1/2 ha un' andamento molto simile a quello della P-Ser36 p66shc, ma leggermente anticipato nel tempo: infatti il picco di fosforilazione si registra a 200 μ M resveratrolo, come nel caso della fosforilazione in Ser36 di p66shc, ma a 15 minuti, dunque in anticipo rispetto al picco

di fosforilazione di p66shc che si osservava a 30 minuti. Per approfondire la relazione tra P-ERK1/2 e P-Ser36 p66shc, è stato utilizzato U0126, un inibitore specifico di ERK1/2. In presenza dell' inibitore e del resveratrolo, non si osserva più la fosforilazione di p66shc indotta da resveratrolo: ciò suggerisce che bloccando l' attività di ERK1/2 si blocca anche la fosforilazione in Ser36 di p66shc, lasciando ipotizzare un ruolo significativo di ERK1/2 nella fosforilazione di p66shc in Ser36.

Per ampliare il quadro degli effetti del resveratrolo nel sistema sperimentale impiegato, è stato valutato il livello di fosforilazione/attivazione della proteina chinasi Akt/PKB. Questa chinasi svolge un ruolo primario nel mediare i segnali che inducono la sopravvivenza cellulare e che bloccano le vie apoptotiche. Anche in base alle curve di crescita ottenute dopo stimolazione con resveratrolo, e che dimostrano un effetto dose-dipendente del polifenolo di inibizione della crescita cellulare, era ipotizzabile che venisse interessato lo stato di attivazione di AKT. I dati ottenuti evidenziano una marcata riduzione della fosforilazione di AKT già dopo 5 minuti di trattamento con 200 μ M di resveratrolo. L' inattivazione di AKT quindi, potrebbe indirizzare alla cellula un segnale di morte programmata, il che sarebbe coerente con i dati delle curve di crescita effettuate dopo stimolo con resveratrolo.

Inoltre i saggi di motilità cellulare effettuati su HaCat, indicano che il resveratrolo sembra ridurre anche la capacità di migrazione delle cellule. Infatti, negli esperimenti di *wound healing*, nei quali si interrompe la continuità di un monostrato di cellule in coltura, si osserva che la presenza di resveratrolo alla concentrazione di 200 μ Mol/L inibisce fortemente il ripristino della copertura cellulare delle aree meccanicamente denudate rispetto alle piastre di controllo. Il resveratrolo, dunque, non solo riduce la proliferazione delle cellule prostatiche in coltura, ma ne inibisce anche la motilità. Si tratta quindi di un complesso di azioni che potrebbe, *in vivo*, sottendere ad un' efficace azione antineoplastica ed antimetastatica.

Tuttavia, quando si è indagato sulla possibile relazione tra resveratrolo e Pyk2, tirosin chinasi citoplasmatica che partecipa al controllo dei meccanismi di adesione e motilità cellulare, non si è riscontrato un significativo effetto del polifenolo sulla chinasi. Per altro è stato osservato che cellule epiteliali esprimenti una forma di Pyk2 difettiva dell' attività chinasica (EPN-PKM3), presentano una motilità alterata, in particolare aumenta la motilità cellulare in risposta allo stimolo del siero rispetto a cellule epiteliali di prostata che esprimono Pyk2 normalmente attivo. Inoltre è riportato in letteratura che Pyk2 sembra avere un ruolo importante nella regolazione della differenziazione dei cheratinociti. Nonostante dunque il profondo coinvolgimento di Pyk2 nei processi che sembrano essere sensibili al resveratrolo, al momento non ci sono evidenze a favore di un' influenza del resveratrolo sullo stato di attivazione di Pyk2.

In sintesi, il resveratrolo è capace di indurre attivazione di ERK1/2, di fosforilare P-Ser36 p66shc, ma inibisce l'attività di AKT, la motilità cellulare, la proliferazione e l'adesione cellulare in un modello sperimentale di cheratinociti umani, e in gran parte questi effetti si verificano anche nelle cellule epiteliali prostatiche.

Il resveratrolo, dunque, può indurre probabilmente apoptosi stimolando la fosforilazione di p66shc in Ser36, fosforilazione importate per il controllo dell'apoptosi. Ma probabilmente il resveratrolo ha un ruolo importante anche nell'mantenimento dello stato differenziato sia in cellule di prostata sia nei cheratinociti. Come esperimenti futuri si pensa di valutare lo stato dei markers del differenziamento di cheratinociti ed epitelio prostatico in seguito a stimolo con resveratrolo.

In prospettiva, il resveratrolo potrebbe essere valutato, dal punto di vista applicativo, come agente capace di bloccare l'iperproliferazione cellulare in vari contesti, da quelli di tipo neoplastico ad altri meno gravi, ma comunque spesso invalidanti, come nel caso della psoriasi, malattia della pelle in cui si verifica una forte iperproliferazione cellulare, con conseguenti fenomeni di infiammazione.

Infine, nel presente lavoro, gli studi sul resveratrolo sono stati replicati in gran parte anche per un'altra promettente molecola presente negli alimenti, la (-)-epigallocatechina-3-gallato (EGCG), perchè solo dalla conoscenza sempre più allargata dei molteplici composti presenti nell'alimentazione si potrà avere una visione completa dei meccanismi molecolari e degli effetti sulla salute di un complesso cocktail di migliaia di diverse sostanze che viene assunto con l'alimentazione. Sono quindi stati presentati anche esperimenti di immunoprecipitazione per valutare la fosforilazione di p66shc in serina 36 indotta dalla EGCG, un flavonoide appartenente alla famiglia delle Catechine presente per lo più nel tè verde e nel cacao. Le EGCG hanno attività di *scavengers*, e sono considerate molecole anti-invecchiamento. Il possibile meccanismo d'azione delle EGCG, è ancora poco conosciuto. Si sa però che le EGCG hanno una funzione proapoptotica, ed è riportato in letteratura che inducono attivazione di caspasi 3 e depolarizzazione della membrana mitocondriale con conseguente rilascio del citocromo c.

Sia in Cina che in Giappone dove il consumo di tè verde è molto alto, l'incidenza di alcuni tipi di cancro, in particolare quelli che interessano per la pelle, è più bassa rispetto alle popolazioni che non fanno un gran consumo di tè verde, l'attività benefica del tè viene attribuita ai polifenoli in particolare alla presenza dell'EGCG.

Dai risultati ottenuti si evince che anche l'EGCG induce una forte fosforilazione di p66shc in serina 36 già con 10 µM di EGCG per poi raggiungere un plateau. Questa attivazione di p66shc in serina 36 si è riscontrata nelle cellule di prostata ma è quasi inesistente nei

cheratinociti. Inoltre l' EGCG induce una forte attivazione di ERK1/2 sia nelle cellule di prostata che nei cheratinociti.

Si stanno eseguendo esperimenti di proliferazione e adesione cellulare per verificare se l' EGCG abbia attività simili a quelle del resveratrolo.

Per facilitare la visione complessiva dei risultati degli esperimenti condotti sul modello di cheratinociti e su quello cutaneo, si riporta la seguente tabella sinottica.

Tabella – Visione complessiva degli effetti del resveratrolo (Res) e dell' (-)-epigallocatechina-3-gallato (EGCG) nelle cellule HaCaT, EPN e PKM3.

Riassunto dei risultati

HaCaT							
	Prolif	Ades	Motil	Ser36-P p66Shc	ERK-P	Sensib U0126	P- AKT
Res	↓	↓	↓	↑	↑	SI	↓
EGCG	n.d.	n.d.	n.d.	--	↑	n.d.	n.d.
EPN							
Res	↓	n.d.	↓	↑	↑	SI	n.d.
EGCG	n.d.	n.d.	n.d.	↑	↑	n.d.	n.d.
PKM3							
Res	↓	n.d.	↓	↑	↑	SI	n.d.
EGCG	n.d.	n.d.	n.d.	↑	↑	n.d.	n.d.

Prolif = proliferazione; Ades = adesione; Motil = motilità; Sensib = sensibilità; ↓ = riduzione; ↑ = incremento; n.d. = non determinato.

Oggi c'è consapevolezza, grazie agli studi clinico-epidemiologici degli ultimi 50 anni, che l' alimentazione può essere uno dei più importanti fattori ambientali nell' interazione geni-ambiente per migliorare quantità, ma anche qualità della vita dell' uomo. La sfida attuale e degli anni futuri, in questo settore, è la definizione dei meccanismi molecolari alla base della relazione tra alimentazione e salute per fornire nuove strategie per la prevenzione e la cura dei principali flagelli della società contemporanea, quali malattie cardiovascolari e cancro.

7. BIBLIOGRAFIA

Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK

Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor α is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site.

J Biol Chem 1997, 272:5128-5132

Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H.

Inhibition of ultraviolet B-mediated activation of nuclear factor κ B in normal human epidermal keratinocytes by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate.

Oncogene. 2003 Feb 20;22(7):1035-44.

Agarwal R.

Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents.

Biochem Pharmacol. 2000 Oct 15;60(8):1051-9.

Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK, Mukhtar H.

Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells.

Clin Cancer Res. 2001 May;7(5):1466-73.

Alkhalaf M, Jaffal S.

Potent antiproliferative effects of resveratrol on human osteosarcoma SJSA1 cells: Novel cellular mechanisms involving the ERKs/p53 cascade.

Free Radic Biol Med. 2006 Jul 15;41(2):318-25.

Araim O, Ballantyne J, Waterhouse AL, Sumpio BE.

Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols.

J Vasc Surg. 2002 Jun;35(6):1226-32.

Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Bano MC, Obrador E, Estrela JM.

Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability.

Free Radic Biol Med. 2002 Aug 1;33(3):387-98

Aumont V, Krisa S, Battaglia E, Netter P, Richard T, Merillon JM, Magdalou J, Sabolovic N.

Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans- and cis-resveratrol in human.

Arch Biochem Biophys. 2001 Sep 15;393(2):281-9

Aviram M.

Platelet secretory products enhance LDL receptor activity and inhibit scavenger receptor activity in human monocyte derived macrophages.

Metabolism. 1989 May;38(5):425-30

Barger PM, Browning AC, Garner AN, Kelly DP.

p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor α : a potential role in the cardiac metabolic stress response.

J Biol Chem 2001, 276:44495- 44501

Bhavani Prasad Kota, Tom Hsun-Wei Huang, Basil D Roufogalis.

An overview on biological mechanisms of PPARs.
Pharmacological Research (2005) 51 :85–94

Berger J., Moller, D., 2002.

The mechanisms of action of PPARs.
Annu. Rev. Med. 53, 409–435.

Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Urien S, Tillement JP, Bertelli A.

Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats.
Int J Clin Pharmacol Res. 1996;16(4-5):77-81

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W.

Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat.
Endocrinology. 1996 Jan;137(1):354-66.

Burcham Philip C.

Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts
Mutagenesis vol.13 no.3 pp.287-305, 1998 Review

Carr AC, Myzak MC, Stocker R, McCall MR, Frei B.

Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis.
FEBS Lett. 2000 Dec 29;487(2):176-80.

Chakrabarti R, Misra P, Vikramadithyan RK, Premkumar M, Hiriyan J, Datla SR, Damarla RK, Suresh J. Rajagopalan R.

Antidiabetic and hypolipidemic potential of DRF 2519--a dual activator of PPAR-alpha and PPAR-gamma.
Eur J Pharmacol. 2004 May 3;491(2-3):195-206.

Chao DT, Korsmeyer SJ.

BCL-2 family: regulators of cell death.
Annu Rev Immunol. 1998;16:395-419. Review

Chen JD, Evans RM.

A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.
Nature. 1995 Oct 5;377(6548):454-7.

Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, et al.

PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway.
Nat Med 2001; 7: 53-8.

Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S.

Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells.
Blood. 1998 Aug 1;92(3):996-1002.

- Damianaki A, Bakogeorgou E, Kampa M, Notas G, Hatzoglou A, Panagiotou S, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E.**
Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells.
J Cell Biochem. 2000 Jun 6;78(3):429-41
- De Amicis F, Lanzino M, Kisslinger A, Cali G, Chieffi P, Ando S, Mancini FP, Tramontano D.**
Loss of proline-rich tyrosine kinase 2 function induces spreading and motility of epithelial prostate cells.
J Cell Physiol. 2006 Oct;209(1):74-80.
- Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J.**
A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity.
Nat Genet 1998, 20:284-287
- Delmas D, Rebe C, Lacour S, Filomenko R, Athias A, Gambert P, Cherkaoui-Malki M, Jannin B, Dubrez-Daloz L, Latruffe N, Solary E.**
Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells.
J Biol Chem. 2003 Oct 17;278(42):41482-90.
- Diel P, Olf S, Schmidt S, Michna H.**
Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o,p'-DDT, p-tert-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction, cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7.
J Steroid Biochem Mol Biol. 2002 Jan;80(1):61-70.
- Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ.**
Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1).
Mol Cell Biol. 2000 Dec;20(24):9138-48.
- Doll R, Peto, R.**
The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risk of cancer in US today.
J Natl Cancer Institute 1981; 66, 1191-1308.
- Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M.**
Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor a interacting protein.
J Biol Chem 1999, 274:15901-15907
- Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W.**
Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptor.
Cell 68:879-887 1992

El-Mowafy AM, Alkhalaf M.

Resveratrol activates adenylyl-cyclase in human breast cancer cells: a novel, estrogen receptor-independent cytostatic mechanism.

Carcinogenesis. 2003 May;24(5):869-73.

Escher, P., and Wahli, W.

Peroxisome proliferator-activated receptors: Insight into multiple cellular function.

Mutat. Res. 448, 121–138. 2000

Faisal A, el-Shemerly M, Hess D, Nagamine Y.

Serine/threonine phosphorylation of ShcA. Regulation of protein-tyrosine phosphatase-pest binding and involvement in insulin signaling.

J Biol Chem. 2002 Aug 16;277(33):30144-52.

Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L.

Redox regulation of NF-kappa B activation.

Free Radic Biol Med. 1997;22(6):1115-26

Foschi M, Franchi F, Han J, La Villa G, Sorokin A.

Endothelin-1 induces serine phosphorylation of the adaptor protein p66Shc and its association with 14-3-3 protein in glomerular mesangial cells.

J Biol Chem. 2001 Jul 13;276(28):26640-7.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE.

Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine.

Lancet. 1993 Feb 20;341(8843):454-7.

Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE.

Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol.

Lancet. 1993 Apr 24;341(8852):1103-4.

Fu H, Subramanian RR, Masters SC.

14-3-3 proteins: structure, function, and regulation.

Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000;40:617-47. Review.

Fukao H, Ijiri Y, Miura M, Hashimoto M, Yamashita T, Fukunaga C, Oiwa K, Kawai Y, Suwa M, Yamamoto J.

Effect of trans-resveratrol on the thrombogenicity and atherogenicity in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice.

Blood Coagul Fibrinolysis. 2004 Sep;15(6):441-6.

Gimbrone MA Jr, Resnick N, Nagel T, Khachigian LM, Collins T, Topper JN.

Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis.

Ann N Y Acad Sci. 1997 Apr 15;811:1-10; discussion 10-1. Review.

Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pellicci G, Luzi L, Minacci S, Marcaccio M.

Electron Transfer between Cytochrome c and p66 Generates Reactive Oxygen Species that Trigger Mitochondrial Apoptosis.

Cell. 2005 122 2 221-233

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC

Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer.
J Natl Cancer Inst. 1995 Dec 6;87(23):1767-76

Goulinet S, Chapman MJ.

Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Apr;17(4):786-96

Gotoh N, Toyoda M, Shibuya M.

Tyrosine phosphorylation sites at amino acids 239 and 240 of Shc are involved in epidermal growth factor-induced mitogenic signaling that is distinct from Ras/mitogen-activated protein kinase activation.
Mol Cell Biol. 1997 Apr;17(4):1824-31.

Grandien K, Berkenstam A, Gustafsson JA.

The estrogen receptor gene: promoter organization and expression.
Int J Biochem Cell Biol. 1997 Dec;29(12):1343-69.

Gutteridge JM, Halliwell B.

Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future.
Ann N Y Acad Sci. 2000;899:136-47. Review.

Haider UG, Sorescu D, Griendling KK, Vollmar AM, Dirsch VM.

Resveratrol increases serine15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells.
Mol Pharmacol. 2003 Apr;63(4):925-32.

Harborne, J.B.

Plant phenolics. In: BELL EA, CHARLWOOD BV (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology*, volume 8 Secondary Plant Products, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. Pp:329-395, 1980

Hansson GK, Jonasson L, Lojstjed B, Stemme S, Kocher O, Gabbiani G.

Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques.
Atherosclerosis. 1988 Aug;72(2-3):135-41.

Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S.

Immune mechanisms in atherosclerosis.
Arteriosclerosis. 1989 Sep-Oct;9(5):567-78.

Hegele RA.

The pathogenesis of atherosclerosis.
Clin Chim Acta. 1996 Mar 15;246(1-2):21-38.

Hiromura K, Pippin JW, Fero ML, Roberts JM, Shankland SJ.

Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1).
J Clin Invest. 1999 Mar;103(5):597-604.

Hi R, Osada S, Yumoto N, Osumi T.

Characterization of the amino-terminal activation domain of peroxisome proliferator-activated receptor α . Importance of α -helical structure in the transactivating function.
J Biol Chem 1999, 274:35152-35158.

Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al.

Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor.
Nature. 1995 Oct 5;377(6548):397-404.

Hsu S.

Green tea and the skin.
J Am Acad Dermatol. 2005 Jun;52(6):1049-59. Review

H.-U. Simon, A. Haj-Yehia and F. Levi-Schaffer

Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction
Apoptosis Vol 5 No 5 2000 415-418

Hu Y, Wang X, Zeng L, Cai DY, Sabapathy K, Goff SP, Firpo EJ, Li B.

ERK phosphorylates p66shcA on Ser36 and subsequently regulates p27kip1 expression via the Akt-FOXO3a pathway: implication of p27kip1 in cell response to oxidative stress.
Mol Biol Cell. 2005 Aug;16(8):3705-18.

Iannelli P, Zarrilli V, Varricchio E, Tramontano D, Mancini FP.

The dietary antioxidant resveratrol affects redox changes of PPAR α activity.
Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2007 May 17(4):247-56

Issemann I, Green S.

Activation of a member of the steroid hormone receptor super family by peroxisome proliferators.
Nature 1990;347:645-50.

Issemann I, Prince R, Tugwood J, Green S.

A role for fatty acids and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferation?
Biochem Soc Trans 1992;20:824-7

Jackson JG, Yoneda T, Clark GM, Yee D.

Elevated levels of p66 Shc are found in breast cancer cell lines and primary tumors with high metastatic potential.
Clin Cancer Res. 2000 Mar;6(3):1135-9.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM.

Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.
Science. 1997 Jan 10;275(5297):218-20.

Jia Y, Qi C, Kashireddi P, Surapureddi S, Zhu YJ, Rao MS, Le Roith D, Chambon P, Gonzalez FJ, Reddy JK.

Transcription coactivator PBP, the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein, is required for PPARalpha-regulated gene expression in liver.
J Biol Chem. 2004 Jun 4;279(23):24427-34.

Juge-Aubry CE, Hammar E, Siegrist-Kaiser C, Pernin A, Takeshita A, Chin WW, Burger AG, Meier CA.

Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor α by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain.
J Biol Chem 1999, 274:10505-10510.

Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Hüttemann M.

The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases.
Biochim Biophys Acta. 2004 Apr 12;1655(1-3):400-8.

Kasuno K, Naqvi A, Dericco J, Yamamori T, Santhanam L, Mattagajasingh I, Yang S, Meyskens FL, Bosserhoff AK, Irani K.

Antagonism of p66shc by melanoma inhibitory activity.
Cell Death Differ. 2007 Aug;14(8):1414-21.

Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P.

Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27.
Cancer Res. 1997 Dec 15;57(24):5441-5.

Katzenellenbogen BS, Korach KS.

A new actor in the estrogen receptor drama--enter ER-beta.
Endocrinology. 1997 Mar;138(3):861-2.

Keys A, Keys, M.

How to eat well and stay well, the Mediterranean way. Garden City, New York: Doubleday & Co., Inc.; 1975.

Keys A.

Seven Countries. A multivariate analysis of death and coronary heart disease.
A Commonwealth Fund Book, Harvard University Press, Cambridge Mass and London 1980.

Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H.

Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate.
Cancer Res. 2006 Mar 1;66(5):2500-5. Review.

Kim S, Iwao H.

Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases.
Pharmacol Rev. 2000;52:11-34.

Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM

Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator-activated receptor signalling pathways through heterodimer formation of their receptors.
Nature 358:771-774. 1992

Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM.

Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jul 19;91(15):7355-9.

Klinge CM, Blankenship KA, Risinger KE, Bhatnagar S, Noisin EL, Sumanasekera WK, Zhao L, Brey DM, Keynton RS.

Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells.

J Biol Chem. 2005 Mar 4;280(9):7460-8

Kohlmeier L, Kark JD, Gomez-Gracia E, Martin BC, Steck SE, Kardinaal AF, Ringstad J, Thamm M, Masaev V, Riemersma R, Martin-Moreno JM, Huttunen JK, Kok FJ.

Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study.

Am J Epidemiol. 1997 Oct 15;146(8):618-26.

Kroetz DL, Yook P, Costet P, Bianchi P and Pineau T.

peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes.

J. Biol. Chem., 1998;273:31581-31589.

Kuhnle G, Spencer JP, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C, Hahn U.

Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide.

Biochem Biophys Res Commun. 2000 May 27;272(1):212-7

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA.

Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jun 11;93(12):5925-30.

Kuwajerwala N, Cifuentes E, Gautam S, Menon M, Barrack ER, Reddy GP.

Resveratrol induces prostate cancer cell entry into S phase and inhibits DNA synthesis.

Cancer Res. 2002 May 1;62(9):2488-92

Lai KM, Pawson T.

The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo.

Genes Dev. 2000 May 1;14(9):1132-45.

Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS.

Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations.

Am J Clin Nutr. 2005 Jan;81(1 Suppl):284S-291S. Review

Latruffe N, Cherkaoui Malki M, Nicolas-Frances V, Jannin B, Clemencet MC, Hansmannel F, Passilly-Degrace P, Berlot JP.

Peroxisome-proliferator-activated receptors as physiological sensors of fatty acid metabolism: molecular regulation in peroxisomes.

Biochem Soc Trans. 2001 May;29(Pt 2):305-9.

Laudet V, Hanni C, et al.

Evolution of the nuclear receptor gene super family.
EMBO J 1992;11:1003–13.

Lee MS, Igawa T, Chen SJ, Van Bommel D, Lin JS, Lin FF, Johansson SL, Christman JK, Lin MF.

p66Shc protein is upregulated by steroid hormones in hormone-sensitive cancer cells and in primary prostate carcinomas.
Int J Cancer. 2004 Feb 20;108(5):672-8.

Lemberger T, Desvergne B, Wahli W.

Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology.
Annu Rev Cell Dev Biol 1996;12:335–63.

Libby P.

Changing concepts of atherosclerosis.
J Intern Med. 2000;247:349–358.

Libby P.

Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes
Circulation. 2001;104:365.

Libby P, Hansson GK.

Involvement of the immune system in human atherosclerosis: current knowledge and unanswered questions.
Lab Invest. 1991 Jan;64(1):5-15. Review.

Lieberman BA.

The estrogen receptor activity cycle: dependence on multiple protein-protein interactions.
Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 1997;7(1-2):43-59.

Liu RH

Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action.
J Nutr. 2004 Dec;134(12 Suppl):3479S-3485S. Review

Lyras L, Perry RH, Perry EK, Ince PG, Jenner A, Jenner P, Halliwell B.

Oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in cortical brain regions from patients with dementia with Lewy bodies.
J Neurochem. 1998 Jul;71(1):302-12.

Lord JD, McIntosh BC, Greenberg PD, Nelson BH.

The IL-2 receptor promotes proliferation, bcl-2 and bcl-x induction, but not cell viability through the adapter molecule Shc.
J Immunol. 1998 Nov 1;161(9):4627-33.

Lu R, Serrero G.

Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells.
J Cell Physiol. 1999 Jun;179(3):297-304.

Luscher TF, Tschudi MR, Wenzel RR, Noll G.

Endothelial dysfunction and nitrogen monoxide (NO; nitric oxide)
Internist (Berl). 1997 May;38(5):411-9.

Luzi L, Confalonieri S, Di Fiore PP, Pelicci PG.

Evolution of Shc functions from nematode to human.
Curr Opin Genet Dev. 2000 Dec;10(6):668-74.

Mancini M, Stamler J.

Diet for preventing cardiovascular diseases: light from Ancel Keys, Distinguished Centenarian Scientist.
Nutr Metab Cardiovasc Dis 2004; 14: 52-57.

Masuda M, Suzui M, Weinstein IB.

Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines.
Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12):4220-9

Meyer JW, Schmitt ME.

A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis.
FEBS Lett. 2000 Apr 21;472(1):1-4.

Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG.

The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals.
Nature. 1999 Nov 18;402(6759):309-13.

Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pelicci G, Lai KM, Superti-Furga G, Pawson T, Di Fiore PP, Lanfrancone L, Pelicci PG.

Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway.
EMBO J. 1997 Feb 17;16(4):706-16.

Miloso M, Bertelli AA, Nicolini G, Tredici G.

Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.
Neurosci Lett. 1999 Apr 2;264(1-3):141-4.

Mitchell SH, Zhu W, Young CY.

Resveratrol inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells.
Cancer Res. 1999 Dec 1;59(23):5892-5.

Mnjoyan ZH, Fujise K.

Profound negative regulatory effects by resveratrol on vascular smooth muscle cells: a role of p53-p21(WAF1/CIP1) pathway.
Biochem Biophys Res Commun. 2003 Nov 14;311(2):546-52.

Mojzisová G, Kuchta M.

Dietary Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease
Physiol Res. 50:529-535, 2001

Muerhoff AS, Griffin KJ, Johnson EF.

The peroxisome proliferator activated receptor mediates the induction of CYP4A6, a cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, by clofibrilic acid.
J Biol Chem 1992;267:19051-3.

Muramatsu M, Inoue S.

Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions?
Biochem Biophys Res Commun. 2000 Apr 2;270(1):1-10.

Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD.

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives.
Phytochemistry. 2006 Sep;67(17):1849-55. Epub 2006 Jul 31.

Napoli C, Martin-Padura I, de Nigris F, Giorgio M, Mansueto G, Somma P, Condorelli M, Sica G, De Rosa G, Pelicci P.

Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Feb 18;100(4):2112-6.

Narayanan BA, Narayanan NK, Stoner GD, Bullock BP.

Interactive gene expression pattern in prostate cancer cells exposed to phenolic antioxidants.
Life Sci. 2002 Mar 1;70(15):1821-39.

Nemoto S, Finkel T.

Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway.
Science. 2002 Mar 29;295(5564):2450-2. Epub 2002 Mar 7.

Olas B, Zbikowska HM, Wachowicz B, Krajewski T, Buczynski A, Magnuszewska A.

Inhibitory effect of resveratrol on free radical generation in blood platelets.
Acta Biochim Pol. 1999;46(4):961-6.

Okada S, Kao AW, Ceresa BP, Blaikie P, Margolis B, Pessin JE.

The 66-kDa Shc isoform is a negative regulator of the epidermal growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway.
J Biol Chem. 1997 Oct 31;272(44):28042-9.

Okano, H., Shiraki, K., Inoue, H., Yamanaka, T., Deguchi, M., Sugimoto, K., Sakai, T., Ohmori, S., Fujikawa, K., Murata, K., and Nakano, T.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma augments tumor necrosis factor family-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma.
Anticancer Drugs 13, 59-68. 2002

Orsini F, Moroni M, Contursi C, Yano M, Pelicci P, Giorgio M, Migliaccio E.

Regulatory effects of the mitochondrial energetic status on mitochondrial p66Shc.
Biol Chem. 2006 Oct-Nov;387(10-11):1405-10.

Pacini S, Pellegrini M, Migliaccio E, Patrussi L, Olivieri C, Ventura A, Carraro F, Naldini A, Lanfrancone L, Pelicci P, Baldari CT.

p66SHC promotes apoptosis and antagonizes mitogenic signaling in T cells.
Mol Cell Biol. 2004 Feb;24(4):1747-57.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.

Global cancer statistics, 2002.
CA Cancer J Clin. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.

Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D.

A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Feb;86(3):1046-50.

Pellicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T, Pellicci PG.

A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction.
Cell. 1992 Jul 10;70(1):93-104.

Penny M Kris-Etherton, Kari D Hecker, Andrea Bonanome, et al.

Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer
The American Journal of Medicine 2002 113, 9, 71-88

Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F.

Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation.
Blood. 1998 Jan 15;91(2):484-90.

Pinton P, Rimessi A, Marchi S, Orsini F, Migliaccio E, Giorgio M, Contursi C, Minucci S, Mantovani F, Wieckowski MR, Del Sal G, Pellicci PG, Rizzuto R.

Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc.
Science. 2007 Feb 2;315(5812):659-63.

Plutzky Jorge,MD

The Vascular Biology of Atherosclerosis.
Am J Med. 2003;115(8A):55S–61S.

Radomska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E, Mackenzie PI.

Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases.
Drug Metab Rev. 1999 Nov;31(4):817-99.

Rankin SM, Parthasarathy S, Steinberg D.

Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages.
J Lipid Res. 1991 Mar;32(3):449-56.

Ravichandran KS.

Signaling via Shc family adapter proteins.
Oncogene. 2001 Oct 1;20(44):6322-30.

Ravichandran KS, Lee KK, Songyang Z, Cantley LC, Burn P, Burakoff SJ.

Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation.
Science. 1993 Nov 5;262(5135):902-5.

Ross R.

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.
Nature. 1993 Apr 29;362(6423):801-9.

Ross, R.

Atherosclerosis an inflammatory disease.
N Engl J Med. 1999, 340, 115-126.

Ross R.

Atherosclerosis is an inflammatory disease.
Am Heart J. 1999 Nov;138(5 Pt 2):S419-20.

Schmandt R, Liu SK, McGlade CJ.

Cloning and characterization of mPAL, a novel Shc SH2 domain-binding protein expressed in proliferating cells.
Oncogene. 1999 Mar 11;18(10):1867-79.

Schmitz ML, Bacher S, Droge W.

Molecular analysis of mitogen-activated protein kinase signaling pathways induced by reactive oxygen intermediates.
Methods Enzymol. 2002;352:53-61

Schuff-Werner P, Schutz E, Seyde WC, Eisenhauer T, Janning G, Armstrong VW, Seidel D.

Improved haemorrhology associated with a reduction in plasma fibrinogen and LDL in patients being treated by heparin-induced extracorporeal LDL precipitation (HELP).
Eur J Clin Invest. 1989 Feb;19(1):30-7.

Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA

Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-g.
Nature 1998, 396:377-380.

She QB, Huang C, Zhang Y, Dong Z.

Involvement of c-jun NH(2)-terminal kinases in resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis.
Mol Carcinog. 2002 Apr;33(4):244-50.

Shibasaki M, Takahashi K, Itou T, Bujo H, Saito Y.

A PPAR agonist improves TNF- α -induced insulin resistance of adipose tissue in mice.
Biochem Biophys Res Commun 2003;309:419-24.

Signorelli P, Ghidoni R.

Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises.
J Nutr Biochem. 2005 Aug;16(8):449-66.

Siyuan Le, Thomas J. Connors, and Anna C. Maroney

c-Jun N-terminal Kinase Specifically Phosphorylates p66^{ShcA} at Serine 36 in Response to Ultraviolet Irradiation
J. Biol. Chem., Vol. 276, 51, 48332-48336, 2001

Skottova N, Vecera R, Urbanek K, Vana P, Walterova D, Cvak L.

Effects of polyphenolic fraction of silymarin on lipoprotein profile in rats fed cholesterol-rich diets. *Pharmacol Res.* 2003 Jan;47(1):17-26

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC.

Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998; 98: 2088-93.

Staels B, Koenig W, Habib A, et al.

Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature*, 1998, 393, 790-3

Steinberg D, Carew TE, Fielding C, Fogelman AM, Mahley RW, Sniderman AD, Zilversmit DB.

Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation.* 1989 Sep;80(3):719-23.

Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L.

Beyond cholesterol. Modifications of LDL that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989, 320, 915-924.

Surh YJ.

Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 2003 Oct;3(10):768-80.

Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ.

Dietary polyphenolic phytochemicals--promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *Int J Cancer.* 2007 Feb 1;120(3):451-8.

Toyokuni S.

Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Jul-Aug;8(7-8):1373-7.

Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME.

The many forks in FOXO's road. *Sci STKE.* 2003 Mar 4;2003(172):RE5.

Trinei M, Giorgio M, Cicalese A, Barozzi S, Ventura A, Migliaccio E, Milia E, Padura IM, Raker VA, Maccarana M, Petronilli V, Minucci S, Bernardi P, Lanfrancone L, Pelicci PG.

A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene.* 2002 May 30;21(24):3872-8.

Trub T, Choi WE, Wolf G, Ottinger E, Chen Y, Weiss M, Shoelson SE. Specificity of the PTB domain of Shc for beta turn-forming pentapeptide motifs amino-terminal to phosphotyrosine. *J Biol Chem.* 1995 Aug 4;270(31):18205-8.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.

Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.
Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.

Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer
Chem Biol Interact. 2006 Mar 10;160(1):1-40

Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP.

The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation.
Biochem J. 2004 Jun 1;380(Pt 2):297-309.

Veeramani S, Igawa T, Yuan TC, Lin FF, Lee MS, Lin JS, Johansson SL, Lin MF.

Expression of p66(Shc) protein correlates with proliferation of human prostate cancer cells.
Oncogene. 2005 Nov 3;24(48):7203-12.

Vega RB, Huss JM, Kelly DP.

The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes.
Mol Cell Biol 2000, 20:1868-1876

Verges B.

Clinical interest of PPARs ligands.
Diabetes Metab. 2004 Feb;30(1):7-12.

Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE.

Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents.
J Clin Invest. 1996 Jun 1;97(11):2553-61.

Vitrac X, Desmouliere A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N, Rosenbaum J, Merillon JM.

Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration.
Life Sci. 2003 Apr 4;72(20):2219-33.

Wahli W, Braissant O, Desvergne B.

Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more.
Chem Biol 1995; 2:261-6.

Wang D, Dubois RN.

Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer.
Semin Oncol. 2004 Feb;31(1 Suppl 3):64-73.

Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McInerney E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JA, Nilsson S, Kushner PJ.

The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions.
Mol Endocrinol. 1999 Oct;13(10):1672-85.

Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS.

Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). Differential activity of PPAR γ 1 and -2 isoforms and influence of insulin.

J Biol Chem 1997, 272:20230-20235.

Winder W.W. and Duan C.

control of fructose 2,6-diphosphate in muscle of exercising fasted rats.

Am.J.Physiol.,1992;262:E919-924

World Cancer Research Fund. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, D.C.; 1997.

Xie, Q.W., Kashiwabara, Y. and Nathan, C.,

Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase.

J Biol Chem. 1994, 269, 4705-4708.

Xie Y, Hung MC.

p66Shc isoform down-regulated and not required for HER-2/neu signaling pathway in human breast cancer cell lines with HER-2/neu overexpression.

Biochem Biophys Res Commun. 1996 Apr 5;221(1):140-5.

Xu HE, Lambert MH, Montana VG, et al.

Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator- activated receptors.

Mol Cell 1999;3:397-403

Yang CP, Horwitz SB.

Taxol mediates serine phosphorylation of the 66-kDa Shc isoform.

Cancer Res. 2000 Sep 15;60(18):5171-8.

Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, Lee YS, Hirschelman WH, Pezzuto JM, Mehta RG, van Breemen RB.

Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol.

Pharm Res. 2002 Dec;19(12):1907-14

Zaccagnini G, Martelli F, Fasanaro P, Magenta A, Gaetano C, Di Carlo A, Biglioli P, Giorgio M, Martin-Padura I, Pelicci PG, Capogrossi MC.

p66ShcA modulates tissue response to hindlimb ischemia.

Circulation. 2004 Jun 15;109(23):2917-23.

Zhang B, Marcus SL, Miyata KS, Subramani S, Capone JP, Rachubinski RA.

Characterization of protein-DNA interactions within the peroxisome proliferator-responsive element of the rat hydratasedehydrogenase gene.

J Biol Chem 1993;268:12939.

Zhang Z, Kumar R, Santen RJ, Song RX.

The role of adapter protein Shc in estrogen non-genomic action.

Steroids. 2004 Aug;69(8-9):523-9.

Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK.

Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor.

J Biol Chem. 1997 Oct 10;272(41):25500-6.

Zou J, Huang Y, Chen Q, Wang N, Cao K, Hsieh TC, Wu JM.

Suppression of mitogenesis and regulation of cell cycle traverse by resveratrol in cultured smooth muscle cells.

Int J Oncol. 1999 Oct;15(4):647-51.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Francesco Paolo Mancini, per avermi insegnato a “vivere il laboratorio”, per la costante disponibilità e cortesia avuta nei miei confronti durante tutti questi anni, e per l’ aiuto fornito durante la stesura di questo lavoro; il Prof. Vittorio Colantuoni, le Dott. sse Vincenza Zarrilli, Lina Sabatino, e Adriana Bianconcini, che hanno seguito lo svolgersi della prima parte di questo lavoro, la Prof. ssa Donatella Tramontano e la Dott. ssa Annamaria Kisslinger per i loro consigli, le stimolanti discussioni scientifiche e le aperture di ricerca che hanno guidato lo svolgersi del lavoro sperimentale.

Un doveroso ringraziamento va a Maurizio Lamagna e Maria Rosaria Arena per la loro pazienza e assistenza tecnica.

Un affettuoso e caloroso ringraziamento va a tutti coloro che mi hanno sostenuto e confortato, con il loro affetto e la loro amicizia, in questi anni di dottorato, rendendo la permanenza in laboratorio più allegra. Ringrazio pertanto Patrizia, Mary, Manuela, Gabriella, Daniela, Marianna, Diana, Rita, Raffaella, Luisa, Michela, Mario.

Un particolare grazie va ai miei genitori e a mio fratello, che mi hanno sempre incoraggiato e che spesso hanno condiviso con me le levatacce mattutine; ad Antonella, Annarita, ed Angelo che hanno spesso cercato di animare i miei rientri da Napoli.

Un caro grazie va a Cosimo per avermi sempre stimolato, per aver creduto in me e per aver sopportato i momenti più difficili e stressanti di questo percorso.