

Dottorato di Ricerca in  
**Biotechnologie mediche**

**Ciclo XX°**

**MED/04**

Dipartimento di Patologia Sperimentale

**Zinco, invecchiamento e sistema immunitario: effetti  
sull'apoptosi e sulla proliferazione dei linfociti**

**Dott.ssa Rita Ostan**

Coordinatore:

**Prof.ssa Marialuisa Zerbini**

Relatore:

**Prof. Claudio Franceschi**

---

**Esame finale anno 2008**

*We shall not cease from exploration  
And the end of all our exploring  
Will be to arrive where we started  
And know the place for the first time.*

*Little Gidding V, Four Quartets  
T.S. Eliot (1943)*

<b>PREMESSA.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 L'invvecchiamento .....</b>	<b>10</b>
1.1.1 La Teoria del Network.....	13
1.1.2 La Teoria del Rimodellamento.....	16
<b>1.2 L'apoptosi .....</b>	<b>20</b>
1.2.1 Aspetti morfologici .....	22
1.2.2 Pathways di apoptosi .....	25
1.2.3 Apoptosi e sistema immunitario.....	44
<b>1.3 Necrosi e Oncosi .....</b>	<b>47</b>
<b>1.4 Il Ciclo Cellulare .....</b>	<b>48</b>
1.4.1 Il controllo del ciclo cellulare.....	50
<b>1.5 p53 .....</b>	<b>53</b>
1.5.1 Polimorfismi al codone 72 di p53.....	58
<b>1.6 Lo Zinco .....</b>	<b>60</b>
1.6.1 Introduzione .....	60
1.6.2 Metabolismo dello zinco .....	62
1.6.3 Zinco e sistema immunitario.....	63
1.6.4 La supplementazione di zinco nell'invvecchiamento: studi <i>in vitro</i> .....	65
1.6.5 Effetti <i>in vivo</i> della supplementazione di zinco nell'invvecchiamento ....	67
1.6.6 Zinco e apoptosi.....	69
1.6.7 Zinco e ciclo cellulare .....	73
1.6.8 Le metallotioneine .....	74
<b>2. Scopo della Tesi.....</b>	<b>80</b>
<b>3. Materiali e Metodi .....</b>	<b>84</b>
<b>3.1 Reclutamento dei soggetti.....</b>	<b>85</b>
3.1.1 Determinazione della concentrazione sierica di zinco .....	85
<b>3.2 Allestimento dei Campioni.....</b>	<b>85</b>

3.2.1 Separazione dei PBMCs da sangue periferico .....	85
<b>3.3 Studio dell'apoptosi</b> .....	<b>87</b>
3.3.1 Allestimento delle colture cellulari per lo studio dell'apoptosi.....	87
3.3.2 Marcatura con Annexina V/Propidio Ioduro .....	88
3.3.3 Determinazione del potenziale di membrana mitocondriale.....	90
3.3.4 Valutazione del rilascio del Cyt C dal mitocondrio.....	90
3.3.5 Test di attivazione delle caspasi-3 e -7 (FLICA) .....	92
3.3.6 Espressione della Caspasi-3, di Bcl-2 e di PARP (Western Blotting).....	93
<b>3.4 Studio dell'espressione delle metallothioneine intracellulari</b> .....	<b>100</b>
3.4.1 Allestimento delle colture cellulari per lo studio dell'espressione delle MTs .....	101
3.4.2 Marcatura delle MTs intracellulari.....	101
3.4.2 Marcatura degli antigeni di superficie.....	103
<b>3.5 Studio del ciclo cellulare</b> .....	<b>103</b>
3.5.1 Allestimento delle colture cellulari per lo studio del ciclo cellulare ....	103
3.5.2 Analisi del ciclo cellulare .....	104
<b>3.6 Analisi del polimorfismo al codone 72 di p53</b> .....	<b>106</b>
3.6.1 Estrazione del DNA.....	106
3.6.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR) su DNA genomico per la genotipizzazione del Codone 72 di p53.....	108
<b>3.7 Analisi statistica</b> .....	<b>110</b>
3.7.1 Analisi ematochimiche .....	111
3.7.2 Analisi dei livelli di zinco sierico .....	111
3.7.3 Analisi citofluorimetriche .....	111
<b>4. Risultati</b> .....	<b>112</b>
<b>4.1 Analisi ematochimiche</b> .....	<b>113</b>
<b>4.2 Determinazione della concentrazione sierica di zinco</b> .....	<b>116</b>
<b>4.3 Studio dell'apoptosi</b> .....	<b>118</b>
4.3.1 Effetti dello zinco sull'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo .....	118

4.3.2 Effetti dello zinco sulla depolarizzazione mitocondriale.....	120
4.3.3 Effetti dello zinco sul rilascio del Cyt C dal mitocondrio .....	122
4.3.4 Attivazione delle caspasi-3 e -7 (FLICA) .....	123
4.3.5 Attivazione della Caspasi-3 (Western blot).....	124
4.3.6 Cleavage di PARP .....	127
4.3.7 Espressione di Bcl-2.....	129
<b>4.3 Metallotioneine</b> .....	<b>130</b>
<b>4.4 Effetti dello Zinco sul ciclo cellulare</b> .....	<b>132</b>
<b>4.5 Ruolo delle varianti geniche di p53 su apoptosi e ciclo cellulare</b> .....	<b>138</b>
4.6.1 Apoptosi .....	138
4.6.3 Ciclo cellulare .....	141
<b>4.6 Effetti della supplementazione <i>in vivo</i> di zinco</b> .....	<b>146</b>
4.7.1 Studio dell'apoptosi: effetti della supplementazione <i>in vivo</i> di zinco sull'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo .....	146
4.7.2 Studio dell'apoptosi: effetti della supplementazione <i>in vivo</i> di zinco sulla depolarizzazione mitocondriale.....	148
4.7.3 Effetti della supplementazione <i>in vivo</i> di zinco sul ciclo cellulare .....	148
<b>5. Discussione</b> .....	<b>150</b>
<b>5.1 Analisi Ematochimiche</b> .....	<b>152</b>
5.2 Livelli sierici di zinco .....	154
<b>5.3 Apoptosi, zinco e invecchiamento</b> .....	<b>155</b>
<b>5.4 Espressione delle metallotioneine intracellulari</b> .....	<b>158</b>
<b>5.5 Effetti dello zinco sul ciclo cellulare</b> .....	<b>159</b>
<b>5.6 Ruolo delle varianti geniche di p53 nell'apoptosi e nel ciclo cellulare in presenza di zinco</b> .....	<b>161</b>
5.6.1 p53 e apoptosi .....	161
5.6.2 p53 e ciclo cellulare .....	162
<b>5.7 Effetti della supplementazione <i>in vivo</i> di zinco</b> .....	<b>164</b>
5.7.1 Effetti della supplementazione <i>in vivo</i> di zinco sull'apoptosi .....	164

5.7.2 Effetti della supplementazione <i>in vivo</i> di zinco sul ciclo cellulare .....	165
<b>6. Bibliografia.....</b>	<b>166</b>

# PREMESSA

La presente ricerca si inserisce nell'ambito del progetto di ricerca dal titolo "Zinco, stress ossidativo e immunosenescenza: implicazioni biochimiche, genetiche e di stile di vita per il raggiungimento di un invecchiamento in buona salute. Acronimo ZINCAGE", approvato e finanziato dalla Unione Europea nell'ambito del 6° Programma Quadro, svoltosi dal 2004 al 2007 a cui hanno collaborato 17 gruppi di ricerca di 8 differenti paesi europei.

Il fine di tale progetto era lo studio dell'influenza che lo stile di vita, fattori biochimici, genetici ed, in particolare, l'apporto di zinco possono esercitare sul processo di invecchiamento in buona salute. Infatti, alcuni micro-nutrienti con proprietà anti-ossidanti, quale, ad esempio, lo zinco, controllano lo sviluppo e la funzionalità delle cellule del sistema immunitario, l'attività di proteine legate allo stress e di enzimi anti-ossidanti e contribuiscono alla conservazione dell'integrità e della stabilità genomica, suggerendo una interazione dieta-geni. Con l'invecchiamento, l'apporto di zinco diminuisce provocando fragilità, disabilità e un'aumentata incidenza delle principali malattie degenerative associate all'età (cancro, infezioni e aterosclerosi). In questo contesto, il progetto si proponeva di esaminare il ruolo dello zinco sulla funzionalità immunitaria e, più in generale, sulla salute degli anziani.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 L'INVECCHIAMENTO

L'invecchiamento è un processo che caratterizza tutti i viventi, con maggiore o minore velocità, e si manifesta con una progressiva diminuzione della capacità di adattamento agli stimoli e agli insulti dell'ambiente. Tale evento conduce inesorabilmente l'organismo ad una condizione di maggiore suscettibilità e vulnerabilità nei confronti delle malattie, con conseguente aumento della mortalità in maniera età-dipendente.

Il ciclo di vita degli organismi viventi può essere visto come una sorta di percorso, più o meno complesso, che inizia con la nascita e termina inevitabilmente con la morte dell'individuo. All'interno di tale percorso si osservano continui cambiamenti non solo a livello anatomico e fisiologico, ma anche cellulare e molecolare, cambiamenti che possono essere caratterizzati da guadagno, perdita o mantenimento di struttura, funzione o capacità. Ogni individuo, pertanto, nel corso del proprio sviluppo, passa attraverso vari stadi differenti, ciascuno direttamente conseguente e correlato al precedente, che hanno come risultato ultimo l'invecchiamento dell'intero sistema. Nel caso dell'uomo, tale fenomeno è caratterizzato da una notevole eterogeneità, dovuta in parte alle differenze genetiche individuali, in parte alle interazioni con l'ambiente. Tale eterogeneità, inoltre, non si manifesta solo tra individui diversi, ma anche all'interno del singolo: infatti, in uno stesso organismo, gli organi e i tessuti invecchiano in modo differente, generando una sorta di Mosaico Proliferativo (Franceschi et al., 1999) in cui anche le singole cellule manifestano storie e potenziali replicativi diversi.

Gli ultimi 50 anni, nel mondo occidentale, hanno registrato un progressivo incremento della vita media degli individui, dovuto sia al miglioramento delle condizioni di vita e dell'igiene ambientale, che allo sviluppo ed alla applicazione di nuove conoscenze in campo medico e farmaceutico. Pertanto, nelle condizioni attuali, l'aspettativa media di vita, soprattutto nei Paesi più industrializzati, ha subito un drastico aumento rispetto alla prima metà del secolo scorso, come dimostrano le curve di mortalità, in cui si osservano una più alta percentuale relativa di soggetti anziani e, al contempo, una notevole diffusione degli ultranovantenni e dei centenari (questi ultimi in particolare, sebbene tuttora

rappresentino un'esigua percentuale sul totale, erano pressoché assenti in tali regioni fino a 50 anni fa). Un altro importante aspetto relativo alle curve di mortalità che nel corso del tempo ha subito un'evidente modifica, è il range di età all'interno del quale cade la mortalità media degli individui: questo, infatti, rispetto a pochi anni fa, in cui la mortalità era distribuita in modo ben più uniforme dall'infanzia alla vecchiaia, è adesso limitato ad un range ristretto e decisamente spostato in avanti verso i limiti estremi della vita umana. Tutto ciò ha avuto come conseguenza primaria la necessità, per la medicina, di prestare sempre maggiore attenzione a tutti gli stati patologici e clinici correlati, più o meno direttamente, con l'invecchiamento: negli ultimi 50 anni, infatti, l'uomo si è trovato quasi improvvisamente a dover affrontare tutta una serie di problematiche fino ad ora pressoché ignorate o comunque ritenute di secondaria importanza perché manifeste solo in un'esigua percentuale della popolazione, ma che adesso, con una vita media che ha ormai superato gli 80 anni nella maggior parte dei Paesi industrializzati, coinvolgono larga parte della popolazione mondiale.

L'approccio medico teso ad affrontare i nuovi problemi introdotti dall'aumento dell'aspettativa di vita non può essere mirato alla cura e trattamento delle malattie classicamente associate alla vecchiaia, quali il morbo di Parkinson, l'Alzheimer e i disturbi cardiocircolatori. Il fenomeno dell'invecchiamento è, infatti, estremamente complesso e richiede anzitutto un approccio integrato, in grado cioè di combinare, al di là degli studi puramente biologici, anche studi inerenti varie scienze sociali, tra cui quelli demografici, storici, antropologici (Franceschi et al., 2000a). Ciò ha portato alla nascita del termine "invecchiamento con successo", usato per identificare il fenomeno in sé distinguendolo dagli eventi avversi (quali le disabilità e le malattie) che lo possono accompagnare ma che non lo rappresentano in quanto tale. In questa prospettiva si presume che si possano raggiungere i limiti estremi della vita umana liberi da patologie e ancora in grado di svolgere le proprie attività. I centenari diventano, così, un modello di studio dei determinanti biologici della longevità, distinguendoli da coloro in cui l'invecchiamento "usuale" ha portato ad una minore durata della vita e/o all'insorgenza di malattie. Essi costituiscono un buon esempio di come fattori

genetici, biologici, comportamentali e sociali si siano combinati in modo ottimale, permettendo di vivere a lungo e in buona salute: in altre parole, rappresentano un modello *in vivo* di invecchiamento con successo (Franceschi et al., 2000b). Circa un terzo di essi presentano, infatti, buone condizioni di salute che spesso mantengono fino alla morte. Si tratta, pertanto, di una sorta di popolazione selezionata di individui che, in un modo o nell'altro, sono sfuggiti alle più frequenti malattie che si manifestano in età avanzata, quali tumori, diabete, demenza e Alzheimer. Al contempo, però, i centenari presentano comunque tutti i segni e le caratteristiche di un processo di invecchiamento prolungato: sono, perciò, molto "fragili" e la definizione del loro stato di salute è, dal punto di vista metodologico, piuttosto difficile in quanto non esistono criteri di valutazione universali ed oggettivi.

Il concetto di fragilità è da intendersi come un declino globale dello stato di salute che coinvolge in maniera parallela diversi sistemi fisiologici mettendo in crisi l'omeostasi (alcuni autori parlano di omeostenosi; Franceschi et al., 2000b) determinando una peculiare ma generica suscettibilità e disabilità verso lo sviluppo di malattie ponendo il soggetto a rischio elevato di morte ed altri esiti negativi (Giorn. Geront., Suppl. 1, vol. XLVII, pagg. 79-88, 1999). E' ormai noto che le principali funzioni di mantenimento dell'omeostasi nell'organismo sono svolte dal sistema immuno-neuro-endocrino (Franceschi et al., 2000b). Si pensa, perciò, che i cambiamenti che si verificano in questo network nel corso della vita umana siano strettamente legati alle dinamiche di insorgenza dei processi di invecchiamento e, quando accade, all'invecchiamento con successo.

Gran parte delle caratteristiche fenotipiche osservate nel processo di invecchiamento sono frutto dell'insorgenza, con l'età, di un uno stato pro-infiammatorio cronico di basso grado detto "*Inflamm-aging*", in parte sotto controllo genetico: tale stato sembra essere la conseguenza della continua stimolazione antigenica che continua oltre l'età riproduttiva e quindi largamente non prevista dall'evoluzione (Franceschi et al., 2000a,b; Ginaldi et al., 2005). Il danno tissutale che ne deriva sembra essere correlato al rischio di morte nelle persone anziane e inoltre, risulta essere deleterio per la longevità (Bonafè, 2001). Alcuni studi hanno permesso di individuare i marcatori genetici, cellulari e

sierologici dell'inflamm-ageing, quali un immunofenotipo caratterizzato da una diminuzione delle cellule T naïve ed un accumulo di cellule di memoria, un incremento dei livelli di citochine pro-infiammatorie e alterazioni significative della frequenza di polimorfismi funzionali di citochine pro- o anti-infiammatorie (Franceschi et al., 2000; Salvioli et al., 2006; Capri et al., 2006). Inoltre, il processo d'invecchiamento è largamente influenzato dalle alterazioni dell'omeostasi dello stato redox e dal progressivo aumento dello stress ossidativo. Questo è coinvolto nella trasduzione del segnale cellulare, nella risposta infiammatoria e nel danno tissutale determinando cambiamenti metabolici ed energetici che modificano alcune funzioni cellulari, quali la crescita, la termoregolazione e l'omeostasi. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono inoltre in grado di indurre profondi effetti sull'espressione genica e sono implicate nella patogenesi di numerose patologie età-correlate quali aterosclerosi, diabete di tipo II, neurodegenerazione, osteoporosi e osteoartrite, accomunate da una forte componente infiammatoria/immunologica. Inoltre, stress ossidativo e ROS sono attivi induttori di apoptosi e possono agire come mediatori influenzando diversi fattori di trascrizione, quali NF- $\kappa$ B e AP-1 (Salvioli et al., 2006a,b). Alterazioni nell'apoptosi durante l'invecchiamento potrebbero quindi spiegare alcuni degli aspetti più importanti dell'immunosenescenza (Ginaldi et al., 2005) quali l'accumulo di megacloni espansi di cellule di memoria, la restrizione del repertorio dei linfociti T e l'aumento di fenomeni autoimmunitari.

I meccanismi cellulari e molecolari correlati alla capacità dell'organismo di rispondere adeguatamente ad una serie di stress di tipo ossidativo e infiammatorio sembrano dunque giocare un ruolo importante nel favorire la longevità umana e nell'evitare/ritardare le maggiori patologie età-correlate.

### **1.1.1 La Teoria del Network**

La teoria del network, proposta per la prima volta nel 1989, combina i dati ottenuti da studi di biologia cellulare e molecolare con le teorie evoluzionistiche sull'invecchiamento elaborate in particolare da Kirkwood negli anni '70 (Franceschi et al., 2000b). Secondo questa teoria, l'invecchiamento è indirettamente controllato da una rete (network) di meccanismi di difesa cellulari

e molecolari col compito di salvaguardare le cellule dai fattori di stress interni ed esterni a cui sono esposte nel corso del proprio ciclo vitale. Tali agenti di stress possono essere di natura fisica (radiazioni, calore), chimica (metaboliti tossici, radicali liberi) o biologica (virus e microrganismi patogeni) e possono a loro volta indurre l'attivazione di diversi meccanismi difensivi, tra i quali particolare importanza hanno:

- processi di riparazione del DNA;
- sistemi di difesa, enzimatici e non, contro lo stress ossidativo;
- produzione di Heat Shock Proteins (HSPs) e di proteine dello stress;
- attivazione della poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP)
- apoptosi, intesa come il processo ancestrale con cui vengono eliminate le cellule danneggiate, mutate, infette o trasformate (Franceschi et al., 1995b).

Questi processi cellulari e molecolari si sono sommati uno dopo l'altro nel corso dell'evoluzione e costituiscono la base dei sistemi di invecchiamento (Franceschi et al., 1995b). Si tratta, infatti, di un vero e proprio network di meccanismi interconnessi ed integrati che possono essere considerati e studiati nell'insieme piuttosto che singolarmente. Un'alterazione o un difetto di questi impedisce alla cellula di mantenere la propria omeostasi causandone la senescenza, intesa come invecchiamento a livello cellulare determinato da modificazioni fisiologiche (inclusa la capacità di risposta e/o la produzione di fattori di crescita), con conseguente sbilanciamento tra proliferazione e morte cellulare in tessuti ed organi. I sistemi immunitario e neuro-endocrino, caratterizzati a loro volta da strette interazioni, giocherebbero un ruolo molto importante nel network, all'interno del quale si può riconoscere un gruppo più ristretto di meccanismi molecolari e cellulari altamente integrati, da cui dipende l'invecchiamento e dei quali solo alcuni potrebbero avere funzioni critiche.

Non è ancora chiaro quale contributo ciascuno dei suddetti meccanismi fornisca all'intero network e come quest'ultimo sia gerarchicamente organizzato, soprattutto negli organismi superiori. Da un punto di vista evolutivo, la rete basale di difesa contro lo stress è altamente conservata nelle diverse specie e si è arricchita ed ampliata generando nuovi e più elevati livelli di organizzazione in grado di interagire e di modularne l'attività al fine di trasformare

un'informazione locale in una risposta generalizzata all'intero organismo (Franceschi et al., 2000b). Esempi di omologie tra le specie rispetto alle attività del network si riscontrano, infatti, lungo tutta la scala evolutiva.

In *S. Cerevisiae*, modello di studio degli eucarioti unicellulari, la risposta allo stress e la durata della vita dipendono dall'espressione del prodotto del gene RAS2, che coordina le informazioni riguardanti stato energetico, disponibilità di nutrienti e ciclo cellulare, e attiva la risposta a vari tipi di stress. Studi su mutanti privi di RAS2 (Shama et al., 1998) hanno dimostrato come anche in questo organismo si verifichi il fenomeno chiamato "hormesis", secondo cui l'esposizione transiente ad uno stress sub-letale agisce positivamente a lungo termine sulla capacità individuale di risposta e sulla longevità. Si verifica, infatti, un aumento dell'attività dei meccanismi di difesa che genera una forma di memoria molecolare, dovuta a modificazioni progressive del sistema, in grado di regolare in modo appropriato le future risposte allo stress. Pertanto, in *S. Cerevisiae* non sono necessariamente gli individui con la massima capacità di risposta allo stress ad essere i più longevi; paradossalmente è infatti più utile ai fini della sopravvivenza l'essere incapaci di rispondere o regolare una risposta minima a stimoli esterni.

In *C. Elegans*, modello di organismo pluricellulare, esiste una via metabolica ancestrale dell'insulina i cui componenti (IGF-1, i geni *daf-2* e *daf-16*, *age-1*, *unc-31* e *unc-64*) corrispondono a omologhi umani e sono coinvolti in meccanismi di risposta allo stress ambientale, sopravvivenza in caso di inedia ed estensione della durata della vita. Nel loro complesso possono essere concepiti come un sistema neuro-endocrino primordiale coordinato e integrato dall'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1).

Nei mammiferi, e in particolare nelle specie murina e umana, la complessa organizzazione del sistema immuno-neuro-endocrino consente all'organismo di far fronte alla notevole quantità di agenti stressanti durante tutta la vita. Esso controlla l'attività delle HSPs, incorporata nel sistema catecolaminergico di risposta allo stress, sia per la regolazione fisiologica della vascolatura, sia in seguito ad una serie di insulti elementari (caldo, freddo) e complessi (nutrizionali, psicologici). L'elevata produzione e attivazione di tali proteine in seguito a stress

cronico è anche tra i meccanismi implicati nell'ipertensione, ad evidenza di come, in alcune circostanze, sembra essere preferibile, ai fini della sopravvivenza, una bassa responsività ed un adattamento alle condizioni ambientali. Le modificazioni caratteristiche dell'invecchiamento dei mammiferi (riduzione del numero dei recettori catecolaminergici in periferia, diminuzione dei livelli di HSPs e della loro inducibilità, calo della responsività del sistema nervoso simpatico) sono probabilmente determinate dalle conseguenze a lungo termine dello stress cronico a cui l'organismo è esposto durante tutto l'arco della sua vita e che lo rende meno capace di far fronte ai cambiamenti ambientali (*omeostenosi*). Gli individui anziani, infatti, sono in grado di rispondere allo stress come i giovani, ma mostrano una ridotta capacità di recupero in seguito alle modificazioni da esso indotte. Inoltre, l'invecchiamento espone gli organismi agli effetti collaterali deleteri delle risposte, come dimostra la tossicità a livello metabolico delle HSPs (la cui sovraespressione è riscontrabile in molte neoplasie maligne) e delle catecolamine, i probabili responsabili della perdita selettiva di neuroni dopaminergici e dell'aumentata suscettibilità dei neuroni dell'ippocampo alla neurotossicità della  $\beta$ -amiloide. Si ipotizza, quindi, che la strategia per una sopravvivenza a lungo termine sia quella di mantenere, nell'organismo, la risposta allo stress entro un determinato range, in cui cioè insulti cronici possono rendere il sistema insensibile ai cambiamenti attraverso l'aumento della soglia di attivazione o la diminuzione della sensibilità di effettori periferici (Franceschi et al., 2000b).

Queste considerazioni devono essere estese ad una popolazione estremamente eterogenea come quella umana, in cui tutti i fenomeni descritti dipendono, oltre che dalle interazioni con l'ambiente, anche dalla combinazione di varianti geniche (polimorfismi) implicate nei processi di risposta.

### **1.1.2 La Teoria del Rimodellamento**

La necessità di concettualizzare gli studi sull'immunosenescenza umana, unita all'esistenza di un nuovo modello di studio rappresentato dai centenari in buona salute, ha portato all'elaborazione della teoria del rimodellamento dell'invecchiamento (Franceschi et al., 1995b), secondo cui le disfunzioni immunologiche collegate con l'età hanno un impatto significativo sulla durata

della vita e sulle malattie. In questo approccio sono stati considerati in buona salute gli individui centenari in cui erano assenti le principali patologie e disabilità fisico-cognitive tipiche dell'anziano. I dati raccolti misero in evidenza due caratteristiche da cui successivamente si svilupparono i punti fondamentali della teoria: le alterazioni in molti parametri immunologici misurabili nei centenari sono meno consistenti del previsto e le loro risposte immunitarie sono interessate in modo differente dai processi di invecchiamento. L'immunosenescenza sarebbe, perciò, il risultato del continuo adattamento del corpo ai cambiamenti deteriorativi che si verificano nel tempo. In quest'ottica il fenomeno assume caratteristiche dinamiche in cui alcune capacità vengono perse ed altre acquisite, tenendo comunque conto del fatto che la proprietà di rimodellamento del sistema immunitario è geneticamente controllata in tutte le specie. Da un punto di vista evolutivo, infatti, occorre considerare che il sistema immunitario umano è stato selezionato per svolgere le proprie funzioni fino all'età riproduttiva, per andare poi incontro a senescenza. L'aumento della percentuale di persone che vivono fino ad 80-120 anni ed il fatto che le condizioni ambientali attuali cambino repentinamente incrementando la probabilità di comparsa di nuovi antigeni più che in passato, obbligano il sistema immunitario umano ad operare in condizioni finora non previste dall'evoluzione e quindi a modificarsi in modo non ancora del tutto chiaro.

L'immunosenescenza è qualitativamente la stessa per ogni specie, ma quantitativamente dipende dalla scala evolutiva in termini di durata della vita e dimensioni corporee. L'immunità innata, essendo la più conservata nelle specie e possedendo meccanismi relativamente più semplici, risulta la meno interessata dai cambiamenti legati all'invecchiamento, al contrario di quanto accade nei confronti della più evoluta, ma anche più delicata, risposta adattativa clonotipica. Un ruolo cruciale nell'immunosenescenza è svolto dal timo, organo linfoide primario deputato allo sviluppo dei linfociti T e all'induzione della loro tolleranza nei confronti di antigeni autologhi, soggetto a progressiva involuzione a partire dalla pubertà. In termini evolutivisti tale fenomeno può essere interpretato come una conseguenza del fatto che la sua funzione non è più necessaria dopo l'età riproduttiva, quando il repertorio linfocitario individuale è già stato

selezionato; inoltre il suo mantenimento in termini di costi per l'organismo è troppo elevato, poiché ogni giorno vi muoiono il 95% dei linfociti presenti. L'immunità cellulo-mediata, infatti, è quella che va incontro ai cambiamenti più drastici rispetto alla componente umorale.

Per quanto riguarda i linfociti B, il loro numero assoluto diminuisce con l'età, ma si verifica, al tempo stesso, un aumento dei livelli sierici di alcuni subsets di Immunoglobuline di classe A (IgA) e G (IgG) dirette prevalentemente contro batteri e virus e prodotte dalle cellule di memoria ed effettrici (Franceschi et al., 1995b). Questo apparente paradosso potrebbe essere spiegato ipotizzando che i linfociti B e le plasmacellule proliferino in altri organi e non nel sangue periferico, oppure che il loro ciclo vitale si sia allungato nei centri germinali (ipotesi più accreditate), o infine che vengano semplicemente prodotte quantità più elevate di Ig. Inoltre, mentre con l'età aumentano i livelli sierici di linfociti B CD5<sup>+</sup>, una particolare sottopopolazione che produce auto-anticorpi polireattivi; nei soggetti anziani in buona salute se ne producono in bassa quantità e nei centenari sono spesso praticamente assenti.

Nei linfociti T si verifica con l'età un aumento del numero di cellule attivate e di memoria (CD45R0<sup>+</sup>) e una diminuzione dei linfociti vergini (CD45RA<sup>+</sup>), ma negli anziani in buona salute e nei centenari i livelli di CD45RA<sup>+</sup> sono più consistenti del previsto (Franceschi et al., 1995b). Probabilmente tali cellule sono prodotte in siti extra-timici o in seguito alla proliferazione dei linfociti vergini e di memoria, o si verifica un aumento della durata della loro vita media. Queste modificazioni sono molto più marcate all'interno dei CD8<sup>+</sup>, che durante la vita sono soggetti a maggiore attivazione rispetto ai linfociti CD4<sup>+</sup>, a causa del carico antigenico alla base delle più frequenti infezioni acute che colpiscono l'organismo. Nei soggetti anziani e centenari si osserva un'espansione molto marcata di cloni CD8<sup>+</sup> che hanno già incontrato l'antigene (CD28<sup>-</sup>) e sono meno suscettibili a stimoli apoptotici o a morte cellulare indotta da attivazione, come dimostra la riduzione dell'espressione in superficie di CD95 (Franceschi et al., 1995b).

Un aspetto interessante delle modificazioni dei linfociti T in individui molto anziani e centenari è rappresentato dalla comparsa all'interno dei cloni espansi di cellule effettrici con caratteristiche intermedie tra le popolazioni T e Natural Killer

(NK) e marcatori di superficie di entrambe (Bonafè et al., 2001). Lo studio della controparte murina di tali cellule NK/T ha permesso di scoprirne alcune caratteristiche che potrebbero essere simili anche nell'uomo:

- sono prodotte nel timo e in altre sedi;
- sono soggette a restrizione MHC diversa dalle normali cellule T e comprendono anche cloni auto-reattivi: ciò potrebbe spiegare nell'uomo la maggiore tendenza, con l'età, a sviluppare una risposta immunitaria aggressiva contro antigeni autologhi e, dall'altro lato, ad aumentare l'immunosorveglianza, ad esempio contro cellule tumorali;
- producono elevati livelli di IFN- $\gamma$  e/o IL-4, così come le cellule NK/T umane.

La comparsa di questa particolare popolazione è stata documentata anche nei CD4<sup>+</sup>, ma in maniera meno evidente (Nociari et al., 1999). La letteratura ha sempre riportato, in relazione con l'invecchiamento, uno spostamento dal profilo Th<sub>1</sub> al Th<sub>2</sub>, ma recenti studi hanno evidenziato nei centenari cellule CD4<sup>+</sup> effettrici in grado di produrre sia IFN- $\gamma$  sia IL-4 (fenotipo Th<sub>0</sub>), molto simili ai linfociti murini NK/T di tipo Th<sub>0</sub>.

Nell'immunità innata, che comprende processi di chemotassi, fagocitosi e citotossicità naturale, sono pochi i cambiamenti riscontrati in seguito all'invecchiamento e probabilmente questo è uno dei motivi per cui tra i centenari in buona salute non si osserva un aumento nella frequenza di patologie infettive. Nei centenari, infatti, si osservano l'espansione di cellule NK ad elevata attività citotossica ed il mantenimento dei processi chemotattici (Franceschi et al., 1995b).

I cambiamenti descritti determinano il riempimento dello "*Spazio Immunologico*" (Franceschi et al., 2000b), concetto elaborato per mettere in evidenza le principali caratteristiche del sistema immunitario fra cui, in primo luogo, i suoi reali limiti fisici. Questa definizione ha origine dall'osservazione che, in seguito a trapianto di midollo osseo, chemioterapia antitumorale e ricostruzione del sistema immunitario dopo terapia mirata contro l'AIDS (trattamenti che determinano un aumento della "disponibilità di spazio" nella periferia dell'organismo), le cellule T vergini proliferano indipendentemente dalla presenza di antigeni, fenomeno indicato come "*Espansione Omeostatica*" (Franceschi et al., 2000b). Per spiegare questo evento è stata ipotizzata, in condizioni di normalità, l'esistenza di una

inibizione reciproca che coinvolge i linfociti T in competizione per la disponibilità di spazio nel sistema e che viene meno quando si presenta la necessità di ripopolarlo. Tale espansione, determinata principalmente dallo "svuotamento" del sistema immunitario, è risultata indipendente anche dalla presenza di molecole MHC di classe I e II (Murali-Krishna et al., 1999; Swain et al., 1999).

Anche lo spazio immunologico è quindi interessato dai rimodellamenti, sia quantitativamente (riduzione delle dimensioni e del numero di cellule) che qualitativamente, e in questo caso con particolare riferimento alle alterazioni che subiscono le proteine dell'organismo nel corso del tempo (tra cui ossidazione e glicosilazione) e che si riflettono in cambiamenti nei peptidi autologhi che vengono presentati dalle cellule specializzate. Ciò potrebbe spiegare non solo i disordini autoimmunitari ma anche altre patologie in cui è implicato il sistema immunitario.

## **1.2 L'APOPTOSI**

La morte cellulare come aspetto essenziale del normale funzionamento degli organismi pluricellulari è un concetto diffuso fin dall'antichità: il fatto che alcune strutture fossero transitorie e destinate a scomparire era infatti noto già con Galeno, il quale per primo osservò lo stato transitorio del dotto arterioso fetale nell'uomo. Ovviamente, Galeno non si riferiva direttamente alla morte delle cellule, in quanto il concetto stesso di cellula fu introdotto solo nel 1839 da Schleiden e Schwann. La prima descrizione di morte cellulare risale invece al 1842, con le osservazioni di Vogt sulla metamorfosi dell'anfibio (Clarke e Clarke, 1995). L'osservazione della morte cellulare come evento fisiologico necessario per lo sviluppo corretto dell'organismo adulto ha poi portato alcuni studiosi a introdurre il concetto di evento programmato (Glucksmann, 1951; Lockshin, 1965). Nel 1972 Kerr, Wyllie e Currie introdussero una teoria in cui si faceva distinzione tra due fondamentali tipi di morte cellulare: la necrosi, forma violenta e incontrollata di morte cellulare indotta da eventi chimici, fisici o biologici letali; l'apoptosi, il cui nome deriva da un termine greco col quale si indica la caduta dei

petali o delle foglie dagli alberi, processo fisiologico normale e altamente regolato (Kerr et al., 1972).

Oggi sappiamo che l'apoptosi ha un duplice ruolo: bilanciare finemente il numero di cellule nello sviluppo embrionale e mantenere l'omeostasi negli organismi pluricellulari adulti (e quindi anche nell'uomo). Nell'adulto, infatti, la morte cellulare programmata è responsabile dell'equilibrio fra proliferazione e mantenimento di un numero costante di cellule nei tessuti; inoltre rappresenta un meccanismo di difesa per cui le cellule danneggiate, quindi potenzialmente pericolose, sono eliminate per il bene dell'organismo stesso. Le cellule infettate da virus, ad esempio, andando incontro ad apoptosi, ne limitano la diffusione all'interno dell'ospite impedendo la produzione di nuove particelle virali. Altri tipi di danni, quali il danno al DNA, inducono apoptosi, in tal caso mirata all'eliminazione di cellule portatrici di mutazioni potenzialmente dannose (ad esempio mutazioni che potrebbero portare allo sviluppo del cancro).

Durante lo sviluppo, l'apoptosi svolge un ruolo chiave eliminando da molti tessuti cellule non necessarie: ad esempio, è responsabile dell'eliminazione dei tessuti larvali durante la metamorfosi degli anfibi e degli insetti e dell'eliminazione delle membrane interdigitali (Figura 1).

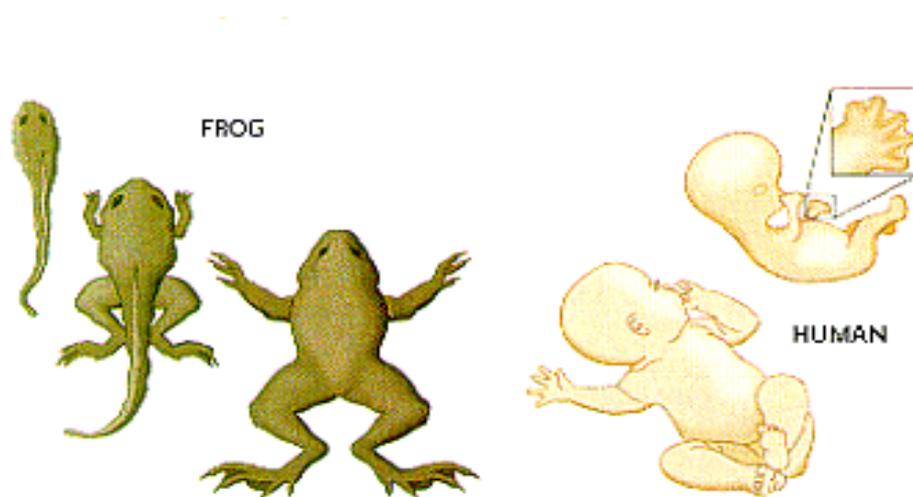


Figura 1: L'eliminazione dei tessuti larvali degli anfibi e degli insetti e l'eliminazione delle membrane interdigitali nei feti umani sono fenomeni regolati tramite apoptosi.

Un altro esempio di morte cellulare programmata si trova a livello del sistema nervoso dei mammiferi: i neuroni, infatti, sono prodotti in eccesso e, durante lo sviluppo, fino al 50% viene eliminato attraverso apoptosi. Quelli che sopravvivono sono selezionati in base alla formazione di connessioni con le cellule bersaglio, le quali secernono fattori di crescita (GFs) che favoriscono la sopravvivenza cellulare bloccando il programma di morte dei neuroni (Raff et al., 1993).

La sopravvivenza di molti altri tipi di cellule negli animali dipende in modo simile da GFs o da contatti con cellule adiacenti o con la matrice extracellulare, così si pensa che l'apoptosi svolga un ruolo fondamentale nella regolazione delle associazioni fra le cellule nei tessuti. Difetti nel processo apoptotico sono implicati in molte patologie umane, quali la Corea di Huntington, danni ischemici, disordini autoimmuni, molte forme di cancro e sindromi neurodegenerative come l'Alzheimer (Thompson, 1995; Nicholson, 1996).

### **1.2.1 Aspetti morfologici**

Le cellule che vanno incontro ad apoptosi mostrano caratteristiche morfologiche peculiari che consentono di distinguerle dalle cellule necrotiche: il primo dei cambiamenti cellulari è in genere l'arrotondamento della cellula stessa, a cui segue la perdita dei contatti con le cellule circostanti e la scomparsa dalla superficie di specializzazioni di membrana quali microvilli e desmosomi. Il volume cellulare va incontro a una notevole riduzione a causa della perdita osmotica di acqua e ioni con conseguente condensazione del citoplasma. Non si verificano, invece, lesioni specifiche negli organelli citoplasmatici che in genere mantengono un aspetto normale anche se spesso si può osservare la dilatazione delle cisterne del reticolo endoplasmatico.

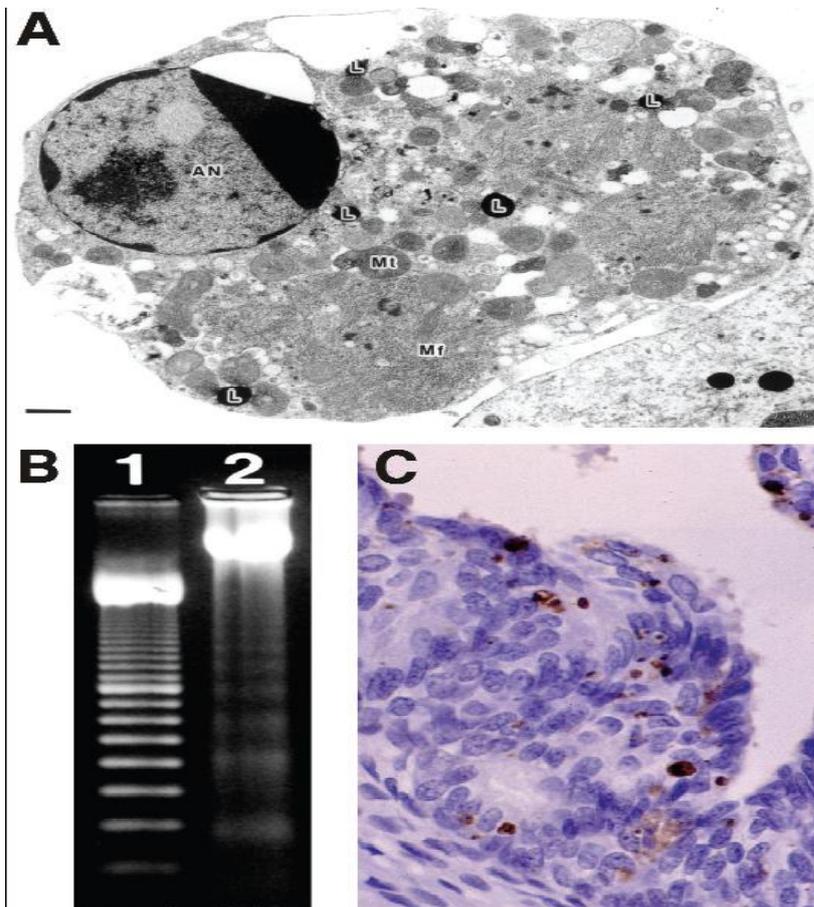


Figura 2: Metodi per rilevare l'apoptosi. (A) fotomiografia che mostra l'apoptosi indotta da Fas in cardiomiociti di topo. E' evidente la condensazione della cromatina nucleare nella periferia del nucleo. AN, nucleo apoptotico (nucleo picnotico); Mt, mitocondrio; Mf, miofibrille; L, struttura lipid-like. Barra di scala: 1 $\mu$ m. (B) Gel elettroforesi che mostra un pattern DNA ladder in timo di ratto (seconda lane). L'apoptosi è stata indotta con trattamento con methylprednisolone. La prima lane mostra le bande di un marker 100bp. (C) Saggio TUNEL di tessuto prostatico di coniglio prelevato 48 ore prima. Le cellule TUNEL-positive sono colorate in marrone (Takemura G., 2006).

A livello nucleare, in seguito alla precoce scomparsa del nucleolo durante la riduzione di volume del citoplasma, la cromatina si condensa progressivamente fino a scomporsi in masse granulari compatte che si spostano verso la membrana cellulare. Tali masse aumentano di numero e si fondono tra loro formando un nucleo apoptotico, detto picnotico, dalla caratteristica forma a mezza luna (Figura 2A). Gli eventi proteolitici a carico delle varie componenti nucleari sembrano essere responsabili della condensazione cromatinica e dell'esposizione del DNA genomico all'attacco enzimatico di nucleasi che tagliano il DNA a livello dei linker internucleosomali, generando frammenti di 180-200 paia di basi (bp) o

multipli interi. La specifica frammentazione del DNA è sicuramente una delle principali caratteristiche biochimiche del processo apoptotico (Willie, 1980) e può essere evidenziata con saggi quali l'elettroforesi su gel del DNA (DNA ladder) (Figura 2B) o la tecnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP in situ nick end-labelling, Figura 2C) (Didenko e Hornsby, 1996). Anche la matrice nucleare subisce profonde modificazioni a carico della lamina e della matrice nucleare interna. La lamina, complessa rete di fibre proteiche che avvolgono completamente la membrana nucleare, va incontro a fosforilazione immediatamente prima che inizi la condensazione cromatinica, dando così inizio ad un processo degradativo contemporaneamente alla condensazione stessa. La rete di fibre proteiche e di strutture granulari che costituisce la matrice nucleare interna viene solubilizzata contribuendo alla frammentazione del DNA per esposizione all'attacco delle nucleasi.

Al termine del processo di condensazione, il nucleo si scompone in frammenti che, insieme a mitocondri e porzioni del reticolo endoplasmatico, vengono inglobati in protuberanze che si formano sulla superficie interna della membrana plasmatica (blebs) conferendole un aspetto caratteristico (blebbing). I blebs, in seguito, si fondono per dare origine ai cosiddetti corpi apoptotici che si staccano dalla superficie cellulare e vengono fagocitati dalle cellule circostanti e/o da macrofagi tissutali e degradati all'interno dei lisosomi (Savill et al., 1993). Le modalità di riconoscimento e fagocitosi dipendono, oltre che dal tipo cellulare coinvolto, anche da stimoli provenienti dal microambiente. Il risultato finale è, comunque, una "eliminazione pulita" in grado di evitare danni di origine infiammatoria al tessuto.

Inoltre, durante tutto il processo non si verificano fuoriuscite di costituenti cellulari nello spazio interstiziale, poiché la membrana plasmatica è resa più resistente dalla formazione di legami crociati irreversibili transglutammasi-dipendenti tra proteine di membrana, citoplasmatiche e componenti del citoscheletro.

### 1.2.2 Pathways di apoptosi

Esistono due vie principali di morte apoptotica, a seconda della natura dello stimolo induttore:

1. Via intrinseca, anche detta via mitocondriale. Attivata da stimoli induttori interni alla cellula, quali, ad esempio, stress ossidativo, danno al DNA o da stimoli extracellulari quali la carenza di nutrienti o di fattori di crescita;
2. Via estrinseca, mediata dall'attivazione di Recettori di Morte (DR) localizzati sulla membrana plasmatica.

In entrambi i casi l'apoptosi è mediata dall'attivazione di Serina-proteasi specifiche denominate Caspasi, che tagliano un gran numero di substrati citoplasmatici e nucleari per indurre gli eventi caratteristici della morte programmata. Sebbene entrambe le vie comportino l'attivazione di effettori comuni o caspasi esecutrici, i due processi differiscono nell'attivazione delle caspasi iniziatrici (Gupta S., 2000).



Figura 4: Rappresentazione schematica del processo di induzione di morte apoptotica.

### 1.2.3.1 Via intrinseca

EVENTI PRE-MITOCONDRIALI: la via intrinseca integra un ampio spettro di stress intracellulari (ad esempio stress ossidativo e danno al DNA) ed extracellulari (carenza di fattori di crescita o di nutrienti, radiazioni, stress chimici o fisici). La via intrinseca è caratterizzata da una complessa interazione tra molteplici segnali che convergono al mitocondrio causandone la perdita di funzionalità e il conseguente rilascio di fattori apoptogeni e l'attivazione delle caspasi (Crow et al., 2004). Il legame tra stimolo apoptotico e meccanismi apoptotici è fornito da una serie di vie di segnalazione periferiche che comportano, per la maggior parte, il coinvolgimento delle proteine pro-apoptotiche appartenenti alla famiglia Bcl-2 (Danial e Korsmeyer, 2004). Tale famiglia è composta da 2 grandi gruppi:

1. *Proteine Anti-Apoptotiche*: i membri di questa famiglia contrastano l'azione delle proteine Bcl-2 pro-apoptotiche e, sebbene il loro ruolo di regolatori anti-apoptotici sia stato scoperto molti anni fa, il loro preciso meccanismo di azione resta sconosciuto. Bcl-2 e Bcl-xL si trovano costitutivamente ancorate alla membrana mitocondriale esterna e al reticolo endoplasmatico (Krajewski et al., 1993) anche se la maggior parte dei membri di questa famiglia si localizza a livello citosolico (Hsu e Youle, 1997). Si ipotizza che il rapporto Bcl-2 (o Bcl-xL)/Bax (o Bak) determini la sopravvivenza o meno della cellula (Oltvai et al., 1993). La base fisica di questo fenomeno sembrava essere l'interazione diretta tra le due proteine ma alcuni dati hanno introdotto la possibilità che tali interazioni fossero in realtà degli artefatti dovuti ai detergenti non ionici e buffers usati per gli esperimenti (Hsu e Youle, 1997). Inoltre, studi genetici hanno dimostrato che Bcl-2 e Bax sono in grado di esercitare la propria attività in modo indipendente (Knudson e Korsmeyer, 1997), avvalorando l'ipotesi che Bcl-2 e Bcl-xL possano agire attraverso meccanismi diversi dall'interazione diretta con Bax e Bak. Un possibile meccanismo di azione prevedrebbe che Bcl-2 e Bcl-xL funzionino da "sequestratori" delle proteine BH3-only prevenendo così l'attivazione di Bax e Bak (Cheng et al., 2001).

2. *Proteine Pro-Apoptotiche*, ulteriormente suddivise in:

a.*multidominio*: Bax (Oltvai et al., 1993) e Bak (Farrow et al., 1995; Chittenden et al., 1995; Kiefer et al., 1995) sono richieste, da sole o insieme, per tutti i processi apoptotici mediati dalla via intrinseca (Wei et al., 2001). Infatti, le cellule che non esprimono tali proteine sono incapaci di attivare questa via in quanto controllano l'accesso al mitocondrio dei segnali apoptotici. L'attivazione di Bax e di Bak è regolata attraverso cambiamenti conformazionali. Bax è trattenuto nel citosol in forma inattiva dall'inserzione di un' $\alpha$ -elica C-terminale all'interno di una cavità idrofobica formata dai domini BH1-BH3 (Suzuki et al., 2000). In risposta a stimoli apoptotici, un cambiamento conformazionale, che coinvolge l' $\alpha$ -elica C-terminale ed il dominio N-terminale, induce la traslocazione di Bax al mitocondrio, con conseguente oligomerizzazione e inserzione della coda C-terminale nella membrana esterna mitocondriale (OMM). A questo punto Bax è in grado di stimolare il rilascio del citocromo c (Cyt C) e di altri fattori apoptogeni nel citosol. Sebbene i precisi meccanismi che regolano l'attivazione conformazionale di Bax non siano ancora noti, sembra che essi coinvolgano la caspasi-2 e altre proteine leganti Bax (Lassus et al., 2002). p53, espressa in risposta a insulti genotossici, ipossia e altri stress cellulari, sembra attivare Bax mediante cambiamenti conformazionali. Tale meccanismo non è ancora completamente chiarito, in quanto le due proteine non sembrano interagire tra loro (Chipuk et al., 2004). Anche Bak va incontro ad attivazione per modificazione conformazionale. In questo caso la coda C-terminale della proteina inattiva si trova costitutivamente ancorata alla membrana mitocondriale esterna. L'inibizione di Bak è dovuta all'interazione con VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) e Mcl-1 (*Mieloid Cell Leucemia 1*), una proteina Bcl-2 anti-apoptotica (Cheng et al., 2003; Leu et al., 2004). L'attivazione di Bak è determinata dalla rimozione di VDAC da parte di Bim, Bid e Bad, e di Mcl-1 da parte di p53 nelle fasi iniziali del processo apoptotico. L'attivazione conformazionale di Bak induce la sua oligomerizzazione intramembrana e causa rilascio di fattori apoptogeni dal mitocondrio

b. *BH3-only*: I membri di questa sottofamiglia funzionano da sentinelle che sorvegliano i segnali apoptotici a monte e li trasmettono, direttamente o indirettamente, a Bax e Bak. A differenza di queste ultime, le proteine BH3-only sono spesso specializzate nella traduzione di alcuni stimoli specifici. Bim, ad esempio, è sensibile alla deprivazione di citochine nei linfociti, mentre Puma risponde solo a p53 (Yu et al., 2001; Nakano et al., 2001). In generale, la capacità di indurre apoptosi delle BH3-only dipende dal dominio BH3 e la loro attivazione coinvolge diversi meccanismi. Bid può essere attivata da taglio proteolitico da parte della caspasi-8 o della caspasi-3 (Wei et al. 1996). In seguito al taglio, la porzione C-terminale (tBid) trasloca al mitocondrio per inserirsi nella membrana esterna lasciando il dominio BH3 esposto nella porzione citosolica dove può legare Bak e liberarlo dall'inibizione di VDAC (Wei et al. 1996). Bid, pertanto, funge da ponte diretto tra la via intrinseca ed estrinseca. Nel caso di Bim e Bmf, invece, l'attivazione avviene per rilascio rispettivamente dal microtubulo e dal citoscheletro (Puthalakath et al., 2001). Bad (Yang et al., 1995) è regolato da fosforilazione su specifici residui di serina per azione di chinasi. Inoltre, la perdita di fattori di sopravvivenza di vario genere (ad es. l'Insulin-like Growth Factor) ne induce defosforilazione e il conseguente attacco alla membrana mitocondriale, dove interviene per staccare VDAC da Bak. L'induzione della trascrizione genica ha un ruolo centrale nella regolazione di altre proteine BH3-only, ad esempio l'attivazione di Puma e Noxa avviene per azione di p53 (Yu et al., 2001; Nakano et al., 2001).

**EVENTI INTRAMITOCONDRIALI:** Nella via intrinseca i mitocondri fungono da interfaccia tra meccanismi apoptotici upstream che coinvolgono le caspasi e meccanismi di morte downstream. Durante l'apoptosi si assiste al rimodellamento funzionale e strutturale del mitocondrio con conseguente rilascio di proteine apoptogene nel citosol (Cyt C, Smac/DIABLO, AIF ed endoG).

La permeabilizzazione della membrana mitocondriale (MMP), evento caratteristico della morte cellulare, è spesso considerata il "punto di non ritorno" nella cascata di eventi che portano all'apoptosi (Green e Kroemer, 1998). La membrana mitocondriale esterna (OMM) è, in condizioni normali, permeabile ai

metaboliti ma non alle proteine; l'analisi della sua permeabilizzazione, infatti, si basa per lo più su saggi che determinano la traslocazione di proteine dallo spazio intermembrana al citosol (Kroemer et al., 2007). Tuttavia, non tutte le proteine dello spazio intermembrana sono rilasciate nel citosol simultaneamente. Ad esempio, sembra che il rilascio del Cyt C sia successivo a quello di Smac/DIABLO e preceda quello di AIF (Arnoult et al., 2003; Modjtahedi et al., 2006), probabilmente ad opera di meccanismi differenti. In alcuni casi la permeabilizzazione della OMM, osservata tramite microscopia elettronica, ha evidenziato dei gap attraverso i quali sembra defluire il contenuto dello spazio intermembrana (Terauchia et al., 2005). Il rigonfiamento osmotico della matrice, dovuto all'influsso di acqua, può portare alla rottura della membrana esterna. A questo punto la permeabilizzazione, così come la disfunzione mitocondriale e il rilascio di apoptogeni, risultano irreversibili. Tuttavia, i dati sul contributo effettivo delle rotture membranali alla permeabilizzazione della OMM sono ad oggi ancora discordanti. L'utilizzo della microscopia confocale a fluorescenza ha, infatti, evidenziato la presenza di grossi pori formati da oligomeri di Bax/Bak in mitocondri di cellule apoptotiche (Nechushtan et al., 2001), giustificando la permeabilizzazione senza rottura della membrana.

La membrana mitocondriale interna (IMM), solitamente impermeabile agli ioni e all'acqua, viene permeabilizzata attraverso la formazione di pori o canali che causano la dissipazione del potenziale di membrana ( $\Delta\Psi_m$ ). I cationi lipofilici si accumulano nella matrice mitocondriale secondo il gradiente generato da  $\Delta\Psi_m$  che, in condizioni fisiologiche, si stabilisce attorno ai 120-180 mV (con la porzione intramitocondriale più elettronegativa). Ai fini dell'analisi della permeabilizzazione della IMM, sono stati proposti numerosi fluorocromi cationici che consentono la valutazione del  $\Delta\Psi_m$  (Castedo et al., 2002; Metivier et al., 1998), tra cui la sonda lipofilica JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide), che emette nel rosso per alti valori di  $\Delta\Psi_m$  e nel verde per  $\Delta\Psi_m$  bassi.

La dissipazione del  $\Delta\Psi_m$ , comunque, oltre che dalla permeabilizzazione della IMM, è indotta anche dalla perdita della funzione respiratoria mitocondriale. L'apertura dei pori potrebbe essere, in realtà, solo un evento transitorio (Kroemer

et al., 2007). La permeabilizzazione della IMM ha come conseguenza il rigonfiamento della matrice dovuto all'ingresso di acqua e soluti (Hunter et al., 1976), che porta alla distensione e riorganizzazione delle creste mitocondriali, così come alla riduzione della densità elettronica interna.

#### MMP E RILASCIO DI FATTORI APOPTOGENICI

Sebbene sia noto che il rilascio del Cyt C e di altri fattori apoptogeni mitocondriali sia stimolato dalle proteine Bcl-2 pro-apoptotiche e inibito dalle anti-apoptotiche, i meccanismi precisi del suo passaggio al citosol sono tuttora sconosciuti. Nel corso degli anni, sono stati proposti numerosi modelli:

- Modello MPT. Tale modello postula che il rilascio di Cyt C sia legato alla MPT (*Mitochondrial Permeability Transition*), evento innescato dalla permeabilizzazione della OMM (figura 6A). In condizioni di stress o in seguito a segnali di morte il canale voltaggio-dipendente della membrana interna (PTPC) si apre per consentire il passaggio di molecole <1,5 kDa, inclusi acqua e protoni, inducendo il rigonfiamento della matrice e l'espansione della membrana mitocondriale interna. L'IMM riesce a contenere questo aumento di volume senza rompersi grazie alla sua elevata area superficiale, mentre l'OMM possiede una capacità di espansione di gran lunga più limitata e pertanto si rompe rilasciando il Cyt C e altri fattori apoptogeni nel citosol.

Il PTPC, che sembra essere il primo responsabile della MPT, si assembla a livello dei contact sites della membrana mitocondriale (regioni in cui la normale distanza OMM-IMM è quasi annullata) ed è strutturalmente costituito dall'interazione tra le molecole VDAC, ANT (Scambiatore di Nucleotidi ATP/ADP), CypD (Ciclofilina D) (Zoratti e Szabo, 1995). La sua apertura, oltre ad essere Ca<sup>2+</sup>-sensibile, è influenzata da agenti pro-ossidanti, proteine Bcl-2 pro-apoptotiche (es. Bax, Bak e Bid) e da alcuni agenti chemioterapici (Brenner e Grimm, 2006). Altre molecole, quali i ligandi della CypD, di ANT e alcune proteine Bcl-2 anti-apoptotiche possiedono, invece, azione inibitoria (Halestrap e Brenner, 2003).

I meccanismi che portano all'apertura del PTPC sembrerebbero vari: 1) modificazioni chimiche di una proteina del PTPC (Costantini et al., 2000);

2) modificazioni delle interazioni proteina-proteina all'interno del complesso (Verrier et al., 2004); 3) modificazione dei livelli di espressione di componenti pro- o anti-apoptotiche di PTPC (Bauer et al., 1999); 4) modificazioni del microambiente lipidico indotte dall'accumulo di  $Ca^{2+}$  nel mitocondrio (Brustovetsky e Klingenberg, 1996).

ANT sembra avere un ruolo fondamentale nel processo di permeabilizzazione: sebbene sia uno scambiatore di nucleotidi ATP/ADP nella IMM, media anche la formazione di pori (Halestrap e Brenner 2003). Tale modello, tuttavia, non spiega molti tipi di apoptosi in cui il rilascio di Cyt C avviene prima o senza il rigonfiamento mitocondriale o il collasso del potenziale della membrana mitocondriale stessa (Bossy-Wetzel et al., 1998; Scorrano et al., 2002).

Date le limitazioni del modello di MPT nella spiegazione delle prime fasi di rilascio del Cyt C, sono stati proposti altri modelli focalizzati su permeabilizzazioni più selettive della OMM, nei quali le proteine Bax e Bak svolgono un ruolo fondamentale: queste infatti hanno la capacità di: 1) indurre altre proteine a formare canali per il rilascio di Cyt C; 2) formare esse stesse dei pori; 3) indurre la formazione di canali lipidici.

- Modello Bax-VDAC. Tale modello ha origine dall'osservazione che Bax interagisce con VDAC (Narita et al., 1998); inoltre, l'aggiunta di Bax a liposomi contenenti VDAC induce modificazioni in VDAC stesso che ne comportano la trasformazione da canale voltaggio-dipendente selettivo per gli anioni a poro voltaggio-indipendente e non selettivo in grado di consentire il rilascio di Cyt C (figura 6B) (Shimizu et al., 1999). Studi su lievito, tuttavia, dimostrano che l'assenza di VDAC non influenza il rilascio di Cyt C indotto da Bax (Priault et al., 1999), e VDAC sembra svolgere un ruolo anti-apoptotico grazie alla capacità di inibire Bak (Cheng et al., 2003). Bax potrebbe quindi modulare il rilascio di Cyt C tramite altre vie non ancora identificate.

- Modello Bax-pore. Secondo tale ipotesi, Bax e Bak formano dei pori nella OMM (figura 6C). Il primo indizio del coinvolgimento delle proteine Bcl-2 nella formazione di pori viene dall'analisi della struttura

tridimensionale di Bcl-xL (Muchmore et al., 1996): Bax, Bcl-xL e Bcl-2 sono capaci di formare canali ionici in membrane artificiali e, in determinate condizioni, i canali Bax sono inibiti da Bcl-2 (Antonsson et al., 1997). Infine, Bax può formare pori capaci di rilasciare il Cyt C nei liposomi (Saito et al., 2000).

Alcuni studi dimostrano che i pori Bax-indotti sono sensibili alla composizione lipidica della membrana su cui si trovano (Kuwana et al., 2002) e, da tali osservazioni, è nato un modello alternativo secondo cui Bax induce la formazione di pori lipidici (Figura 6C). A supporto di tale teoria c'è soprattutto il fatto che Bax è in grado di ridurre la tensione lineare delle membrane, una proprietà che può facilitare il riarrangiamento dei fosfolipidi in pori o strutture simili (Basanez et al., 1999).

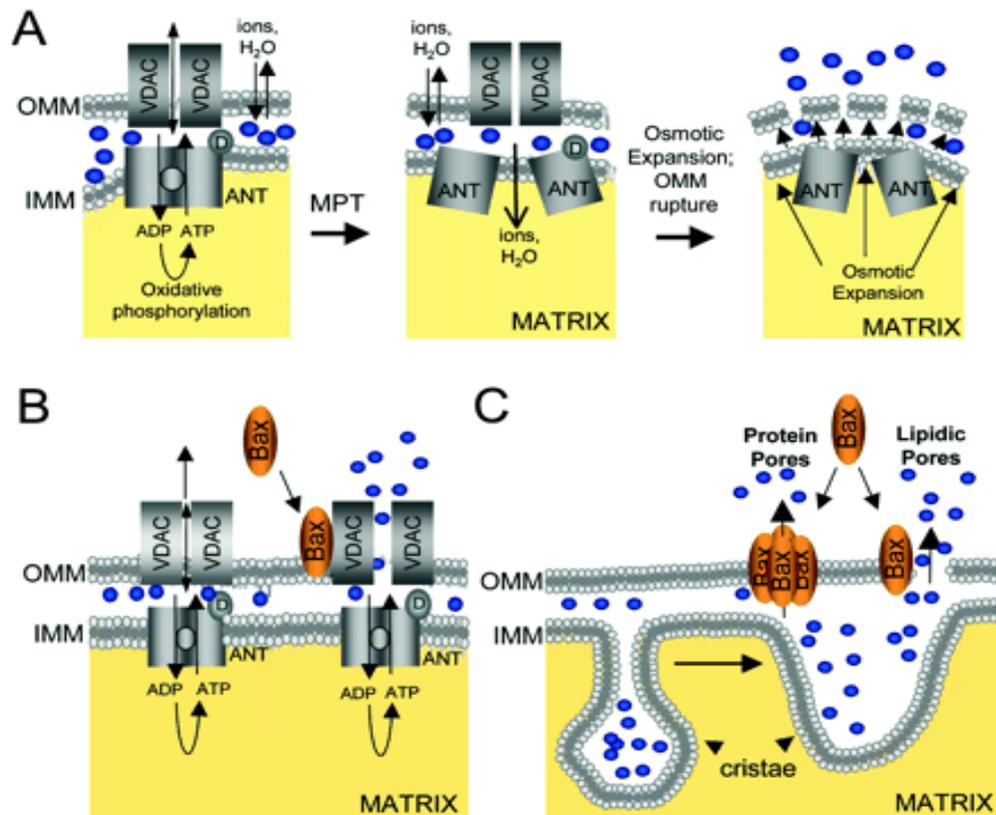


Figura 6: Modelli di rilascio del Cyt C. (A) Modello MPT. A sinistra, il PTPC nelle cellule sane funge da scambiatore di nucleotidi. In risposta a segnali di stress ANT va incontro a cambiamenti conformazionali (figura centrale) che causano l'apertura del poro e l'ingresso di acqua e ioni, con conseguente rigonfiamento dell'IMM. Ciò causa rottura della OMM e rilascio del Cyt C (a destra in blu). (B) Modello Bax-VDAC. Nelle cellule sane (a sinistra) VDAC fa parte del complesso di scambiatore di nucleotidi ma, legandosi a Bax (a destra), modifica le proprie proprietà e rilascia Cyt C. (C) Modelli Bax pore. Nelle cellule sane (a sinistra) il Cyt C si trova sequestrato nelle creste ma, nel corso dell'apoptosi, il rimodellamento delle creste causa apertura delle junction e rilascio di Cyt C nell'ICS. La formazione di pori di Bax o lipidici (stimolata da Bax) induce rilascio di Cyt C nel citosol.

I meccanismi che mediano il rilascio di altri fattori apoptogenici sono poco conosciuti e l'inibizione delle caspasi influenza diversamente il rilascio di queste proteine, suggerendo il coinvolgimento di vari meccanismi. A differenza del rilascio caspasi-indipendente di Smac/DIABLO, la traslocazione di AIF e della Endonucleasi G (EndoG) è sensibile all'inibizione delle caspasi (Adrain et al., 2001), anche se non tutti i lavori sono concordi (Arnoult et al., 2003). E' quindi chiaro che sono necessari ulteriori studi per comprendere il meccanismo che regola il rilascio dei fattori apoptogenici.

## RIMODELLAMENTO DELLE CRESTE MITOCONDRIALI

La visione classica del mitocondrio distingue due compartimenti sub-mitocondriali: la matrice (circondata dalla IMM) e lo spazio intermembrana (tra l'IMM e l'OMM). Analisi topografiche di microscopia elettronica (Frey e Mannella, 2000; Mannella, 2006) hanno cambiato questa visione portando all'identificazione di un ulteriore compartimento, lo Spazio Intracreste (ICS) formato da ripiegamenti della IMM (creste) e in grado di comunicare con lo spazio intermembrana attraverso giunzioni "a collo di bottiglia" (giunzioni delle creste, *cristae junctions*). Il Cyt C è contenuto in gran parte nelle ICS (circa l'85%); il suo rilascio in seguito a permeabilizzazione della OMM è favorito da un processo aggiuntivo che coinvolge la struttura interna del mitocondrio. Tale processo è stato denominato "rimodellamento delle creste" e comporta l'allargamento delle *junctions* e la mobilitazione del Cyt C contenuto nell'ICS.

Molte proteine coinvolte nelle dinamiche mitocondriali (fusione e fissione) potrebbero avere un ruolo fondamentale nel rimodellamento apoptotico delle creste; per esempio, Drp-1 (dynamamin-related protein 1) partecipa alla fissione mitocondriale ed è richiesta per il rilascio ottimale di Cyt C, presumibilmente proprio contribuendo al rimodellamento delle creste (Germani et al., 2005).

Recenti studi suggeriscono che le *cristae junctions* siano mantenute intatte da Opa-1 (optic atrophy 1), una proteina integrale della IMM coinvolta nelle dinamiche mitocondriali (Perfettini et al., 2005). Dopo il taglio da parte di proteasi specifiche, Opa-1 attivata è rilasciata nell'IMS come proteina solubile. Entrambe le forme (Opa-1 solubile e integrale) formano degli oligomeri che si disgregano nel corso del rimodellamento delle creste, ad esempio, quando il mitocondrio è esposto all'azione di Bid o durante il rigonfiamento osmotico. Questi oligomeri possono costituire parte della struttura che preserva le *cristae junctions* nella giusta conformazione (Frezza et al., 2006). Anche questo argomento necessita ulteriori approfondimenti, in quanto la sua comprensione potrebbe fornire risvolti interessanti per la determinazione di come i diversi effettori pro-apoptotici interagiscono coi meccanismi molecolari che mediano il rimodellamento delle creste.

## EVENTI POST-MITOCONDRIALI

- **Formazione dell'apoptosoma:** l'apoptosoma è un complesso multiproteico che, mediante taglio proteolitico delle procaspasi downstream, contribuisce all'attivazione della cascata di caspasi. Tale complesso è costituito dalla proteina adattatrice Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), dalla caspasi-9 e dal Cyt C. Quest'ultimo, dopo il rilascio nel citoplasma, lega delle sequenze ripetute al C-terminale di Apaf-1 (Nijhawan et al., 1997). L'ATP normalmente presente nel citoplasma interagisce con un dominio specifico nella porzione centrale di Apaf-1, stimolandone un cambio conformazionale che porta alla sua omo-oligomerizzazione e al reclutamento della procaspasi-9 (mediato dai domini CARD, caspase recruitment domain, presenti sia su Apaf-1 che sulla procaspasi) per dare origine all'apoptosoma (Nijhawan et al., 1997; Jiang e Wang, 2000). Sembra che l'evento scatenante l'attivazione della procaspasi-9 sia la sua dimerizzazione, alla quale segue il taglio proteolitico per autocatalisi. Una volta attivato, tale enzima taglia la procaspasi-3 downstream, anch'essa reclutata all'interno del complesso (Bratton et al., 2001). Cellule geneticamente prive di Cyt C (Li et al., 2000), Apaf-1 (Yoshida et al., 1998) o procaspasi-9 (Kuida et al., 1998) manifestano una marcata resistenza agli attivatori della via mitocondriale dimostrando il ruolo fondamentale svolto dagli eventi post-mitocondriali durante l'apoptosi.
- **Inibitori dell'apoptosi:** Le proteine della famiglia IAP (inhibitors of apoptosis), contenenti regioni BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis repeats), fungono da antagonisti negli steps post-mitocondriali della via intrinseca (Liston et al., 2003). Tra questi XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) lega ed inibisce le caspasi-3, -6 e -7 (Devereaux et al., 1998) bloccando l'accesso del substrato ai siti attivi. XIAP inibisce anche l'attivazione della procaspasi-9 nell'apoptosoma prevenendone la dimerizzazione e proteggendo quindi la cellula da un'eventuale danno dovuto ad attivazione accidentale delle caspasi (Shiozaki et al., 2003). Le proteine IAP, pertanto, inibiscono sia le caspasi upstream (caspasi-9, principale attivatrice della via intrinseca), che le caspasi downstream

(caspasi-3 e -7). Il rilascio di Smac/DIABLO nel citosol blocca l'attività inibitoria di XIAP sostituendosi alle caspasi nel sito di interazione (Verhagen et al., 2000) consentendo, quindi, l'attivazione delle caspasi. Le IAP possiedono anche un dominio RING ubiquitina E3-ligasi, che media la degradazione proteica ubiquitina-dipendente (Yang et al., 2000) conferendo a queste proteine la possibilità di indurre una rapida autodegradazione che consente l'innescamento dell'apoptosi in caso di insulti dannosi alla cellula.

- Apoptosis-Inducing Factor (AIF) ed Endonucleasi G (EndoG): un'altra proteina mitocondriale che promuove la morte cellulare quando rilasciata nel citoplasma è AIF, flavoproteina con attività di ossido-reduttasi (Susin et al., 1999). In risposta a segnali di morte, AIF trasloca al nucleo in maniera PARP-dipendente (poli-ADP-ribosio polimerasi) (Yu et al., 2002) dove innesca la degradazione del DNA in frammenti di 50 Kb, che successivamente vengono tagliati a livello intranucleosomale da parte delle endonucleasi (Susin et al., 1999). AIF in sé non ha attività endonucleasica, ma si lega e coopera con l'Endonucleasi G, rilasciata dal mitocondrio nel corso dell'apoptosi (Li et al., 2001) secondo un meccanismo non ancora chiarito.
- Il risultato netto della segnalazione apoptotica è la disfunzione mitocondriale e l'attivazione delle caspasi; la cascata delle caspasi downstream porta al taglio proteolitico di numerose proteine strutturali e regolatrici (Fischer et al., 2003) che ha come risultato finale l'implosione della cellula stessa in modi ancora non del tutto chiari.

## RETICOLO ENDOPLASMATICO

I mitocondri sono considerati gli organelli centrali della via intrinseca anche se, in alcune circostanze, il reticolo endoplasmatico gioca un ruolo talmente importante da introdurre l'ipotesi dell'esistenza di una morte cellulare mitocondrio-indipendente. Ad esempio, stimoli quali la ceramide, l'acido arachidonico e lo stress ossidativo sembrano necessitare della via reticolare per un'efficiente induzione di apoptosi (Scorrano et al., 2003).

Sebbene i meccanismi di cui il reticolo si serve per attivare la morte cellulare non siano ancora completamente chiariti, l'aumento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  intracellulare svolge un ruolo centrale. Il livello di  $Ca^{2+}$  nel Reticolo aumenta per

azione di Bax e Bak (Scorrano et al., 2003; Zonget al., 2003), mentre diminuisce per azione di Bcl-2 (Pinton et al., 2000; Foyouzi-Youssefi et al., 2000). L'incremento delle scorte intrareticolari facilita un considerevole rilascio di  $Ca^{2+}$  nel citoplasma in seguito a stimoli apoptotici. L'aumento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  nel citoplasma può attivare molteplici meccanismi apoptotici:

1. un eccesso di  $Ca^{2+}$  mitocondriale può indurre l'apertura del complesso del poro mitocondriale (MPTP) con conseguente rilascio di Cyt C (Halestrap et al., 2002);
2. attivare la calpaina, in grado di tagliare Bid portando al rilascio di Cyt C (Chen et al., 2001);
3. la calpaina attivata è in grado di tagliare la caspasi-12 (Nakagawa et al., 2000) che, da studi recenti, sembra traslocare al citoplasma per attivare la caspasi-9 indipendentemente dalla formazione dell'apoptosoma (Rao et al., 2002).

Alcuni segnali di attivazione del pathway di morte mediato dal reticolo hanno origine al suo interno, dove un complesso sistema di meccanismi media la risposta all'unfolding delle proteine e ad altri stress (Rao et al., 2004). Inoltre, alcune proteine BH3-only, trasduttori di stimoli apoptotici a Bax e Bak nel mitocondrio, potrebbero svolgere funzioni analoghe per la via del reticolo: da alcuni studi è infatti emerso un possibile coinvolgimento di Bik e Puma in tale via (Germani et al., 2002; Reimertz et al., 2003). E' inoltre noto che segnali upstream, generati nella via estrinseca, sono trasmessi al reticolo tramite Bap31 (B-cell receptor-associated protein 31), proteina integrale di membrana del Reticolo Endoplasmatico che, tagliata dalla caspasi-8, induce rilascio di  $Ca^{2+}$  (Breckenridge et al., 2003).

#### LA CASCATA DELLE CASPASI

Sebbene i primi studi sull'apoptosi fossero concentrati sul coinvolgimento delle nucleasi, è apparso subito chiaro che gli esecutori materiali della morte cellulare fossero alcune proteasi (Kumar e Harvey, 1995). Particolare attenzione avevano suscitato le ICE-like-proteases (Il-1 $\beta$ -converting enzyme-like proteasi), grazie agli studi effettuati da Horovitz e dai suoi colleghi sulla morte cellulare programmata in *C. Elegans*. Durante lo sviluppo normale del nematode, 131 cellule somatiche su

1090 totali sono eliminate per morte cellulare programmata. I geni ced-3 e ced-4 sono necessari perché avvenga l'apoptosi. Il gene ced-9, invece, funziona da regolatore negativo: se inattivo, le cellule che normalmente sopravviverebbero vanno incontro ad apoptosi, portando alla morte dell'animale in via di sviluppo; mentre se è sovraespresso, la normale morte cellulare programmata non avviene (Hengartner et al., 1994). La proteina CED-9 mostra omologia di sequenza con Bcl-2. CED-3 ha invece un notevole grado di similarità strutturale e funzionale con ICE (Yuan et al., 1993), capace di indurre di apoptosi se overespresso. Ciò ha suggerito un ruolo chiave di CED-3 nell'attivazione di tale processo (Yuan et al., 1993; Miura et al., 1993).

In seguito alla scoperta dell'omologia tra CED-3 e ICE nel 1993, sono state identificate altre 9 proteasi ICE-like implicate nel processo di morte programmata. Questi enzimi sono stati raggruppati in un'unica famiglia denominata Caspasi, termine in cui la 'c' indica l'attività Cisteina-proteasica, mentre 'aspasi' si riferisce all'abilità di tagliare dopo un residuo di acido aspartico. In base al ruolo svolto nell'ambito dei meccanismi cellulari, le caspasi si possono dividere in tre gruppi fondamentali:

- I. infiammatorie;
- II. iniziatrici dell'apoptosi o upstream;
- III. caspasi effettrici o downstream (figura 7).

Tutte le caspasi sono sintetizzate come proenzimi inattivi la cui attivazione è determinata da taglio proteolitico a livello di specifici siti recanti Aspartato (Cohen, 1997). Il taglio del predominio CARD (Caspase recruitment domain) dà origine ad una subunità maggiore e ad una minore, che in genere si assemblano in modo da costituire un tetramero attivo composto da due dimeri associati. Ogni dimero è mantenuto unito da interazioni idrofobiche che portano alla formazione di foglietti  $\beta$  paralleli, ciascuno composto da filamenti  $\beta$  antiparalleli. Due eterodimeri si associano tra loro formando un foglietto  $\beta$  inserito in mezzo ad  $\alpha$ -eliche. Nel corso della fase post-mitochondriale dell'apoptosi, le caspasi esplicano la propria azione di taglio a livello di proteine bersaglio specifiche inattivandole: tra esse troviamo PARP, lamin B e l'istone H1 (Cohen, 1997).

Proteina substrato	Sito di taglio	Caspasi	Funzione del substrato
PARP	G	3,7	Enzima di riparo del DNA
U1-70 kDA	G	3	Splicing dell'RNA
DNA-PK <sub>CS</sub>	N	3	Riparo di DNA double-strand break
Gas2	G	?	Componente del sistema di microfilamenti
Proteina chinasi C $\delta$	N	3	Tagliata in forma attiva nell'apoptosi
Pro-IL-1 $\beta$	A	1	Citochina tagliata in forma attiva
D4-GDP dissociation inhibitor	S	3	Regolatore delle Rho GTPasi
Lamin A	N	6	Assist nel mantenimento della forma nucleare
Proteine eteroribonucleari C1 e C2	?	3,7	Processazione del pre-mRNA
Huntingtina	DxxD	3	Prodotto genico dell'Huntington
SREBP-1 e SREBP-2	S	3,7	Sterol regulatory element binding proteins
Fodrina	S?	?	Proteina citoscheletrica associata alla membrana
Rb	G	3	Proteina che regola il ciclo cellulare

Tabella 1: alcuni substrati delle caspasi.

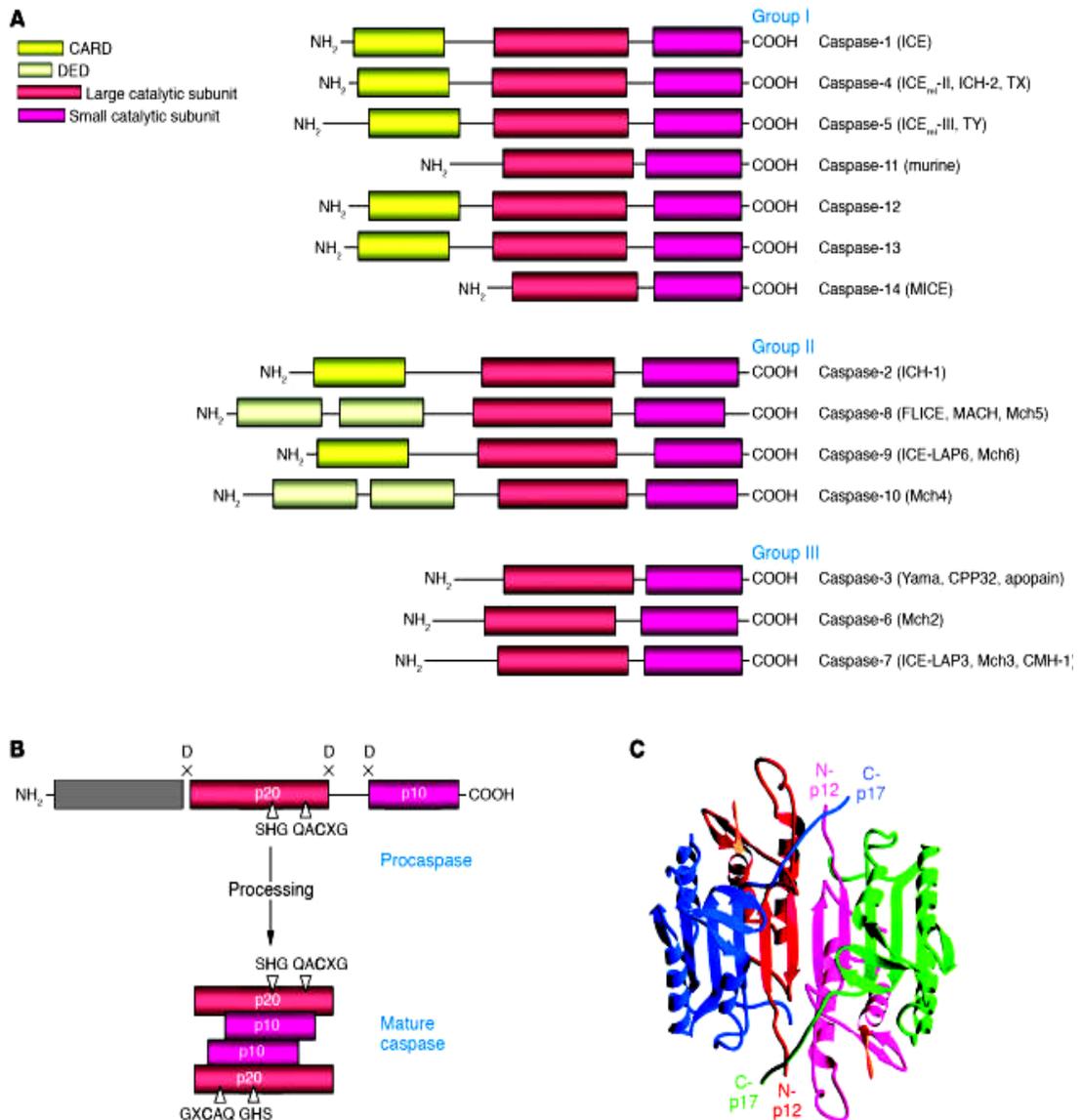


Figura 7: Struttura delle caspasi. (A) La famiglia delle caspasi suddivisa in 3 gruppi principali: I) infiammatorie; II) iniziatrici; III) esecutrici. (B) Schema dell'attivazione delle caspasi per taglio proteolitico su specifici siti di Asp-X, che porta alla formazione dell'enzima maturo in forma tetrameric. In figura sono indicati i residui coinvolti nella formazione del sito attivo. (C) Struttura 3D dell'eterodimero; ad ogni colore corrisponde un singolo monomero (J Clin Invest. 2005 October 1; 115(10): 2665-2672. Copyright© 2005, American Society for Clinical Investigation).

- Caspasi-3: svolge un ruolo chiave nella fase post-mitochondriale dell'apoptosi, in quanto è responsabile del taglio proteolitico di molti substrati proteici determinanti, tra cui PARP (Cohen et al., 1997). La caspasi-3 è una proteina del peso di circa 32 kDa identificata per la prima volta nel 1994 (Fernandes-Alnemri et al., 1994). Membro della sotto-famiglia CED-3 delle caspasi, è un enzima ampiamente distribuito e il suo livello di espressione è

particolarmente elevato in linee cellulari di origine linfocitaria, suggerendo che tale proteasi possa costituire un importante mediatore dell'apoptosi nel sistema immunitario (Fernandes-Alnemri et al., 1994). Infatti, il Granzima B, rilasciato dai granuli dei linfociti T citotossici per uccidere le cellule bersaglio della risposta immunitaria, è stato identificato come uno dei principali attivatori della caspasi-3, come le caspasi-8 e -9 (Quan et al., 1996). L'enzima attivo è composto da 2 subunità di 17 e 12 kDa, derivate dal taglio del precursore a livello dei siti specifici Asp28-Ser29 e Asp175-Ser176 (Nicholson et al., 1995). Sebbene il taglio iniziale abbia luogo probabilmente tra le subunità grande e piccola, sembra che la processazione all'interno del prodominio inizi in corrispondenza dell'Asp9 e coinvolga l'Asp28 in un secondo momento (Fernandes-Alnemri et al., 1996; Srinivasula et al., 1996). Nel corso della fase esecutiva dell'apoptosi la caspasi-3 è responsabile della proteolisi di un gran numero di substrati, ciascuno dei quali contiene un motivo comune Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) (Lazebnik et al., 1994).

#### 1.2.3.2 Via estrinseca

I recettori di morte (*Death Receptors, DRs*) appartengono alla superfamiglia di recettori TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptors*) e la loro attivazione tramite legame specifico con death-ligands porta alla trasduzione del segnale apoptotico (Bhardwaj e Aggarwal, 2003). Ad oggi sono stati caratterizzati 8 recettori di morte, tra cui: CD95 (o Fas), il cui ligando specifico è CD95L (o FasL); TNFR1, che lega il TNF; TRAILR1 e TRAILR2 che riconoscono entrambi TRAIL (French e Tschopp, 2003; Wajant, 2003). In tutti questi recettori è presente un dominio citoplasmatico di circa 80 residui amminoacidici detto Death Domain (DD). In seguito all'attivazione del recettore tramite legame specifico col corrispondente ligando, il DD è in grado di attivare la cascata di segnalazione.

Si possono distinguere due tipi fondamentali di complessi di segnalazione da DR:

1. *CD95-like signalling*: complessi di segnalazione induttori di morte (DISCs), tra cui CD95, TRAILR1 e TRAILR2. La formazione del complesso DISC risulta nell'attivazione della caspasi-8, che gioca un ruolo centrale nella traduzione del segnale apoptotico. Il complesso recettore-DISC comprende

i recettori oligomerizzati (probabilmente trimerizzati), la molecola DD-adattatrice FADD (*Fas-associated Death Domain*), due isoforme della procaspasi-8 (-8a e -8b), la procaspasi-10 e la proteina inibitrice FLICE (FLIPL/S ) (Peter e Krammer, 2003). L'attivazione della procaspasi-8 sembra seguire un modello di "prossimità indotta", secondo il quale alte concentrazioni locali di procaspasi a livello del DISC ne inducono taglio autocatalitico. La caspasi-8 attivata, rilasciata nel citosol, trasmette il segnale apoptotico. Anche la procaspasi-10 va incontro ad attivazione, ma sono tuttora poco chiari i meccanismi molecolari della cascata di segnalazione da essa dipendenti (Sprick et al., 2002). La segnalazione CD95-like può seguire due diverse modalità (Scaffaldi et al., 1998). Le cellule di Tipo I sono caratterizzate da alti livelli di formazione di DISC e alta concentrazione di procaspasi-8; ciò determina l'attivazione diretta delle caspasi effettrici downstream da parte della caspasi-8 attivata. Nelle cellule di Tipo II, invece, la segnalazione necessita un'amplificazione che coinvolge la proteina Bid, in quanto la formazione di DISC e di caspasi-8 attiva sono presenti solo a bassi livelli. La proteina Bid attivata induce rilascio del Cyt C dal mitocondrio e attivazione della procaspasi-9 per taglio proteolitico. Ciò si traduce nell'attivazione del complesso dell'apoptosoma e di una ulteriore cascata di caspasi downstream (Korsmeyer et al., 2000).

2. *TNFR-like signalling*: gruppo di recettori che, reclutando un diverso set di molecole, sono in grado di tradurre sia segnali di morte che di sopravvivenza (tra cui ad esempio TNFR1). In seguito alla stimolazione si formano due diversi complessi di segnalazione (Micheau e Tschopp, 2003). Il Complesso I (formato alla membrana) comprende: recettore e ligando specifico, RIP (*receptor-interacting protein*), TRADD (*TNFR-associated Death Domain protein*), TRAF-1/2 (*TNFR-associated factor*) e probabilmente altre molecole non ancora identificate. Tale complesso sembra agire sull'attivazione del pathway di segnalazione di NF- $\kappa$ B, che porta all'espressione di geni di sopravvivenza (Bhardwaj e Aggarwal, 2003; Karin e Lin, 2002). FADD e procaspasi-8 non fanno parte del Complesso I,

ma sembra che quest'ultimo sia in grado di traslocare nel citosol per reclutarle in un secondo momento assieme a FLIPL/S, dando origine al cosiddetto Traddosoma o Complesso II (Micheau e Tschopp, 2003). La procaspasi-8 è attivata a livello del traddosoma e può dar origine alla cascata di segnalazione di morte. In questo modello, la scelta tra sopravvivenza o morte dipende dall'efficienza di formazione del Complesso II. Sono comunque necessari ulteriori studi che approfondiscano gli aspetti regolatori di questo meccanismo decisionale vita/morte.

La via di segnalazione di morte estrinseca può essere regolata e modulata a vari livelli (French e Tschopp, 2003). FLIP, ad esempio, blocca l'attivazione della procaspasi-8 nel complesso DISC mentre, più a valle, le IAPs (*inhibitors of apoptosis*) inibiscono l'attivazione delle caspasi effettrici. Un approfondimento sullo studio della regolazione della via estrinseca apre molte possibilità per il design di nuove strategie terapeutiche mirate a intervenire in vari punti nel pathway di segnalazione di morte. Ciò potrebbe consentire il trattamento di numerose patologie potenzialmente associate a difetti nella segnalazione da DR, come la sclerosi multipla e l'Alzheimer.

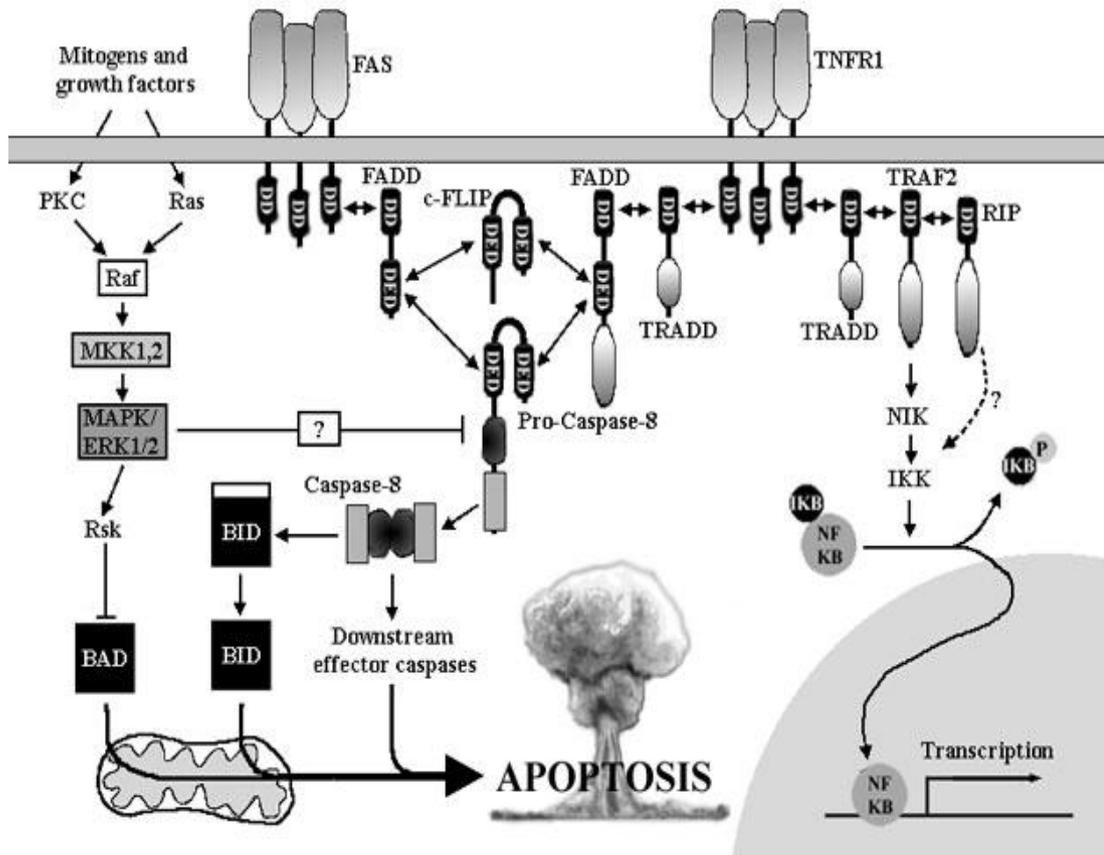


Figura 8: Regolazione della segnalazione da DR. Il trimero Fas attivato recluta l'adattatore FADD tramite interazione tra i rispettivi Death Domains (DD). FADD funge da ponte tra Fas e la traduzione del segnale downstream inducendo l'attivazione della procaspasi-8. La via di segnalazione TNFR1-mediata usa la proteina TRADD per reclutare FADD. Il Complesso I da solo (TNFR1/TRADD) attiva la via di segnalazione che porta all'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB e quindi determina la sopravvivenza. Il legame citosolico di TRADD con FADD, invece, porta alla formazione del Complesso II e conseguente attivazione della procaspasi-8. La caspasi-8 attivata è in grado di indurre apoptosi direttamente per attivazione di caspasi effettrici downstream (Tipo I) oppure attraverso la via mitocondriale mediante attivazione di Bid (Tipo II). Mitogeni e fattori di crescita possono inibire direttamente l'attivazione della caspasi-8 secondo meccanismi ancora non noti. In più, l'attivazione della via MAPK/ERK può portare a fosforilazione, e quindi attivazione, di BAD.

### 1.2.3 Apoptosi e Sistema Immunitario

Per le cellule del sistema immunitario l'apoptosi riveste un ruolo particolarmente importante in quanto, in seguito all'espansione clonale innescata dalla risposta all'antigene, si rendono necessari per l'organismo l'eliminazione delle cellule espanse ed il ritorno a livelli basali (Akbar e Salmon, 1997). Viene perciò attivata la via estrinseca di morte per interazione di ligandi specifici (citochine) con i

recettori di superficie detti Death Receptors (ad esempio CD95) (Krammer, 2000). Numerosi studi hanno messo in evidenza che i linfociti T attivati manifestano un'espressione di CD95 sulla superficie della membrana plasmatica di gran lunga maggiore del normale (Gupta, 2002). La via intrinseca generalmente è innescata da agenti dannosi come lo stress ossidativo (Hengartner, 2000), tuttavia anche i linfociti T espansi possono seguire questa via per entrare in apoptosi. I linfociti, una volta attivati, hanno quindi diverse possibilità di andare incontro a morte e questa sorta di ridondanza costituisce per l'organismo un meccanismo di protezione dall'autoreattività (Jaattela e Tschopp, 2003). L'apoptosi è comunque necessaria per le componenti del sistema immunitario, ma è fondamentale anche per eliminare cellule vecchie o trasformate. In questo caso p53 svolge un ruolo determinante: l'attività di questo induttore apoptotico è regolata da stimoli quali l'accorciamento dei telomeri (tipico delle cellule "vecchie") e danno al DNA (caratteristico delle cellule trasformate) (Vaziri et al., 1997; Vogelstein et al., 2000). L'immunosenescenza, intesa come rimodellamento del sistema immunitario osservato soprattutto in risposta a stimolazione antigenica cronica e stress ossidativo, è un fenomeno che comporta anche una diversa risposta delle cellule agli stimoli apoptotici (Franceschi et al., 2000b). Ogni volta che termina un'espansione clonale dovuta a risposta all'antigene, il sistema immunitario ritorna verso una situazione di equilibrio, tuttavia sempre diversa dalle condizioni di partenza. Questo fenomeno causa un progressivo aumento della predisposizione a reazioni infiammatorie croniche e una diminuzione della capacità di rispondere in modo efficiente all'attacco di nuovi antigeni. La conseguenza diretta dell'inflam-ageing e dell'iper-produzione di ROS sono l'aumento della morte cellulare indotta da attivazione (AICD) e la contemporanea diminuzione della sensibilità cellulare alla morte indotta da danno (DICD). Può quindi essere ipotizzato che l'immunosenescenza sia caratterizzata, da un lato, da un'aumentata tendenza dei linfociti attivati ad andare incontro ad apoptosi e, dall'altro, da una diminuita propensione all'apoptosi indotta da danno. L'aumento della AICD porta a risposte immuni meno vigorose, mentre la diminuzione della DICD comporta un accumulo di linfociti con un fenotipo invecchiato e disfunzionale o di cellule danneggiate, aumentando il rischio di

patologie neoplastiche (De Martinis et al., 2007). Il rimodellamento dell'apoptosi è quindi compatibile con le maggiori caratteristiche dell'immunosenescenza (figura 9) (Franceschi et al., 2000c), quali:

- diminuita reattività nei confronti di stimoli acuti;
- accumulo di linfociti di memoria;
- diminuzione dei livelli di linfociti T helper (CD4<sup>+</sup>), che si riflette soprattutto in una risposta inefficiente ai vaccini;
- aumento dei livelli di linfociti T citotossici (CD8<sup>+</sup>).

Intervenire sui meccanismi di regolazione dei pathways apoptotici potrebbe avere un effetto di prevenzione o ritardo dell'immunosenescenza. A tal scopo sono stati proposti modelli terapeutici anti-ageing basati, tra l'altro, sulla modulazione della lunghezza dei telomeri, modulazione dell'espressione dei Death Receptors sulla superficie dei linfociti e l'inibizione delle citochine pro-infiammatorie (Pawelec et al., 2004; Shin et al., 2001).

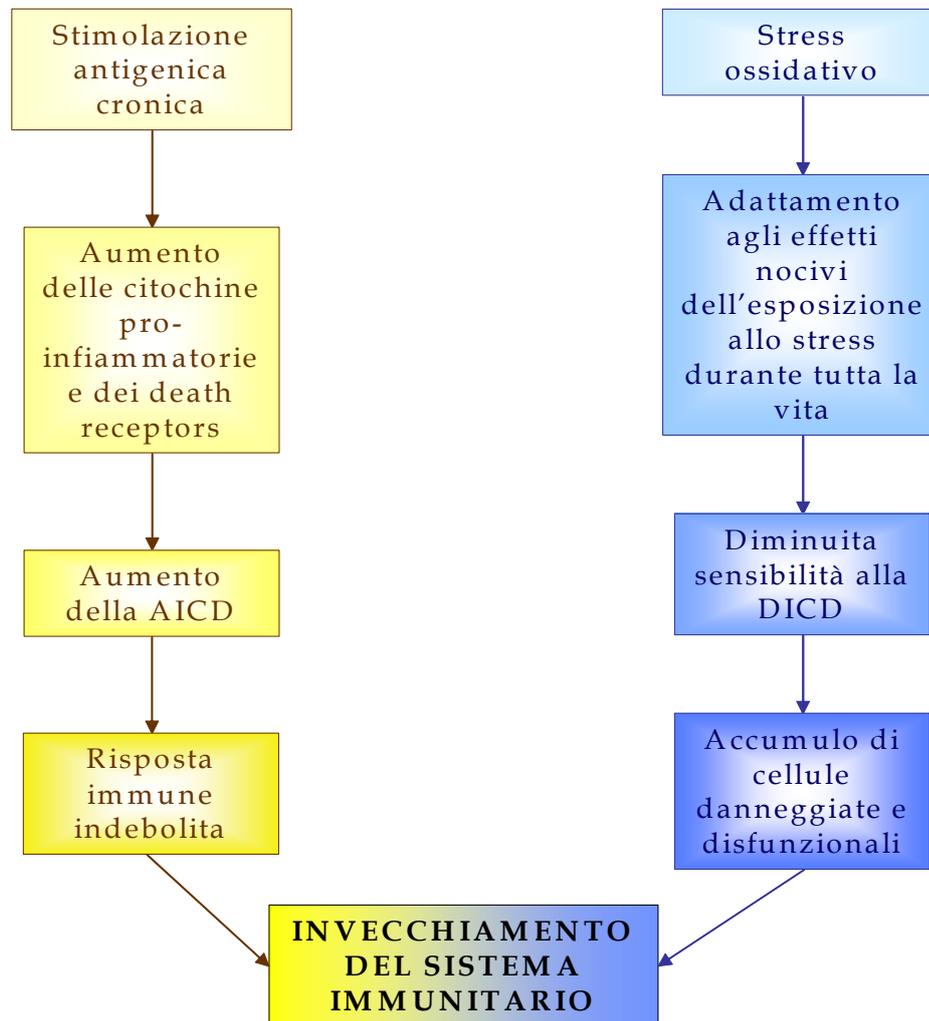


Figura 9: immunosenescenza e rimodellamento dell'apoptosi (De Martinis et al., 2007).

### 1.3 NECROSI E ONCOSI

Necrosi è un termine generico che descrive una modalità di morte cellulare diversa dall'apoptosi. L'uso comune di tale termine a volte può causare confusione perché: 1) le cellule morte sono talmente degradate nello stadio finale che dal punto di vista morfologico diventa impossibile determinare se la morte sia avvenuta per via apoptotica o per necrosi; 2) il termine necrosi si riferisce ad uno stadio irreversibile della morte cellulare. Per questo Majno e Joris hanno introdotto un altro termine, oncosi, per indicare tutti quei percorsi di morte cellulare accompagnati da rigonfiamento e idropisia (Majno e Joris, 1995) che si distinguono dall'apoptosi, in cui si ha un restringimento del volume cellulare. Pertanto, col termine necrosi si può indicare lo stadio finale dell'apoptosi e dell'oncosi, durante il quale si osserva un' avanzata degenerazione della

morfologia cellulare. Nella fase di oncosi i mitocondri perdono precocemente forma e funzionalità e la cellula diventa rapidamente incapace di mantenere l'omeostasi. La membrana plasmatica è particolarmente suscettibile al danno, che ne pregiudica precocemente l'integrità. Ciò causa l'inevitabile deregolazione dell'equilibrio osmotico e le cellule si gonfiano e scoppiano (necrosi) rilasciando i loro componenti citosolici nello spazio interstiziale determinando così l'innesco di un processo infiammatorio (Ueda et al., 1994).

## 1.4 IL CICLO CELLULARE

Il ciclo cellulare è la serie di eventi ordinati che avvengono nella cellula tra una divisione cellulare e quella successiva. Esistono due tipi di divisione cellulare: la mitosi e la meiosi. La prima riguarda le cellule somatiche, la seconda le cellule germinali. I due processi, oltre a presentare delle chiare differenze morfologiche, sono soggetti a meccanismi regolativi di controllo a livello molecolare in parte comuni e in parte specifici.

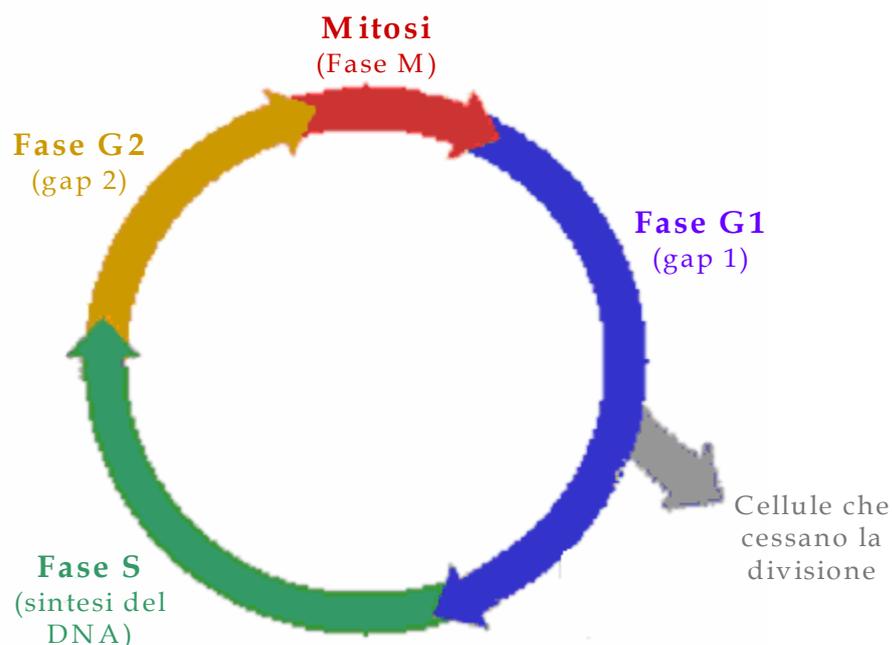


Figura 10: rappresentazione grafica delle principali fasi del ciclo cellulare.

Il ciclo cellulare di una cellula somatica consiste nell'alternanza fra interfase e divisione mitotica (Pardee et al., 1978; Nasmyth, 1996). L'interfase è il periodo compreso fra due divisioni cellulari, in cui la cellula sintetizza le molecole necessarie all'accrescimento (ad esempio la maggior parte delle proteine); non tutte le cellule si duplicano dopo l'accrescimento: alcune, infatti, si arrestano una volta giunte a maturazione (eritrociti). Il tempo compreso fra la mitosi e la fase S è detto fase G1 (gap 1). E' soprattutto in questo intervallo che avviene la crescita della cellula. Nella tarda G1 si osserva anche un incremento della produzione di enzimi per la sintesi di DNA, necessari nella successiva fase S di replicazione. Conclusa la fase S, la cellula entra nella seconda fase di intervallo, detta G2, durante la quale si prepara alla divisione. Ultimata la G2, infatti, inizia la mitosi vera e propria (fase M, suddivisa ulteriormente in profase, prometafase, metafase, anafase, telofase), che porta alla divisione cellulare con la formazione di due cellule figlie identiche (figura 10). La progressione attraverso il ciclo cellulare è regolata da molteplici fattori genetici e biochimici con due funzioni principali:

- Completamento. Ogni evento deve essere completato prima di passare al successivo;
- Alternanza. E' necessario assicurarsi che ciò che è già avvenuto non venga ripetuto (Shackelford et al., 1999).

Attualmente la ricerca è volta soprattutto a scoprire gli "interruttori" molecolari che determinano il passaggio delle cellule dalla fase di accrescimento citoplasmatico a quella di divisione cellulare. I difetti a carico della regolazione del ciclo cellulare possono portare alla crescita senza controllo tipica delle cellule tumorali. I risultati finora ottenuti dimostrano che, sebbene esistano numerosi fattori in grado di modificare la progressione delle cellule attraverso la divisione cellulare, i meccanismi di base che la controllano sono di tipo genetico (Nigg, 1995). In particolare, il passaggio da una fase all'altra del ciclo è regolato dall'azione di complessi proteici le cui componenti chiave sono proteine regolatorie dette Cicline e proteine-chinasi ciclina-dipendenti (Cdk). I differenti complessi ciclina/Cdk sono espressi in fasi diverse del ciclo cellulare e dirigono, pertanto, la progressione attraverso diversi punti di controllo (Nigg, 1995; Matsushime et al., 1994).

La regolazione dell'attività dei complessi ciclina/Cdk comprende: regolazione temporale di accumulo e degradazione delle cicline; legame dei polipeptidi inibitori Cdk; fosforilazione/defosforilazione delle cicline e dei Cdk (Morgan, 1997). In condizioni normali, il ciclo cellulare procede senza interruzioni. In presenza di un danno, tuttavia, le cellule sono capaci di arrestare la proliferazione in G1, S e G2 e ricominciare il ciclo proliferativo solo dopo che il danno è stato riparato. In alternativa, le cellule possono andare incontro ad apoptosi o entrare in uno stato di quiescenza irreversibile. I "checkpoints" sono meccanismi di sorveglianza cellulare che monitorano il corretto completamento degli eventi nelle varie fasi del ciclo cellulare e ne ritardano o bloccano la progressione in risposta a danni al DNA e altri eventi deleteri (Elledge, 1996).

#### **1.4.1 Il controllo del ciclo cellulare**

**Fase G1:** l'inizio del meccanismo di divisione cellulare è regolato dall'azione delle cicline di tipo D. Queste, indotte in risposta a fattori di crescita, si assemblano in complessi ciclina/Cdk e regolano la fosforilazione della proteina Retinoblastoma (pRb), evento necessario per la progressione attraverso la fase G1. Nell'uomo sono note 3 isoforme di ciclina D (Tipo D1, D2 e D3), ognuna espressa in maniera differente nei diversi tipi cellulari (Matsushime et al., 1994). Le cicline-D si associano normalmente con Cdk-4 e Cdk-6 per formare dei complessi ciclina/Cdk la cui azione induce fosforilazione di pRb (Meyerson et al., 1994). In condizioni di quiescenza e nella prima fase G1, la proteina pRb inattiva è associata a E2F, un membro della famiglia di fattori trascrizionali DP-1: la fosforilazione di pRb induce il rilascio di E2F che trasloca al nucleo attivando la trascrizione di geni necessari per la replicazione del DNA richiesti durante la fase S (Dou et al., 1991). Anche il complesso ciclina E/Cdk2 gioca un ruolo cruciale nella transizione dalla fase G1 alla fase S: la ciclina E e la ciclina D agiscono insieme nel passaggio G1/S, mentre sembra che solo la ciclina E sia richiesta anche nel corso della fase S (Koff et al., 1991).

G1/S checkpoint: l'arresto del ciclo cellulare in risposta al danno al DNA dipende principalmente dall'azione del prodotto del gene TP53 (Kastan et al., 1992). Tale fattore di trascrizione agisce attivando geni tra cui TP21, Mdm2 e GADD45 (Funk

et al., 1992) oppure inibendo la trascrizione di altri fattori di trascrizione basali legandosi a livello delle TATA box (Ragimov et al., 1993). p21, oltre a regolare direttamente la trascrizione del DNA nel passaggio alla fase S, agisce anche da inibitore delle Cdk legandosi ai complessi ciclina/Cdk e la sua overespressione è implicata nell'arresto del ciclo in G1, sebbene anche altri eventi siano richiesti nel G1/S checkpoint (Dulic et al., 1998). Un altro importante regolatore dei complessi ciclina/Cdk delle fasi G1/S è p16, un membro della famiglia di proteine INK4: p16 inibisce i complessi ciclina D/Cdk4-6 e pertanto ha un ruolo attivo nella regolazione della fosforilazione di pRb (Serrano et al., 1993; Stewart e Pietsenpol, 2001). Infine, la regolazione del G1/S checkpoint è determinata dagli eventi di fosforilazione o defosforilazione delle proteine Cdk a livello di specifici residui di treonina e tirosina. Fosforilazioni e defosforilazioni sono meccanismi normali nella regolazione dei complessi ciclina/Cdk della fase G1, ma in presenza di danno cellulare l'attività chinasi può aumentare anche di 10 volte rispetto alle condizioni normali, soprattutto quando la cellula si trova a rispondere a danni al DNA causati, ad esempio, da radiazioni ultraviolette (Terada et al., 1995).

**Fase S:** la transizione G1/S, la progressione attraverso la fase S e il passaggio dalla fase G2 alla fase M richiedono l'attività della ciclina A. In particolare, la ciclina A complessata con Cdk2 è coinvolta nel corso della fase S (Pines et al., 1990), mentre il complesso ciclina A/Cdc2 svolge un ruolo determinante nella transizione G2/M (Rosenblatt et al., 1992). I bersagli di tali complessi sono ignoti, ma da studi in vitro è emerso che i substrati proteici includono l'istone H1 e pRb (Peeper et al., 1993). Come avviene per le cicline D ed E, anche la deregolazione delle cicline A è implicata in alcune forme di cancro (Chao et al., 1998).

S checkpoint: si conosce ancora poco a proposito del funzionamento di questo checkpoint. Cellule di mammifero esposte a radiazioni ionizzanti mostrano in pochi minuti una riduzione della sintesi del DNA. Tale soppressione è bifasica: a bassi livelli di radiazioni viene inibito l'inizio di nuovi repliconi, mentre, a livelli più alti e/o prolungati nel tempo, si assiste ad arresto dei repliconi già avviati (Larner et al., 1994). I meccanismi che regolano tale tipo di inibizione sono tuttavia sconosciuti.

**Fase G2/M:** la progressione della fase G2 e l'ingresso in fase M sono regolati dall'attività chinasi dei complessi ciclina B/Cdc2 (Arion et al., 1998). Nei mammiferi sono state caratterizzate 3 isoforme di ciclina B: le cicline B1 e B2 sono citoplasmatiche e traslocano al nucleo associate in un complesso attivo (Pines e Hunter, 1991; Jackman et al., 1995); la ciclina B3, invece, sembra essere localizzata costitutivamente a livello nucleare (Gallant e Nigg, 1994). *In vitro*, i complessi ciclina B/Cdc2 manifestano attività chinasi verso numerosi substrati proteici endogeni, incluso l'istone H1 (Erikson e Maller, 1999).

G2/M checkpoint: il meccanismo biochimico coinvolto nell'arresto in G2 induce cascate di segnalazione che convergono nell'inibizione dei complessi ciclina B/Cdc2 (Hwang e Muschell, 1998). In seguito a danno al DNA, i membri della famiglia proteica PI-3K innescano meccanismi di trasduzione del segnale che regolano il riparo del DNA e la progressione del ciclo cellulare. Molte delle proteine PI-3K, tra cui ad esempio ATM e ATR, sono in grado di fosforilare direttamente p53 (Canman e Lim, 1998). Recenti studi mostrano che p53 e p21 sono necessarie per mantenere l'arresto in G2 in seguito a danno al DNA in quanto cellule tumorali che non esprimono queste proteine entrano in mitosi con una cinetica altamente accelerata. Il meccanismo di arresto p53-dipendente comporta un'iniziale inibizione dell'attività del complesso ciclina B/Cdc2 da parte di p21 (Flatt et al., 2000). Oltre alla modulazione p21-mediata dei complessi ciclina B/Cdc2, p53 regola il G2 checkpoint anche attraverso l'up-regolazione trascrizionale di geni quali 14-3-3 $\sigma$  e GADD45. 14-3-3 $\sigma$ , in particolare, modula la localizzazione sub-cellulare dei complessi ciclina B/Cdc2 che normalmente si accumulano nel citoplasma tra la fase S e l'inizio della G2 e traslocano al nucleo nel corso della progressione cellulare verso la fase M (Gallant e Nigg, 1992). 14-3-3 $\sigma$ , indotto in risposta a danno al DNA, invece, si lega a Cdc2 trattenendolo nel citoplasma e impedendogli di svolgere il proprio ruolo nella progressione del ciclo cellulare (Chan et al., 1999) (figura 11).

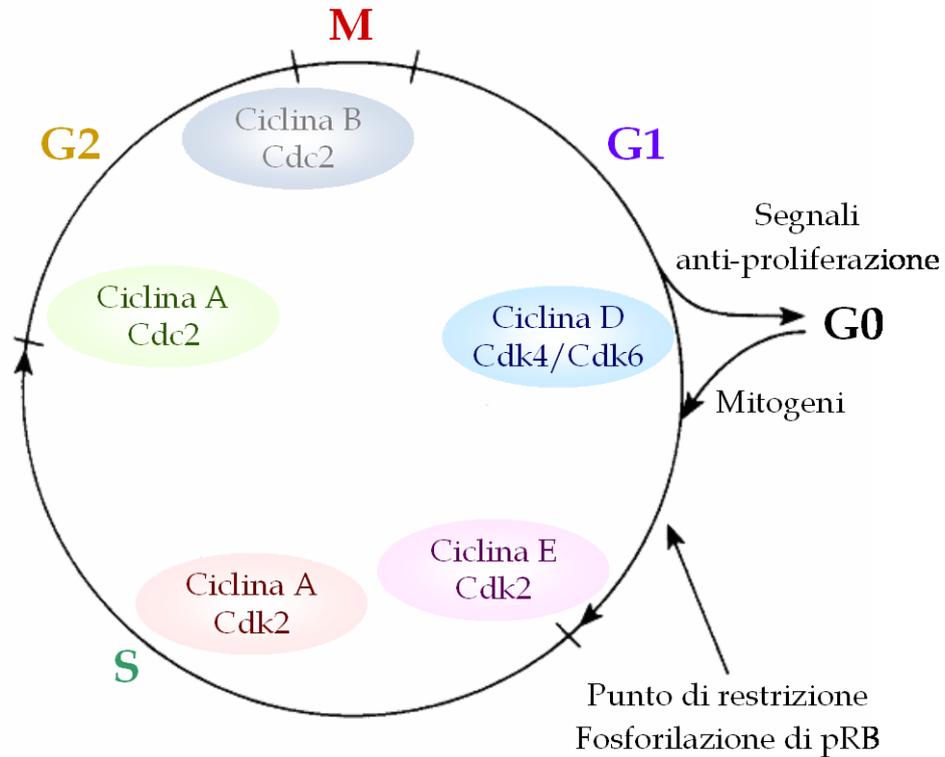


Figura 11: rappresentazione schematica delle fasi del ciclo cellulare e dei principali complessi ciclina/Cdk che le regolano.

## 1.5 P53

p53 è un fattore di trascrizione costitutivamente espresso in molte cellule e tessuti ed è coinvolto nel mantenimento dell'integrità genomica. È stato descritto come "guardiano del genoma", per il suo ruolo nel mantenimento della stabilità mediante la prevenzione delle mutazioni (Strachan e Reed, 1999). Il gene codificante per la proteina p53 (TP53) è localizzato sul braccio corto del cromosoma umano 17 e si estende per una regione di 20kb. TP53 codifica per una fosfoproteina del peso di 53 kDa, formata da 393 amminoacidi. La catena polipeptidica è divisa in 6 domini, ognuno dei quali possiede una specifica funzione:

1. *Dominio di transattivazione* all'estremità N-terminale: permette alla proteina di reclutare l'apparato basale di trascrizione, comprendente la proteina di legame al TATA box (TBP) e i fattori ad essa associati (TAF), componenti di TFIID. TBP è in grado di interagire con il dominio di attivazione (residui 20-57) e con il dominio C-terminale (residui 318-393). Gli amminoacidi 19, 22 e 23

sono richiesti per l'attivazione trascrizionale di p53 (Lin et al, 1994) e per il legame con TAFII60 e TAFII40;

2. *Dominio ricco in prolina (PRD)*: è contenuto nella regione N-terminale (residui 63-97). Questa regione è richiesta per l'apoptosi mediata da p53 (Sakamuro et al., 1997): contiene 5 ripetizioni del motivo PxxP e potrebbe essere coinvolta nell'interazione con elementi delle cascate di traduzione del segnale. La delezione del motivo PxxP indebolisce la capacità apoptogena di p53, senza interferire con la sua capacità di arrestare la crescita. Le capacità trascrizionale ed apoptotica della proteina parzialmente deleta sono influenzate negativamente da parte di MDM2: la regione può agire come un'ancora per legare proteine che possono modulare l'interazione tra p53 e MDM2. Questo dominio presenta un polimorfismo al codone 72;
3. *Dominio di legame al DNA*: riconosce e lega sequenze consenso p53-specifiche sui geni bersaglio. Questo dominio è responsabile della formazione di legami di coordinazione con un atomo di  $Zn^{2+}$  che ne stabilizza la struttura: agenti chelanti dei metalli inibiscono la capacità di legare sequenze specifiche sul DNA e comportano cambiamenti conformazionali nella proteina. p53 interagisce con sequenze di DNA a doppio filamento: la sequenza consenso riconosciuta è simmetrica e consiste di 2 copie del motivo 5'-PuPuPu-C(A/T)(T/A)GPyPyPy-3', separata da 0-13 nucleotidi. Modificazioni di questa sequenza determinano perdita di affinità per p53;
4. *Regione linker flessibile*: compresa tra la regione centrale e quella C-terminale;
5. *Regione C-terminale* (residui 300-393), contenente:
  - *Dominio di tetramerizzazione*: p53 forma tetrameri simmetrici; tale processo sembra essere necessario per un'efficiente transattivazione *in vivo*. Mutanti privi del dominio C-terminale non formano tetrameri, ma le molecole mutanti monomeriche mantengono le proprietà di specificità di legame del DNA *in vitro*;
  - *Dominio regolatorio trascrizionale*, detto anche *dominio apoptotico*: riconosce il danno al DNA. Fosforilazioni, acetilazioni, glicosilazioni o taglio proteolitico di questa porzione determinano un cambiamento

conformazionale della proteina, che ne consente l'attivazione e il legame a specifiche sequenze.

La proteina intatta ha dimensioni che non consentono il suo studio in soluzione con le tecniche di spettroscopia NMR attualmente disponibili: la struttura tridimensionale completa non è pertanto conosciuta. Tuttavia, è stato possibile ottenere la struttura cristallina del dominio legante il DNA (residui 102-292), associato ad un frammento di DNA di 21bp, contenente una specifica sequenza di legame di p53 (figura 12). Successivamente, studi ai raggi X hanno permesso di determinare una regione del dominio di oligomerizzazione implicata nella formazione dei tetrametri (Chene et al., 1997).

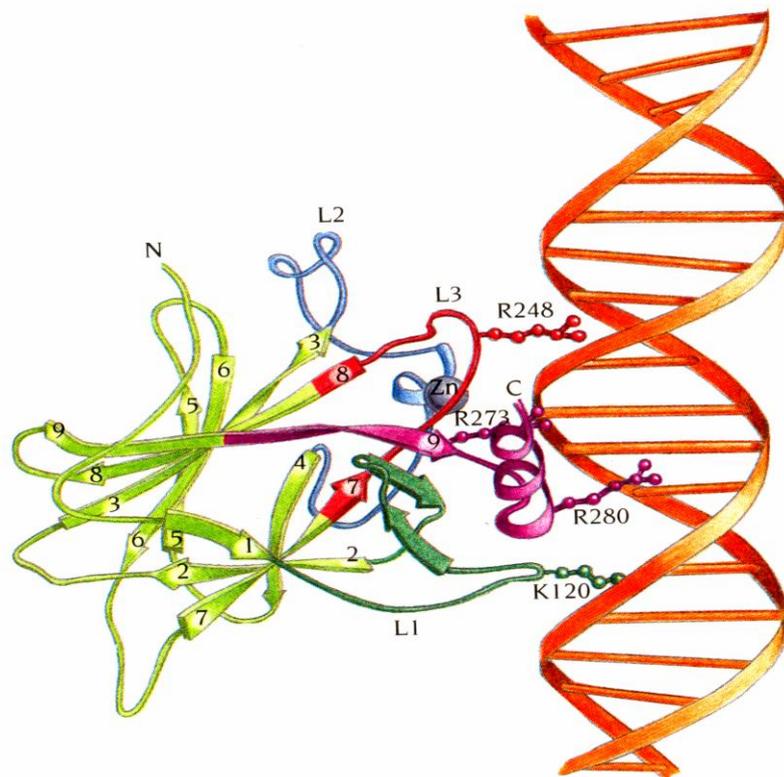


Figura 12: rappresentazione grafica del dominio di legame a DNA di p53 e sua interazione con l'acido nucleico.

Il gene codificante per p53 (TP53) fa parte del gruppo di geni denominati "oncosoppressori", cioè di quei geni che, nell'ambito del controllo della crescita cellulare, agiscono normalmente in modo da inibire la proliferazione cellulare e lo sviluppo di tumori. L'inattivazione o la perdita di tali geni comporta la rimozione di regolatori negativi della proliferazione cellulare e contribuisce alla

proliferazione anormale delle cellule tumorali. Infatti, mutazioni di p53 sono comuni a molte neoplasie maligne umane: TP53 agisce come un oncosoppressore (con le quattro subunità nella forma wild type). Da tessuti somatici di molti tumori umani si è visto che l'allele wild type viene frequentemente perso, mentre l'allele mutato è spesso trattenuto, favorendo la crescita di cellule maligne. p53 svolge un ruolo fondamentale nel controllo di funzioni cellulari essenziali quali proliferazione, apoptosi e riparo dei danni indotti al DNA ed è, perciò, direttamente coinvolto nella trasformazione e nello sviluppo di fenotipi biologicamente e clinicamente aggressivi. p53 è in grado di prevenire la propagazione di cellule che abbiano subito un danno genetico: in seguito a danni al DNA cellulare, la proteina è in grado di arrestare la progressione del ciclo per facilitare l'azione dei sistemi di riparo o, nel caso in cui il danno risulti troppo esteso, di iniziare un processo apoptotico che favorisca l'eliminazione delle cellule danneggiate (Jin e Levine, 2001).

In seguito a danno del DNA, p53 arresta la crescita cellulare inducendo l'espressione di alcuni fattori, il più importante dei quali è l'inibitore delle Cdk, p21 (Pim e Banks, 2004). p21 media l'arresto del ciclo cellulare legando e inibendo i complessi ciclina/CDK chinasi-dipendenti (Marx J, 1993). In particolare, bloccando la fosforilazione delle proteine che regolano il ciclo cellulare (ad esempio proteine della famiglia del Retinoblastoma), p21 inibisce l'attività dei fattori di trascrizione come E2F necessari per la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. L'arresto del ciclo cellulare che ne deriva fornisce il tempo necessario alla riparazione del DNA danneggiato prima della sua replicazione.

Nel caso in cui il danno al DNA sia talmente esteso da non poter essere riparato, p53 agisce attivando il meccanismo di apoptosi: questo tipo di risposta avviene normalmente nelle cellule di mammifero ed è necessario per l'eliminazione delle cellule con mutazioni potenzialmente deleterie che potrebbero quindi diventare cancerose. Le cellule prive di p53 non vanno incontro ad apoptosi in risposta ad agenti che danneggiano il DNA, come le radiazioni e molte delle sostanze usate nella chemioterapia del cancro (Hollstein et al., 1991). La regione di p53 che modula l'apoptosi sembra essere localizzata nel C-terminale (residui: 364-393) e nel dominio ricco in prolina (residui: 64-91) (Zhu et al, 2000). p53 è in grado di

transattivare la trascrizione di geni proapoptotici come Bax e CD95/Fas. Inoltre, l'azione proapoptotica di p53 coinvolge i geni PIGs, responsabili della generazione di specie reattive dell'ossigeno. Un ulteriore coinvolgimento di p53 nel processo apoptotico sembra riguardare la traslocazione di Bax nel mitocondrio, con concomitante rilascio di Cyt C dai mitocondri verso il citosol. Durante l'apoptosi, p53 può anche inibire la trascrizione di geni antiapoptotici come Bcl-2. Esiste anche un meccanismo di regolazione dell'apoptosi indipendente dalla trascrizione: una frazione di p53 sembra traslocare direttamente nei mitocondri (Marchenko, 2003). La localizzazione mitocondriale di p53 è sufficiente ad attivare il programma apoptotico: p53 inibisce Bax e Bcl-xL presenti sulla membrana esterna del mitocondrio e induce oligodimerizzazione di Bak (Mihara et al, 2003), con rapido rilascio di Cyt C e attivazione della cascata delle caspasi effettrici.

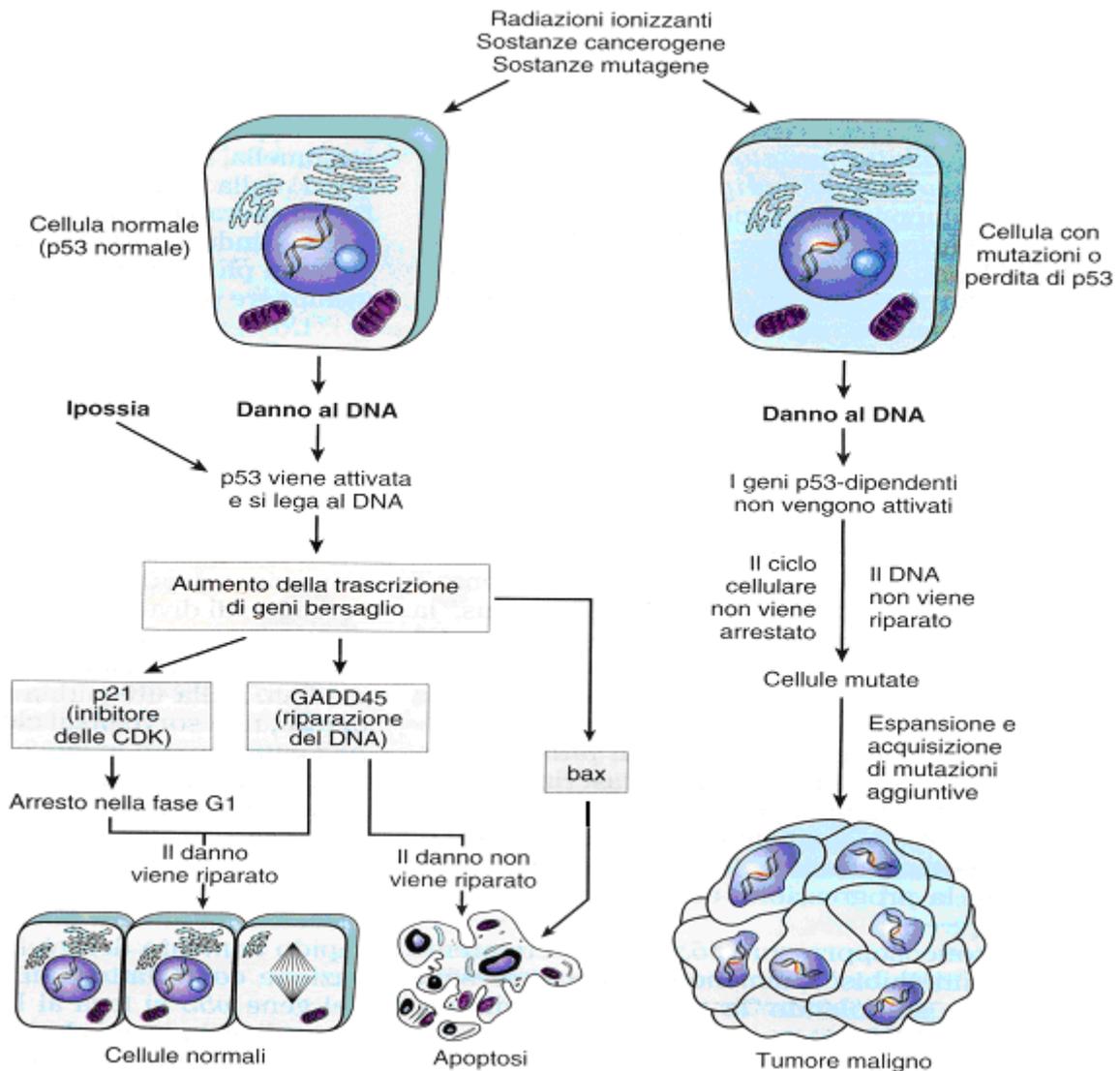


Figura 13: ruolo di p53 nel mantenimento dell'integrità genomica.

### 1.5.1 Polimorfismi al codone 72 di p53

A livello del dominio ricco di prolina (PRD), importante per la capacità di p53 di indurre apoptosi (Walker e Levine, 1996), è stato individuato un polimorfismo comune al codone 72, codificante per una Arginina o per una Prolina (Matlashewski et al., 1987). Le 2 varianti polimorfiche manifestano un diverso comportamento migratorio nell'elettroforesi su gel di poliacrilammide (Matlashewski et al., 1987). Recenti studi hanno poi mostrato differenze nell'attività di p53 che dipendono da tale polimorfismo. E' emerso che la variante polimorfica Arg72 induce una maggiore suscettibilità di p53 alla degradazione da

parte della proteina E6 di HPV (Human Papilloma Virus) (Storey et al., 1998). Studi epidemiologici hanno suggerito che i 2 polimorfismi sono in grado di influenzare anche la suscettibilità individuale a vari tumori (Boltze et al., 2002; Papadakis et al., 2002). Più recentemente, si è osservato che la forma Pro72 di p53 ha una maggiore abilità di interagire con i fattori TAFII32 e TAFII70 rispetto all'Arg72 (Thomas et al., 1999) e, poiché l'attività trascrizionale di p53 dipende dall'interazione di tali proteine (Thut et al., 1995), la forma Pro72 risulta un fattore di trascrizione più efficace. Al contrario, per quanto riguarda la capacità di indurre apoptosi, la forma Arg72 sembra essere più efficiente (Thomas et al., 1999), probabilmente perché in grado di traslocare al mitocondrio in modo più attivo tramite un'interazione specifica con la proteina mitocondriale GRP75 (Dumont et al., 2003). Per quanto riguarda il ruolo delle due varianti polimorfiche di p53 nell'induzione dell'arresto del ciclo cellulare, invece, non sono emerse differenze significative, sebbene la forma Pro72 sembri essere più efficiente in questo senso (Pim e Banks, 2003).

Inoltre, studi su fibroblasti e linfociti di soggetti anziani e centenari hanno evidenziato che la differenza nella suscettibilità all'apoptosi dovuta alle due forme alleliche si accentua rispetto al giovane (Bonafè et al., 2004). Questo indica che questo allele può avere diversi effetti a differenti età, costituendo un esempio di pleiotropia antagonista (Capri et al., 2006). Inoltre, dal confronto di gruppi di pazienti anziani affetti da ischemia miocardica acuta suddivisi in base alla variante polimorfica, è emerso che i livelli sierici di Troponina I e CK-MB (markers correlati con l'estensione del danno ischemico), sono maggiori nei pazienti Arg<sup>+</sup> (cioè gli omozigoti per la variante polimorfica Arg72 e gli eterozigoti) rispetto ai Arg<sup>-</sup> (omozigoti per la variante Pro72). Ciò suggerisce che il polimorfismo al codone 72 di p53 contribuisca a determinare una variabilità nella propensione all'apoptosi dei soggetti anziani, e che abbia un ruolo potenzialmente rilevante nel contesto di una patologia tipica dell'invecchiamento quale l'ischemia del miocardio (Bonafè et al., 2004).

Infine, il polimorfismo al codone 72 di p53 sembra essere coinvolto anche nella proliferazione cellulare: in particolare Salvioli et al. hanno dimostrato che, in fibroblasti di centenari, i soggetti Pro<sup>-</sup> (omozigoti per la variante Arg72) superano

più facilmente il checkpoint G1/S del ciclo cellulare in confronto ai soggetti Pro<sup>+</sup> (Salvioli et al., 2005).

## 1.6 LO ZINCO

### 1.6.1 Introduzione

Lo zinco è un oligoelemento essenziale per gli organismi viventi ed i loro processi biologici (Raulin, 1869). La carenza di tale elemento nell'uomo provoca sintomi evidenti quali la diminuzione di linfociti e lesioni della pelle con infezioni secondarie. Se tale carenza diventa cronica si hanno ritardi dell'accrescimento e disturbi della sessualità reversibili. Lo zinco è presente in tutti i tessuti del corpo umano in forma prevalentemente intracellulare: circa il 30-40% si trova localizzato in vescicole specializzate (per gli enzimi digestivi o per l'accumulo di ormoni), mentre la restante parte rimane a livello della membrana cellulare. Lo zinco gioca un ruolo essenziale come cofattore di oltre 300 enzimi, tra cui la superossido dismutasi, l'alcool deidrogenasi e molte proteasi (Vallee e Auld, 1990). Esso è importante anche ai fini del corretto folding di specifici domini proteici e per la stabilità delle proteine (Berg e Shi, 1996). Lo zinco complessato con l'ATP è necessario per la sintesi del piridossal-5'-fosfato e del FAD (flavin adenosin dinucleotide), coenzimi essenziali per la sintesi di ammine biogene e per il metabolismo della monoammina-ossidasi (Dakshinamurti et al., 1990). Inoltre, tale ione costituisce il fulcro dei motivi zinc fingers (figura 14) di legame col DNA, caratteristici dei fattori di replicazione e trascrizione e frequenti nei recettori nucleari degli ormoni.

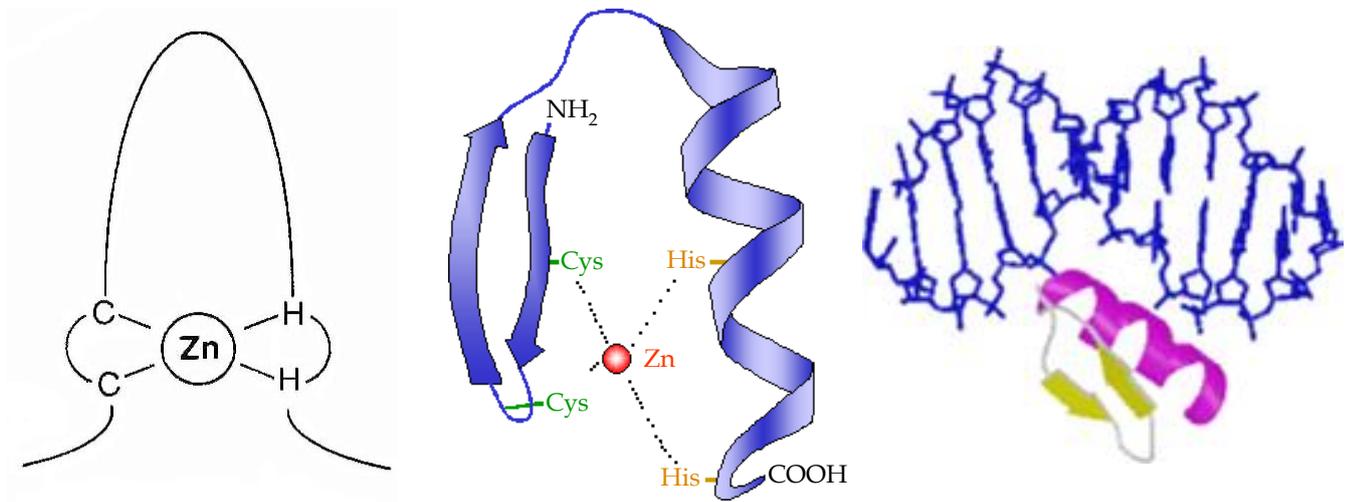


Figura 14: struttura terziaria del motivo zinc finger ed esempio di interazione con il DNA.

Oltre a funzioni strettamente associate al metabolismo ed alla trascrizione genica, lo zinco gioca un ruolo fondamentale anche in molti processi fisiologici. Le sue diverse funzioni non riguardano solo l'associazione stretta con le proteine, che ne determinano una quantità fissa a livello cellulare, ma anche pool di ioni sequestrati all'interno di vescicole o che stabiliscono legami blandi con proteine, lipidi e citoscheletro. Questi pool "labili" sono influenzati in modo particolare dalla deficienza o dall'eccesso di zinco e si pensa possano avere un ruolo protettivo ed antiapoptotico (Chai et al., 1999).

Anche se i livelli di zinco assunto con la dieta variano in modo sostanziale, le cellule eucariotiche devono mantenere l'omeostasi intracellulare di zinco per garantire le corrette funzioni a livello genico e proteico. Tale omeostasi è regolata nei mammiferi da processi di influsso ed efflusso, sequestro in vescicole (*zincosomi*) ed associazione con le metallotioneine (MTs) (Haase e Beyersmann 2002; Harris 2002), proteine citoplasmatiche ubiquitarie, di basso peso molecolare (6-7 kDa), ricche di cisteina (Hempe e Cousins, 1992) e caratterizzate dall'alto contenuto di ioni metallici e zolfo. Esse rappresentano il gruppo di proteine intracellulari leganti zinco più abbondanti negli eucarioti. Sebbene la loro precisa funzione biologica rimanga ancora sconosciuta, sembra chiaro che le MTs siano implicate in diversi processi, dall'apoptosi alla detossificazione da ioni metallici, dallo stress ossidativo al differenziamento cellulare (Kagi e Schaffer, 1988). Tra i

trasportatori di zinco, due famiglie proteiche rivestono particolare importanza: le proteine ZIP (Zrt, Irt-like proteins) trasportano lo zinco ed altri cationi divalenti all'interno della cellula, mentre i membri della famiglia CDF (cation diffusion facilitator) sembrano coinvolti nell'efflusso e nel trasporto alle vescicole intracellulari, controllando quindi i livelli di zinco libero e proteggendo le cellule dai suoi effetti tossici (Liuzzi e Cousins, 2004). Al di là dei processi di trasporto, infine, l'omeostasi dello zinco è mantenuta anche attraverso il legame o il rilascio di tale ione da parte delle metallotioneine.

### **1.6.2 Metabolismo dello zinco**

Lo zinco (~3 g) è il secondo oligoelemento più abbondante nel corpo dopo il Fe (4 g) (Solomons, 1985). Il corpo non riesce ad accumulare zinco ed è pertanto essenziale un costante apporto di questo elemento con la dieta. La dose giornaliera di zinco raccomandata è 5 mg al giorno per i neonati, 10 per i bambini, 15 per gli adolescenti, gli adulti e le donne incinte e 16-19 per le donne che allattano. La carne rossa e le proteine animali, oltre ad essere tra i cibi più ricchi di zinco, sono anche quelli in cui lo zinco è associato a ligandi che meglio facilitano il suo assorbimento (Solomons et al., 1985). Altre fonti importanti di zinco sono il pesce, i latticini, i cereali e le noci (Dreosti, 1993). Altri nutrienti interferiscono con l'assorbimento dello zinco. Ciò è particolarmente vero per i vegetali che contengono fitato (inositolo esafosfato) componente delle piante che, chelando lo zinco, ne impedisce l'assorbimento (Arsenault e Brown, 2003). Una dieta povera di proteine e ricca in fitato contribuisce alla deficienza di zinco frequentemente osservata in molti paesi in via di sviluppo. Un scarso apporto di zinco è accompagnato da una serie di manifestazioni cliniche, che possono portare conseguenze anche molto gravi se non adeguatamente trattate. D'altra parte, un eccesso di questo metallo interferisce con la sintesi e la funzione di alcune macromolecole e può diventare tossico per la cellula (Cunningham-Rundles et al 2005). L'equilibrio viene mantenuto attraverso la regolazione dell'assorbimento intestinale, l'escrezione attraverso le feci e il riassorbimento renale. Spesso la deficienza di zinco è presente nei pazienti anziani ospedalizzati e, ancora più spesso, è associata a infezioni respiratorie, insufficienza cardiaca e aterosclerosi

(Beattie e Kwun, 2004; Vasto et al., 2006). Attualmente, gli anziani tendono ad evitare la carne e gli altri alimenti ricchi di zinco per il timore di aumentare il colesterolo. In compenso, essi incrementano il consumo di prodotti farinacei che, al giorno d'oggi, risultano poveri in zinco, magnesio e altri nutrienti essenziali a causa del processo di raffinazione (Cunningham-Rundles et al 2005).

Il plasma contiene lo 0,1% dello zinco corporeo, è il mezzo naturale per il trasporto di questo elemento e, pertanto, il turnover dello zinco plasmatico avviene molto velocemente (circa 150 volte al giorno in un essere umano). (King et al., 2000). Il pool di zinco più labile è quello legato all'albumina (circa l'80% dello zinco plasmatico), il rimanente è, invece, saldamente legato a proteine a più alto peso molecolare, prevalentemente l' $\alpha$ -2-macroglobulina (Chesters et al., 1998). Anche alcuni tessuti, come, ad esempio, quello epatico contengono riserve labili di zinco, anche in queste sedi le cinetiche del suo turnover sono più lente rispetto a quelle plasmatiche (Lowe et al., 1993). Per di più, lo zinco mostra un rapido uptake nelle cellule endoteliali e può essere coinvolto nell'endocitosi mediata da recettori dell'albumina legata a ioni zinco (Rowe e Bobilya, 2000). La instabilità dell'albumina legata allo zinco e la facilità con cui essa viene trasportata alle cellule endoteliali suggerisce che l'endotelio vascolare può essere particolarmente influenzato da cambiamenti nella concentrazione di zinco plasmatico, a loro volta dipendenti dall'omeostasi corporea di zinco (Hambidge e Krebs, 2001). Inoltre, nel trasporto e nella distribuzione di questo ione giocano un ruolo fondamentale le MTs.

### **1.6.3 Zinco e sistema immunitario**

Lo zinco esercita un'azione polivalente influenzando ogni aspetto della risposta immune, costituendo pertanto un elemento essenziale per il normale funzionamento del sistema immunitario. Inoltre, lo zinco influenza sia la proliferazione delle cellule immunitarie che quella dei patogeni: una delle risposte della fase acuta durante le infezioni è proprio l'abbassamento della concentrazione plasmatica di zinco come meccanismo di difesa. Malattie quali la diarrea cronica, i disordini gastro-intestinali, la cirrosi epatica e la fibrosi cistica

causano, tra l'altro, l'induzione di uno stato di carenza di zinco il cui effetto si riscontra in un incremento delle infezioni prolungate (Prasad 1985).

Immunità innata: la fase più precoce della risposta immunitaria è il reclutamento dei leucociti dal circolo sanguigno verso i tessuti infiammati. Le cellule del sistema immunitario coinvolte rispondono agli stimoli chemiotattici aderendo all'endotelio e raggiungendo il sito di infezione per diapedesi. Lo zinco induce adesione all'endotelio dei mielomonociti, mentre la sua chelazione riduce il reclutamento cellulare (Chavakis et al., 1999). La chemotassi dei granulociti neutrofili (PMN) diminuisce in condizioni di deficienza di zinco *in vivo*, mentre, *in vitro*, tale ione mostra un'attività chemotattica sui neutrofili (Hujanen et al., 1995). Ancora più importante per i PMN è l'effetto generale dello zinco sulla proliferazione cellulare poiché queste cellule sono prodotte e rilasciate dal midollo osseo al tasso di 60 milioni al minuto. Infine, le principali funzioni dell'immunità innata sono compromesse in condizioni di carenza di zinco: si osservano diminuzione dell'attività delle cellule Natural Killer (NK), della fagocitosi da parte di macrofagi e granulociti neutrofili, produzione di burst ossidativi (Keen e Gershwin 1990) e diminuzione del numero di granulociti (Prasad, 2000).

Cellule Natural Killer (NK): l'influenza dello zinco sulle cellule NK si può in parte spiegare a livello molecolare: lo zinco è richiesto nel riconoscimento e nell'interazione tra il recettore KIR p58 (Killer cell Inhibitory Receptor) delle NK e le molecole MHC di classe I (principalmente HLA-C) presenti sulle cellule bersaglio. In contrasto i segnali positivi non richiedono zinco (Rajagopalan et al., 1995). Lo zinco sembrerebbe, quindi, evocare attività killer aspecifica e deregolazione delle cellule NK. In uno studio condotto su anziani in buono stato di salute (SENIEUR-elderly), un gruppo con bassi livelli sierici di zinco e assenza di malnutrizione mostrava un aumentato numero di cellule NK, la cui attività citotossica risultava, tuttavia, diminuita (Rink et al., 1998). Questo effetto si osserva in condizioni sperimentali di carenza di zinco *in vivo* e *in vitro* (Prasad, 1988, 2000). E' inoltre plausibile, vista l'importanza delle NK nel controllo della proliferazione tumorale e nella risposta ad infezioni virali, che periodi di zincopenia possano essere alla base di un'aumentata incidenza di

mutazioni e quindi alla base di cancro e/o di malattie virali croniche (Ho e Annes, 2002; Keen, 1993).

Monociti: lo zinco ha numerosi effetti *in vitro* sui monociti: ad esempio, induce attivazione (Herold et al., 1993) e produzione di citochine in monociti isolati e in linee cellulari monocitarie (Driessen et al., 1994; Wellinghausen et al., 1996a). Il meccanismo diretto attraverso cui avviene tale attivazione zinco-mediata resta poco chiaro, sebbene sembri coinvolgere alcune proteine chinasi cAMP- e cGMP-dipendenti (Wellinghausen et al., 1996a). Un aspetto interessante è che i monociti di persone anziane carenti di zinco producono più citochine pro-infiammatorie se stimolati con lipopolisaccaride o con esteri del forbolo (Rink et al., 1998). D'altra parte, la somministrazione di zinco *in vitro* può ripristinare la produzione difettiva di IFN- $\alpha$  dai PBMCs di anziani con carenza di zinco (Cakman et al., 1997).

In conclusione, il sistema dell'immunità innata necessita di zinco per la generazione e per la funzionalità del grande numero di cellule che lo compongono.

#### **1.6.4 La supplementazione di zinco nell'invecchiamento: studi "in vitro"**

In linea con il ruolo fondamentale dello zinco per l'immunocompetenza, la supplementazione nei topi e negli esseri umani anziani è stata messa in atto per migliorarne la funzione immunitaria. Il razionale scientifico per il ruolo svolto dalla supplementazione di zinco *in vivo* sul sistema immunitario trova sostegno consistente dai dati ottenuti *in vitro* usando cellule del sistema immunitario e cellule di carcinoma prostatico.

- Cellule del sistema immunitario: gli effetti dello zinco sulle cellule del sistema immunitario sono stati valutati misurando la concentrazione di citochine in campioni stimolati con zinco. Quando i PBMCs vengono stimolati con zinco, l'IL-1, l'IL-6, il TNF- $\alpha$ , il recettore solubile dell'IL-2 e l'IFN- $\gamma$  vengono rilasciati (Ibs e Rink, 2003). La secrezione di IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  viene indotta direttamente dallo zinco in monociti ed è indipendente dalla presenza di linfociti (Driessen et al., 1994). L'effetto dello zinco sui monociti può comunque dipendere da stimoli esterni. Infatti, lo zinco inibisce il rilascio LPS-

indotto di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  da monociti umani e da linee cellulari monocitarie mediante l'inibizione dell'attività della nucleotidasi ciclica fosfodiesterasi (von Bulow et al., 2005) suggerendo che questo oligoelemento possa mostrare proprietà anti-infiammatorie. La dose di zinco utilizzata è una variabile critica. In mezzi di coltura senza siero, concentrazioni di zinco superiori a 100  $\mu$ M stimolano i monociti ma prevengono l'attivazione delle cellule T, forse a causa del minore contenuto intracellulare di zinco nelle cellule T rispetto ai monociti (Ibs e Rink, 2003).

Trattamenti con zinco *in vitro* mostrano generalmente effetti positivi sulla sopravvivenza cellulare ma tali effetti dipendono ampiamente dal tipo cellulare e dalla dose di zinco utilizzata. Sembra infatti che sia la prevenzione sia l'induzione dell'apoptosi siano mediate da pathways che coinvolgono lo zinco o enzimi zinco-dipendenti (Clegg et al., 2005; Wiseman et al., 2006). Pertanto, la modulazione dell'omeostasi dello zinco gioca un ruolo fondamentale non solo nel prevenire l'apoptosi quando lo stress ossidativo è basso ma anche nell'induzione dell'apoptosi in presenza di forte stress ossidativo (Ostan et al., 2006) e danno cellulare per down-regolare le risposte immuni ed eliminare cellule danneggiate, maligne o infettate da virus (Fraker e Lill-Elghanian, 2004). Anche esperimenti su timociti sostengono questo punto di vista: mezzi supplementati con concentrazioni di zinco da 50 a 150  $\mu$ M prevengono l'apoptosi indotta da desametasone o da privazione di siero in timociti anziani (Provinciali et al., 1998), mentre l'introduzione diretta di zinco-piritione (zinco libero) nei timociti ne induce l'apoptosi (Mann e Fraker, 2005).

- Cellule di carcinoma prostatico: trattamenti a dosi fisiologiche di zinco (15  $\mu$ M) *in vitro* inibiscono la crescita e inducono apoptosi in cellule di carcinoma prostatico umano (Liang et al., 1999) suggerendo che alcune pathways zinco-dipendenti coinvolte nella protezione dai tumori vengano ripristinate. È stato inoltre riportato che i livelli di MTs sono direttamente correlati al grado istologico di cancro alla prostata (El Sharkawy et al., 2006). Migliorando la disponibilità di ioni zinco attraverso la supplementazione si potrebbe pertanto

recuperare il ruolo protettivo delle MTs conducendo le cellule cancerose all'apoptosi.

Secondo questi dati *in vitro* si potrebbe presumere che una supplementazione *in vivo* di zinco non eccedente la dose fisiologica potrebbe essere di beneficio durante l'invecchiamento proteggendo dall'apoptosi le cellule non danneggiate, riducendo l'infiammazione e prevenendo quindi l'insorgenza di alcune malattie età-associate (Mocchegiani et al., 2006).

### **1.6.5 Effetti *in vivo* della supplementazione di zinco nell'invecchiamento**

- Topi anziani: dati in letteratura riportano che una supplementazione fisiologica di zinco nella dieta per tutta la durata della vita in roditori adulti previene alcune modificazioni immunitarie cellulo-mediate tipiche dell'età avanzata, i.e. la diminuzione dei livelli di timulina circolante (Iwata et al., 1979). Più recentemente, si è visto che una supplementazione fisiologica di zinco (18 µg di Zn<sup>2+</sup> nell'acqua per un mese) nei topi anziani induce un aumento della funzionalità timica (Mocchegiani et al., 1995; Dardenne et al., 1993) e un ripristino della citotossicità delle cellule natural killer (Mocchegiani et al., 1995). Inoltre, topi Balb/c anziani trattati quotidianamente con la dose di zinco sopra riportata dall'età di 12-14 mesi (età pre-senescente) mostrano un aumento significativo del tasso di sopravvivenza oltre il 33° mese quando, normalmente, i topi appartenenti a questo ceppo arrivano fino al 28-29° mese. L'incremento della sopravvivenza nei topi trattati con zinco è particolarmente dovuto alla diminuzione significativa di mortalità per cancro e infezioni in età media (24-25° mese) (Mocchegiani et al., 2000).

- Invecchiamento umano: non esistono dati ben definiti sugli effetti della supplementazione di zinco sulla funzionalità immunitaria nell'invecchiamento a causa delle differenti dosi di zinco utilizzate e della diversa durata del trattamento impiegato (Duchateau et al., 1981; Sanstead et al., 1982; Boden et al., 1990; Prasad et al., 1993; Boukaiba et al., 1982; Cakman et al., 1997; Fortes et al., 1998).

Sebbene lo zinco sia stato utilizzato alla dose raccomandata RDA (da 15 a 25 mg al giorno) nella maggioranza di questi studi, i risultati ottenuti sono diversi: Prasad

et al. (1993) e Boukaiba et al. (1993) hanno trovato un incremento dell'attività dell'ormone timulina e un miglioramento nella risposta ai test agli antigeni cutanei e dell'acutezza del gusto (15 mg al giorno di zinco per 4 mesi); Bogden et al. (1990) non hanno riportato cambiamenti nella risposta proliferativa ai mitogeni dei linfociti (15 mg al giorno di zinco per 1 anno); Cakman et al. (1997) hanno trovato un aumento della produzione dell'IFN- $\alpha$  nei leucociti (15 mg al giorno per 45 giorni); Fortes et al. (1998) riportano un aumento nel numero di linfociti T citotossici (25 mg al giorno per 40 giorni); anche Duchateau et al. (1981) e Sanstead et al. (1982) hanno osservato un miglioramento nella risposta ai test agli antigeni cutanei e dell'acutezza del gusto (220 mg al giorno di zinco per 1 mese). Sembra pertanto evidente che dosi fisiologiche di zinco per un lungo periodo o alte dosi per un breve periodo possano indurre effetti limitati sulla risposta immunitaria, forse a causa dell'accumulo di zinco in vari organi e tessuti con conseguente effetto tossico sulla funzionalità immunitaria (Fosmire, 1990; Sanstead, 1995). In questo contesto, è importante ricordare che alte dosi di zinco possono scatenare l'apoptosi delle cellule del sistema immunitario in presenza di forte stress ossidativo. Pertanto la supplementazione di zinco andrebbe utilizzata per brevi periodi o per cicli alternati di trattamento.

Il trattamento con 15 mg di zinco per un mese in pazienti affetti da sindrome di Down, in soggetti anziani e pazienti anziani con infezioni ristabilisce la funzionalità endocrina del timo, la risposta proliferativa dei linfociti ai mitogeni, il numero di CD4<sup>+</sup>, la citotossicità delle cellule Natural Killer (Mocchegiani et al., 1999; Franceschi et al., 1988) e la riparazione del DNA (Chiricolo et al., 1993). A livello clinico, si è osservata una riduzione significativa delle infezioni recidive nella sindrome di Down (Licastro et al., 1994), nei soggetti anziani e nei pazienti anziani con infezioni e una ripresa più rapida dalla patologia (Mocchegiani et al., 1999 e 2003).

Uno dei grossi problemi è la selezione dei soggetti anziani che necessitino realmente della supplementazione di zinco, in quanto le semplici misurazioni dei livelli plasmatici o dello zinco intracellulare con la spettrometria di assorbimento atomico (AAS) possono non essere misure sufficienti se si tiene conto che lo zinco è legato a molti enzimi e proteine. Ora è possibile testare la biodisponibilità di

zinco intracellulare utilizzando sonde fluorescenti (Malavolta et al., 2006). Inoltre, l'associazione tra lo zinco libero intracellulare, la sua biodisponibilità, i polimorfismi delle proteine leganti zinco e le abitudini alimentari è un ulteriore mezzo utile per la selezione corretta di anziani che necessitino realmente della supplementazione di questo elemento. Pertanto, i dati contraddittori ottenuti durante i diversi esperimenti clinici possono essere dovuti alla selezione di soggetti anziani con diversa biodisponibilità di zinco libero o con diversi polimorfismi (Mocchegiani et al., 2006).

Inoltre, è importante considerare che lo zinco influenza l'espressione del MTmRNA (Haq et al., 2003). Nasce quindi un ulteriore problema: la supplementazione di zinco potrebbe portare ad un aumento eccessivo di queste proteine, già presenti ad elevati livelli negli anziani, producendo conseguenti effetti dannosi. Esperimenti recenti su topi anziani trattati con zinco non mostrano ulteriori aumenti dell'MTmRNA nel fegato suggerendo che le MTs nell'invecchiamento siano completamente saturate dagli ioni zinco pre-esistenti (Mocchegiani et al., 2002). Quindi, il possibile ruolo dannoso assunto dalle MTs durante l'invecchiamento potrebbe essere evitato con una supplementazione fisiologica di zinco per brevi periodi o per cicli alternati (Mocchegiani et al., 1999).

### **1.6.6 Zinco e apoptosi**

Le prove più convincenti riguardo ad un ruolo fisiologico dello zinco nella protezione dall'apoptosi provengono da studi di deplezione sugli animali, dove l'apoptosi aumenta considerevolmente in alcuni organi e tessuti, inclusi l'epitelio intestinale, la pelle e i linfociti timici di animali adulti (Duvall e Wyllie, 1986; Zalewski e Forbes, 1993). In quasi tutti i modelli studiati di apoptosi indotta da carenza di zinco *in vivo*, l'aumento della morte cellulare sembra essere una diretta conseguenza della diminuzione dei livelli di zinco intracellulare nei tessuti affetti. Un'eccezione è costituita dall'involuzione del timo in topi carenti di zinco, che sembra essere in parte dovuta all'aumento di glucocorticoidi circolanti prodotti in risposta allo stress associato alla carenza di zinco (Fraker e Telford, 1997).

Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che la deplezione di zinco intracellulare in colture di cellule in terreno senza zinco provoca apoptosi (Martin et al., 1991;

Zalewski et al., 1991; Treves et al., 1994). L'apoptosi indotta da carenza di zinco, *in vitro* e *in vivo*, manifesta tutte le principali caratteristiche morfologiche dell'apoptosi, inclusa la frammentazione del DNA e del nucleo, la condensazione della cromatina e la formazione di corpi apoptotici (Truongtran et al., 2000b). Inoltre, tale fenomeno sembra dipendere dall'attivazione della caspasi-3, in quanto la sua attività è aumentata in cellule carenti di zinco (Chai et al., 2000).

La deplezione di zinco aumenta i livelli di apoptosi ed esiste una potente sinergia nell'induzione di apoptosi tra la deplezione di zinco ed altri induttori apoptotici quali la colchicina, il TNF e la proteina Tat dell'HIV-1 (Zalewski et al., 1999; Seve et al., 1999; Meerarani et al., 2000). Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che la carenza di zinco provoca aumento della suscettibilità all'apoptosi indotta da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nelle cellule dell'epitelio respiratorio (Truongtran et al., 2000a). Pertanto, una drastica riduzione dello zinco libero intracellulare può indurre apoptosi in modo diretto, mentre riduzioni meno drastiche possono semplicemente rendere le cellule più vulnerabili all'apoptosi da altre tossine. Quest'ultimo aspetto, in particolare, ha importanti applicazioni cliniche a causa delle relazioni che esistono tra la carenza di zinco, l'incidenza e la gravità di molte malattie.

Esistono numerosi esempi riguardo all'aumento della resistenza ad induttori apoptotici di vario genere in animali sottoposti a supplementazione di zinco (Floersheim et al., 1992; Waring et al., 1990; Matsushita et al., 1996). E' stato dimostrato che lo zinco sopprime l'attività della caspasi-3 e l'apoptosi *in vivo* sui topi (Kown et al., 2000) e ciò concorda con gli effetti citoprotettivi e anti-apoptotici evidenziati su modelli cellulari analizzati *in vitro*.

In ogni caso, l'interpretazione dei risultati ottenuti da studi di supplementazione di zinco resta ancora tutta da chiarire. Gli studi *in vivo* suggeriscono che è possibile manipolare i livelli di zinco intracellulare in quantità sufficiente da influenzare la vulnerabilità delle cellule e dei tessuti nei confronti di agenti pro-apoptotici. La maggior parte degli studi *in vitro* sull'inibizione dell'apoptosi da parte dello zinco sono basati sull'utilizzo di terreni contenenti concentrazioni di sali di zinco al di sopra di quelle fisiologiche, in quanto l'uptake di zinco attraverso la membrana plasmatica è relativamente basso (Truong-Tran et al., 2000; Nodera et al., 2001; Lambert et al., 2001; Schrantz et al., 2001; Rudolf et al.,

2005). Inoltre, lo zinco disponibile a livello metabolico viene distribuito in modo non uniforme all'interno delle cellule stesse, è infatti riscontrabile in concentrazioni nanoMolari-picoMolari nel citosol, mentre può raggiungere concentrazioni milliMolari nelle vescicole (Frederickson, 1989). Lo zinco responsabile della soppressione dell'apoptosi potrebbe essere compartimentalizzato o meno, pertanto non è possibile stabilire le concentrazioni locali di zinco disponibile. Infine, non siamo ancora in grado di stabilire con certezza se la supplementazione di zinco agisce sugli stessi targets molecolari della via apoptotica su cui ha effetto la deplezione di zinco (Truong-Tran et al., 2000). Gli studi di supplementazione e deplezione di zinco dovranno, quindi, tener conto dei molteplici aspetti dell'influenza dello zinco nell'apoptosi, soprattutto in quanto tale elemento agisce su più livelli contemporaneamente, influenzando l'attività di molte famiglie di proteine quali le nucleasi, le caspasi e i membri della famiglia Bcl-2.

#### 1.6.6.1 Meccanismi dell'azione anti-apoptotica dello zinco

Lo zinco sembra svolgere un ruolo anti-apoptotico secondo due meccanismi fondamentali:

1. limita l'estensione del danno indotto dai radicali liberi dell'ossigeno e da altre tossine sopprimendo alcune delle vie di segnalazione che portano ad attivazione delle caspasi e quindi ad apoptosi;
2. agisce direttamente su alcuni regolatori apoptotici, soprattutto sulle caspasi.

Queste due modalità d'azione potrebbero essere correlate in quanto la processazione proteolitica delle procaspasi e la loro attività enzimatica sono influenzate dallo stato redox della cellula. Parte del ruolo citoprotettivo dello zinco potrebbe essere proprio quello di proteggere alcuni gruppi sulfidrili essenziali delle caspasi mascherandoli (Truong-tran et al., 2001).

#### Protezione dallo stress ossidativo

La carenza di zinco *in vitro* è connessa con l'incremento del danno da stress ossidativo e molto spesso la successiva supplementazione con anti-ossidanti (ad esempio la vitamina C) inverte questi effetti proteggendo dallo sviluppo di lesioni alla pelle o altre manifestazioni della carenza di zinco. Analoghi risultati si

ottengono con la supplementazione di zinco (Bettger e O'Dell, 1981; Taylor et al., 1990; Oteiza et al., 1995; Kraus et al., 1995). Ulteriori studi hanno stabilito l'esistenza di una forte associazione tra aumento di stress ossidativo, del danno tissutale e dell'apoptosi nella pelle e nei villi intestinali di topi e ratti carenti di zinco (Cui et al., 1999; Cui et al., 2000). Sembra essere poco probabile che lo zinco protegga dal danno ossidativo agendo sull'attività della SOD (Cu/Zn Superossido Dismutasi), enzima che rimuove i radicali superossido. Il ruolo dello zinco in tale enzima potrebbe essere, infatti, semplicemente strutturale, in quanto studi *in vitro* su cheratinociti depleti di zinco hanno manifestato apoptosi senza tuttavia subire modificazioni nell'attività della SOD (Parat et al., 1997). E' probabile, invece, che lo zinco ad azione citoprotettiva sia piuttosto lo zinco libero che si trova nel citosol o immagazzinato all'interno di vescicole e organelli (ad esempio nel Reticolo Endoplasmatico).

Lo zinco è uno stabilizzatore di lipidi e proteine e protegge le membrane cellulari e le macromolecole dal danno ossidativo (Bettger e O'Dell, 1981; Henning et al., 1993; Powell, 2000). Questo microelemento protegge i gruppi sulfidrilici delle proteine dall'ossidazione formando complessi tiolato, forti ma reversibili (Williams, 1987) ed è uno stabilizzatore dei microtubuli (Hesketh, 1982).

### Effetti sulla caspasi-3

Oltre a contrastare lo stress ossidativo, lo zinco influenza l'apoptosi interagendo direttamente con alcuni regolatori apoptotici. Inizialmente si pensava che lo zinco inibisse l'endonucleasi responsabile della frammentazione apoptotica del DNA (Duvall e Willie, 1986). Tuttavia, esperimenti condotti separando il nucleo dal citosol in cellule precedentemente trattate con zinco, hanno evidenziato che il suo principale bersaglio era citoplasmatico: si trattava, infatti, di una proteasi Aspartato-specifica successivamente identificata come la caspasi-3 (Faleiro et al., 1997). Le modalità con cui lo zinco blocca l'attività della caspasi-3 costituisce, però, un argomento ancora controverso: è probabile che lo zinco agisca bloccando la processazione della procaspasi-3 piuttosto che l'attività stessa dell'enzima (Truong-Tran et al., 2000b). Lo zinco sembra interagire con un gruppo sulfidrilico essenziale della Cys163 nella procaspasi-3 umana. Quindi si potrebbe ipotizzare

che lo zinco protegga dall'ossidazione e sopprima temporaneamente l'attività della caspasi (Truong-Tran et al., 2001).

#### Altri potenziali targets dello zinco

Concentrazioni farmacologiche di zinco e di altri cationi divalenti sono in grado di bloccare il rilascio del Cyt C dal mitocondrio (Zamzami et al., 1996), ma non è ancora chiaro se tale blocco avvenga anche a concentrazioni fisiologiche. Lo zinco potrebbe anche influenzare i livelli di fattori ausiliari dell'attivazione della caspasi-3 come, ad esempio, membri della famiglia Bcl-2 anti-apoptotici. La supplementazione di zinco *in vitro* induce aumento del rapporto Bcl-2/Bax in linee monocitarie, rendendole più resistenti all'apoptosi: tuttavia, in tali studi è stata usata una concentrazione di zinco superiore a quella fisiologica. Pertanto, l'aumento del rapporto Bcl-2/Bax osservato potrebbe essere in parte dovuto alla risposta allo stress causato dal livello eccessivo di zinco piuttosto che da un suo effetto fisiologico nella regolazione dell'apoptosi (Fukamachi et al., 1998). Lo zinco, infine, potrebbe influenzare i meccanismi cellulari a livello dell'espressione genica agendo ad esempio sulle proteine zinc-finger.

#### **1.6.7 Zinco e ciclo cellulare**

Lo zinco è un elemento strutturale essenziale per gli enzimi coinvolti nella sintesi del DNA (Chesters et al., 1989), nella trascrizione (Wu et al., 1992), nella sintesi di aminoacil-tRNA (Hicks e Wallwork, 1987) e nella funzione ribosomale (Hard et al., 2000). Inoltre, è presente nelle strutture zinc finger dei fattori di trascrizione che controllano l'attività dei geni in risposta ai fattori di crescita (Berg e Shi, 1996). Lo zinco non funge solo da elemento strutturale: molti studi, infatti, hanno messo in evidenza il suo ruolo centrale nel controllo nei meccanismi di regolazione della crescita e proliferazione cellulare. L'inibizione della crescita è uno dei principali effetti della carenza di zinco ed è stato evidenziato sia *in vitro* che *in vivo*. Nonostante i numerosi esperimenti condotti in questo senso, non è ancora chiaro quale possa essere l'esatto ruolo dello zinco nella regolazione della proliferazione. La carenza di zinco diminuisce i livelli di espressione di IGF-1 nel topo e nell'uomo, che media la transizione dalla fase G1 alla fase S nel ciclo cellulare *in vitro* (Roth e Kirchgessner, 1994). Pertanto, l'influenza dello zinco su questo

ormone indica un probabile coinvolgimento di tale oligoelemento nella regolazione della proliferazione stimolata dai fattori di crescita.

I primi studi volti a comprendere il ruolo svolto dallo zinco nella regolazione delle fasi del ciclo cellulare misero in evidenza che lo zinco era richiesto durante la fase G1 per consentire alla cellula l'ingresso nella fase S (Chesters et al., 1989). Inizialmente si pensò che un possibile bersaglio dello zinco fosse qualche fattore determinante per l'avvio della sintesi del DNA e che in assenza di zinco il genoma non potesse andare incontro a duplicazione. In realtà, successivamente si è visto che, una volta passato il checkpoint della fase G1, esso non sembra essere ulteriormente richiesto per il corretto svolgimento della fase S (Chesters et al., 1999). Questo potrebbe significare che le proteine del complesso di sintesi del DNA siano in grado di conservare gli ioni zinco ad esse associati e di mantenere la loro funzione metabolica anche quando la disponibilità di zinco libero viene drasticamente ridotta.

Lo zinco libero, pur non essendo richiesto direttamente nella sintesi del DNA, sembra comunque necessario in quanto la sua carenza blocca le cellule in fase G2 e ne impedisce il passaggio alla fase M (Chesters et al., 1999).

### **1.6.8 Le metallotioneine**

Le metallotioneine (MTs), un gruppo di proteine caratterizzate dal basso peso molecolare (6-7 kDa) e dall'alto contenuto di ioni metallici, contenenti 60-68 residui aminoacidici tra cui 20 cisteine, giocano un ruolo fondamentale nell'omeostasi cellulare dei metalli grazie alla loro alta affinità per gli ioni metallici, in particolare per lo zinco ( $K_d = 1.4 \times 10^{-13} \text{ M}$ ) (Kagi e Schaffer, 1988). Le 20 cisteine sono coinvolte nel legame di 7 atomi di zinco mediante legami tiolici (Maret e Vallee, 1998). Esistono diverse isoforme di MTs caratterizzate dalla lunghezza della catena aminoacidica: le isoforme I, II, III e IV mappano sul cromosoma 16 nell'uomo e sul cromosoma 8 nel topo con vari polimorfismi (West et al, 1990). Le isoforme più comuni sono la I e la II; espresse in molti organi e tessuti compreso il cervello, l'isoforma III chiamata anche GIF (growth inhibitory factor) è espressa esclusivamente nel sistema nervoso centrale mentre l'isoforma IV è ristretta all'epitelio squamoso. Le MTs distribuiscono lo zinco intracellulare:

queste proteine, infatti, attraverso la rimozione e il trasferimento di zinco influenzano l'attività di proteine zinco-dipendenti (Jiang et al, 1998) e sono coinvolte nella modulazione dell'attività di legame al DNA dei fattori di trascrizione zinc-fingers. Inoltre, le MTs agiscono come anti-ossidanti in quanto, essendo il gruppo zinco sulfuro sensibile ai cambiamenti dello stato redox della cellula, un agente ossidante induce il trasferimento di zinco dal suo sito di legame nella MTs a quello a più bassa affinità in altre proteine (figura 15) (Maret e Vallee, 1998). Questo trasferimento è rilevante, per esempio, nel conferire l'attività biologica ai metallo-enzimi antiossidanti, come la superossido-dismutasi (SOD) (Lazo et al, 1998). Pertanto, le proprietà redox delle MTs e i loro effetti sullo zinco nei clusters metallotiolici sono cruciali per le funzioni anti-ossidanti delle MTs (Kagi e Schaffer, 1998).

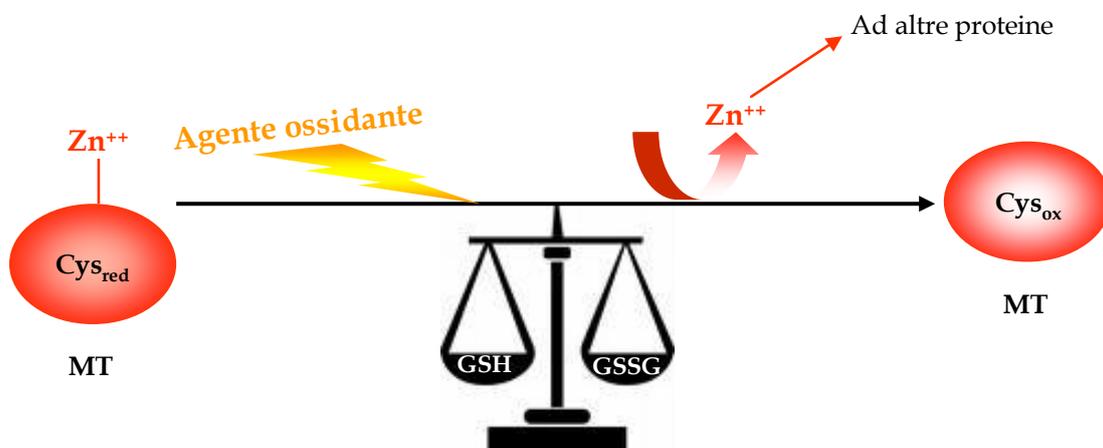


Figura 15: ruolo antiossidante delle MTs. Un agente ossidante è in grado di indurre il trasferimento di zinco dal gruppo zinco sulfuro nella MTs a quello a più bassa affinità in altre proteine.

In linea con questo ruolo, l'espressione genica delle isoforme delle MTs, attraverso il fattore di trascrizione MTF-I (Palmiter, 1994) è stata documentata dai molluschi agli umani (Kagi e Schaffer, 1998) suggerendo l'importante ruolo giocato dalle MTs come agenti protettivi dagli invertebrati ai vertebrati. Questo ruolo assume un significato speciale nella difesa dallo stress transitorio, come può accadere nell'età giovane-adulta (Kelly et al., 1996; Cai et al., 1999) ma può essere discutibile se le MTs mantengono la loro funzione protettiva durante l'invecchiamento quando lo stress diventa cronico. Infatti il danno ossidativo è

persistente durante l'invecchiamento ("*Free radical theory of ageing*") (Ashok e Ali, 1999) a dispetto di un aumento di MTs nel fegato, nel cervello (Mocchegiani et al., 1997 e 2001) come nel cancro e nelle infezioni (Abdel-Mageed e Agrawal, 1997; Mocchegiani et al., 2003) di solito associato ad una prognosi sfavorevole (Ebadi e Swanson, 1988). Secondo queste scoperte, si può ipotizzare che lo zinco non possa essere trasferito dalle MTs ad altre proteine durante l'invecchiamento e in caso di infiammazione cronica, ma che sia continuamente sequestrato dalle MTs provocando un abbassamento della disponibilità di ioni zinco con una conseguente immunodeficienza. Al contrario, in caso di bassi livelli di infiammazione, come nei soggetti centenari, l'espressione genica delle MTs è bassa e accoppiata con una buona disponibilità di zinco e un'efficiente risposta immunitaria innata (Mocchegiani et al., 2002a). Pertanto, l'omeostasi dello zinco da parte delle MTs potrebbe essere un aspetto cruciale per comprendere l'immunosenescenza e per sviluppare strategie volte a migliorare la risposta immune nell'invecchiamento.

#### 1.6.7.1 Metallotioneine e immunosenescenza

Per una risposta immune efficiente contro gli agenti stressanti e l'infiammazione, i macrofagi producono diverse citochine come l'IL-1, l'IL-6, l'IFN- $\alpha$  e il TNF- $\alpha$  che, a loro volta, provocano la sintesi di MTs nel fegato (Cui et al., 1998) e, allo stesso tempo, un'alterazione dei livelli di zinco (Bui et al., 1994). Questi lavori suggeriscono un'interazione tra zinco, MTs e sistema immunitario. L'IL-1, per esempio, è coinvolta nella produzione di MTmRNA nelle cellule epiteliali timiche (TEC) attraverso l'attivazione della PKC che è, a sua volta, zinco-dipendente (Coto et al., 1992) e partecipa all'espressione genica delle MTs metallo-indotta (Yu et al., 1997). Inoltre, le MTs donano zinco per la riattivazione dell'ormone timulina nelle TECs (Coto et al., 1992). Le MTs agiscono come riserva di zinco in caso di zinco deficienza e, nello stesso tempo, possiedono un'alta capacità tamponante per lo zinco: in caso di alte concentrazione di questo ione, infatti, esse sono in grado di ridurre la tossicità (Mocchegiani et al., 2000). Le MTs, pertanto, rappresentano agenti protettivi che prevengono la zinco-deficienza durante uno stato infiammatorio. In presenza di infiammazione, infatti, le MTs extracellulari operano come fattori chemiotattici che governano la migrazione dei leucociti al

sito di infiammazione e come segnale di pericolo che influenza il comportamento funzionale delle cellule danneggiate. Gli alti livelli di MTs prodotti nell'infiammazione cronica possono alterare le normali risposte chemiotattiche che regolano la migrazione dei leucociti (Yin et al., 2005). L'interazione tra MTs e il sistema immunitario assume una particolare rilevanza durante l'invecchiamento e nelle malattie età correlate (cancro e infezioni), caratterizzate da alti livelli di MTs e di citochine pro-infiammatorie, diminuita efficienza immunitaria e bassa biodisponibilità di zinco (Mocchegiani et al., 2000 e 2002a). La presenza di alti livelli di MTs nel timo atrofico di topi anziani suggerisce che nell'immunosenescenza la funzione di queste metallo-proteine cambia da protettiva in età giovane-adulta a dannosa nell'età avanzata (Mocchegiani et al., 2004). Un'ulteriore indicazione a sostegno del ruolo pleiotropico delle MTs proviene dalla misurazione dei livelli di zinco e di MTs nel fegato e nel timo dei topi anziani che mostrano un rapporto Zn/MTs molto inferiore a quello osservato nei topi giovani e molto anziani (invecchiamento con successo). Nello stesso tempo, i topi giovani e molto anziani mostrano valori abbastanza simili di attività timica endocrina, di MTmRNA nel timo e nel fegato e di citotossicità delle cellule NK nel fegato rispetto ai topi anziani (Mocchegiani et al., 2002b). Questo suggerisce, da una parte, un'efficiente funzione timica in età molto avanzata malgrado l'atrofia e un'efficace funzione extra-timica delle cellule T nel fegato dovuta ai bassi livelli di zinco legato alle MTs e dall'altra il ruolo pleiotropico delle MTs. Gli alti livelli di MTmRNA nei linfociti di topi anziani e di soggetti Down e i bassi livelli di MTmRNA nei linfociti di soggetti giovani-adulti e centenari (Mocchegiani et al., 2002b) sono di ulteriore sostegno al ruolo pleiotropico delle MTs durante l'invecchiamento. Questo fatto provoca un bassa biodisponibilità di zinco e, di conseguenza, una risposta immunitaria compromessa a livello timico ed extra-timico. Le MTs, pertanto, durante l'invecchiamento non rappresentano più proteine donatrici, ma assumono, al contrario, il ruolo di sequestratrici di zinco. Di conseguenza, le MTs aumentano enormemente nel timo e nel fegato dei topi anziani con un possibile effetto dannoso. Questo fenomeno è stato proposto essere coinvolto nell'involutione timica osservata durante l'invecchiamento (Mocchegiani et al., 2004). D'altra

parte, livelli aumentati di MTs inducono una down-regolazione di molte altre funzioni biologiche relative allo zinco, come ad esempio il metabolismo, l'espressione genica e la trasduzione del segnale (Kagi e Schaffer, 1988). Comunque, il principale problema durante l'invecchiamento rimane l'incapacità delle MTs di rilasciare efficacemente lo zinco. In questo contesto, un corretto equilibrio tra iNOS e cNOS provoca il rilascio di zinco dalle MTs, via S-nitrosilazione (Zangger et al., 2001). Con l'invecchiamento, l'iNOS aumenta rispetto al cNOS causando uno squilibrio nella sintesi di NO e un limitato rilascio di zinco dalle MTs (Mocchegiani e al., 2000). Inoltre, recentemente è stato individuato un polimorfismo delle MTs (-209A/G MT2A): i soggetti anziani con genotipo AA per tale polimorfismo mostrano una bassa bio-disponibilità di zinco, alti livelli di IL-6 e un alterato metabolismo lipidico con conseguente aumento nei rischi di aterosclerosi e diabete di tipo II (Giacconi et al., 2005).

Le MTs possono essere quindi considerate come marker biologici e genetici di immunosenescenza.

Queste proteine possono trasformarsi da fattori protettivi in età giovane-adulta ad agenti nocivi per la funzione immunitaria durante l'invecchiamento e nelle malattie età-associate, secondo il concetto che diversi geni/proteine che aumentano la fitness nelle prime fasi della vita possono assumere un effetto negativo più tardi (*"Antagonistic Pleiotropy Theory of Ageing"*) (figura 16) (Franceschi et al., 1999; Williams e Day, 2003; Mocchegiani et al., 2006).

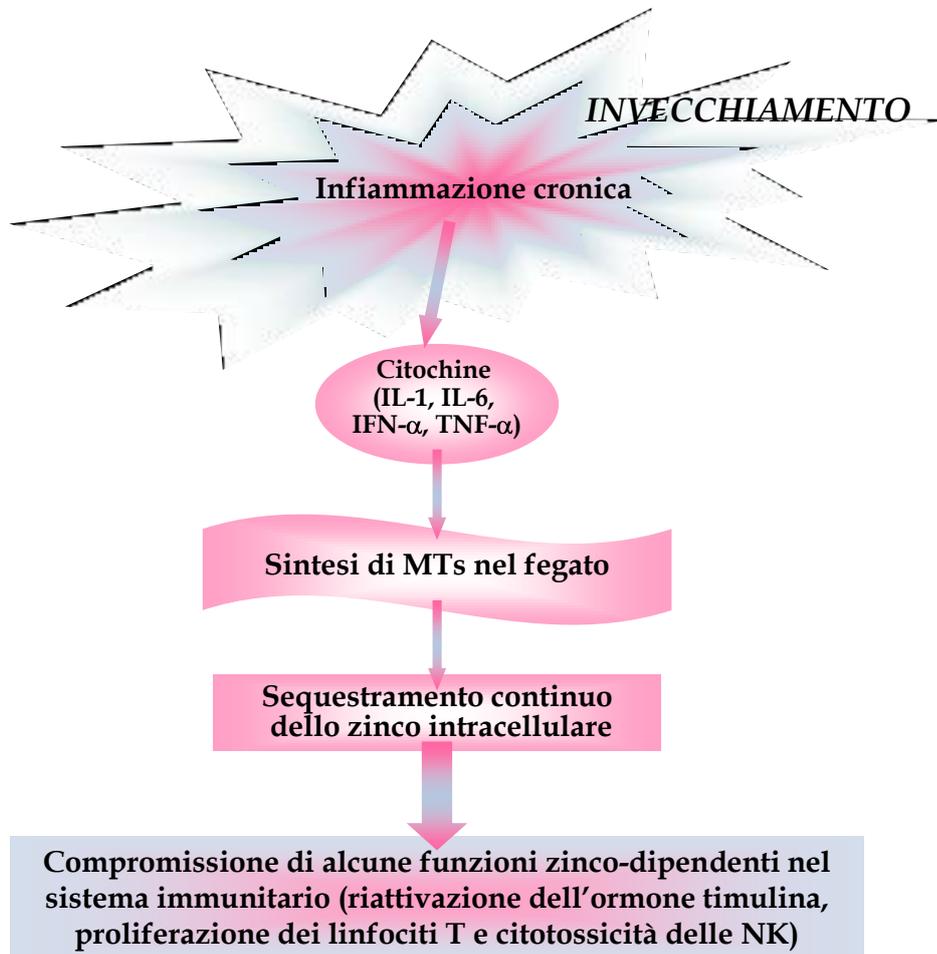


Figura 16: le metallothioneine nella teoria della pleiotropia antagonista dell'invecchiamento.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Negli ultimi anni è stato fatto un notevole sforzo per chiarire gli aspetti molecolari, biochimici e cellulari dell'invecchiamento. Con l'età l'organismo va incontro a rimodellamento del sistema immunitario e diminuzione della funzionalità della risposta immune: tali fenomeni sono da riferire all'immunosenescenza, evento causato prevalentemente dall'esposizione continua per tutta la durata della vita ad antigeni ed agenti stressanti quale, ad esempio, lo stress ossidativo (Franceschi et al., 2000). Ciò si traduce in un generale "deterioramento" del sistema immunitario, nel quale l'aumento delle citochine pro-infiammatorie svolge un ruolo determinante: queste, infatti, contribuiscono al processo di "*inflamm-aging*", inteso come il fenomeno di infiammazione cronica che porta all'invecchiamento dell'organismo (Salvioli et al., 2006). Il processo di invecchiamento è, inoltre, caratterizzato da alterazioni dell'omeostasi dello stato redox e progressivo aumento dello stress ossidativo. Questo è coinvolto nella trasduzione del segnale cellulare, nella risposta infiammatoria e nel danno tissutale, determinando cambiamenti metabolici ed energetici che modificano alcune funzioni cellulari, quali la proliferazione, la morte cellulare programmata (apoptosi) e l'omeostasi. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono inoltre implicate nella patogenesi di numerose patologie età-correlate quali aterosclerosi, diabete di tipo II, neurodegenerazione, osteoporosi, tutte accomunate da una forte componente infiammatoria e immunologica. Inoltre, stress ossidativo e ROS sono attivi induttori di apoptosi, le cui alterazioni durante l'invecchiamento potrebbero spiegare alcuni degli aspetti più importanti dell'immunosenescenza quali l'accumulo di megacloni espansi di cellule di memoria, la restrizione del repertorio dei linfociti T e l'aumento di fenomeni autoimmuni (Franceschi et al., 1995a). I meccanismi cellulari e molecolari correlati con la capacità dell'organismo di rispondere adeguatamente a stress di tipo ossidativo e infiammatorio sembrano dunque giocare un ruolo importante nel favorire la longevità umana e nell'evitare/ritardare le principali patologie età-correlate.

Nell'invecchiamento, inoltre, si osserva una generale diminuzione dei livelli plasmatici di zinco, con gravi conseguenze sul sistema immunitario. Lo zinco, infatti, protegge le cellule dallo stress ossidativo stabilizzando i lipidi, le proteine, il DNA e i microtubuli, e influenza direttamente alcuni regolatori apoptotici

fondamentali quali ad esempio le caspasi, le endonucleasi, il rapporto Bcl-2/Bax. I dati riportati in merito dalla letteratura, tuttavia, sono risultati spesso contrastanti. La carenza di zinco ha comunque un effetto determinante sulla proliferazione cellulare e sulla regolazione dell'apoptosi, che, nel sistema immunitario, si traduce in anomalie nella proliferazione delle cellule dell'immunità innata, nell'attività delle cellule NK, nello sviluppo e funzione dei linfociti T. La zincopenia potrebbe risultare, pertanto, in una funzione immunitaria compromessa e in un generale aumento della suscettibilità alle infezioni.

In questo contesto lo scopo di questa tesi è chiarire il ruolo dello zinco in due processi fondamentali per il sistema immunitario quali l'apoptosi, spontanea e indotta da stress ossidativi, e la proliferazione cellulare.

L'effetto dello zinco *in vitro* sull'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo è stato studiato utilizzando i Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) provenienti da 75 soggetti sani suddivisi in tre gruppi di età (25 giovani, età media  $29 \pm 1$  anni; 30 anziani, età media  $72 \pm 1$  anni; 20 nonagenari, età media  $93 \pm 1$  anni). L'apoptosi è stata studiata utilizzando diverse metodologie quali:

- Analisi citofluorimetrica biparametrica per la valutazione dell'esposizione della fosfatidilserina sul foglietto esterno della membrana plasmatica;
- Analisi citofluorimetrica del potenziale di membrana mitocondriale, parametro strettamente correlato all'apoptosi, utilizzando la sonda JC-1;
- Analisi citofluorimetrica del rilascio del Cyt C dal mitocondrio;
- Analisi citofluorimetrica dell'attivazione della caspasi-3, utilizzando il FLICA test;
- Analisi mediante Western Blotting dell'attivazione della caspasi-3;
- Analisi mediante Western Blotting dell'espressione di Bcl-2;
- Analisi mediante Western Blotting della proteolisi di PARP.

Inoltre, per capire se l'espressione delle metallothioneine nel sistema immunitario in risposta allo zinco possa subire modificazioni con l'invecchiamento, sono stati valutati i livelli di MTs intracellulari a seguito di una supplementazione *in vitro* con diverse concentrazioni di zinco (12,5-125  $\mu$ M) nelle due principali sottopopolazioni linfocitarie, linfociti T CD4<sup>+</sup> (T *helper*) e linfociti T CD8<sup>+</sup> (T

*citotossici*) in 9 soggetti giovani (età media:  $28 \pm 2$  anni) e 9 soggetti anziani (età media:  $79 \pm 3$  anni). L'espressione delle MTs è stata analizzata mediante citofluorimetria a flusso.

L'effetto di diverse concentrazioni di zinco *in vitro* sulla proliferazione cellulare è stato studiato utilizzando i PBMCs di un totale di 48 soggetti (14 giovani, età media  $28 \pm 1$  anni; 11 anziani, età media  $73 \pm 1$ ; 23 nonagenari, età media  $93 \pm 1$ ) tramite analisi biparametrica in citometria a flusso per valutare le diverse fasi del ciclo (valutando il contenuto di DNA e l'incorporazione di Bromo-deossi-Uridina).

Inoltre, da studi precedenti (Bonafè et al., 2004) è emerso che il polimorfismo al codone 72 del gene p53 (Arg72 o Pro72) influisce sulla suscettibilità all'apoptosi. Infatti, Bonafé et al. ha dimostrato che nei soggetti anziani esiste una diversa propensione all'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo in dipendenza dal genotipo di p53; i soggetti anziani Pro<sup>-</sup> (Arg/Arg) risultano essere molto più suscettibili all'apoptosi indotta da stress ossidativo in confronto a soggetti anziani Pro<sup>+</sup> (Arg/Pro; Pro/Pro). Lo stesso polimorfismo sembra essere coinvolto anche nella proliferazione cellulare: in particolare Salvioli et al. ha dimostrato che, in fibroblasti di centenari, i soggetti Pro<sup>-</sup> superano più facilmente il *checkpoint* G1/S del ciclo cellulare rispetto ai soggetti Pro<sup>+</sup> (Salvioli et al., 2005). Considerando questi dati della letteratura, abbiamo voluto verificare se lo zinco *in vitro* possa avere effetti sul diverso comportamento età-correlato dei due polimorfismi sulla propensione all'apoptosi indotta da stress ossidativo e sul ciclo cellulare. A tal fine, tutti i soggetti sono stati genotizzati e l'apoptosi e il ciclo cellulare sono stati valutati dividendo i soggetti sulla base del polimorfismo.

In aggiunta agli studi sull'effetto dello zinco *in vitro*, è stato analizzato anche l'effetto di una supplementazione *in vivo* di zinco sull'apoptosi, sulla funzionalità mitocondriale e sul ciclo cellulare sui PBMCs in un gruppo di 12 soggetti anziani (età media:  $75 \pm 2$  anni).

### **3. MATERIALI E METODI**

### 3.1 RECLUTAMENTO DEI SOGGETTI

Sono stati reclutati in totale 75 soggetti anziani (età compresa tra i 60 e i 102 anni) residenti nella città di Bologna e provincia, suddivisi in due gruppi di età:

- Anziani: 42 soggetti in buono stato di salute di età compresa tra i 60 e gli 84 anni. 22 femmine e 20 maschi, età media  $73 \pm 1$  anni;
- Nonagenari: 33 soggetti in buono stato di salute di età compresa tra gli 85 e i 102 anni. 21 femmine e 12 maschi, età media  $93 \pm 1$  anni.

Prima sottoscrizione del consenso informato, ognuno dei soggetti reclutati per lo studio è stato sottoposto alle analisi ematologiche di routine (formula leucocitaria, colesterolemia, VES, ecc.) e ad un breve questionario informativo allo scopo di valutarne l'idoneità in termini fisici, psicologici e cognitivi.

Il gruppo di controllo utilizzato è invece composto da 25 soggetti giovani sani tra i 23 e i 41 anni (9 maschi; 16 femmine; età media:  $29 \pm 1$  anni).

#### 3.1.1 Determinazione della concentrazione sierica di zinco

La determinazione della concentrazione sierica di zinco è stata effettuata tramite l'utilizzo di un apposito saggio colorimetrico *in vitro* su campioni di siero o di plasma (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). Lo zinco si lega al sale sodico 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)-fenolo (5-Br-PAPS) formando un chelato rosso-violetto, la cui assorbenza, misurata a 560 nm, è direttamente proporzionale alla quantità di zinco presente.

### 3.2 ALLESTIMENTO DEI CAMPIONI

#### 3.2.1 Separazione dei PBMCs da sangue periferico

I Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) sono stati separati mediante gradiente di densità secondo la metodica di Böyum (Böyum, 1968), contati e messi in coltura. La procedura utilizzata per la separazione è la seguente:

- ◆ 20-25 ml di sangue intero sono stati raccolti, tramite venipuntura, in provette contenenti eparina (LH-Metall-Analytik, Sarstedt, Numbrecht, Germany);

- ◆ Il sangue, trasferito in provette a fondo conico da 50 ml, è diluito in rapporto 1:2 con PBS sterile (SIGMA-Aldrich, Ayrshire, UK) a temperatura ambiente e quindi 10-12 ml di Fycoll Hypaque (Lymphoprep™, Oslo, Norway) vengono aggiunti lentamente a partire dal fondo della provetta;
- ◆ Il sangue stratificato è centrifugato a 500 g per 25 minuti a 20° C senza freno: ciò consente la separazione delle diverse componenti ematiche secondo un gradiente di densità che porta alla formazione di un anello opalescente costituito da linfociti e monociti, all'interfaccia plasma-Fycoll;
- ◆ L'anello di linfomonociti è raccolto in una provetta da 50 ml, portato a volume con PBS sterile a temperatura ambiente e quindi centrifugato a 500 g per 10 minuti;
- ◆ Dopo l'aspirazione del surnatante, il pellet di linfomonociti è risospeso in un tubo da 10 ml con PBS sterile addizionato con 2-3 ml di FCS (Fetal Calf Serum, SIGMA-Aldrich), centrifugato a 400 g per 10 minuti a temperatura ambiente e quindi risospeso in PBS addizionato con FCS;
- ◆ I PBMCs sono centrifugati a bassa velocità (260 g per 10 minuti), pellettati e risospesi in 5-6 ml di terreno completo (RPMI 1640 (SIGMA-Aldrich, Ayrshire, UK), contenente FCS (SIGMA-Aldrich, Ayrshire, UK) al 10%, Penicillina-Streptomicina (P-S, 100 unità Penicillina + 0,1 mg Streptomicina/1ml NaCl 0,85%, SIGMA-Aldrich, Ayrshire, UK) all'1% e L-Glutammina (L-Glut, 200 mM in NaCl 0,85%, BioWhittaker, Verviers, Belgium) all'1%;
- ◆ Si procede alla conta dei PBMCs in camera Neubauer (BRAND, Wertheim, Germany): 20 µl di sospensione cellulare sono aggiunti a 380 µl di colorante di Turk (Merck, Darmstadt, Germany), che colora il nucleo facilitando la visualizzazione delle cellule al microscopio;
- ◆ Una volta contate le cellule, si aggiunge l'adeguata quantità di terreno completo RPMI 1640 alla sospensione cellulare in modo da ottenere una concentrazione finale di  $2 \times 10^6$  cellule/ml.

### 3.3 STUDIO DELL'APOPTOSI

#### 3.3.1 Allestimento delle colture cellulari per lo studio dell'apoptosi

Per gli studi relativi all'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo, le cellule mononucleate vengono poste in coltura in piastre multiwell da 6 o da 24 pozzetti nelle seguenti condizioni sperimentali, in modo da ottenere una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml:

1. Cellule coltivate in terreno completo per 48 e 72 ore in incubatore al 5% di CO<sub>2</sub> a temperatura di 37° C. Questo campione è utilizzato per valutare l'apoptosi spontanea derivante dalle condizioni di coltura;
2. Cellule coltivate nelle stesse condizioni precedenti con l'aggiunta di una soluzione di ZnSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) alla concentrazione finale di 12,5 µM;
3. Cellule coltivate nelle stesse condizioni precedenti con l'aggiunta di una soluzione di 2-desossi-D-Ribosio (dRib, SIGMA-Aldrich, Ayrshire, UK) alla concentrazione finale di 10 mM. Il dRib è uno zucchero riducente in grado di indurre stress ossidativo depletando completamente le cellule di GSH. Pertanto questo campione sarà utilizzato per valutare l'apoptosi indotta da stress ossidativo;
4. Cellule coltivate nelle stesse condizioni precedenti con l'aggiunta di dRib (10 mM) e ZnSO<sub>4</sub> (12,5 µM).

Le cellule verranno raccolte alle 48 e 72 ore e sottoposte a vari test atti a valutare aspetti diversi del processo apoptotico:

- Test dell'Annexina V/Propidio Ioduro (PI);
- Determinazione del potenziale di membrana mitocondriale con la sonda JC-1;
- Test FLICA;
- Valutazione del rilascio del Cyt C dal mitocondrio;
- Espressione della caspasi-3, di Bcl-2 e di PARP (Western Blotting).

### 3.3.2 Marcatura con Annexina V/Propidio Ioduro

La suscettibilità all'apoptosi è misurata marcando le cellule con Annexina V-FITC e Propidio Ioduro (PI), in modo da ottenere un'accurata quantificazione dell'apoptosi e la discriminazione tra apoptosi precoce e apoptosi tardiva/necrosi. L'Annexina V è una proteina  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente che lega con alta affinità per il fosfolipide di membrana fosfatidilserina e può quindi essere usata per l'identificazione delle cellule apoptotiche (Vermes et al., 1995). In cellule sane, infatti, la fosfatidilserina è localizzata esclusivamente nel foglietto interno della membrana cellulare; nelle prime fasi del processo apoptotico, tuttavia, questo fosfolipide trasloca dal foglietto interno a quello esterno della membrana plasmatica, rendendosi così disponibile al legame con l'Annexina V. L'integrità della membrana plasmatica in questa fase non è ancora compromessa. La rilevazione è possibile perché l'Annexina V è coniugata al fluorocromo Isotiocianato di Fluorescina (FITC), che emette nel verde. Il Propidio Ioduro è un marcatore dell'apoptosi tardiva, poiché non è in grado di penetrare in cellule integre (siano esse sane o in fase di apoptosi precoce). Nella fase tardiva di apoptosi/necrosi, la cellula perde l'integrità di membrana, consentendo l'entrata del Propidio Ioduro che, avendo affinità per il DNA, si comporta come un colorante vitale. Il test dell'Annexina V/PI (Bender MedSystem, Burlingame, CA) viene, quindi, utilizzato per caratterizzare le cellule in fase apoptotica precoce ( $\text{Anx}^+/\text{PI}^-$ ) e quelle in fase tardiva/necrosi ( $\text{Anx}^+/\text{PI}^+$ ). In figura 17 è mostrato un esempio rappresentativo di analisi citofluorimetrica Annexina V/PI di apoptosi spontanea e di apoptosi indotta da stress ossidativo:

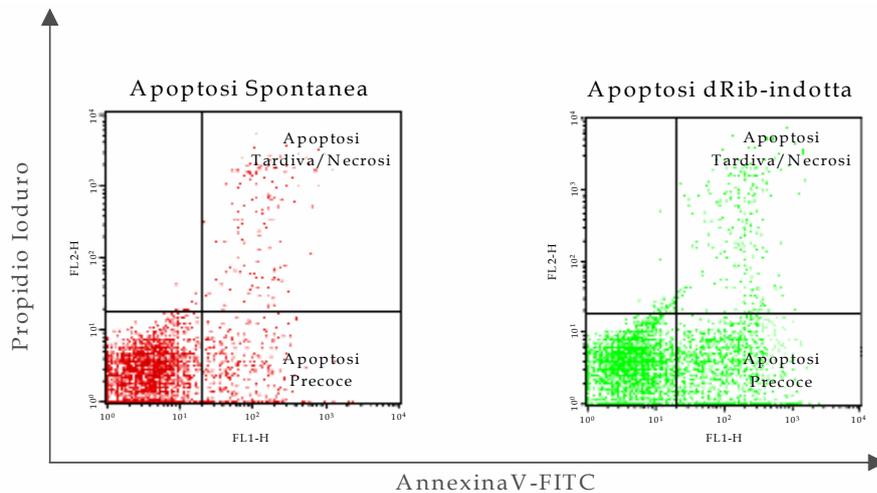


Figura 17: esempio di analisi biparametrica in citometria a flusso mediante marcatura con Annexina V-FITC e Propidio Ioduro in un soggetto nonagenario sano dopo 48 ore di coltura in assenza o presenza di dRib per valutare rispettivamente l'apoptosi spontanea e l'apoptosi indotta da stress ossidativo.

Per l'esecuzione del test è stata eseguita la seguente procedura:

- Circa  $3 \times 10^5$  cellule sono state raccolte e trasferite in un tubo di polistirene da 5 ml;
- Si effettua un lavaggio con 2 ml di PBS non sterile a temperatura ambiente. Le cellule sono centrifugate a 400 g per 5 minuti a 4° C;
- Dopo aver decantato, il pellet è vortexato e risospeso in 195  $\mu$ l di Binding Buffer all'1X fornito dal kit. Vengono aggiunti 5  $\mu$ l di Annexina V-FITC, quindi le cellule sono incubate al buio a temperatura ambiente per 10 minuti;
- Dopo un lavaggio con 2 ml di PBS, le cellule sono centrifugate a 400 g per 5 minuti a 4° C. Il pellet è vortexato e risospeso in 200  $\mu$ l di Binding Buffer 1X;
- Si aggiungono 15  $\mu$ l di PI (20  $\mu$ g/ml) (Bender MedSystem);
- I campioni sono pronti per l'acquisizione al citofluorimetro.

Le analisi citofluorimetriche sono effettuate usando un citofluorimetro a flusso (BD, San Josè, CA, USA), dotato di un laser ad Argon a 488 nm. In tutte le analisi è stato acquisito un minimo di  $10^4$  cellule per campione, che sono state poi analizzate con il software Cell Quest (BD, San Josè, CA, USA).

### 3.3.3 Determinazione del potenziale di membrana mitocondriale

JC-1 è una sonda cationica lipofilica (*5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide*) e, per la sua natura cationica, entra velocemente nei mitocondri, normalmente polarizzati a -120/-180 mV; ciò comporta l'accumulo di una grande quantità di JC-1 nello spazio intermembrana e la conseguente formazione di aggregati, i quali, eccitati da un raggio a 488 nm, emettono nel rosso/arancio (circa 590 nm). Durante il processo apoptotico i mitocondri vanno incontro a una depolarizzazione della loro membrana, favorendo formazione del permeability transition pore e il rilascio di Cyt C e altri fattori pro-apoptotici. In tal caso, il JC-1 resta in forma monomerica con emissione nel verde (circa 527 nm) (Reers et al., 1991; Cossarizza et al., 1993). Per l'esecuzione del test è stata eseguita la seguente procedura:

- Circa  $3 \times 10^5$  cellule sono raccolte e trasferite in un tubo di polistirene da 5 ml;
- Vengono aggiunti 700  $\mu$ l di terreno completo e 2  $\mu$ l di JC-1 (JC-1, Molecular Probes, Eugene, OR USA) alla concentrazione di 2,5  $\mu$ g/ml in DMSO, quindi le cellule sono incubate al buio a temperatura ambiente per 15 minuti;
- Viene aggiunto 1 ml di terreno completo a cui segue una centrifuga a 250 g per 5 minuti a temperatura ambiente;
- Dopo aver decantato, il pellet è vortexato e risospeso in 350  $\mu$ l di terreno completo;
- I campioni sono pronti per l'acquisizione al citofluorimetro seguendo le modalità del punto precedente.

### 3.3.4 Valutazione del rilascio del Cyt C dal mitocondrio

E' stata messa a punto una tecnica citofluorimetrica capace di rilevare il rilascio del Cyt C dal mitocondrio in PBMCs a seguito di diversi trattamenti (Vedi paragrafo 3.2.1). Il protocollo prevede la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna, la fissazione dei PBMCs, la marcatura con un anticorpo monoclonale anti-Cyt C e la successive marcatura con un anticorpo secondario marcato con un fluorocromo (Modificato da Waterhouse e Trapani, 2003).

- ◆ Circa  $10^6$  cellule sono raccolte e trasferite in un tubo di polistirene da 5 ml;
- ◆ Si effettua un lavaggio con 2 ml di PBS non sterile a temperatura ambiente. Le cellule sono centrifugate a 400 g per 5 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ ;
- ◆ Dopo aver decantato, il pellet è vortexato e risospeso in 1 ml di una soluzione di digitonina  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$  per la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna. La digitonina è un glucoside steroideo in grado di solubilizzare le membrane ricche di steroli, come quella plasmatica e quella mitocondriale esterna;
- ◆ Il campione viene incubato per 15 minuti in ghiaccio;
- ◆ Si effettua un lavaggio con 2 ml di PBS non sterile a temperatura ambiente. Le cellule sono centrifugate a 700 g per 5 minuti a temperatura ambiente;
- ◆ Dopo aver decantato, il pellet è vortexato e risospeso in 1 ml di una soluzione di paraformaldeide (PFA) (BDH, England) 0,4% per la fissazione;
- ◆ Il campione viene incubato per 20 minuti a temperatura ambiente;
- ◆ Si effettuano due lavaggi con 2 ml di PBS non sterile a temperatura ambiente. Le cellule sono centrifugate a 700 g per 5 minuti a temperatura ambiente. In questo caso, il surnatante viene rimosso per aspirazione, piuttosto che per inversione, in quanto la paraformaldeide rende il pellet "scivoloso" ed esiste quindi la possibilità di perderlo rovesciando le provette;
- ◆ Il pellet viene risospeso in  $300\ \mu\text{l}$  di blocking buffer e incubato per almeno un'ora a  $4^{\circ}\text{C}$ ;
- ◆ Si aggiungono  $2\ \mu\text{l}$  di anticorpo anti-Cyt C (Santa Cruz Biotechnology);
- ◆ Il campione viene incubato a  $4^{\circ}\text{C}$  per una notte;
- ◆ Si effettuano due lavaggi con 2 ml di PBS non sterile a temperatura ambiente. Le cellule sono centrifugate a 700 g per 5 minuti a temperatura ambiente. Anche in questo caso il surnatante viene rimosso per aspirazione;

- ◆ Si risospende il campione in 250 µl di blocking buffer e si aggiungono 5 µl di anticorpo secondario Goat anti-mouse Ig FITC (BD, San José, CA);
- ◆ Il campione viene incubato per un'ora a 4° C;
- ◆ Si effettuano due lavaggi con 2 ml di PBS non sterile a temperatura ambiente. Le cellule sono centrifugate a 700 g per 5 minuti a temperatura ambiente. Anche in questo caso il surnatante viene rimosso per aspirazione;
- ◆ Il campione viene risospeso in 200 µl di PBS e acquisito al citofluorimetro. In questo caso viene acquisito un minimo di  $2 \times 10^5$  cellule per campione.

*Composizione della soluzione di permeabilizzazione:*

- Digitonina (SIGMA) 50 µg/ml
- KCl (BDH) 100 mM
- In PBS

*Composizione della soluzione di fissazione:*

- PFA 0,4%
- In PBS

*Composizione del blocking buffer:*

- Saponina (SIGMA) 0,05%
- Albumina sierica bovina (BSA) 3% (Roche, NJ)
- In PBS

### **3.3.5 Test di attivazione delle caspasi-3 e -7 (FLICA)**

Il test FLICA è un saggio colorimetrico funzionale per la valutazione dell'attività delle caspasi-3 e -7. Il metodo è basato sull'utilizzo di un fluorocromo inibitore delle caspasi (FLICA), che entra passivamente nella cellula e si lega covalentemente solo alle due caspasi attive (riconoscendone siti specifici) inibendone l'attività enzimatica. Se l'inibitore è legato alle caspasi attive, viene

rilevato in citofluorimetria a flusso in quanto, se eccitato a 488 nm, emette fluorescenza verde.

Per l'esecuzione del test (Carboxyfluorescein FLICA Apoptosis Detection Kit (Immunological Sciences, SIC, Roma, Italia) è stata eseguita la seguente procedura:

- ◆ Circa  $3 \times 10^5$  cellule sono raccolte e incubate con 10  $\mu$ l di FLICA 30X, per 1 ora a 37° C;
- ◆ Si effettua un lavaggio con Wash Buffer 1X (fornito dal kit), quindi le cellule sono centrifugate a 400 g per 5 minuti a temperatura ambiente. Tale operazione viene ripetuta 2 volte, quindi le cellule sono risospese in 400  $\mu$ l di Wash Buffer 1X;
- ◆ I campioni sono pronti per l'acquisizione al citofluorimetro.

### **3.3.6 Espressione della Caspasi-3, di Bcl-2 e di PARP (Western Blotting)**

Il Western Blotting è una tecnica che consente una valutazione semi-quantitativa dell'espressione di proteine citoplasmatiche e nucleari ottenute da estratti cellulari. La miscela di proteine viene risolta in base al peso molecolare per mezzo di una separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide, trasferita su una membrana di nitrocellulosa e in seguito esposta al riconoscimento da parte di anticorpi specifici.

La separazione elettroforetica è condotta in condizioni denaturanti: le proteine sono risospese in loading buffer (Laemmli buffer) contenente Sodio Dodecil-Fosfato (SDS), che distrugge le interazioni non covalenti e  $\beta$ -mercaptoetanololo, un agente riducente che rompe i ponti disolfuro. Il campione viene quindi riscaldato a 95° C per 5 minuti per garantirne la completa denaturazione. L'SDS lega i polipeptidi denaturati conferendo loro una carica negativa proporzionale al peso molecolare, indipendentemente dalla sequenza amminoacidica. Applicando un campo elettrico, i complessi SDS-polipeptidi si muovono nel gel, attraversando una prima porzione a maglie larghe (Stacking Gel), poi una porzione a maglie più strette (Separating Gel), dove le proteine vengono effettivamente separate. Al termine della corsa elettroforetica le proteine sono trasferite su una membrana di nitrocellulosa, utilizzando un tampone (Transfer Buffer) che conduce la corrente

elettrica. Una volta trasferite su filtro, le proteine possono essere esposte ad un anticorpo primario specifico per un particolare epitopo della proteina di interesse. L'anticorpo primario viene poi riconosciuto da un anticorpo secondario coniugato ad un enzima (fosfatasi alcalina o perossidasi) che converte un specifico substrato in prodotto luminescente. Tale reazione, per impressione di una lastra fotografica, consente di rivelare l'interazione proteina-anticorpo.

Nel presente studio l'analisi semi-quantitativa dell'espressione proteica è effettuata mediante densitometria al Gel Doc (nel nostro caso è stato utilizzato il software Quantity One). Per quanto riguarda la Caspasi-3 e Bcl-2 (proteine citoplasmatiche), allo scopo di ottenere un dato normalizzato confrontabile con gli altri, viene calcolato il rapporto tra il risultato di densitometria ottenuto per ogni banda della proteina di interesse ed il valore densitometrico ottenuto per la corrispondente banda dell'actina, usata nel nostro caso come controllo di isocaricamento; il valore ottenuto per il controllo (cellule non trattate) è stato posto uguale a 100; gli altri valori ottenuti rappresentano, pertanto, la variazione percentuale rispetto al controllo.

La proteolisi di PARP è stata invece studiata sulla frazione proteica nucleare. In questo caso, vista l'enorme difficoltà incontrata nel trovare una proteina da poter usare come controllo di isocaricamento che non venisse degradata durante l'apoptosi, l'analisi è stata effettuata come segue: viene calcolato il rapporto tra il risultato di densitometria ottenuto per la banda della PARP intera (116 kDa) ed il valore densitometrico ottenuto per la corrispondente banda della PARP cleaved (89 kDa). Il valore così ottenuto per il controllo (cellule non trattate) è stato posto uguale a 100; gli altri valori ottenuti rappresentano, pertanto, la variazione percentuale rispetto al controllo.

La tecnica consiste, pertanto, in 5 fasi:

1. estrazione e quantificazione delle proteine;
2. corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide;
3. trasferimento su membrana di nitrocellulosa;
4. immunoblot;
5. sviluppo su lastra fotografica.

### 3.3.6.1 Estrazione e quantificazione delle proteine

Per la procedura di estrazione delle proteine è stato utilizzato il kit NE-PER Nuclear e Cytoplasmatic Extraction Reagents (PIERCE Biotechnology, Rockford, IL). Questo kit è basato sull'utilizzo di 3 reagenti:

- CER I e CER II, che servono per l'estrazione delle proteine citoplasmatiche;
- NER, per l'estrazione delle proteine nucleari.

In base al volume di pellet cellulare a disposizione, sono stati utilizzati i seguenti volumi di reagenti, a ciascuno dei quali è stata aggiunta una quantità di inibitore delle proteasi (SIGMA) allo scopo di evitare possibili eventi degradativi nel corso dell'estrazione:

N° cellule	CER I finale		CER II	NER finale	
	CER I	Inibitore proteasi (100x)		NER	Inibitore proteasi (100x)
$5 \times 10^6$	60 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	3,2 $\mu$ l	21,4 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l
$7 \times 10^6$	80 $\mu$ l	0,8 $\mu$ l	4,4 $\mu$ l	30 $\mu$ l	0,3 $\mu$ l

Tabella 2: composizione delle soluzioni di reagenti utilizzate per l'estrazione delle proteine citoplasmatiche e nucleari.

Le cellule, raccolte dopo 48 ore di incubazione a 37° C con gli stimoli indicati al paragrafo 3.3.1, sono state pellettate e conservate a -80° C fino al momento dell'utilizzo per l'estrazione delle proteine. La procedura è eseguita in ghiaccio secondo la seguente modalità:

- Si aggiunge la soluzione CER I ad ogni campione secondo le quantità indicate in Tabella 2, quindi si vortexa per 15 secondi;
- I campioni vengono incubati in ghiaccio per 10 minuti;
- Si aggiunge il volume di CER II ad ogni campione e si vortexa 5 secondi;
- I campioni sono incubati in ghiaccio per 1 minuto e vortexati nuovamente per altri 5 secondi;
- I campioni sono centrifugati a 15000 g per 5 minuti;

- Il surnatante, contenente le proteine citoplasmatiche, viene trasferito in un'epENDORF e posto in ghiaccio fino alla quantificazione;
- Il pellet rimasto è risospeso nella soluzione NER (vedi Tabella 2), vortexato per 15 secondi incubato in ghiaccio per 10 minuti;
- I campioni sono vortexati per 15 secondi e incubati in ghiaccio per 10 minuti (tale operazione viene ripetuta 3 volte);
- La soluzione è centrifugata a 15000 g per 10 minuti;
- Il surnatante, contenente le proteine nucleari, viene trasferito in una epENDORF e posto in ghiaccio fino alla quantificazione.

Dopo l'estrazione, le proteine sono quantificate con il sistema colorimetrico Bradford, che prevede l'utilizzo del reattivo di Bradford (Comassie Brilliant Blue R-250, BDH, Poole, UK). Il dosaggio proteico è basato sul cambiamento di colore dello stesso colorante, in risposta a varie concentrazioni di proteine. Il reattivo si lega principalmente ai residui aromatici o basici, come l'arginina.

Concentrazioni note di BSA vengono utilizzate per preparare la curva di calibrazione. Tutti i campioni sono diluiti in H<sub>2</sub>O MilliQ per ottenere un volume totale di 100 µl a cui è aggiunto 1 ml di Bradford. Si procede, quindi, alla lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro (595 nm), che è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica presente nei campioni. Dopo la quantificazione, si calcolano, per ciascun campione, i volumi da raccogliere per avere un totale di 40 µg di proteine, nel caso degli estratti citoplasmatici, o di 20 µg, nel caso degli estratti proteici nucleari, le quantità utilizzate per il caricamento su gel di poliacrilammide.

### 3.3.6.2 Preparazione dei gels

Dopo accurata pulizia dei vetri, con acetone, cloroformio ed etanolo in successione, questi vengono montati sull'apposito supporto. Viene preparato per primo il Separating Gel (o Running Gel), che serve per la separazione delle proteine in base al peso molecolare; dopo la sua polimerizzazione viene aggiunto lo Stacking Gel, che, avendo maglie più larghe, consente il corretto allineamento delle proteine per la successiva corsa.

- Separating gel: preparato con Acril/bisAcr 37:5:1 (BioRad, Hercules, CA), concentrazione 40%. La percentuale del gel varia a seconda delle dimensioni delle proteine: nel caso della Caspasi-3 e di Bcl-2 (proteine di piccole dimensioni) è stato usato un gel al 15% di poliacrilammide, mentre nel caso di PARP è stato utilizzato un gel all'8% di poliacrilammide (tabella 3).

	<b>5 ml di GEL al 15%</b>	<b>5 ml di GEL all'8%</b>
H <sub>2</sub> O	1,78 ml	2,6 ml
40% Acril/bisAcr 37:5:1	1,87 ml	1 ml
Tris 1.5M pH 8,8 (Invitrogen)	1,25 ml	1,25 ml
SDS 10% (BDH)	0,05 ml	0,05 ml
APS 10% (BDH)	0,05 ml	0,05 ml
TEMED (SIGMA-Aldrich)	0,003 ml	0,003 ml

Tabella 3: componenti del Separating Gel al 15% e all'8% e relative quantità.

- Stacking gel: preparato con Acril/bisAcr 37:5:1, concentrazione 40% (tabella 4).

	<b>4 ml di GEL al 5%</b>
H <sub>2</sub> O	2,9 ml
40% Acril/bisAcr 37:5:1	0,5 ml
Tris 1.5M pH 8,8 (Invitrogen)	0,5 ml
SDS 10% (BDH)	0,04 ml
APS 10% (BDH)	0,04 ml
TEMED (SIGMA-Aldrich)	0,003 ml

Tabella 4: componenti dello Stacking Gel al 5% e relative quantità.

### 3.3.6.3 Corsa elettroforetica

Un volume corrispondente a 40 µg di proteine nel caso della frazione citoplasmatica e di 20 µg nel caso della frazione nucleare viene unito ad un

isovolume di Laemmli Buffer e posto per 5 minuti in termociclature a 95° C per la completa denaturazione.

Successivamente, dopo aver preparato la cella di corsa con il gel di poliacrilammide immerso in Running Buffer, i campioni e il marker di riferimento (BioRad, Hercules, CA) vengono caricati nei pozzetti. La corsa elettroforetica viene effettuata a 30 mA costanti, a temperatura ambiente. Alla fine della corsa si procede al trasferimento delle proteine.

*Composizione del Laemmli Buffer (1 ml):*

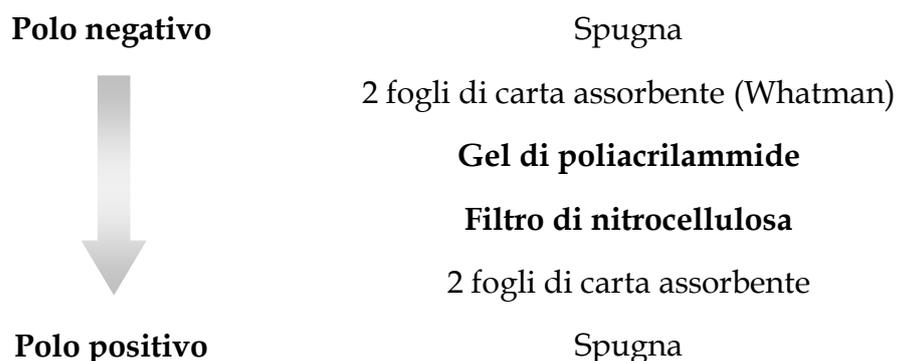
- Tris HCl pH 6,8 (Invitrogen) 950  $\mu$ l
- Glicerolo (BDH) 20%
- SDS (BDH) 10%
- Bromofenolo (BDH) 10%
- $\beta$ -Mercaptoetanololo (BDH) 50  $\mu$ l

*Composizione del Running Buffer:*

- Tris base (Invitrogen) 25 mM
- Glicina (Invitrogen) 250 mM
- SDS 10% 0,1%

3.3.6.4 Trasferimento su filtro di nitrocellulosa

Le proteine vengono trasferite dal gel ad un supporto solido, in questo caso un filtro di nitrocellulosa (BioRad, Hercules, CA). Il trasferimento avviene preparando una serie di strati (sandwich) all'interno di un supporto grigliato secondo l'ordine:



Il sandwich viene inserito nella cella, quindi viene aggiunto il Transfer Buffer e si procede al trasferimento, a 200 mA costanti per 2-3 ore a 4° C. Al termine si effettua la colorazione della membrana con il Rosso Ponceau, che consente la visualizzazione delle bande per verificare l'avvenuto trasferimento dei campioni.

*Composizione del Transfer Buffer (1 l):*

- *Tris base 3 g*
- *Glicina 14,4 g*
- *SDS (BDH) 10%*
- *Metanolo (SIGMA) 200 ml*

*Composizione del Rosso Ponceau 10x (100 ml):*

- *Rosso Ponceau (BDH) 2 g*
- *Acido Tricloroacetico (BDH) 30 g*
- *Acido Sulfosalicilico (SIGMA) 30 g*

### 3.3.6.5 Immunoblot

Dopo alcuni lavaggi con TBS-Tween20 per eliminare la colorazione del Rosso Ponceau, la membrana viene immersa in una soluzione di latte (Biorad) al 6% in TBS-Tween20 per 1-2 ore in agitazione, allo scopo di bloccare tutti i siti aspecifici sul filtro per diminuire il background (bloccaggio).

Al termine del bloccaggio, si effettuano altri lavaggi con TBS-Tween20, quindi la membrana viene incubata per circa un'ora a temperatura ambiente con anticorpo primario anti-Caspasi-3 (Cell Signaling Technology), anti-Bcl-2 (Santa Cruz) oppure anti-PARP (Cell Signaling Technology) diluito in latte al 4% in TBS-Tween20. Seguono, poi, alcuni lavaggi prima di incubare di nuovo il filtro in una soluzione di anticorpo secondario coniugato con l'HRP (Horse Radish Peroxidase) diretto verso il primario e diluito in latte al 3% in TBS-Tween20. L'incubazione è effettuata per circa 1 ora a temperatura ambiente. Dopo gli ultimi lavaggi la membrana è pronta per essere sviluppata.

*TBS-Tween20 (0,025%):*

*Vengono uniti 100 ml di Soluzione A a 5 ml di Soluzione B a cui si aggiungono 500  $\mu$ l di tensioattivo Tween20 (SIGMA) e si porta a volume di 1 litro con acqua MilliQ.*

*Composizione della Soluzione A 10x, pH 7,5, 1 l:*

- NaCl (BDH) 80 g
- KCl (BDH) 3,8 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (BDH) 2 g
- Tris base 30 g

*Composizione della Soluzione B 200x, 1 l:*

- CaCl<sub>2</sub> (Sigma) 30 g
- MgCl<sub>2</sub> (BDH) 20 g

#### 3.3.6.6 Sviluppo

Lo sviluppo viene effettuato in camera oscura con 3 ml di luminolo (Santa Cruz Biotechnology), che reagisce con la perossidasi di radice di rafano (Horse Radish Peroxidase, HRP), l'enzima presente sull'anticorpo secondario, dando un segnale luminescente che impressiona la lastra fotografica (Amersham, GE Healthcare, UK).

Al termine delle analisi, la membrana viene ibridizzata con anticorpi diretti contro proteine housekeeping, quale l'actina (per i gels di proteine citoplasmatiche) allo scopo di verificare l'isocaricamento dei campioni. Tale verifica serve per confermare il fatto che una maggiore o minore intensità della banda di interesse dipenda esclusivamente dall'espressione della proteina studiata e non da differenze nella quantità di proteine caricate.

### **3.4 STUDIO DELL'ESPRESSIONE DELLE METALLOTIONEINE INTRACELLULARI**

E' stato messo a punto un protocollo per l'analisi citofluorimetrica dei livelli relativi intracellulari di metallotioneine (MTs) nelle due principali sottopopolazioni linfocitarie (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>) in presenza di diverse

concentrazioni di zinco *in vitro*. Il protocollo si basa sulla marcatura contemporanea delle MTs intracellulari e dei due antigeni linfocitari di superficie (modificato da Yurkow e Makhijani, 1998).

### **3.4.1 Allestimento delle colture cellulari per lo studio dell'espressione delle MTs**

Per lo studio dell'espressione delle MTs, le cellule mononucleate separate come descritto nel paragrafo 3.2.1 sono poste in coltura in piastre multiwell da 24 pozzetti ( $1 \times 10^6$  cellule/ml) con diverse concentrazioni di zinco secondo il seguente protocollo:

- 1) Cellule coltivate in terreno completo per 24 e 48 ore in incubatore al 5% di CO<sub>2</sub> a temperatura di 37° C. Questo campione è utilizzato come controllo per verificare l'espressione basale di MTs;
- 2) Cellule coltivate nelle stesse condizioni descritte al punto 1 con l'aggiunta di una soluzione di ZnSO<sub>4</sub> alla concentrazione finale 12,5 µM;
- 3) Cellule coltivate nelle stesse condizioni descritte al punto 1 con l'aggiunta di una soluzione di ZnSO<sub>4</sub> alla concentrazione finale 31,25 µM;
- 4) Cellule coltivate nelle stesse condizioni descritte al punto 1 con l'aggiunta di una soluzione di ZnSO<sub>4</sub> alla concentrazione finale 62,5 µM;
- 5) Cellule coltivate nelle stesse condizioni descritte al punto 1 con l'aggiunta di una soluzione di ZnSO<sub>4</sub> alla concentrazione finale 93 µM;
- 6) Cellule coltivate nelle stesse condizioni descritte al punto 1 con l'aggiunta di una soluzione di ZnSO<sub>4</sub> alla concentrazione finale 125 µM.

### **3.4.2 Marcatura delle MTs intracellulari**

- Dopo 24 e 48 ore di coltura, circa  $5 \times 10^5$  cellule vengono raccolte, lavate con 2 ml di PBS e centrifugate a 600 g per 5 minuti a 4° C;
- Dopo aver decantato, il pellet viene risospeso in 2 ml di una soluzione di PFA 0,3% e incubato a 4° C per una notte per la fissazione;

- Al termine dell'incubazione le cellule vengono centrifugate a 800 g per 5 minuti a 4° C;
- Dopo aver aspirato il surnatante, il pellet viene risospeso in 1 ml di soluzione di permeabilizzazione e incubato per 15 minuti a temperatura ambiente;
- Al termine dell'incubazione, il campione viene centrifugato a 800 g per 5 minuti a 4° C;
- Seguono 2 lavaggi con 3 ml di Staining Buffer (centrifuga 800 g, 5 minuti a 4° C);
- Dopo aver aspirato il surnatante, il pellet viene risospeso in 295 µl di Staining Buffer, si aggiungono 5 µl di anticorpo primario per varie isoforme di MTs (clone E9, DAKO, USA). A questo punto, il campione viene incubato per 30 minuti a temperatura ambiente;
- Seguono 2 lavaggi con 3 ml di Staining Buffer (centrifuga 800 g, 5 minuti a 4° C);
- Dopo aver aspirato il surnatante, il pellet viene risospeso in 295 µl di Staining Buffer, si aggiungono 5 µl di anticorpo secondario Goat anti-mouse Ig FITC (BD). A questo punto, il campione viene incubato per 30 minuti a temperatura ambiente;
- Si effettua 1 lavaggio con 3 ml di Staining Buffer (centrifuga 800 g, 5 minuti a 4° C e, dopo aver aspirato il surnatante si risospende il pellet in 200 µl di PBS.

*Composizione della soluzione di fissazione:*

- PFA 0,3%
- In PBS

*Composizione della soluzione di permeabilizzazione:*

- FCS 3%
- Sodio Azide 0,1% (BDH)
- Saponina 0,1%
- In PBS

*Composizione dello staining buffer:*

- FCS 3%
- Sodio Azide 0,1%
- In PBS

### **3.4.2 Marcatura degli antigeni di superficie**

- Si aggiungono gli anticorpi di superficie:
  - 5 µl di anticorpo monoclonale anti-CD4 marcato con Quantum Red (SIGMA);
  - 5 µl di anticorpo monoclonale anti-CD8 marcato con Ficoeritrina (SIGMA);
- Il campione viene incubato per 40 minuti a 4° C al buio vortexando a metà dell'incubazione;
- Seguono 2 lavaggi con 2 ml di PBS (centrifuga 800g per 5 minuti a 4° C);
- Dopo aver aspirato il surnatante e risospeso il pellet in 300 µl di PBS i campioni sono pronti per l'acquisizione al citofluorimetro.

Al citofluorimetro, sono state acquisite  $10^5$  cellule per ogni campione all'interno del gate elettronico dei linfociti, determinato tramite i parametri fisici di FSC e SSC. L'analisi è stata svolta con il software Cell Quest: le cellule che esprimono le metallotioneine risultano positive per la fluorescenza 1 (FL-1), quelle che esprimono il CD8 per la fluorescenza 2 (FL-2) e, infine, le cellule che esprimono il CD4 appaiono positive per la fluorescenza 3 (FL-3).

## **3.5 STUDIO DEL CICLO CELLULARE**

### **3.5.1 Allestimento delle colture cellulari per lo studio del ciclo cellulare**

Per gli studi relativi al ciclo cellulare, le cellule vengono seminate alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml e stimolate per 48 e 72 ore in incubatore al 5% di CO<sub>2</sub> a temperatura di 37° C con PMA (Phorbol Myristate Acetate, SIGMA-Aldrich, Ayrshire, UK) alla concentrazione finale di 50 ng/ml e Ionomicina 1 µM,

in assenza o in presenza di diverse concentrazioni di  $ZnSO_4$  (12,5  $\mu M$ ; 31,25  $\mu M$ ; 62,5  $\mu M$ ; 125  $\mu M$ ).

Le cellule sono raccolte dopo 48 e 72 ore di coltura e sottoposte ad analisi citofluorimetrica biparametrica atta a valutare le varie fasi del ciclo cellulare.

### 3.5.2 Analisi del ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è stato studiato mediante analisi biparametrica in citometria a flusso volta a valutare le diverse fasi del ciclo utilizzando il contenuto di DNA (PI) e l'incorporazione di Bromo-deossi-Uridina (BrdU). La BrdU, un analogo della timidina, è utilizzata dalle cellule in fase S durante la sintesi del DNA. Il Propidio Ioduro, invece, lega stechiometricamente il DNA, consentendo di valutarne la quantità all'interno delle cellule. Le cellule in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hanno un contenuto di DNA 2c e sono negative per la BrdU, quelle in G<sub>2</sub>/M hanno un contenuto di DNA 4c e sono negative per la BrdU, mentre quelle in fase S hanno un contenuto di DNA intermedio e sono positive per la BrdU. Pertanto, tale analisi permette di valutare le percentuali di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. In figura 18 è mostrato un esempio di analisi del ciclo cellulare effettuata con tale metodica:

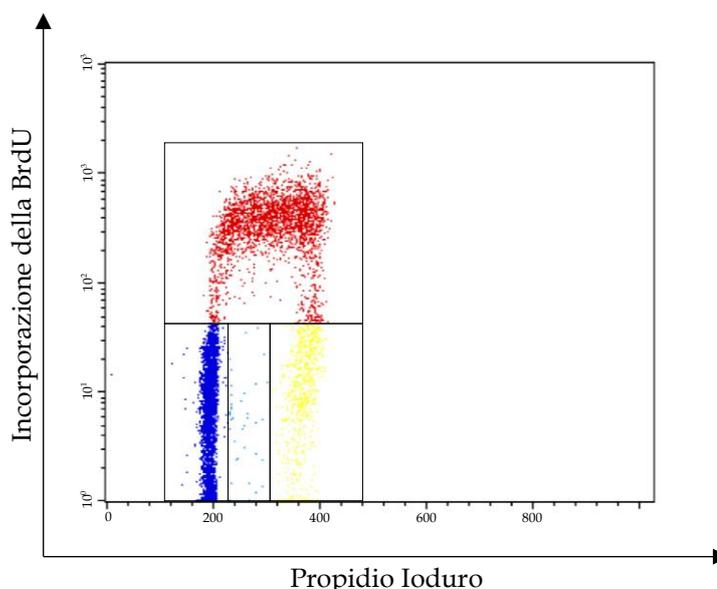


Figura 18: esempio di analisi citofluorimetrica delle varie fasi del ciclo cellulare. In blu sono rappresentate le cellule in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (contenuto di DNA 2c e negative per la BrdU); in rosso le cellule in fase S (contenuto intermedio di DNA e positive per la BrdU); in giallo le cellule in fase G<sub>2</sub>/M (contenuto di DNA 4c e negative per la BrdU); in azzurro le cellule S/BrdU<sup>-</sup> (contenuto intermedio di DNA e negative per la BrdU).

La procedura seguita è la seguente:

- 30 minuti prima che le cellule vengano raccolte, si aggiungono 20  $\mu$ l di BrdU 0,5 M (SIGMA-Aldrich, Ayrshire, UK) al terreno di coltura;
- Le cellule sono trasferite in tubi di polipropilene e lavate con 2 ml di Tween20 (SIGMA-Aldrich, Ayrshire, UK) 0,5% in PBS freddo;
- I campioni sono vortexati e centrifugati a 500 g per 2 minuti a 4° C, quindi sono decantati per rovesciamento e di nuovo vortexati;
- Le cellule sono risospese in 200  $\mu$ l di Tween20 0,5% in PBS freddo;
- Si aggiungono 1,8 ml di Tween20 0,5% in PBS freddo, quindi i campioni sono di nuovo vortexati e centrifugati a 500 g per 2 minuti a 4° C;
- Dopo la decantazione, i campioni sono risospesi in 500  $\mu$ l di Tween20 0,5% in PBS freddo e 500  $\mu$ l di HCl 4N per denaturare il DNA;
- I campioni sono vortexati e quindi incubati per 30 minuti a temperatura ambiente;
- I campioni sono vortexati e centrifugati a 500 g per 2 minuti a 4° C, quindi sono decantati per rovesciamento e di nuovo vortexati;
- Viene aggiunto 1 ml di Tampone Borax 0,1 M per tamponare l'acido, quindi si procede ad una nuova centrifuga come sopra;
- I campioni sono risospesi in 200  $\mu$ l di Tween20 0,5% in PBS freddo, quindi sono aggiunti 5  $\mu$ l di anticorpo monoclonale anti-BrdU (BD, San José, CA);
- I campioni sono incubati per 1 ora al buio a 4° C;
- Si aggiungono 2 ml di Tween20 0,5% in PBS freddo e si centrifuga a 500 g per 2 minuti a 4°C, quindi i campioni sono decantati per rovesciamento e di nuovo vortexati (si ripete tale operazione per 3 volte);
- I campioni sono risospesi in 200  $\mu$ l di Tween20 0,5% in PBS freddo a cui sono aggiunti 5  $\mu$ l di anticorpo secondario Goat anti-mouse Ig FITC (BD, San José, CA);
- I campioni sono incubati per 30 minuti al buio a 4° C;

- Si effettuano 3 lavaggi come sopra, quindi i campioni sono risospesi in 150 µl di Tween20 0,5% in PBS freddo e 150 µl di soluzione tampone contenente Propidio Ioduro per ciclo cellulare;
- I campioni sono incubati a 4° C per 15 minuti, al termine dei quali sono pronti per l'acquisizione al citofluorimetro.

*Composizione del Tampone Propidio Ioduro:*

- *Trisodio Citrato (BDH) 3,4 mM*
- *NaCl (BDH) 9,65 mM*
- *Propidio Ioduro (SIGMA-Aldrich) 20 µg/ml*
- *Detergente NP40 (SIGMA-Aldrich) 0,03%*

### **3.6 ANALISI DEL POLIMORFISMO AL CODONE 72 DI p53**

Per verificare se lo zinco *in vitro* possa avere effetti sul diverso comportamento età-correlato delle due varianti polimorfiche di p53 sulla propensione all'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo e sul ciclo cellulare, tutti i soggetti sono stati genotizzati e l'apoptosi e il ciclo cellulare sono stati valutati dividendo i soggetti sulla base del polimorfismo. La procedura comporta l'estrazione del DNA dai granulociti dei soggetti reclutati, seguita da amplificazione della regione codificante p53 mediante tecnica PCR e, infine, restrizione con un opportuno enzima di restrizione (BstUI) in grado di discriminare tra i due polimorfismi al codone 72 del gene.

#### **3.6.1 Estrazione del DNA**

L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il QIAmp Midi Kit (QIAGEN, Germantown, Maryland), che permette di estrarre il DNA genomico da 1-2 ml di sangue intero o granulociti. Il protocollo seguito nel presente studio prevede l'utilizzo di 2 ml di granulociti, estratti secondo la metodologia indicata al paragrafo 3.2.1 e conservati a -80° C. La procedura eseguita è la seguente:

- Si aggiungono 200 µl di QIAGEN Protease a 2 ml di granulociti e si vortexa brevemente;

- Ad ogni campione sono aggiunti 2,4 ml di Buffer AL (buffer di lavaggio fornito dal kit), quindi si vortexa 3 volte per 5 secondi in modo da ottenere una soluzione omogenea;
- I campioni sono incubati a 70° C per 10 minuti;
- Sono aggiunti ad ogni campione 2 ml di etanolo puro (96%);
- Metà della soluzione ottenuta (circa 3,3 ml) viene trasferita nell'apposita colonnina (QIAamp Midi Column);
- I campioni nelle colonnine sono centrifugati a 1850 g per 3 minuti a temperatura ambiente, al termine dei quali la colonnina è temporaneamente rimossa per scartare il filtrato. Quindi si aggiunge il resto della soluzione e si procede di nuovo come sopra;
- Sono aggiunti 2 ml di Buffer AW1 (buffer di lavaggio) ad ogni colonnina, quindi si centrifuga a 4490 g per 1 minuto a temperatura ambiente;
- Sono aggiunti 2 ml di Buffer AW2 (buffer di lavaggio) e si effettua una centrifuga come sopra, e si aggiungono 300 µl di Buffer AE (buffer di eluizione) direttamente sulle colonnine;
- I campioni, incubati a temperatura ambiente per 5 minuti, vengono successivamente centrifugati a 4490 g per 5 minuti a temperatura ambiente;
- Per migliorare la resa di DNA, 300 µl di eluato vengono ricaricati sulle stesse colonnine, incubati a temperatura ambiente per 5 minuti e, infine, centrifugati a 4490 g per 5 minuti a temperatura ambiente;
- L'eluato viene conservato a 4° C.

La quantificazione del DNA viene effettuata tramite misura dell'assorbanza allo spettrofotometro a 260 nm, mentre il rapporto di assorbanza 260/280 nm indica la purezza del campione. Sono prelevati 2 µl di ogni campione, ai quali si aggiungono 298 µl di acqua MilliQ: la miscela così ottenuta è pronta per essere letta allo spettrofotometro.

### 3.6.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR) su DNA genomico per la genotipizzazione del Codone 72 di p53

La reazione a catena della polimerasi (Polimerase Chain Reaction, PCR) è un metodo *in vitro* rapido e versatile che permette l'amplificazione selettiva di sequenze bersaglio presenti su un campione di DNA. Per fare ciò è necessario costruire 2 oligonucleotidi di 15-20 bp (base pairs) da utilizzare come innesco (primer) per la reazione. Questi primers si legano alle sequenze di DNA complementari e, in presenza dei di-deossi-nucleotidi trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e di una DNA polimerasi termostabile (Taq polimerasi), possono dare inizio alla sintesi di nuovi filamenti di DNA. I filamenti neo-sintetizzati a loro volta agiscono da stampo per ulteriori cicli di amplificazione, originando esponenzialmente copie della sequenza bersaglio specifica.

Il buon esito della reazione di amplificazione dipende da vari fattori, tra cui l'esatta concentrazione di cofattori utilizzati dalla polimerasi (come il magnesio) e dalla specificità dei primers per la sequenza bersaglio. In genere questi ultimi hanno una lunghezza di circa 20 nucleotidi che permette di escludere l'appaiamento perfetto in altri punti del DNA al di fuori della sequenza specifica. E' necessario, inoltre, che i primers abbiano una temperatura di melting ( $T_m$ ) simile per appaiarsi al DNA stampo, strettamente correlata al rapporto GC/AT della sequenza. Occorre, poi, escludere la presenza di ripetizioni all'interno dei primers, che possono portare ad appaiamenti e alla formazione di strutture secondarie, e la complementarietà tra le basi poste al 3', da cui si originano dimeri di primers che riducono l'efficienza della reazione.

Il protocollo per la determinazione del genotipo relativo al codone 72 di p53 prevede un passaggio di amplificazione mediante PCR della sequenza di DNA genomico che comprende l'esone 4 del gene. La reazione di amplificazione è stata eseguita utilizzando i seguenti primers:

5' - GACCCAGGTCCAGATGAAGCT - 3'

3' - ACCGTAGCTGCCCTGGTAGGT - 5'

Il protocollo seguito prevede la preparazione di una miscela di reazione del volume finale di 50 µl contenente:

- 12,5 pmoli di ciascun primer (Roche, Nutley, NJ);

- MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM;
- Una miscela dei 4 di-deossi-ribonucleotidi trifosfato 0,1 mM;
- 0,5 unità dell'enzima r-Taq DNA polimerasi (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA);
- 5 µl di Buffer 10X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Dopo l'aggiunta di 250 ng di DNA genomico, la miscela di reazione viene sottoposta ad una pre-denaturazione iniziale (96° C per 3 minuti), cui fanno seguito 33 cicli di amplificazione costituiti da:

- ◆ 94° C per 1 minuto (denaturazione);
- ◆ 63° C per 1,5 minuti (appaiamento dei primers);
- ◆ 72° C per 1,5 minuti (estensione della sequenza).

La reazione viene ultimata con un passaggio di estensione finale a 72° C per 2 minuti che consente il completamento della sintesi. Tale reazione permette di ottenere un elevato numero di copie della sequenza di 155 bp situata nell'esone 4, che contiene il codone 72.

Una volta ottenuto il frammento in questione, lo si sottopone a digestione enzimatica con l'enzima BstUI (Fermentas, Burlington, Canada). La miscela di reagenti è composta da:

- 15 µl del volume di reazione di amplificazione;
- 2 µl di Buffer specifico 10X;
- 1 µl di acqua MilliQ;
- 10 unità di BstUI.

La miscela di reazione viene incubata per 18 ore a 60° C. I frammenti ottenuti vengono quindi visualizzati per mezzo di una corsa elettroforetica su gel di Agarosio Seakem (FMC) al 2% in tampone TBE 0,5X, ottenuto dalla diluizione della soluzione madre:

- 54 g di Tris base (Invitrogen);
- 27,5 g di acido ortoborico (BDH, Poole, UK);
- 20 ml di EDTA 0,5 M a pH 8 (IBI, Shelton, CT);
- acqua MilliQ (per portare al volume finale di 1 litro).

Al gel di agarosio, prima della sua solidificazione, si aggiunge Bromuro di Etidio (Invitrogen, 1 µl di una soluzione 10 mg/ml ogni 20 ml di gel), un composto che lega il DNA intercalandosi stechiometricamente tra le basi appaiate, ed emette fluorescenza arancione ai raggi UV consentendo di individuare i diversi frammenti che hanno migrato nel gel. Ai campioni di DNA è aggiunto un colorante (10 % di glicerolo, 0,25 % blu di bromofenolo, 0,25 % di xilene cianolo) che, da un lato, aumenta la densità del campione facilitando l'ingresso del DNA nei pozzetti, e dall'altro, permette di seguire la migrazione dei campioni durante la corsa. Si utilizzano anche specifici marcatori di DNA (BioRad, Hercules, CA) costituiti da frammenti di lunghezza compresa tra le 20 e le 1000 bp per individuare il prodotto di interesse. La migrazione ha luogo grazie all'applicazione di una differenza di potenziale tra i 2 poli della cella elettroforetica ed è caratterizzata da una differente velocità di corsa del frammento inversamente proporzionale al logaritmo del peso molecolare. L'assenza dei siti di restrizione sul frammento (sequenza CCCG) consente la visualizzazione sul gel di un unico frammento di 155 bp. La presenza del sito di restrizione (CGCG) determina, invece, la visualizzazione di 2 frammenti, rispettivamente di 108 e 47 bp. In base alla presenza/assenza del sito di restrizione è possibile classificare i 3 genotipi:

- 1 unica banda a 155 bp. Non sono presenti siti di restrizione e il soggetto è omozigote Pro/Pro;
- 2 frammenti a 108 e 47 bp. Il soggetto possiede il sito di restrizione su entrambi gli alleli ed è, perciò, omozigote Arg/Arg;
- 3 frammenti a 155, 108 e 47 bp. Un allele possiede il sito di restrizione, mentre l'altro no; il soggetto è, pertanto, eterozigote per il polimorfismo al codone 72 di p53.

### **3.7 ANALISI STATISTICA**

Per tutte le analisi statistiche è stato utilizzato il programma SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL) per Windows.

### **3.7.1 Analisi ematochimiche**

Dopo aver effettuato un test per verificare l'omogeneità della varianza tra i tre gruppi di età, è stato applicato un test Oneway ANOVA. L'analisi post-hoc è stata compiuta per mezzo di un test Tukey. In particolare, risultati con  $p < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi e i dati sono stati espressi come  $\text{media} \pm \text{S.E.M.}$

### **3.7.2 Analisi dei livelli di zinco sierico**

La varianza tra i tre gruppi di età non è risultata omogena. Sono stati quindi applicati i test statistici non parametrici Kruskal Wallis e Mann-Whitney per individuare eventuali differenze significative tra i tre gruppi di età.

In particolare, risultati con  $p < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi e i dati sono stati espressi come  $\text{media} \pm \text{S.E.M.}$

### **3.7.3 Analisi citofluorimetriche**

I dati ottenuti dalle analisi citofluorimetriche sono stati analizzati con il test statistico  $t$  di Student per dati appaiati nel caso di confronto tra diversi trattamenti e con il test  $t$  di Student per dati non appaiati nel caso di confronto tra i diversi gruppi di età. In particolare, risultati con  $p < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi e tutti i dati sono espressi come  $\text{media} \pm \text{S.E.M.}$

## **4. RISULTATI**

## 4.1 ANALISI EMATOCHIMICHE

Dai risultati ottenuti dal breve questionario somministrato, è risultato che tutti i soggetti reclutati possiedono buone abilità cognitive e motorie, non presentano patologie neoplastiche clinicamente evidenti, insufficienza renale, anemia, disordini autoimmuni o patologie immunitarie. Le medie dei valori delle analisi ematologiche di routine di ogni gruppo di età sono riportate in tabella 5. Anche questi dati confermano che, in generale, i soggetti reclutati sono in buono stato di salute. Tuttavia, nei nonagenari maschi si osserva un valore medio di VES leggermente superiore ai valori di riferimento e negli anziani un valore medio di colesterolo totale che supera lievemente i valori normali. A questo riguardo è importante sottolineare che il valore di HDL risulta comunque normale.

	Giovani (Media $\pm$ S.E.M.)	Anziani (Media $\pm$ S.E.M.)	Nonagenari (Media $\pm$ S.E.M.)	Valori di riferimento
<b>Età</b>	29 $\pm$ 1 anni	73 $\pm$ 1 anni	93 $\pm$ 1 anni	
<b>Sesso</b>	16 F / 9 M	22 F / 20 M	21 F / 12 M	
<b>Leucociti</b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	7,1 $\pm$ 0,6	6,1 $\pm$ 0,1	6,8 $\pm$ 0,3	4.00-9.00
<b>Eritrociti</b> ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	5,0 $\pm$ 0,2 (M) 4,6 $\pm$ 0,1 (F)	4,9 $\pm$ 0,1 (M) 4,7 $\pm$ 0,1 (F)	4,5 $\pm$ 0,1 (M) 4,3 $\pm$ 0,1 (F)	4.40-5.60 (M) 4.00-5.00 (F)
<b>Emoglobina</b> (g/dL)	14,8 $\pm$ 0,5 (M) 13 $\pm$ 0,2 (F)	14,3 $\pm$ 0,2 (M) 13,6 $\pm$ 0,2 (F)	13,8 $\pm$ 0,4 (M) 12,8 $\pm$ 0,3 (F)	13.0-16.5 (M) 12.0-15.0 (F)
<b>Ematocrito</b> (%)	43,5 $\pm$ 1,6 (M) 39,2 $\pm$ 0,7 (F)	42,6 $\pm$ 0,6 (M) 40,9 $\pm$ 0,7 (F)	41,9 $\pm$ 1,2 (M) 38,5 $\pm$ 0,7 (F)	38.5-48.5 (M) 35.5-44.0 (F)
<b>Piastrine</b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	272,9 $\pm$ 21,4	239,1 $\pm$ 9,6	230 $\pm$ 10,3	150-380
<b>VES</b> (mm/h)	--	15,5 $\pm$ 4,1 (M) 24,8 $\pm$ 2,2 (F)	22,1 $\pm$ 4,4 (M) 32,3 $\pm$ 3,9 (F)	0-20 (M) 0-36 (F)
<b>Creatinina</b> (mg/dL)	0,9 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,1	0.50-1.20
<b>Glucosio</b> (g/L)	0,8 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	0.6-1.1
<b>Colesterolo totale</b> (mg/dL)	166,5 $\pm$ 8,1	219 $\pm$ 5,7	188,7 $\pm$ 6,7	<200
<b>HDL</b> (mg/dL)	64,7 $\pm$ 6,7 (M) 65,5 $\pm$ 4,4 (F)	57,9 $\pm$ 1,9 (M) 66,7 $\pm$ 3,7 (F)	59,1 $\pm$ 4,1 (M) 58,9 $\pm$ 2,5 (F)	>35 (M) >45 (F)
<b>Trigliceridi</b> (mg/dL)	74,5 $\pm$ 10,4	133,8 $\pm$ 9,2	106 $\pm$ 9,1	74-172
<b>Albumina</b> (g/dL)	4,5 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,0	3,8 $\pm$ 0,1	3.5-5.0

Tabella 5: valori ematochimici dei soggetti reclutati. I dati sono espressi come Media  $\pm$  E.S dei tre gruppi di età considerati.

Gli istogrammi rappresentati in figura 19 riportano valori medi delle analisi ematochimiche e l'analisi statistica dei confronti per ogni gruppo di età. Non si osservano differenze significative tra i tre gruppi di età per quanto riguarda i valori dei leucociti, dell'emoglobina, delle piastrine, della VES, della creatinina, del glucosio e del colesterolo HDL. Al contrario, per quanto riguarda gli eritrociti e l'ematocrito, i soggetti nonagenari di sesso femminile mostrano una diminuzione significativa rispetto agli anziani dello stesso sesso. Anche l'emoglobina mostra la stessa tendenza anche se le differenze tra le classi di età non sono significative. Considerando il colesterolo totale, invece, i soggetti anziani mostrano livelli significativamente più alti sia rispetto ai giovani sia rispetto ai nonagenari. Anche per quanto riguarda i trigliceridi, i soggetti anziani mostrano valori significativamente più alti rispetto ai giovani. L'albumina, invece, mostra una diminuzione significativa con l'avanzare dell'età.

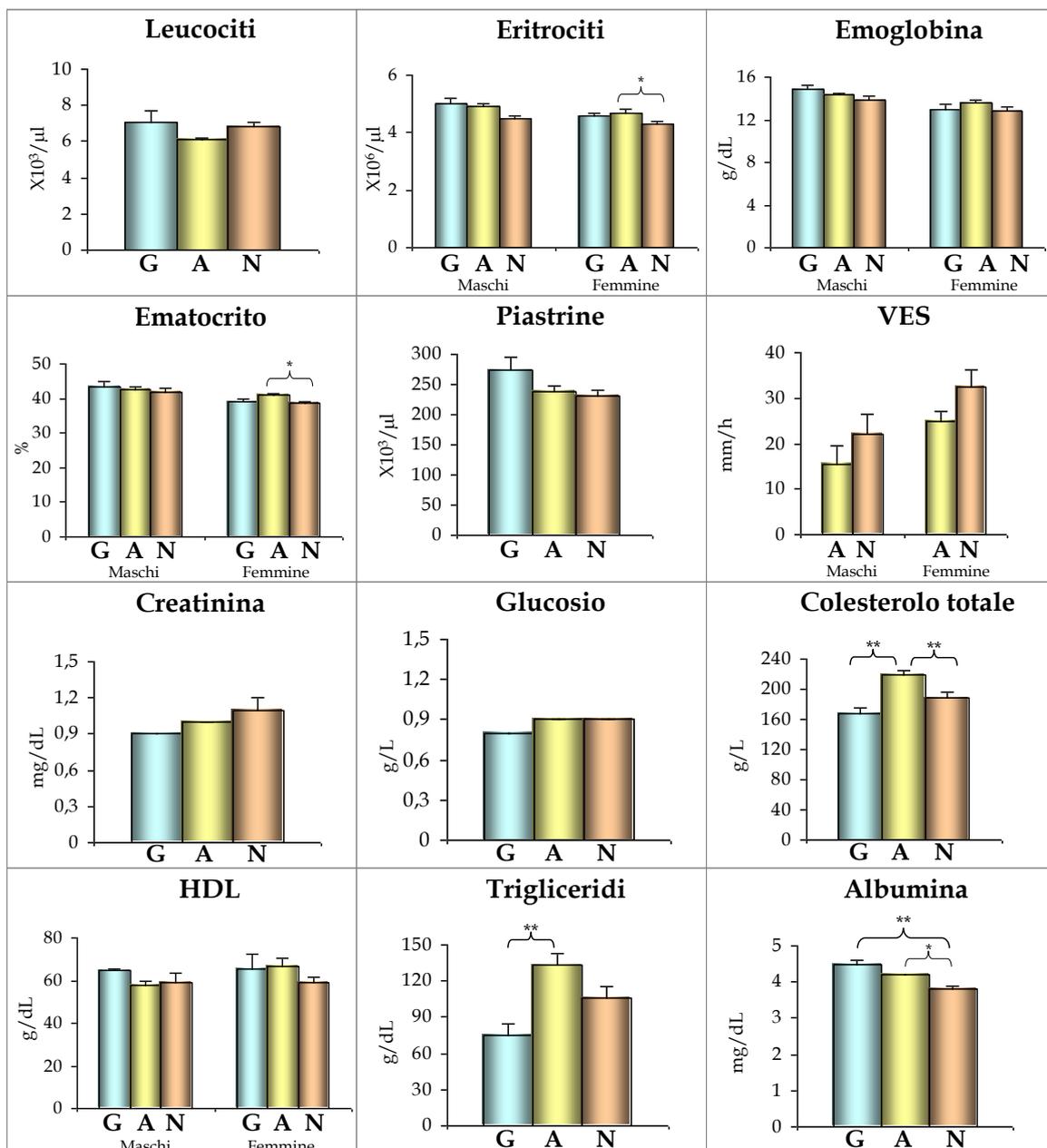


Figura 19: valori delle analisi ematologiche nei giovani (G), negli anziani (A) e nei nonagenari (N). I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. le analisi statistiche sono state effettuate usando il test Tukey; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

## 4.2 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE SIERICA DI ZINCO

Le medie dei valori di zinchemia per ogni gruppo di età sono riportate in tabella 6.

	Giovani (Media ± S.E.M.)	Anziani (Media ± S.E.M.)	Nonagenari (Media ± S.E.M.)	Valori di riferimento
<b>Età</b>	28 ± 1 anni	73 ± 1 anni	93 ± 1 anni	
<b>Sesso</b>	15 F / 8 M	22 F / 14 M	20 F / 13 M	
<b>Zinco (micromoli/L)</b>	14,9 ± 1,0 (M) 11,4 ± 0,8 (F)	12,7 ± 0,4 (M) 12,5 ± 0,4 (F)	10,1 ± 0,7 (M) 9,0 ± 0,5 (F)	11.1-19.5 (M) 10.7-17.5 (F)

Tabella 6: valori di zinchemia dei soggetti reclutati. I valori sono espressi come media ± S.E.M.

I soggetti nonagenari mostrano livelli di zinco sierico significativamente inferiori rispetto ai soggetti giovani e ai soggetti anziani (Figura 20).

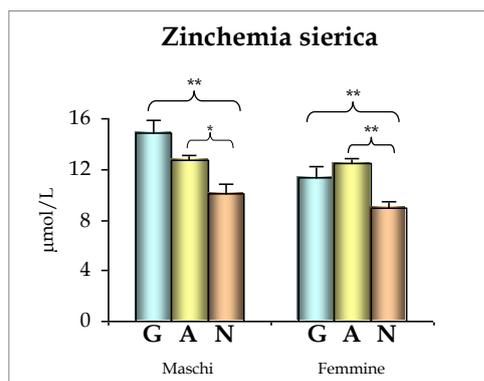


Figura 20: valori di zinchemia nei giovani (G), negli anziani (A) e nei nonagenari (N). I dati sono espressi come media ± S.E.M. le analisi statistiche sono state effettuate usando i test non parametrici Kruskal Wallis e Mann-Whitney; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

I valori individuali di concentrazione di zinco nel siero nei soggetti appartenenti ai tre gruppi di età sono rappresentata in figura 21:

- 4 dei soggetti giovani di sesso femminile sono risultati sotto il range di normalità, al contrario, per tutti i soggetti giovani di sesso maschile sono stati riportati valori di zinco normale;

- 3 dei soggetti anziani di sesso femminile e 2 di sesso maschile mostrano carenza di zinco;
- la maggior parte dei soggetti nonagenari (15 su 20 femmine e 7 su 13 maschi) si trova sotto il range di normalità.

E' da notare la grande variabilità del contenuto sierico di zinco nei soggetti giovani di sesso femminile, quasi certamente relativa ai cambiamenti nello stato ormonale che si verificano durante il ciclo mestruale. La diminuzione dei livelli sierici di zinco osservata nei soggetti nonagenari, invece, può essere spiegata col fatto che, in età avanzata, intervengono fattori quali la dieta inadeguata, il malassorbimento intestinale o la perdita di tale oligoelemento tramite feci o urine.

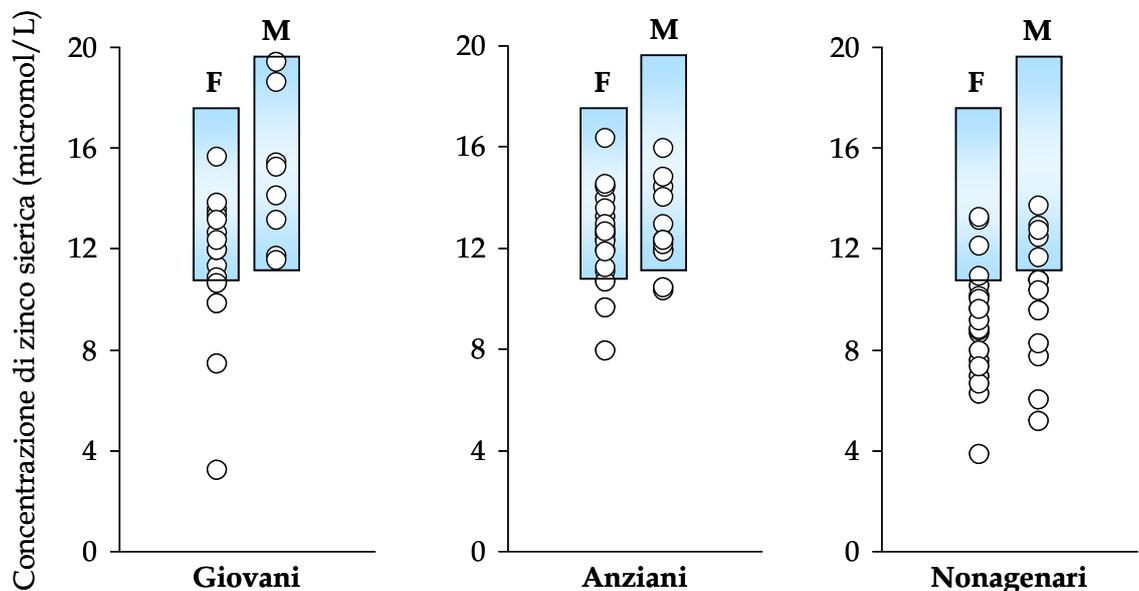


Figura 21: valori individuali di concentrazione sierica di zinco ( $\mu\text{mol/L}$ ) nei tre gruppi di età considerati. Le aree azzurre rappresentano il range di normalità (femmine: 10,7-17,5  $\mu\text{mol/L}$ ; maschi 11,1-19,5  $\mu\text{mol/L}$ ).

## 4.3 STUDIO DELL'APOPTOSI

### 4.3.1 Effetti dello zinco sull'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo

Lo studio dell'apoptosi è stato effettuato sui PBMCs di:

- 25 soggetti giovani (età media  $29 \pm 1$  anni);
- 30 soggetti anziani (età media  $72 \pm 1$  anni);
- 20 soggetti nonagenari (età media  $93 \pm 1$  anni).

E' stata valutata la percentuale di cellule apoptotiche dopo 48 e 72 ore di coltura nelle condizioni indicate al paragrafo 3.3.1.

La suscettibilità all'apoptosi è misurata mediante il test citofluorimetrico biparametrico Annexina V-FITC/Propidio Ioduro (PI), che consente di ottenere un'accurata quantificazione dell'apoptosi e di discriminare tra apoptosi precoce e apoptosi tardiva/necrosi. Questa tecnica è in grado di distinguere tra cellule vive ( $AnxV^-/PI^-$ ), cellule apoptotiche che non presentano ancora alterazioni della permeabilità di membrana ( $AnxV^+/PI^-$ ) e cellule apoptotiche/necrotiche che presentano alterazioni della permeabilità di membrana ( $AnxV^+/PI^+$ ). Le cellule intatte, infatti, hanno la membrana plasmatica integra e non espongono la fosfatidilserina, risultando pertanto negative alla fluorescenza del Propidio Ioduro e dell'Annexina V; le cellule apoptotiche mantengono l'integrità di membrana ma espongono la fosfatidilserina, risultando perciò negative al PI e positive all'Annexina V; le cellule necrotiche, infine, hanno perso l'integrità di membrana e sono quindi positive sia al PI che all'Annexina V. I dati ottenuti dopo 48 e 72 ore di coltura indicano:

#### ⇒ APOPTOSI SPONTANEA

La presenza di zinco riduce l'apoptosi precoce spontanea nei soggetti giovani dopo 48 ore e nei nonagenari dopo 72 ore. Per quanto riguarda i soggetti anziani, lo zinco è in grado di ridurre l'apoptosi tardiva/necrosi spontanea (figura 22).

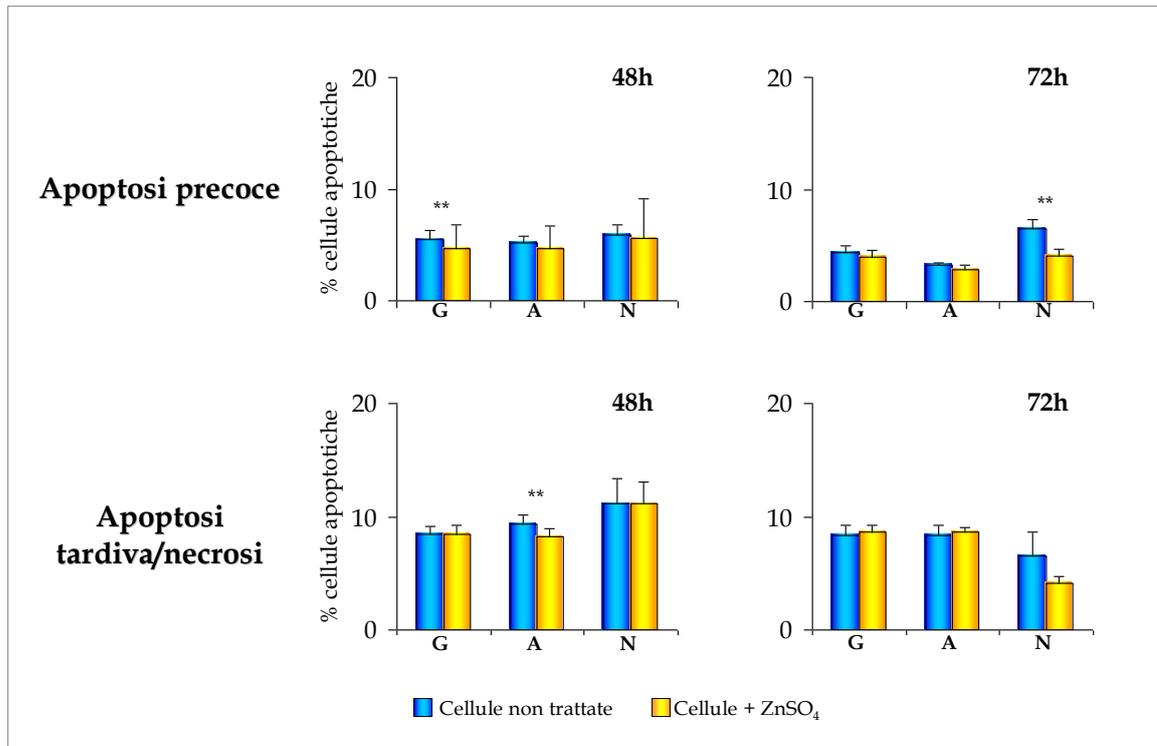


Figura 22: effetti dello zinco sulla suscettibilità all'apoptosi spontanea nei PBMCs, rilevata con marcatura Annexina V/PI, in soggetti giovani (G), anziani (A) e nonagenari (N), dopo 48 e 72 ore di coltura. I pannelli superiori rappresentano le cellule nella fase precoce (Anx<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) di apoptosi, mentre quelli inferiori rappresentano le cellule in fase tardiva (Anx<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

#### ⇒ APOPTOSI dRib-INDOTTA

Lo zinco non sembra avere effetti nella suscettibilità all'apoptosi indotta da stress ossidativo nei soggetti giovani né a 48 né a 72 ore. Nei soggetti anziani tale microelemento, induce una diminuzione dell'apoptosi precoce e in ugual misura ne aumenta l'apoptosi tardiva/necrosi indotta da dRib. Nei nonagenari, infine, lo zinco non influenza l'apoptosi precoce indotta da dRib ma aumenta significativamente l'apoptosi tardiva/necrosi a 48 ore (figura 23). Lo zinco sembra essere, quindi, in grado di influenzare l'apoptosi indotta da stress ossidativo favorendo lo sviluppo di una necrosi secondaria in funzione dell'età del donatore.

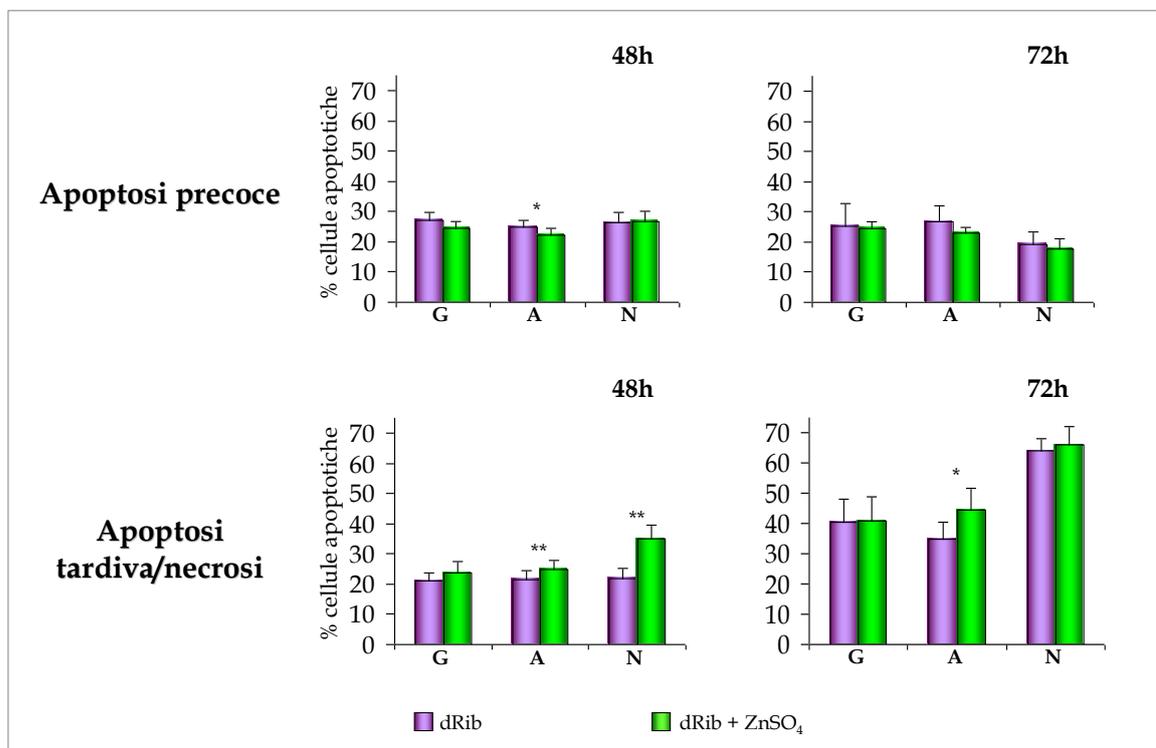


Figura 23: effetti dello zinco sulla suscettibilità all'apoptosi indotta da stress ossidativo nei PBMCs, rilevata con marcatura Annexina V/PI, in soggetti giovani (G), anziani (A) e nonagenari (N), dopo 48 e 72 ore di coltura. I pannelli superiori rappresentano le cellule nella fase precoce (Anx<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) di apoptosi, mentre quelli inferiori rappresentano le cellule in fase tardiva (Anx<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) di apoptosi indotta da stress ossidativo tramite trattamento con dRib 10 mM. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

#### 4.3.2 Effetti dello zinco sulla depolarizzazione mitocondriale

La depolarizzazione mitocondriale, parametro strettamente correlato al processo apoptotico, è stata analizzata sui PBMCs ottenuti dagli stessi soggetti sopra menzionati, tenuti in coltura per 48 e 72 ore nelle condizioni indicate al paragrafo 3.3.1. È stata effettuata un'analisi citofluorimetrica usando la sonda cationica lipofilica JC-1, che è in grado di entrare nei mitocondri formando aggregati nello spazio intermembrana delle cellule normalmente polarizzate (-120/-180 mV); tali aggregati emettono nel rosso/arancio se eccitati da un raggio a 488 nm. Nelle cellule apoptotiche, invece, in conseguenza della depolarizzazione mitocondriale, JC-1 resta in forma monometrica ed emette nel verde. I risultati ottenuti dall'analisi di emissione di fluorescenza mostrano che:

⇒ DEPOLARIZZAZIONE MITOCONDRIALE DURANTE L' APOPTOSI SPONTANEA

Lo zinco non ha effetti significativi sulla depolarizzazione mitocondriale durante l'apoptosi spontanea nei soggetti anziani e nei giovani. Nei nonagenari lo zinco è in grado di diminuire significativamente la depolarizzazione mitocondriale nell'apoptosi spontanea (figura 24).

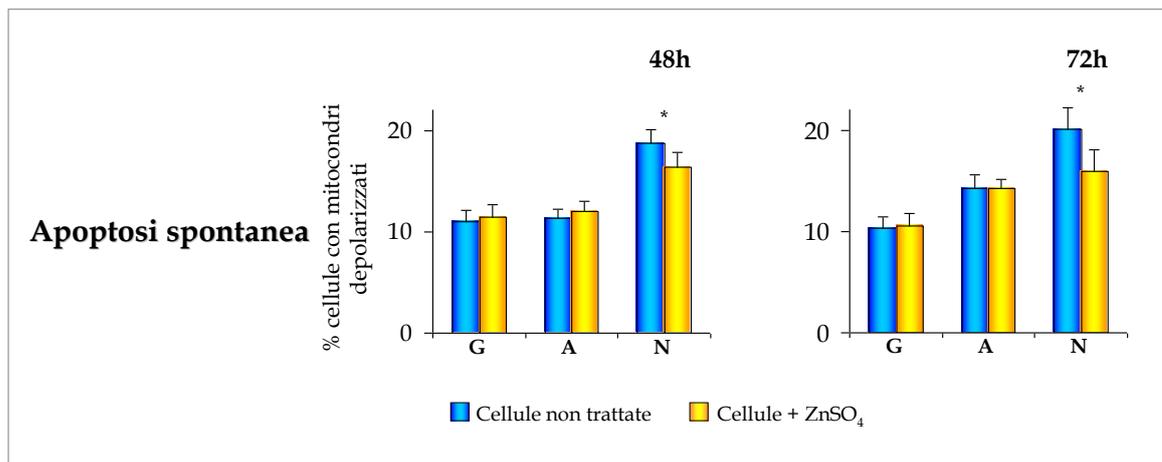


Figura 24: effetto dello zinco sulla depolarizzazione della membrana mitocondriale nei PBMCs rilevato con marcatura JC-1, in soggetti giovani (G), anziani (A) e nonagenari (N), dopo 48 e 72 ore di coltura. Gli istogrammi indicano le percentuali di cellule con mitocondri depolarizzati durante l'apoptosi spontanea. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ .

⇒ DEPOLARIZZAZIONE MITOCONDRIALE DURANTE L' APOPTOSI dRib-INDOTTA

Lo zinco non influenza la funzionalità mitocondriale nelle cellule dei soggetti giovani e anziani, ma aumenta la depolarizzazione mitocondriale durante l'apoptosi indotta da dRib nei nonagenari a 48 ore (figura 25).

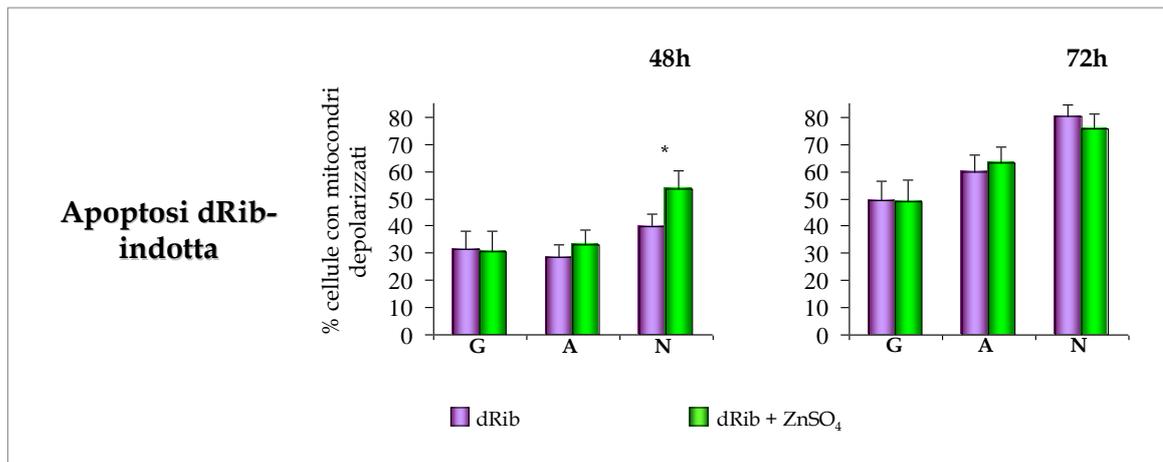


Figura 25: effetto dello zinco sulla depolarizzazione della membrana mitocondriale nei PBMCs rilevato con marcatura JC-1, in soggetti giovani (G), anziani (A) e nonagenari (N), dopo 48 e 72 ore di coltura. Gli istogrammi indicano le percentuali di cellule con mitocondri depolarizzati durante l'apoptosi indotta da dRib. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ .

#### 4.3.3 Effetti dello zinco sul rilascio del Cyt C dal mitocondrio

Il rilascio del Citocromo C (Cyt C) dal mitocondrio è stato rilevato utilizzando una tecnica citofluorimetrica, messa a punto durante lo svolgimento del dottorato, che prevede la permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale, la fissazione delle cellule, la marcatura con un anticorpo monoclonale anti-Citocromo C e con un anticorpo secondario marcato con isotiocinato di fluoresceina (FITC). Questo fenomeno è stato analizzato nei PBMCs di alcuni dei soggetti reclutati (7 giovani, 9 anziani e 4 nonagenari) dopo 48 ore di coltura nelle condizioni indicate al paragrafo 3.3.1. I risultati di queste analisi mostrano che:

##### ⇒ RILASCIO DI CYT C DURANTE L' APOPTOSI SPONTANEA

Lo zinco sembra diminuire il rilascio del Citocromo C dal mitocondrio nei tre gruppi di età considerati (figura 26). Questo dato non è significativo probabilmente a causa dell'esiguo numero di soggetti analizzati.

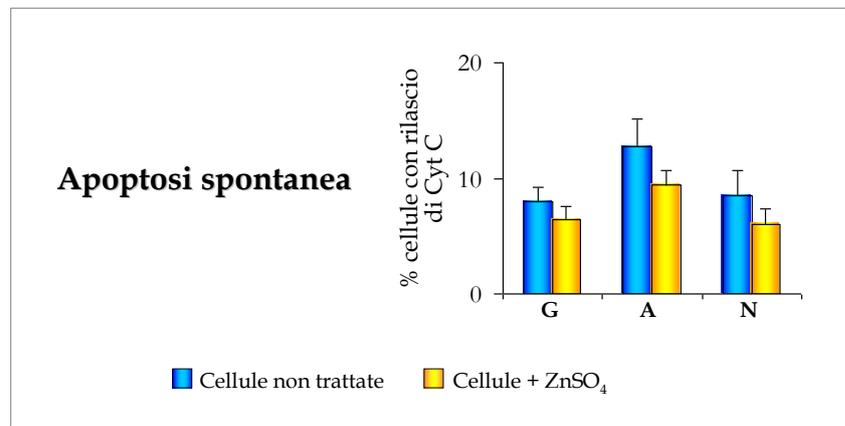


Figura 26: effetto dello zinco sul rilascio del Citocromo C dal mitocondrio durante l'apoptosi spontanea nei PBMCs di soggetti giovani (G), anziani (A) e nonagenari (N) dopo 48 ore di coltura. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati.

⇒ RILASCIO DI CYT C DURANTE L'APOPTOSI dRib-INDOTTA

Lo zinco sembra aumentare il rilascio del Cyt C dal mitocondrio durante l'apoptosi indotta da stress ossidativo, ma anche in questo caso questa tendenza non è significativa (figura 27).

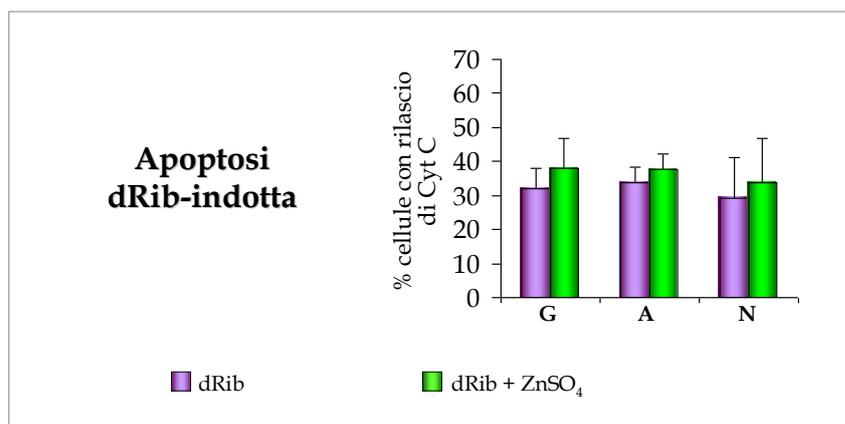


Figura 27: effetto dello zinco sul rilascio del Citocromo C dal mitocondrio durante l'apoptosi indotta da dRib nei PBMCs di soggetti giovani (G), anziani (A) e nonagenari (N) dopo 48 ore di coltura. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati.

#### 4.3.4 Attivazione delle caspasi-3 e -7 (FLICA)

Per comprendere a quale livello del processo apoptotico lo zinco possa esercitare la propria azione, è stata valutata l'attività delle caspasi 3 e 7 usando il saggio colorimetrico funzionale FLICA. Il test è basato sull'utilizzo del FLuorocromo

Inibitore delle Caspasi, che entra passivamente nella cellula e si lega covalentemente solo alle due caspasi se attive (riconoscendone siti specifici) inibendone l'attività enzimatica. Se l'inibitore è legato alle caspasi attive, viene rilevato in citofluorimetria a flusso in quanto, se eccitato a 488 nm, emette fluorescenza verde.

L'analisi è stata effettuata su 11 soggetti giovani, 10 soggetti anziani e 8 soggetti nonagenari dopo 48 ore di coltura nelle condizioni indicate al paragrafo 3.3.1. La presenza di zinco durante l'apoptosi spontanea diminuisce l'attività delle caspasi-3 e -7 negli anziani a 48 ore, mentre nei giovani e nei nonagenari tale ione non sembra avere effetto. Al contrario, considerando l'apoptosi indotta da dRib, lo zinco aumenta l'attivazione delle caspasi-3 e -7 in tutte e tre le classi di età, con effetto particolarmente evidente nei nonagenari (figura 28).

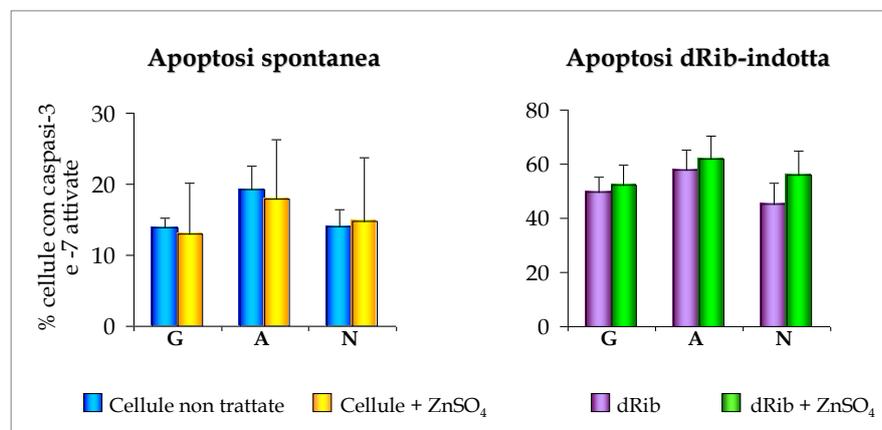


Figura 28: analisi citofluorimetrica dell'attività delle caspasi 3 e 7 misurate con il substrato marcato con carbossifluoresceina (FLICA) nei soggetti giovani, anziani e nonagenari dopo 48 ore di coltura. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati.

#### 4.3.5 Attivazione della Caspasi-3 (Western blot)

E' stata studiata l'attivazione della Caspasi-3 mediante Western Blot sulla frazione citoplasmatica dei PBMCs di alcuni soggetti appartenenti ai tre gruppi di età considerati tenuti in coltura per 48 ore nelle condizioni sperimentali indicate al paragrafo 3.3.1.

La tecnica di Western Blotting consente la valutazione semi-quantitativa delle proteine ottenute da estratti cellulari. La miscela di proteine viene risolta in base

al peso molecolare per mezzo di una separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide, trasferita su una membrana di nitrocellulosa e in seguito esposta al riconoscimento da parte di anticorpi specifici. L'analisi Western Blot è stata effettuata utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per la procaspasi-3 (35 kDa) e uno specifico per la caspasi-3 cleaved che forma due bande a 17 e 19 kDa. Durante l'apoptosi, la scomparsa/diminuzione della banda a 35 kDa e la contemporanea comparsa/aumento delle bande a 17 e 19 kDa indicano che la procaspasi-3 ha subito taglio proteolitico ed è stata, pertanto, convertita in forma attiva. E' stata effettuata un'analisi densitometrica calcolando il rapporto tra il risultato di densitometria ottenuto per ogni banda della procaspasi-3 e per la somma delle bande a 17 e 19 kDa ed il valore densitometrico ottenuto per la corrispondente banda dell'actina (usata nel nostro caso come controllo di isocaricamento) il valore ottenuto per il controllo (cellule non trattate) di ognuna delle tre classi di età è stato posto uguale a 100; gli altri valori ottenuti rappresentano pertanto la variazione percentuale rispetto al controllo. Dall'analisi dei dati (figura 29) è emerso che:

- ⇒ APOPTOSI SPONTANEA: la presenza di zinco in coltura sembra non modificare l'espressione della procaspasi-3 nei giovani nei quali però si osserva una riduzione della caspasi-3 attiva. Nei soggetti anziani, lo zinco aumenta lievemente l'espressione della procaspasi-3 e contemporaneamente riduce l'espressione della caspasi-3 attiva. Anche nei nonagenari lo zinco sembrerebbe aumentare lievemente l'espressione della procaspasi-3 ma, allo stesso tempo, questo oligoelemento induce un lieve aumento nell'espressione della caspasi-3 cleaved. Ciò indica che lo zinco, somministrato in quantità fisiologica, potrebbe svolgere un ruolo protettivo nei confronti delle cellule del sistema immunitario inibendo l'attivazione della caspasi-3 nei soggetti giovani e anziani ma non sembra avere un forte effetto sull'attivazione della caspasi-3 nei nonagenari;
- ⇒ APOPTOSI dRib-INDOTTA: lo zinco sembra diminuire l'attivazione della caspasi-3 nei giovani in quanto si nota un aumento dell'espressione della procaspasi-3 e una diminuzione della caspasi-3

attiva. Nei soggetti anziani e più debolmente nei nonagenari, al contrario, lo zinco sembra aumentare l'attivazione della caspasi-3, in quanto si osserva una diminuzione nell'espressione della procaspasi-3 e un'aumento della caspasi-3 attiva. Ciò conferma i risultati ottenuti dalle analisi in citometria a flusso: si può quindi ipotizzare che questo ione sia in grado di aumentare l'attivazione della caspasi-3 in presenza di uno stress ossidativo nei soggetti anziani e nonagenari.

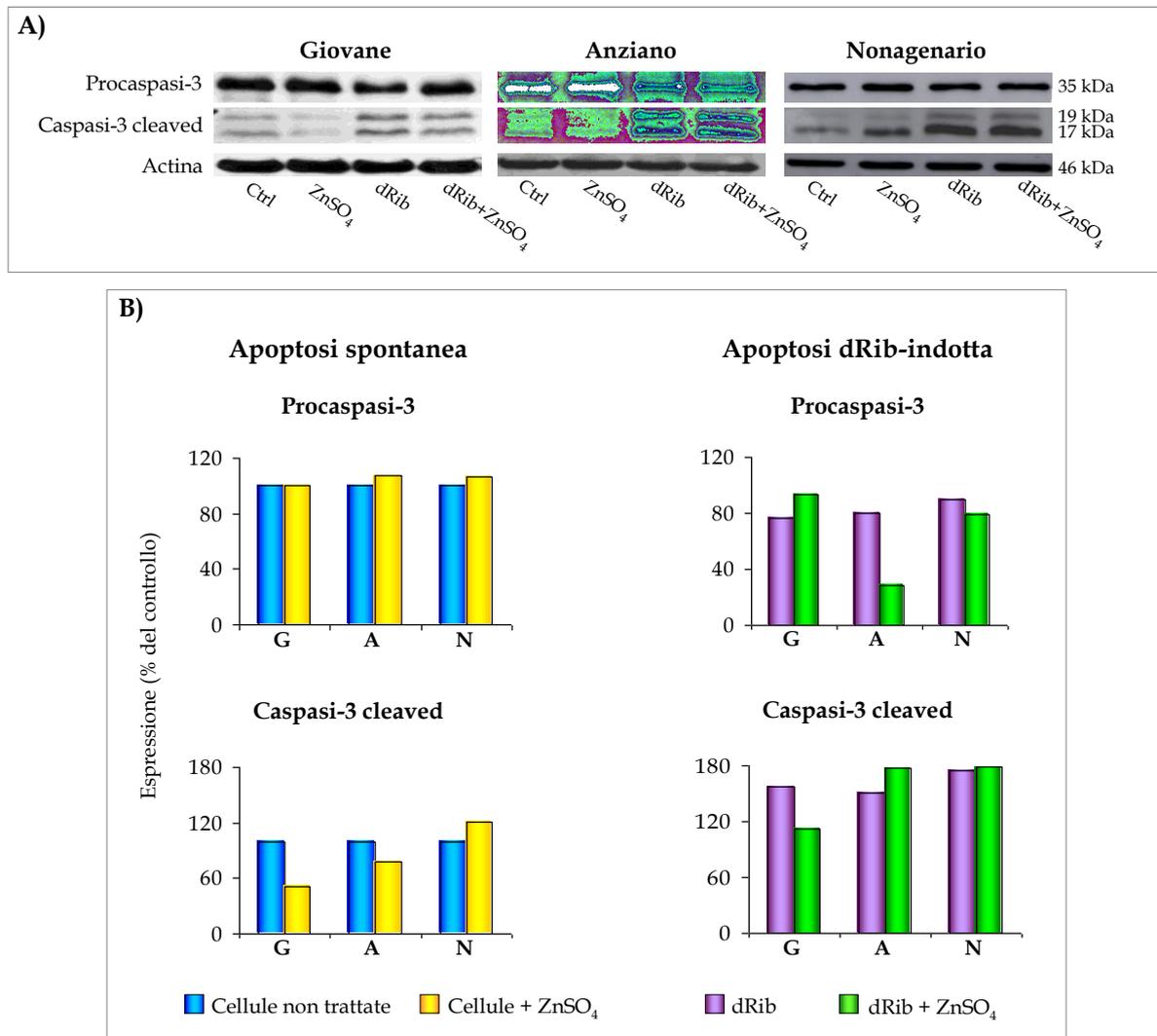


Figura 29: effetto dello zinco sull'attivazione della caspasi-3 durante l'apoptosi spontanea e indotta da dRib nei PBMCs di un soggetto giovane, un anziano e un nonagenario dopo 48 ore di coltura. A) Western blot: le bande in alto, del peso molecolare di 35 kDa, rappresentano l'espressione della procaspasi-3. Le bande al centro, del peso molecolare di 19 e 17 kDa rappresentano l'espressione della caspasi-3 cleaved. Le bande in basso rappresentano l'espressione dell'actina, usata come controllo interno di isocaricamento. B) Analisi densitometrica dei filtri di Western Blot: i dati riportati sono espressi come densità relativa rispetto al controllo (cellule non trattate), al quale è stato attribuito il valore percentuale 100%.

#### 4.3.6 Cleavage di PARP

La poli(ADP-ribosilazione) è una modificazione post-traduzionale delle proteine nucleari in grado di regolarne attività e funzione. L'enzima poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARP) utilizza il NAD<sup>+</sup> come substrato per produrre ADP-ribosio e trasferirlo su varie proteine, inclusa se stessa. Questo processo gioca un ruolo fondamentale in diversi processi come la riparazione del DNA e la morte cellulare. Durante l'apoptosi, infatti, la stimolazione di PARP porta alla sintesi di poli(ADP-ribosio) mentre le caspasi provocano la proteolisi e la conseguente inattivazione di PARP. Il cleavage di PARP produce un frammento C-terminale di 89 kDa (p89, contenente il dominio catalitico) e un frammento N-terminale di 24 kDa (contenente il dominio di legame al DNA). Il frammento p89 mantiene l'attività catalitica basale sebbene non possa essere stimolato dalla rottura del DNA. Infatti, dopo la proteolisi, PARP perde la sua capacità di "nick-sensor" ed è inattiva verso il danno al DNA (Soldani e Scovassi, 2002). Pertanto, il consumo cellulare di NAD<sup>+</sup> viene interrotto. PARP può essere tagliata *in vitro* da quasi tutte le caspasi mentre *in vivo* dalle caspasi-3 e -7. Il cleavage di PARP può essere considerato, pertanto, un importante marker di apoptosi.

La proteolisi di PARP è stata studiata mediante Western Blot sulla frazione proteica nucleare di PBMCs di un campione di soggetti rappresentativi dei tre gruppi di età, tenuti in coltura per 48 ore nelle condizioni menzionate al paragrafo 3.3.1. È stato utilizzato un anticorpo monoclonale in grado di legarsi alla PARP intera (116 kDa) e al frammento p89. L'analisi è stata effettuata calcolando il rapporto tra il risultato di densitometria ottenuto per la banda della PARP intera ed il valore densitometrico ottenuto per la corrispondente banda della PARP cleaved (p89). Il valore così ottenuto per il controllo (cellule non trattate) di ognuna delle tre classi di età considerate è stato posto uguale a 100; gli altri valori ottenuti rappresentano, pertanto, la variazione percentuale rispetto al controllo.

L'analisi ha messo in evidenza che (figura 30):

- ⇒ APOPTOSI SPONTANEA: la presenza di zinco in coltura non sembra aver effetti sulla proteolisi di PARP nei soggetti giovani. Nei soggetti anziani e nonagenari, invece, lo zinco provoca un aumento del rapporto tra PARP (116 kDa) e il frammento p89, indicando che questo

oligoelemento ha un ruolo nella prevenzione della proteolisi di PARP durante l'apoptosi spontanea in questi soggetti.

⇒ APOPTOSI dRib-INDOTTA: lo zinco sembra diminuire il rapporto tra PARP intera e il frammento p89 nei soggetti giovani e nonagenari. Per quanto riguarda i soggetti anziani, in seguito al trattamento delle cellule con dRib e zinco si osserva la totale scomparsa di PARP intera (116 kDa) e la quasi totale scomparsa del frammento p89. E' stato dimostrato che il frammento p89 è in grado di migrare dal nucleo al citoplasma durante le fasi tardive di apoptosi in presenza di una frammentazione nucleare avanzata (Soldani et al., 2001). Questo potrebbe indicare che lo zinco possa essere in grado di aumentare la proteolisi di PARP durante l'apoptosi indotta da stress ossidativo in tutti i gruppi di età considerati.

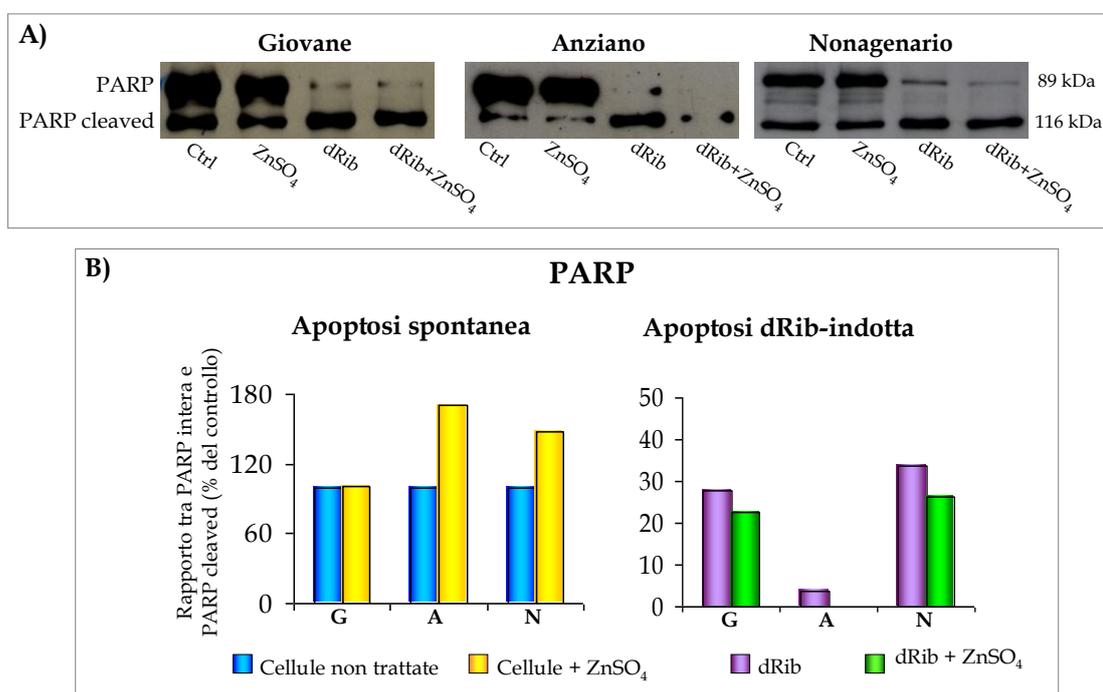


Figura 30: effetto dello zinco sulla proteolisi di PARP durante l'apoptosi spontanea e indotta da dRib nei PBMCs di un soggetto giovane, un anziano e un nonagenario dopo 48 ore di coltura. A) Western blot: le bande in alto, del peso molecolare di 116 kDa, rappresentano l'espressione di PARP intera. Le bande in basso rappresentano l'espressione del frammento di PARP di 89 kDa. B) Analisi densitometrica dei filtri di Western Blot: i dati riportati sono espressi come il rapporto tra il risultato di densitometria ottenuto per la banda della PARP intera (116 kDa) ed il valore densitometrico ottenuto per la corrispondente banda della PARP cleaved (89 kDa). Il valore così ottenuto per il controllo (cellule non trattate) di ognuna delle tre classi di età considerate è stato posto uguale a 100; gli altri valori ottenuti rappresentano, pertanto, la variazione percentuale rispetto al controllo.

### 4.3.7 Espressione di Bcl-2

Bcl-2 è una proteina anti-apoptotica che svolge un ruolo determinante nell'inibizione dell'attivazione della via intrinseca di apoptosi nella fase pre-mitocondriale. L'espressione di Bcl-2 è stata valutata mediante analisi Western Blot nei PBMCs di un campione di soggetti rappresentativi dei tre gruppi di età tenuti in coltura per 48 ore nelle condizioni precedentemente menzionate. L'analisi ha messo in evidenza che (figura 31):

- ⇒ APOPTOSI SPONTANEA: lo zinco aumenta l'espressione di Bcl-2, particolarmente nei giovani;
- ⇒ APOPTOSI dRib-INDOTTA: lo zinco riduce l'espressione di Bcl-2 in tutti i gruppi di età.

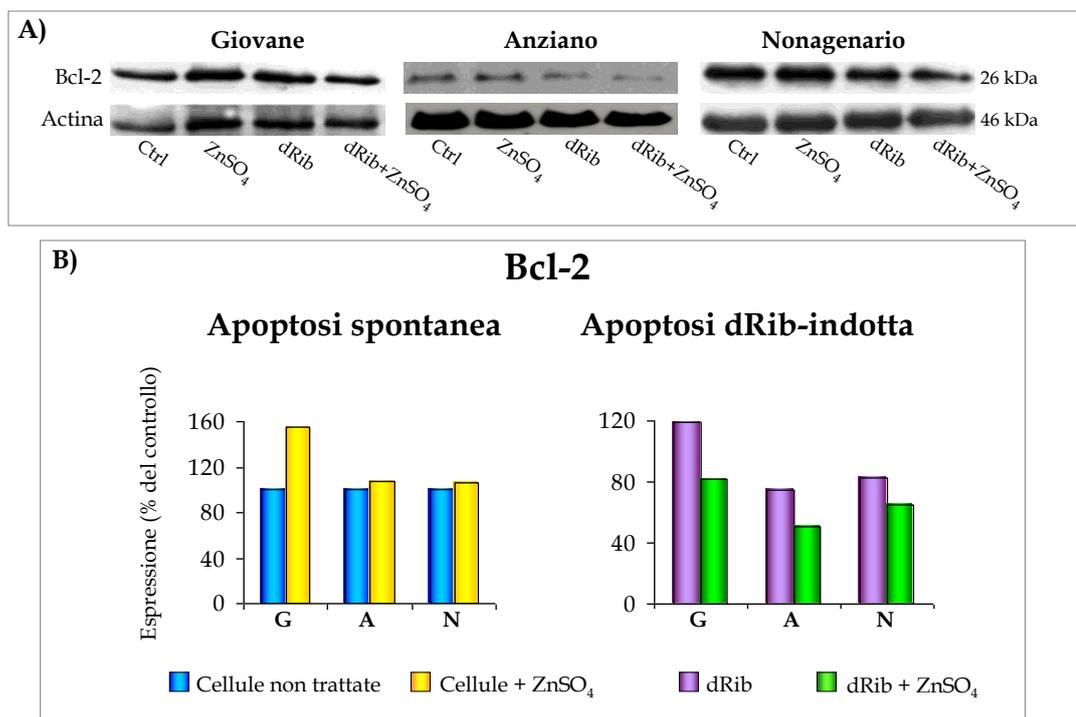


Figura 31: effetto dello zinco sull'espressione di Bcl-2 durante l'apoptosi spontanea e indotta da dRib nei PBMCs di un soggetto giovane, un anziano e un nonagenario dopo 48 ore di coltura. A) Western blot: le bande in alto, del peso molecolare di 26 kDa, rappresentano l'espressione di Bcl-2. Le bande in basso rappresentano l'espressione dell'actina, usata come controllo interno di isocaricamento. B) Analisi densitometrica dei filtri di Western Blot: i dati riportati sono espressi come densità relativa rispetto al controllo (cellule non trattate), al quale è stato attribuito il valore percentuale 100%.

### 4.3 METALLOTIONEINE

L'espressione delle MTs intracellulari è stata valutata nelle due principali sottopopolazioni linfocitarie (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>) in presenza di diverse concentrazioni di zinco *in vitro*. Il protocollo si basa sulla marcatura contemporanea delle MTs intracellulari e dei due antigeni linfocitari di superficie: CD4 e CD8. A tal fine i PBMCs di 9 soggetti giovani (età media 28 ± 2 anni) e di 9 soggetti anziani (età media 79 ± 3 anni) sono stati messi in coltura per 24 e 48 ore nelle condizioni indicate al paragrafo 3.4.1. Per l'analisi è stata considerata la mediana dell'intensità di fluorescenza relativa all'espressione delle metallothioneine nei linfociti totali, nei linfociti T CD4<sup>+</sup> e nei linfociti T CD8<sup>+</sup>. Ad ogni dato è stato sottratto il valore relativo al controllo (cellule non trattate con zinco) per valutare la risposta alle varie concentrazioni di ZnSO<sub>4</sub>. Dall'analisi dei dati (figura 32) è emerso che:

- ✓ LINFOCITI TOTALI: dopo 24 ore di coltura i linfociti dei soggetti giovani e dei soggetti anziani mostrano un'espressione di MTs intracellulari significativamente diversa: in particolare i soggetti anziani mostrano una maggiore espressione di MTs per concentrazioni di ZnSO<sub>4</sub> pari a 31,25 e 62,5 µM. Questa differenza tra i due gruppi di età si annulla quando la concentrazione di zinco aumenta (93 e 125 µM). Dopo 48 ore di coltura l'andamento delle curve di espressione non mostra differenze tra soggetti giovani e anziani.
- ✓ LINFOCITI T CD4<sup>+</sup>: dopo 24 ore di coltura, anche in questa sottopopolazione linfocitaria si nota una diversa espressione delle MTs nei due gruppi di età. In particolare, i linfociti T CD4<sup>+</sup> dei soggetti anziani mostrano una maggiore espressione di MTs per concentrazioni di ZnSO<sub>4</sub> pari a 31,25 e 62,5 µM. Anche dopo 48 ore, i linfociti T CD4<sup>+</sup> dei soggetti anziani esprimono livelli maggiori di MTs intracellulari con concentrazioni di zinco pari a 62,5 e 93 µM.
- ✓ LINFOCITI T CD8<sup>+</sup>: dopo 24 ore di coltura i linfociti T CD8<sup>+</sup> dei soggetti giovani e dei soggetti anziani mostrano un'espressione di MTs intracellulari significativamente diversa: in particolare i soggetti anziani

mostrano una maggiore espressione di MTs per concentrazioni di  $ZnSO_4$  pari a 31,25 e 62,5  $\mu M$ . Questa differenza tra i due gruppi di età si annulla quando la concentrazione di zinco aumenta (93 e 125  $\mu M$ ). Dopo 48 ore di coltura l'andamento delle curve di espressione non mostra differenze tra soggetti giovani e anziani.

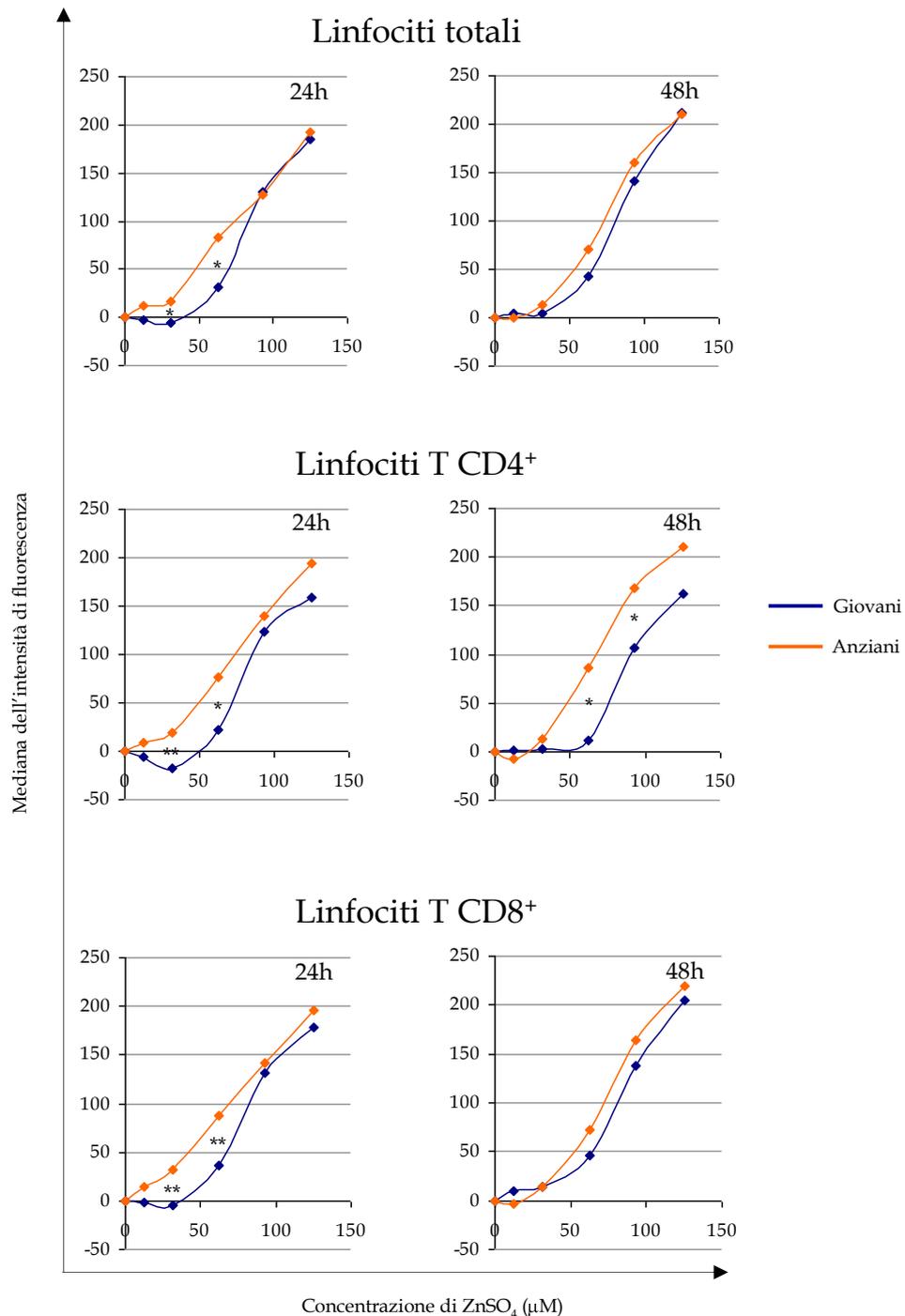


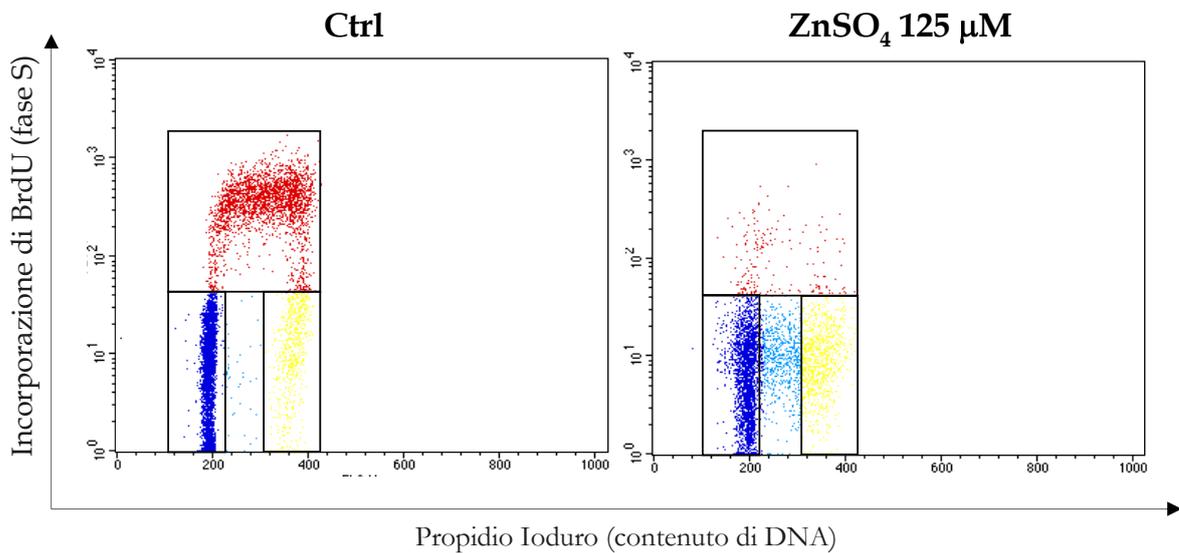
Figura 32: espressione delle MTs intracellulari nei linfociti totali, nei linfociti T CD4<sup>+</sup> e nei linfociti T CD8<sup>+</sup> di soggetti giovani e anziani dopo 24 e 48 ore di coltura con diverse concentrazioni di zinco. I dati sono espressi come media. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati non appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

#### 4.4 EFFETTI DELLO ZINCO SUL CICLO CELLULARE

Per lo studio del ciclo cellulare è stata effettuata un'analisi biparametrica in citometria a flusso volta a valutarne le diverse fasi in base al contenuto di DNA (PI) e all'incorporazione di Bromo-deossi-Uridina (BrdU). La BrdU, un analogo della timina, è utilizzata dalle cellule in fase S durante la sintesi del DNA. Il PI, invece, lega stechiometricamente il DNA, consentendo di valutarne la quantità all'interno delle cellule. Pertanto, tale analisi permette di valutare le percentuali di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare:

- G0/G1: le cellule in questa fase hanno un contenuto di DNA 2c e sono negative per la BrdU;
- G2/M: le cellule in questa fase hanno un contenuto di DNA 4c e sono negative per la BrdU;
- S: le cellule in questa fase hanno un contenuto di DNA intermedio e sono positive per la BrdU.

In conseguenza del trattamento con zinco e in maniera dose-dipendente, inoltre, è stata osservata una quarta popolazione cellulare S/BrdU: le cellule in questa regione hanno un contenuto di DNA intermedio ma non incorporano la BrdU. Non siamo ancora in grado, tuttavia, di stabilire se le cellule appartenenti a tale popolazione sono state bloccate e/o morte. In figura 33 è mostrato un esempio rappresentativo di tale analisi citofluorimetrica che evidenzia l'andamento delle fasi del ciclo cellulare in assenza o presenza di zinco alla concentrazione 125  $\mu$ M in un soggetto nonagenario dopo 48 ore di coltura.



	Ctrl	ZnSO <sub>4</sub> 125 µM
<span style="color: yellow;">■</span> G2/M	7	22
<span style="color: cyan;">■</span> S/BrdU <sup>-</sup>	1	16
<span style="color: red;">■</span> S	32	3
<span style="color: blue;">■</span> G0/G1	60	59

Figura 33: esempio di analisi biparametrica di citometria a flusso per valutare il contenuto di DNA (PI) e l'incorporazione di Bromo-deossi-Uridina (BrdU). Sono mostrati i dati ottenuti nei linfociti di un soggetto nonagenario dopo trattamento con ZnSO<sub>4</sub> per 48 ore. La tabella in basso mostra le percentuali relative alle singole fasi del ciclo cellulare.

Il ciclo cellulare è stato studiato sui PBMCs di 14 soggetti giovani (età media  $28 \pm 1$  anni), 11 anziani (età media  $73 \pm 1$  anni) e 23 nonagenari (età media  $93 \pm 1$  anni) dopo 48 e 72 ore di stimolazione con PMA 50 ng/ml (Forbolo Miristato Acetato) e Ionomicina 1 µM in presenza o assenza di differenti concentrazioni di zinco (12,5 µM; 31,25 µM; 62,5 µM; 125 µM) (vedi paragrafo 3.5.1). I risultati ottenuti indicano i seguenti effetti:

#### 1. Giovani

La presenza di zinco, alla concentrazione 125 µM, aumenta le cellule in fase G0/G1 a 48 e 72 ore, con effetto particolarmente evidente a 72 ore. Alla stessa concentrazione diminuiscono le cellule in fase S dopo 48 e 72 ore, mentre si osserva un aumento della fase G2/M per entrambe le cinetiche studiate. La percentuale di cellule in fase S/BrdU<sup>-</sup>, trascurabile per basse

concentrazioni di zinco, aumenta in maniera dose-dipendente e l'aumento risulta particolarmente significativo in presenza di zinco 125  $\mu\text{M}$  (figura 34).

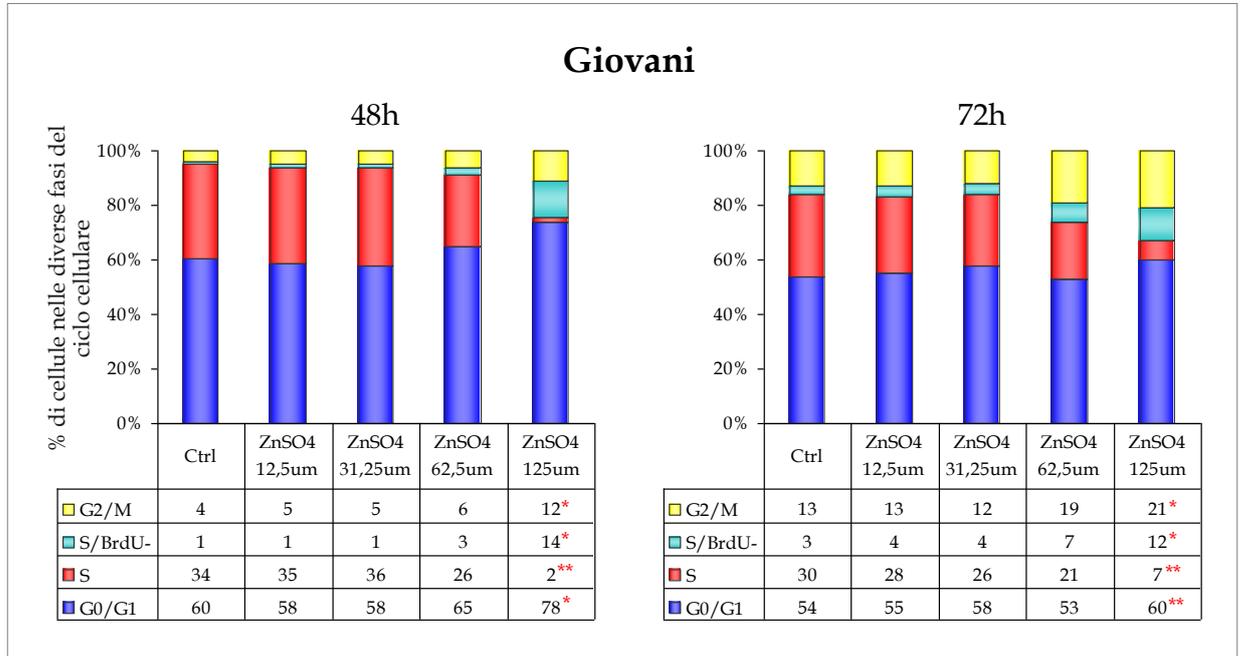


Figura 34: effetti di differenti concentrazioni di zinco sulle fasi del ciclo cellulare nei PBMCs dei soggetti giovani dopo 48 e 72 ore. Le tabelle in basso mostrano le percentuali relative alle singole fasi. I dati sono espressi come media e le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

## 2. Anziani

Anche nei soggetti anziani, così come per i giovani, si osservano variazioni significative della percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare solo alla concentrazione di  $\text{ZnSO}_4$  125  $\mu\text{M}$ . In particolare, la fase S diminuisce a 48 e 72 ore, mentre aumenta la fase G2/M per entrambe le cinetiche. E' da notare che la percentuale di cellule in tale fase, rispetto ai giovani, risulta raddoppiata: ciò potrebbe indurci ad ipotizzare che lo zinco 125  $\mu\text{M}$  induca un'accelerazione età-correlata del processo di divisione cellulare. La percentuale di cellule in fase S/BrdU- aumenta in maniera dose-dipendente a 48 e 72 ore. A differenza di quanto osservato nei giovani, tuttavia, non si osservano variazioni significative nella percentuale di cellule in fase G0/G1 (figura 35).

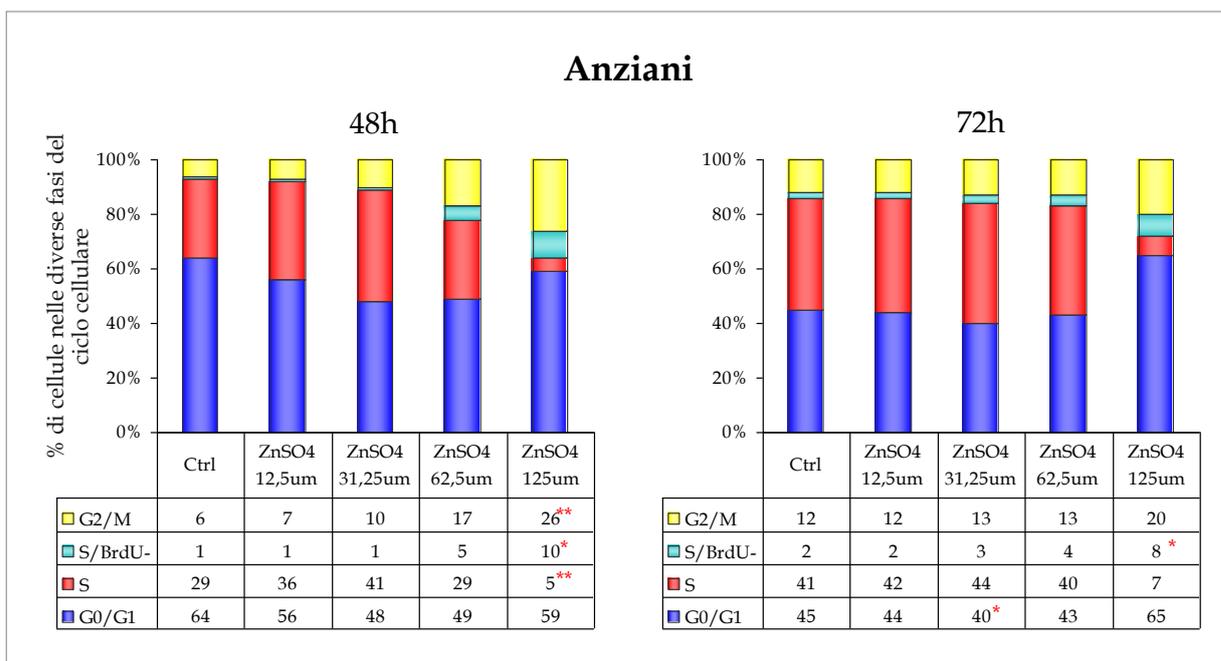


Figura 35: effetti di differenti concentrazioni di zinco sulle fasi del ciclo cellulare nei PBMCs dei soggetti anziani dopo 48 e 72 ore. Le tabelle in basso mostrano le percentuali relative alle singole fasi. I dati sono espressi come media e le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

### 3. Nonagenari

Nei nonagenari lo zinco influenza le varie fasi del ciclo cellulare già alla concentrazione  $62,5 \mu\text{M}$ , a dimostrare che tali soggetti sono probabilmente più sensibili a dosi inferiori di zinco rispetto ai giovani e agli anziani. Si osservano, infatti, in maniera dose-dipendente, una diminuzione significativa della percentuale di cellule in fase S ed un aumento delle cellule in fase G2/M dopo 48 e 72 ore. La percentuale di cellule in fase S/BrdU<sup>-</sup> aumenta in modo dose-dipendente già in presenza di ZnSO<sub>4</sub>  $12,5 \mu\text{M}$  dopo 48 ore, mentre l'aumento di tale fase è evidente a partire dalla concentrazione  $62,5 \mu\text{M}$  dopo 72 ore. Al contrario dei giovani e come osservato per gli anziani, infine, non si osservano variazioni significative della fase G0/G1. Ciò potrebbe suggerire che lo zinco agisca bloccando le cellule in G0/G1 solo nei soggetti giovani, mentre favorisca il passaggio alla fase G2/M in tutti i gruppi di età (figura 36).

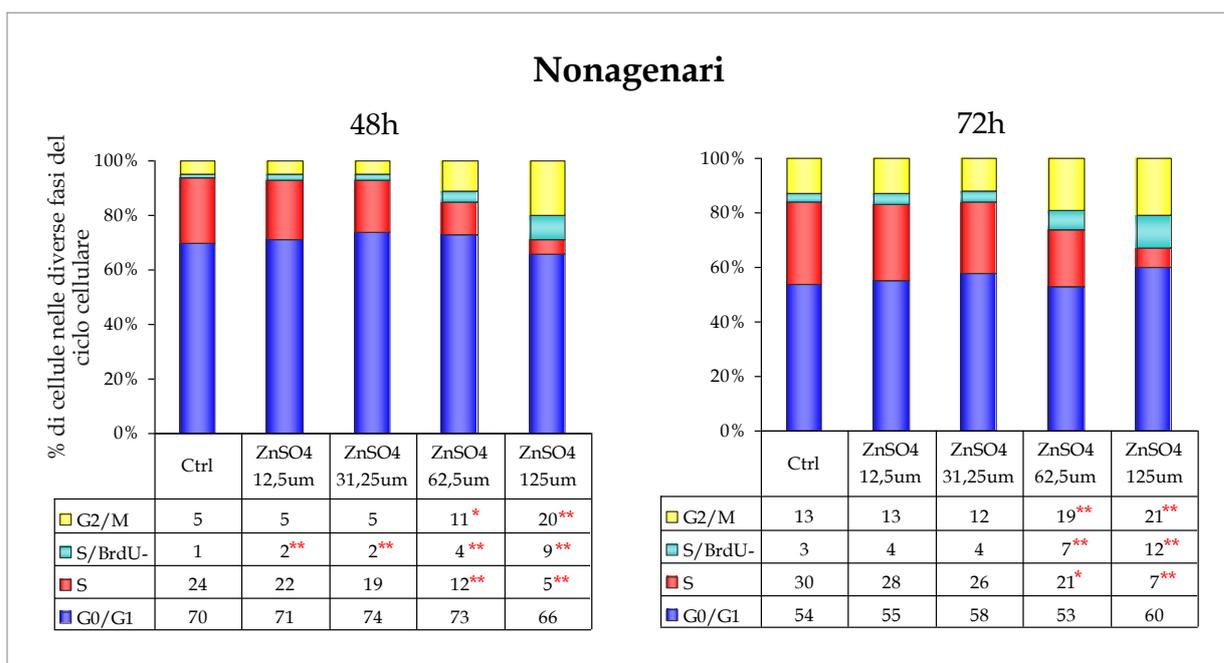


Figura 36: effetti di differenti concentrazioni di zinco sulle fasi del ciclo cellulare nei PBMCs dei soggetti nonagenari dopo 48 e 72 ore. Le tabelle in basso mostrano le percentuali relative alle singole fasi. I dati sono espressi come media e le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Poiché, in tutte e tre le casi di età considerate, l'effetto dello zinco sulle varie fasi del ciclo cellulare sembra essere particolarmente evidente alla concentrazione 125  $\mu\text{M}$ , si è deciso di confrontare le singole fasi tra di loro considerando solo i campioni con cellule stimulate in assenza e in presenza di  $\text{ZnSO}_4$  125  $\mu\text{M}$ . Da tale confronto emerge che, per tutti i gruppi di età, la percentuale di cellule in fase S subisce una notevole diminuzione in presenza di zinco dopo 48 e 72 ore; al contrario, aumentano sia la fase G2/M (soprattutto negli anziani e nei nonagenari) che la fase S/BrdU-. La fase G0/G1, invece, aumenta in modo significativo solo nei soggetti giovani a 48 e 72 ore.

Si potrebbe pertanto ipotizzare che, in presenza di zinco alla concentrazione 125  $\mu\text{M}$ , parte delle cellule che entrano in fase S subiscano un arresto nel corso della duplicazione del DNA, cessando quindi di incorporare la BrdU (cellule in fase S/BrdU-), mentre le altre entrino più velocemente in fase G2/M accumulandovisi. L'aumento della percentuale di cellule in fase G2/M in presenza di zinco è particolarmente evidente nei soggetti più anziani, nei quali risulta più che raddoppiato. Ciò suggerisce che lo zinco abbia in parte il ruolo di

indurre un aumento della velocità della proliferazione cellulare in maniera età-correlata e tale ipotesi è supportata dal fatto che, dopo 72 ore, diminuisce la percentuale di cellule in fase G2/M e aumenta la percentuale in G0/G1, come se le cellule avessero già compiuto un ciclo di duplicazione (figura 37).

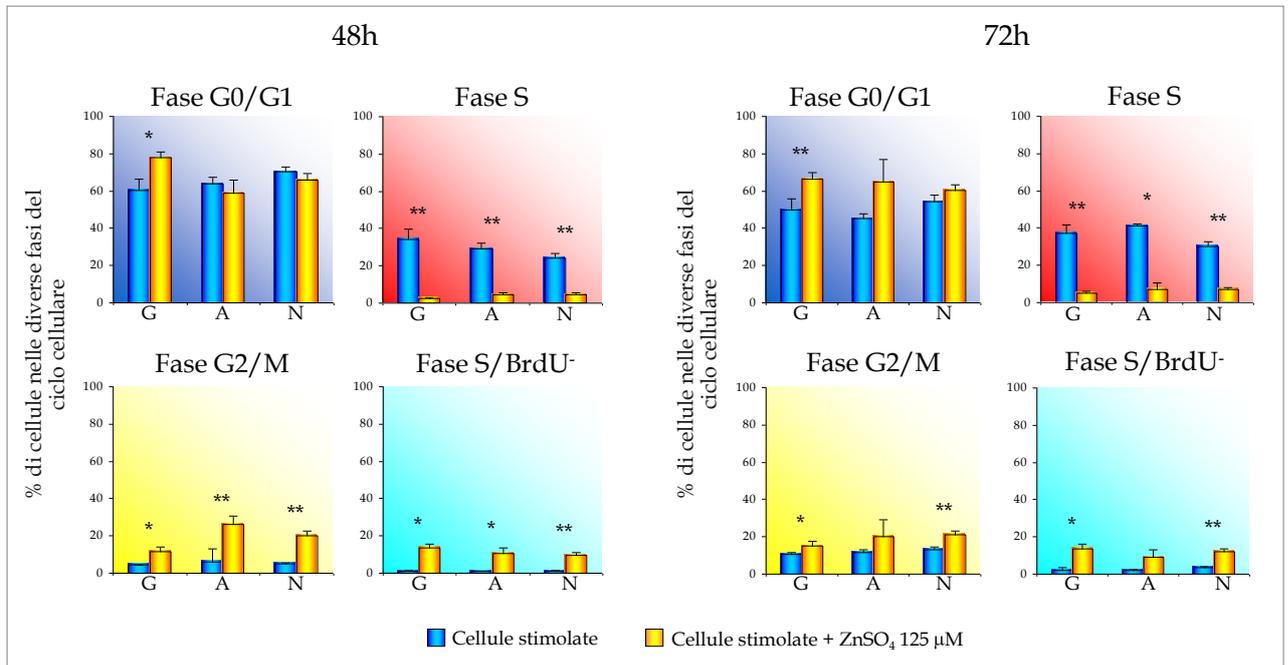


Figura 37: percentuali relative di cellule stimulate (mediante trattamento con PMA e Ionomicina) in assenza o presenza di ZnSO<sub>4</sub> 125 μM nelle varie fasi del ciclo cellulare a 48 e 72 ore di coltura. I dati sono espressi come media e le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

## 4.5 RUOLO DELLE VARIANTI GENICHE DI P53 SU APOPTOSI E CICLO CELLULARE

Per verificare se lo zinco in vitro possa influenzare il diverso comportamento età-correlato delle due varianti polimorfiche di p53 sulla propensione all'apoptosi e sul ciclo cellulare, tutti i soggetti sono stati genotipizzati (tabella 6).

Genotipo	Giovani	Anziani	Nonagenari
	Età media 28 ± 1	Età media 73 ± 1	Età media 93 ± 1
Arg/Arg	20	25	19
Arg/Pro	5	11	9
Pro/Pro	0	6	5

Tabella 6: distribuzione dei genotipi per il codone 72 di p53 nei soggetti giovani, anziani e nonagenari reclutati.

### 4.6.1 Apoptosi

Allo scopo di valutare le relazioni tra la suscettibilità all'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo, zinco e genotipo al codone 72 di p53, sono stati studiati i PBMCs di 41 soggetti suddivisi in tre gruppi di età: 25 soggetti giovani (età media 28 ± 1 anni); 30 soggetti anziani (età media 73 ± 1 anni) e 20 soggetti nonagenari (età media 93 ± 1 anni).

I campioni, all'interno di ciascuna classe di età, sono stati poi suddivisi in due gruppi sulla base del relativo polimorfismo al codone 72 di p53:

- soggetti Pro<sup>-</sup> (con genotipo Arg/Arg): 20 giovani, 17 anziani e 9 nonagenari;
- soggetti Pro<sup>+</sup> (con genotipo Arg/Pro o Pro/Pro): 5 giovani, 13 anziani e 11 nonagenari.

Dai risultati ottenuti è emerso che:

⇒ APOPTOSI SPONTANEA: per quanto riguarda i giovani lo zinco diminuisce significativamente l'apoptosi precoce spontanea nei soggetti Pro<sup>-</sup>. Nei soggetti anziani Pro<sup>-</sup>, invece, lo zinco diminuisce l'apoptosi tardiva spontanea. Lo zinco, al contrario, non sembra avere effetti significativi sull'apoptosi spontanea nei soggetti nonagenari (figura 38).

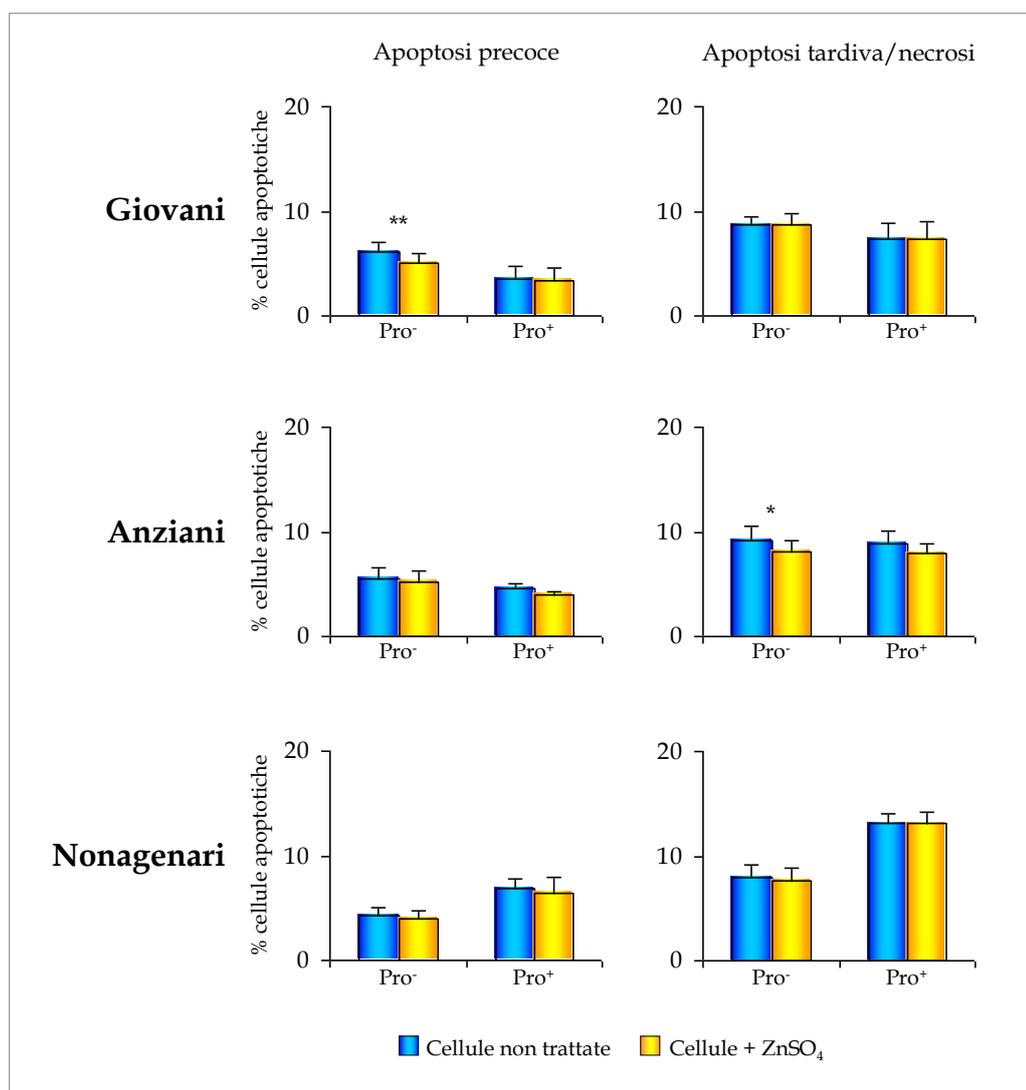


Figura 38: effetti dello zinco sulla suscettibilità all'apoptosi spontanea nei PBMCs di soggetti giovani, anziani e nonagenari rilevata con marcatura Annexina V/PI, in soggetti Pro<sup>-</sup> e Pro<sup>+</sup>, dopo 48 di coltura. I pannelli a sinistra indicano le percentuali di cellule apoptotiche nella fase precoce (Anx<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) di apoptosi, mentre quelli a destra si riferiscono alla percentuale di cellule apoptotiche nella fase tardiva/necrosi (Anx<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

⇒ APOPTOSI dRib INDOTTA: Lo zinco non sembra avere effetti significativi sui soggetti giovani. Al contrario, lo zinco aumenta significativamente l'apoptosi tardiva indotta da stress ossidativo nei PBMCs dei soggetti anziani Pro<sup>-</sup> (figura 39) mentre questo ione non sembra avere un effetto diverso sui soggetti nonagenari Pro<sup>-</sup> e Pro<sup>+</sup>.

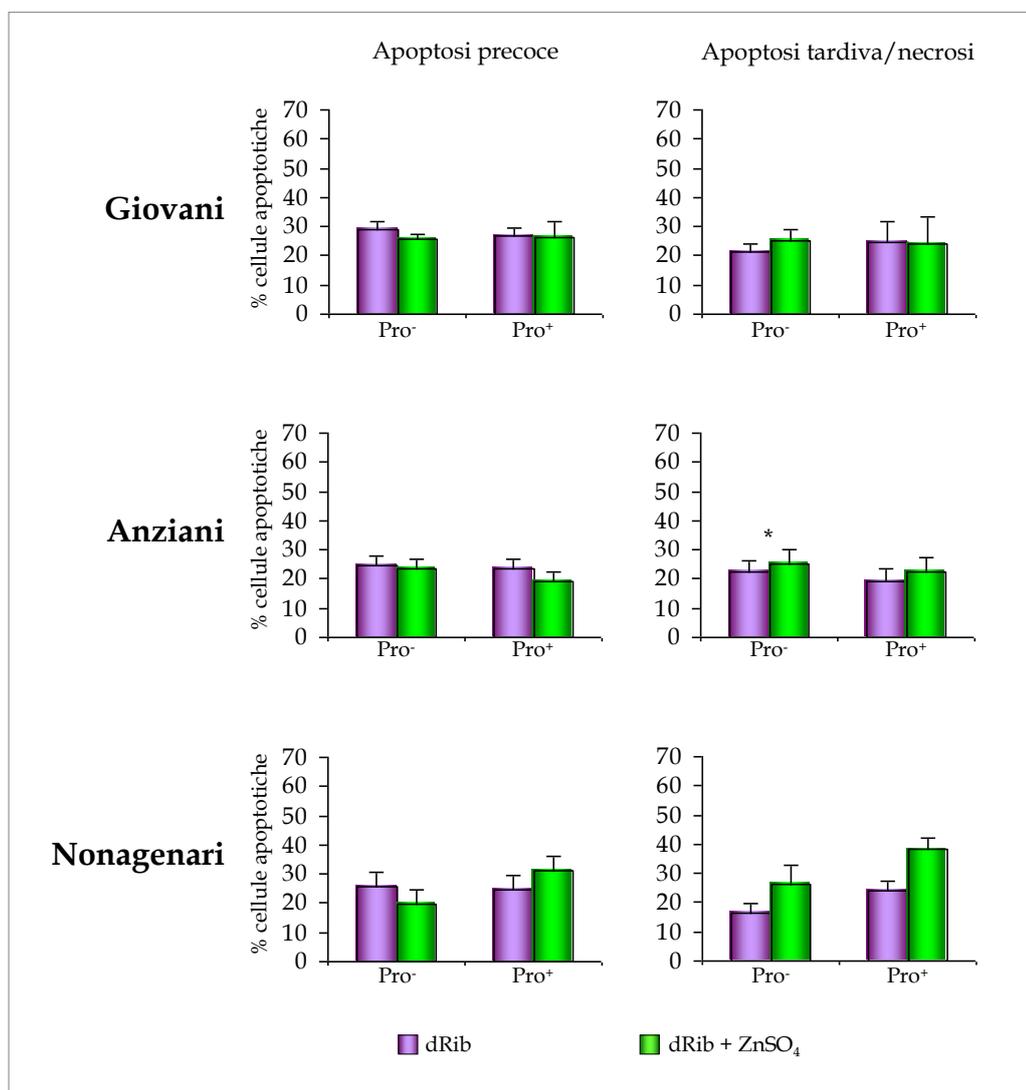


Figura 39: effetti dello zinco sulla suscettibilità all'apoptosi indotta da stress ossidativo mediante trattamento con dRib 10 mM nei PBMCs di soggetti giovani, anziani e nonagenari rilevata con marcatura Annexina V/PI, in soggetti Pro<sup>-</sup> e Pro<sup>+</sup>, dopo 48 ore di coltura. I pannelli a sinistra indicano le percentuali di cellule apoptotiche nella fase precoce (Anx<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) di apoptosi, mentre quelli a destra si riferiscono alla percentuale di cellule apoptotiche nella fase tardiva/necrosi (Anx<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ .

### 4.6.3 Ciclo cellulare

Allo scopo di valutare le relazioni tra le diverse fasi del ciclo cellulare, zinco e genotipo al codone 72 di p53, sono stati studiati i PBMCs di 48 soggetti suddivisi in due classi di età: 14 soggetti giovani (età media  $27 \pm 2$  anni); 34 soggetti anziani (età media  $86 \pm 2$  anni). I soggetti ultrasessantacinquenni e nonagenari sono stati raggruppati in un'unica classe di età (anziani) allo scopo di aumentare la casistica. I campioni, all'interno di ciascuna classe di età, sono stati poi suddivisi in due gruppi sulla base del relativo polimorfismo al codone 72 di p53:

- soggetti Pro<sup>-</sup>: 9 giovani, 20 anziani;
- soggetti Pro<sup>+</sup>: 5 giovani, 14 anziani.

Le cellule sono state stimulate per 48 e 72 ore con PMA 50 ng/ml e Ionomicina 1  $\mu$ M in presenza di differenti concentrazioni di ZnSO<sub>4</sub> (12,5-125  $\mu$ M). Il ciclo cellulare è stato valutato mediante un'analisi biparametrica in citometria a flusso per valutare il contenuto di DNA (PI) e l'incorporazione di BrdU da parte delle cellule. I dati ottenuti dopo 48 e 72 ore di trattamento indicano i seguenti effetti:

- 1) Soggetti Pro<sup>-</sup>: lo zinco, alla concentrazione 125  $\mu$ M, riduce significativamente la fase S e aumenta la G2/M dopo 48 e 72 ore sia nei soggetti giovani che negli anziani. Inoltre, aumenta la percentuale di cellule S/BrdU<sup>-</sup> in modo dose-dipendente. Nei soli soggetti giovani, infine, si osserva l'aumento della fase G2/M in presenza di ZnSO<sub>4</sub> 125  $\mu$ M dopo 48 ore di trattamento (figura 40).

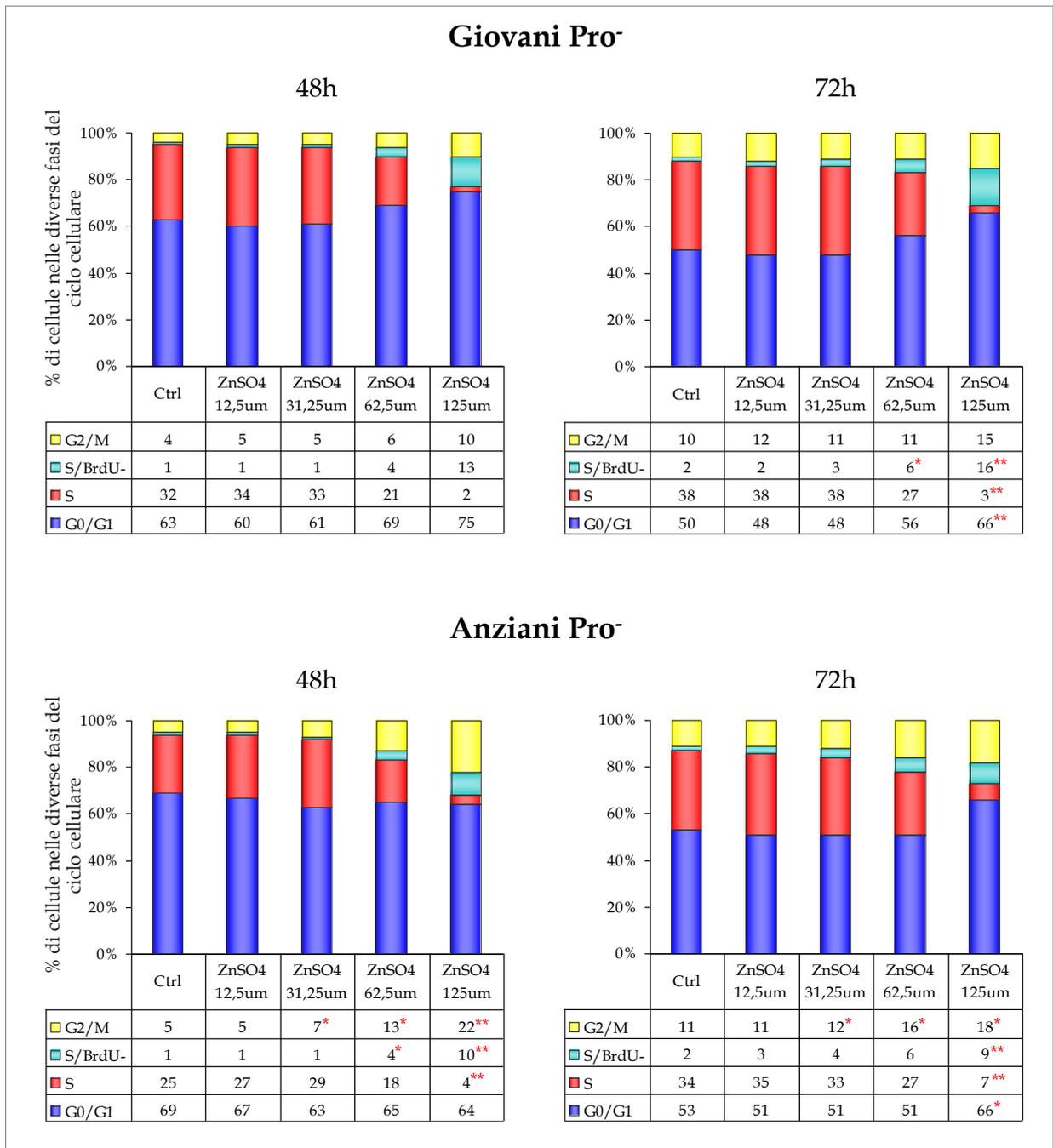


Figura 40: effetti di differenti concentrazioni di zinco sulle fasi del ciclo cellulare nei PBMCs dei soggetti Pro<sup>-</sup> dopo 48 e 72 ore. I pannelli superiori mostrano i dati relativi ai giovani, mentre i pannelli inferiori mostrano quelli relativi agli anziani. Le tabelle sotto ad ogni grafico mostrano le percentuali relative alle singole fasi. I dati sono espressi come media e le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

2) Soggetti Pro<sup>+</sup>: le diverse concentrazioni di zinco non sembrano influenzare la percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare nei soggetti giovani (figura 41, pannelli superiori). Nei soggetti anziani e nonagenari,

invece, si osservano risultati simili a quelli ottenuti nei soggetti Pro- appartenenti alla stessa classe di età (figura 41, pannelli inferiori).

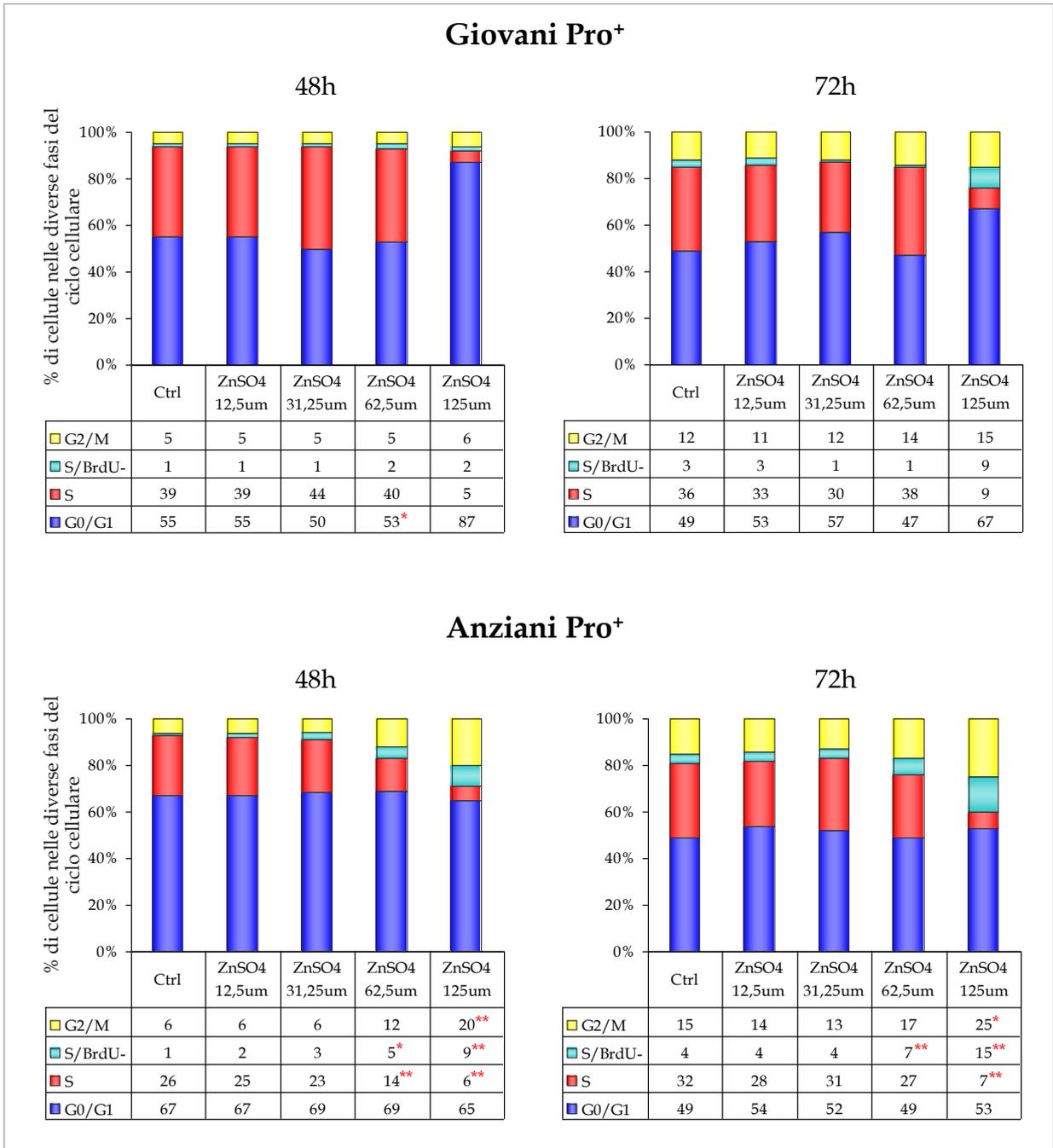


Figura 41: effetti di differenti concentrazioni di zinco sulle fasi del ciclo cellulare nei PBMCs dei soggetti Pro<sup>+</sup> dopo 48 e 72 ore. I pannelli superiori mostrano i dati relativi ai giovani, mentre i pannelli inferiori mostrano quelli relativi agli anziani e nonagenari. Le tabelle sotto ad ogni grafico mostrano le percentuali relative alle singole fasi. I dati sono espressi come media e le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Poiché l'effetto dello zinco sulle varie fasi del ciclo cellulare sembra essere particolarmente evidente alla concentrazione 125  $\mu\text{M}$  in tutte le classi di età, si è deciso di confrontare le singole fasi tra di loro considerando solo i campioni con cellule stimulate in assenza o in presenza di  $\text{ZnSO}_4$  125  $\mu\text{M}$  (figure 42 e 43). Da tale confronto emerge che la diminuzione della percentuale di cellule in fase S in presenza di zinco è osservata sia nei soggetti  $\text{Pro}^-$  che nei soggetti  $\text{Pro}^+$ . L'accumulo in fase S/BrdU<sup>-</sup>, tuttavia, che dall'analisi globale del ciclo cellulare risultava particolarmente evidente nei giovani dopo 48 e 72 ore, sembra essere un fenomeno dovuto per lo più al contributo dei soggetti  $\text{Pro}^-$ , in quanto negli altri non si osservano variazioni significative nella percentuale di cellule in tale fase. Considerando i soggetti anziani, invece, l'aumento in S/BrdU<sup>-</sup> a 48 e 72 ore non sembra essere correlato ad uno in particolare dei due fenotipi. L'aumento della percentuale di cellule in fase G0/G1 nei soggetti giovani sembra essere influenzato sia dalla cinetica (48 o 72 ore) che dalla natura del polimorfismo: dopo 48 ore di coltura, infatti, lo zinco aumenta le cellule in fase G0/G1 in modo particolare nei soggetti  $\text{Pro}^+$ , mentre dopo 72 ore tale aumento diviene evidente anche nei soggetti giovani  $\text{Pro}^-$ . Infine, per quanto riguarda l'aumento della fase G2/M in presenza di zinco, non sono state osservate differenze tra le due varianti polimorfiche.

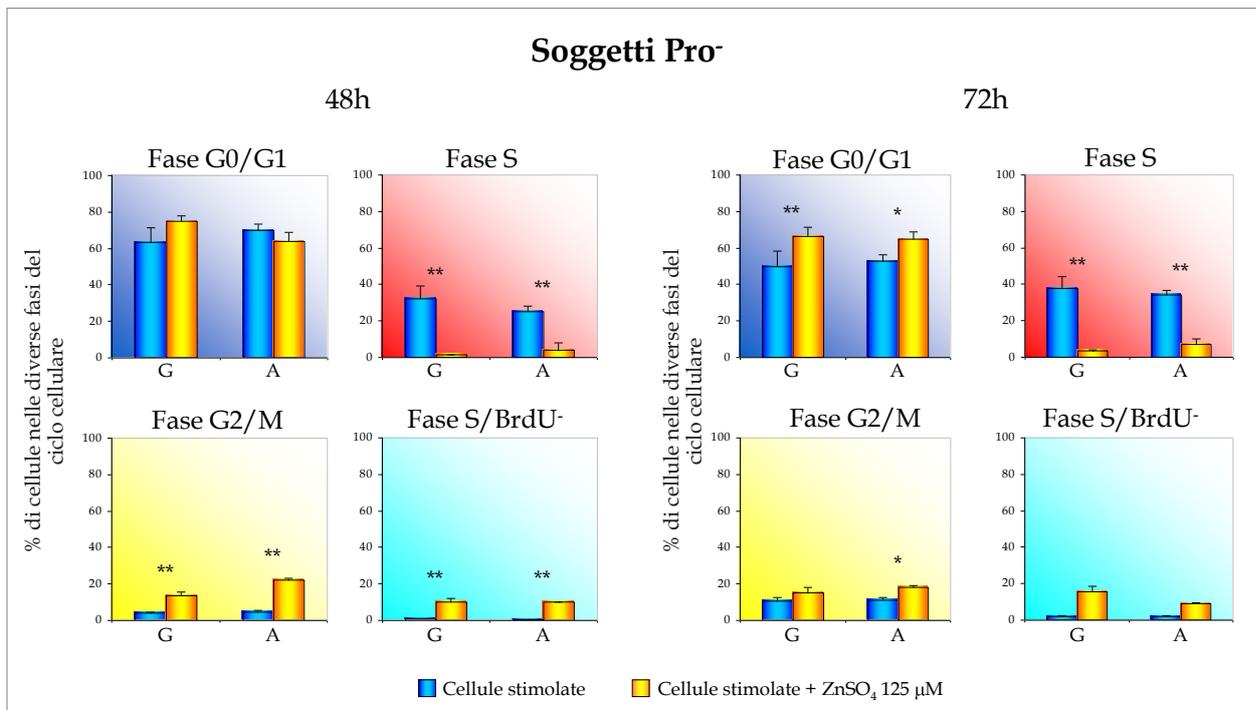


Figura 42: Percentuali relative di cellule stimulate (con PMA e Ionomicina) di soggetti Pro<sup>-</sup> giovani (G) e Anziani (A) in assenza o presenza di ZnSO<sub>4</sub> 125 μM nelle varie fasi del ciclo cellulare a 48 e 72 ore di coltura. I dati sono espressi come media e le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

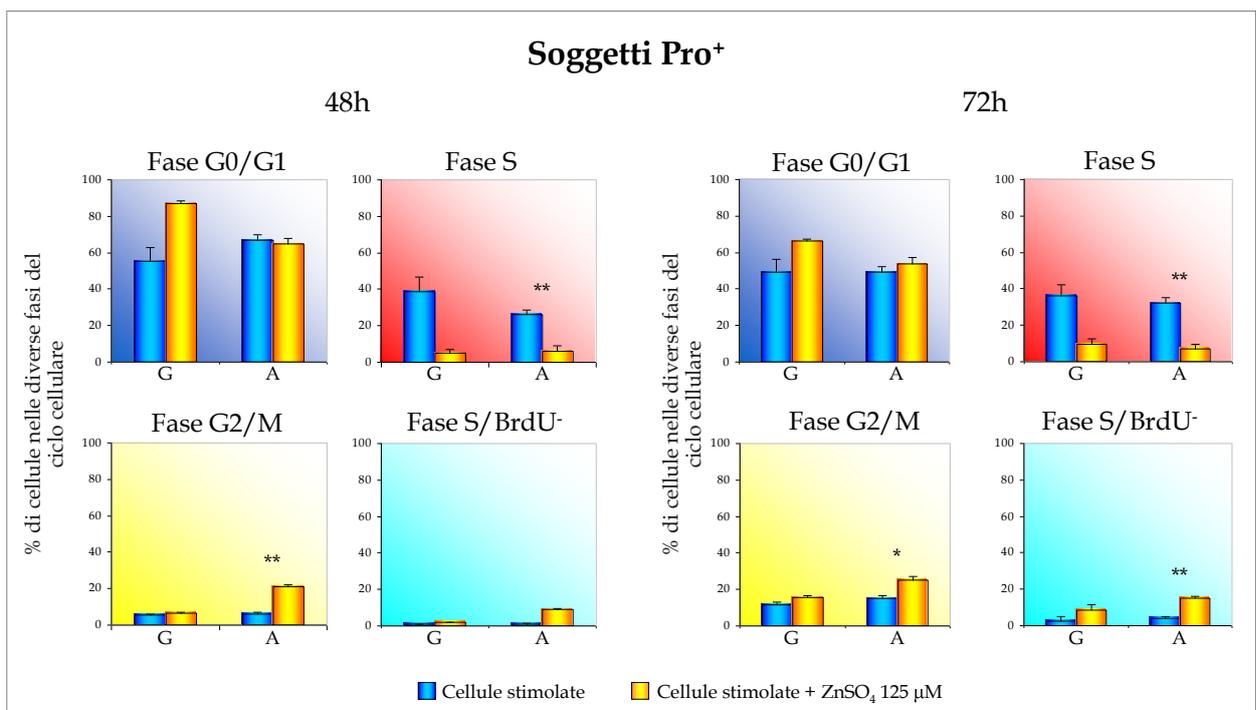


Figura 43: Percentuali relative di cellule stimulate (con PMA e Ionomicina) di soggetti Pro<sup>+</sup> giovani (G) e Anziani (A) in assenza o presenza di ZnSO<sub>4</sub> 125 μM nelle varie fasi del ciclo cellulare a 48 e 72 ore di coltura. I dati sono espressi come media e le analisi statistiche sono state effettuate usando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

## **4.6 EFFETTI DELLA SUPPLEMENTAZIONE *IN VIVO* DI ZINCO**

In aggiunta agli studi sull'effetto dello zinco *in vitro*, è stato analizzato anche l'effetto di una supplementazione *in vivo* di zinco sull'apoptosi e sulla proliferazione dei linfociti su un gruppo di 12 soggetti anziani (eta media:  $75 \pm 2$  anni). I PBMCs di questi soggetti sono stati studiati prima e dopo 6 settimane di supplementazione orale di zinco (10 mg al giorno).

### **4.7.1 Studio dell'apoptosi: effetti della supplementazione *in vivo* di zinco sull'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo**

Lo studio dell'apoptosi è stato effettuato sui PBMCs dei 12 soggetti anziani reclutati prima e dopo la supplementazione orale di zinco.

E' stata valutata la percentuale di cellule apoptotiche dopo 48 e 72 ore di coltura nelle seguenti condizioni:

1. cellule coltivate in terreno completo per 48 e 72 ore in incubatore al 5% di CO<sub>2</sub> a temperatura di 37° C. Questo campione è utilizzato per valutare l'apoptosi spontanea;
2. cellule coltivate nelle stesse condizioni precedenti con l'aggiunta di una soluzione di 2-desossi-D-Ribosio alla concentrazione finale di 10 mM. Questo campione sarà utilizzato per valutare l'apoptosi indotta da stress ossidativo.

La suscettibilità all'apoptosi è misurata mediante il test citofluorimetrico Annexina V-FITC/Propidio Ioduro (PI).

I dati ottenuti dopo 48 e 72 ore di coltura indicano i seguenti effetti:

- ⇒ APOPTOSI SPONTANEA: la supplementazione orale di zinco riduce significativamente l'apoptosi precoce spontanea dopo 48 ore di coltura. Inoltre, la supplementazione *in vivo* riduce significativamente l'apoptosi tardiva spontanea dopo 48 e 72 ore di coltura nei PBMCs dei soggetti anziani reclutati (figura 44).

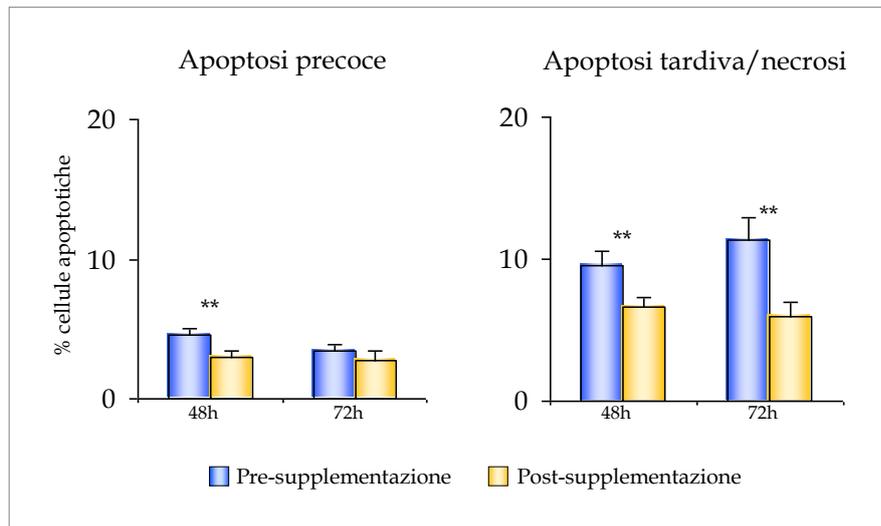


Figura 44: effetto della zinco sulla suscettibilità all'apoptosi spontanea nei PBMCs di soggetti anziani prima e dopo supplementazione di zinco a 48 e 72 ore di coltura. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. L'analisi statistica è stata eseguita applicando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

⇒ APOPTOSI dRib INDOTTA: la supplementazione orale di zinco riduce significativamente l'apoptosi tardiva indotta da stress ossidativo dopo 48 e 72 ore di coltura nei PBMCs dei soggetti anziani reclutati (figura 45).

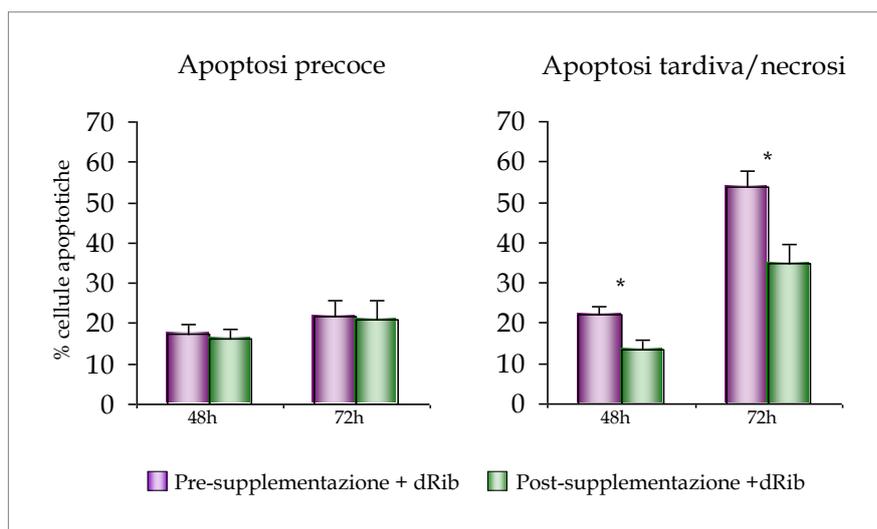


Figura 45: effetto dello zinco sulla suscettibilità all'apoptosi indotta da dRib nei PBMCs di soggetti anziani prima e dopo supplementazione di zinco a 48 e 72 ore di coltura. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. L'analisi statistica è stata eseguita applicando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ .

#### 4.7.2 Studio dell'apoptosi: effetti della supplementazione *in vivo* di zinco sulla depolarizzazione mitocondriale

La depolarizzazione mitocondriale durante l'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo è stata studiata sugli stessi soggetti e nelle stesse condizioni descritte al paragrafo precedente. La variazione del potenziale mitocondriale è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica usando la sonda cationica lipofilica JC-1. I risultati ottenuti dall'analisi di emissione di fluorescenza mostrano che:

- ⇒ **DEPOLARIZZAZIONE MITOCONDRIALE DURANTE L'APOPTOSI SPONTANEA:** a seguito della supplementazione di zinco la depolarizzazione mitocondriale è significativamente ridotta durante l'apoptosi spontanea dopo 48 e 72 ore di coltura (figura 46).
- ⇒ **DEPOLARIZZAZIONE MITOCONDRIALE DURANTE L'APOPTOSI dRib INDOTTA:** la supplementazione *in vivo* di zinco riduce significativamente la depolarizzazione mitocondriale durante l'apoptosi indotta da dRib dopo 72 ore (figura 46).

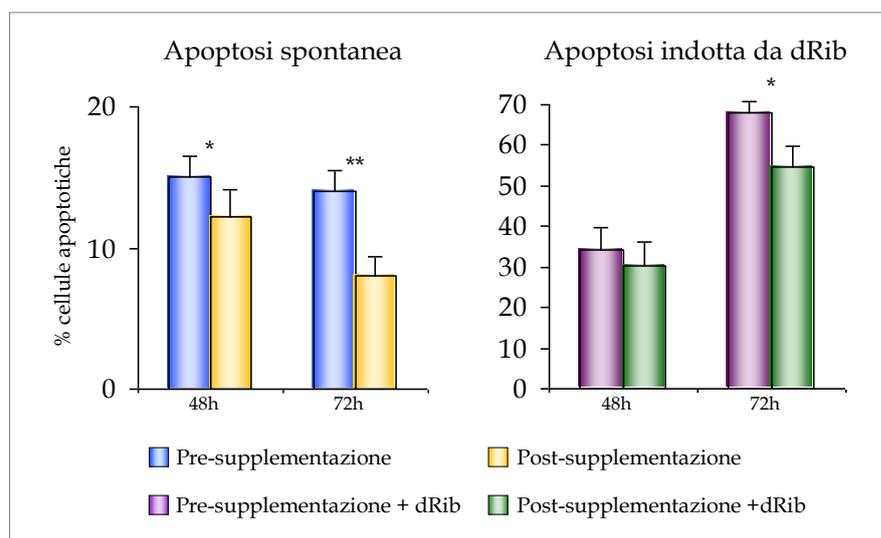


Figura 46: effetto dello zinco sulla depolarizzazione mitocondriale durante l'apoptosi spontanea e indotta da dRib nei PBMCs di soggetti anziani prima e dopo supplementazione di zinco a 48 e 72 ore di coltura. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. L'analisi statistica è stata eseguita applicando il test *t* di Student per dati appaiati; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

#### 4.7.3 Effetti della supplementazione *in vivo* di zinco sul ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è stato studiato sui PBMCs dei 12 soggetti anziani reclutati prima e dopo la supplementazione di zinco dopo 48 e 72 ore di stimolazione con PMA

50 ng/ml (Forbolo Miristato Acetato) e Ionomicina 1  $\mu$ M. Il ciclo cellulare è stato valutato mediante analisi biparametrica in citometria a flusso per valutare il contenuto di DNA (PI) e l'incorporazione di BrdU da parte delle cellule. I dati ottenuti dopo 48 e 72 ore di trattamento non indicano effetti significativi della supplementazione di zinco sul ciclo cellulare (figura 47).

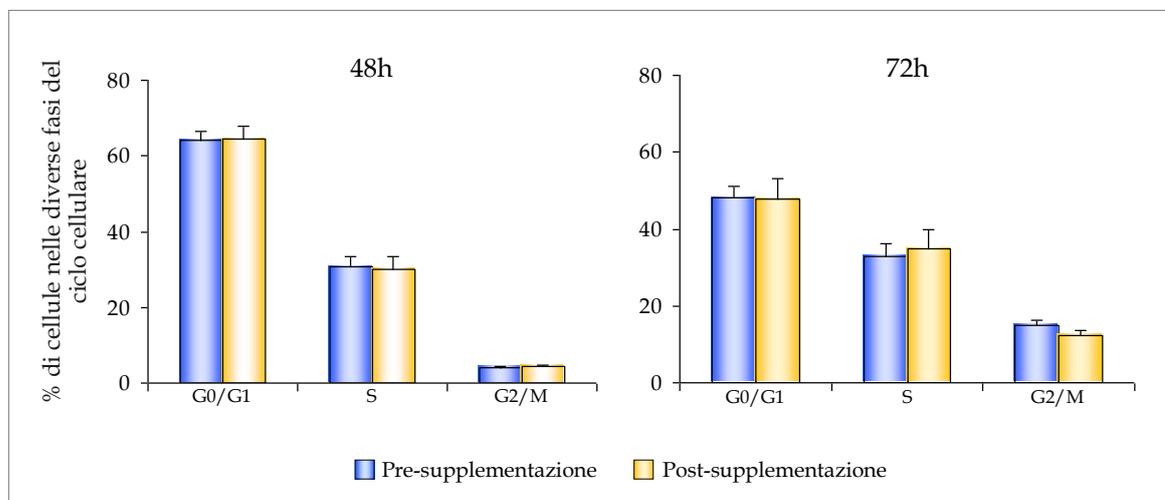


Figura 47: effetto dello zinco sulle fasi del ciclo cellulare nei PBMCs di soggetti anziani prima e dopo supplementazione di zinco a 48 e 72 ore di coltura. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. L'analisi statistica è stata eseguita applicando il test *t* di Student per dati appaiati.

## 5. DISCUSSIONE

L'invecchiamento è un processo caratterizzato da rimodellamento del sistema immunitario e diminuzione della funzionalità della risposta immune, ed è associato ad un' aumentata vulnerabilità alle infezioni del tratto respiratorio e ad un maggiore rischio di mortalità (Lesourd, 1997). Questi cambiamenti età-correlati sono da riferire al fenomeno dell'Immunosenescenza, un evento causato prevalentemente dall'esposizione continua per tutta la durata della vita ad antigeni ed agenti stressanti quale, ad esempio, lo stress ossidativo (Franceschi et al, 2000). Ciò si traduce in un generale "deterioramento" del sistema immunitario, nel quale l'aumento delle citochine pro-infiammatorie svolge un ruolo determinante: queste, infatti, contribuiscono al processo di Inflamm-aging, inteso come il fenomeno di infiammazione cronica che porta all'invecchiamento dell'organismo (Salvioli et al., 2006). Il processo di invecchiamento è, inoltre, caratterizzato da alterazioni dell'omeostasi dello stato redox e progressivo aumento dello stress ossidativo. Questo è coinvolto nella trasduzione del segnale cellulare, nella risposta infiammatoria e nel danno tissutale, determinando cambiamenti metabolici ed energetici che modificano alcune funzioni cellulari, quali la proliferazione, la morte cellulare programmata (apoptosi) e l'omeostasi. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono inoltre implicate nella patogenesi di numerose patologie età-correlate quali aterosclerosi, diabete di tipo II, neurodegenerazione, osteoporosi, tutte accomunate da una forte componente infiammatoria e immunologica. Inoltre, stress ossidativo e ROS sono attivi induttori di apoptosi, le cui alterazioni durante l'invecchiamento potrebbero spiegare alcuni degli aspetti più importanti dell'immunosenescenza quali l'accumulo di megacloni espansi di cellule di memoria, la restrizione del repertorio dei linfociti T e l'aumento di fenomeni autoimmunitari (Franceschi et al., 1995a). I meccanismi cellulari e molecolari correlati con la capacità dell'organismo di rispondere adeguatamente a stress di tipo ossidativo e infiammatorio sembrano dunque giocare un ruolo importante nel favorire la longevità umana e nell'evitare/ritardare l'insorgenza delle principali patologie età-correlate.

Nell'invecchiamento, inoltre, si osserva una generale diminuzione dei livelli plasmatici di zinco, con gravi conseguenze sul sistema immunitario. Lo zinco,

infatti, è un elemento essenziale per il normale funzionamento del sistema immunitario, in quanto esercita un'azione polivalente influenzando ogni aspetto della risposta immune. Esso, inoltre, influenza sia la proliferazione delle cellule immunitarie che quella dei patogeni: infatti una delle risposte della fase acuta durante le infezioni è proprio quella di abbassare la concentrazione plasmatica di zinco come meccanismo di difesa. Malattie quali la diarrea cronica, i disordini gastro-intestinali, la cirrosi epatica e la fibrosi cistica causano, tra l'altro, l'induzione di uno stato di carenza di zinco il cui effetto si riscontra in un incremento delle infezioni prolungate (Prasad 1985)

Lo zinco, inoltre, protegge le cellule dallo stress ossidativo stabilizzando i lipidi, le proteine, il DNA e i microtubuli, e influenza direttamente alcuni regolatori apoptotici fondamentali quali ad esempio le caspasi, le endonucleasi e il rapporto Bcl-2/Bax. La carenza di zinco ha, pertanto, un effetto determinante sulla proliferazione cellulare e sulla regolazione dell'apoptosi (Truong-Tran et al., 2000), con gravi effetti a carico del sistema immunitario. Nell'immunità innata, infatti, la carenza di zinco causa ad esempio diminuzione dell'attività delle cellule Natural Killer (Keen e Gershwin 1990) e del numero di granulociti (Prasad, 2000). Gli effetti dello zinco a carico dell'immunità clonotipica, invece, si manifestano soprattutto in alterazioni nello sviluppo e funzione dei linfociti T (Ibs e Rink, 2003). E' possibile, quindi, che alcune caratteristiche determinanti del fenomeno dell'immunosenescenza, come i cambiamenti dei subsets linfocitari (Franceschi et al., 1995b), la linfopenia e l'atrofia timica (Fabris et al., 1984; Aspinall et al., 2002; Nasi et al., 2006), siano influenzate dai cambiamenti nella biodisponibilità di zinco (Fraker et al., 2000; Dardenne, 2002).

## **5.1 ANALISI EMATOCHIMICHE**

I soggetti anziani e nonagenari reclutati per lo svolgimento di questa tesi possedevano buone abilità cognitive e motorie, non presentavano patologie neoplastiche clinicamente evidenti, insufficienza renale, anemia, disordini autoimmuni o patologie immunitarie.

Anche le analisi ematologiche di routine confermano il generale buono stato di salute dei soggetti reclutati. Il valore medio di VES leggermente superiore ai

valori di riferimento nei nonagenari maschi può essere spiegato nell'ambito del lieve stato pro-infiammatorio cronico caratteristico dell'invecchiamento, definito "inflamm-aging" da Franceschi et al. nel 2000.

La diminuzione dell'ematocrito, degli eritrociti e dell'emoglobina che si osserva nei soggetti nonagenari di sesso femminile potrebbe indicare una lieve tendenza all'anemia. Con l'avanzare dell'età, infatti, si osserva una progressiva riduzione della riserva funzionale del midollo ematopoietico, una riduzione della capacità maturativa dei precursori, una riduzione del numero di precursori staminali (ridotta risposta eritrocitaria), una riduzione della produzione di fattori di crescita e una riduzione della risposta ad essi, compresa l'eritropoietina (Balducci, 2006). Nell'anziano, la causa di anemia viene di solito attribuita a patologie sottostanti quali cancro, malattie infettive, o a malnutrizione e carenza di ferro, tuttavia in alcuni casi non è possibile attribuire l'anemia ad alcuna di queste cause. È stato ipotizzato che il processo di invecchiamento stesso possa essere un intrinseco fattore di sviluppo di anemia, probabilmente attraverso la disregolazione età-correlata di alcune citochine proinfiammatorie come l'interleuchina-6 (IL-6): è stato ipotizzato, infatti, che, come altre citochine, essa determini la diretta inibizione della produzione di eritropoietina o l'inibizione dell'interazione con il recettore per l'eritropoietina (Ershler, 2003; Barbagallo et al., 2004).

Nei soggetti anziani si osserva un valore medio di colesterolo totale leggermente superiore ai parametri di riferimento e superiore a quelli riscontrati nei giovani e nei nonagenari. Questo valore rimane comunque entro valori accettabili (<240 mg/dL) e anche i valori di HDL sono del tutto normali. Questo lieve aumento del colesterolo negli anziani risulta in linea con dati in letteratura che mostrano un aumento del colesterolo dai 20 ai 65 anni. In seguito questo valore tende a diminuire leggermente negli uomini e a raggiungere un plateau nelle donne (Ettinger et al., 1992; Johnson et al., 1993). Anche i trigliceridi risultano aumentati nei soggetti anziani rispetto ai giovani, mentre i nonagenari non presentano differenze significative.

L'albumina, invece, mostra una diminuzione significativa con l'avanzare dell'età. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che un numero considerevole di citochine (p. es., tumor necrosis factor, interleuchina-2, interleuchina-6) è in grado

di ridurre l'assunzione di cibo. Alcuni anziani hanno livelli elevati di queste citochine, che possono contribuire all'anoressia. Gli eventi stressanti (p. es., interventi chirurgici, infezioni, ustioni) provocano generalmente il rilascio di citochine, il quale inibisce la produzione di albumina e ne provoca lo spostamento dal sangue circolante allo spazio extravascolare. Questa evenienza potrebbe essere alla base del calo dei livelli di albumina durante l'invecchiamento.

## **5.2 LIVELLI SIERICI DI ZINCO**

Nel presente studio sono stati determinati i livelli sierici di zinco allo scopo di verificare se effettivamente i soggetti da noi reclutati, in particolare anziani e nonagenari, fossero carenti di zinco come indicato dalla letteratura. E' noto, infatti, che una dieta inadeguata, così come ad esempio il malassorbimento intestinale o la perdita tramite feci o urine, causano diminuzione dei livelli sierici di zinco e questi fenomeni si manifestano soprattutto in età avanzata (King, 1990). Attualmente, gli anziani tendono ad evitare la carne e gli altri alimenti ricchi di zinco per il timore di aumentare il colesterolo. In compenso, essi incrementano il consumo di prodotti farinacei che, al giorno d'oggi, risultano poveri in zinco, magnesio e altri nutrienti essenziali a causa del processo di raffinazione (Cunningham-Rundles et al 2005). Inoltre, il pool di zinco più labile è quello legato all'albumina e nei soggetti reclutati si osserva una diminuzione di tale proteina con l'avanzare dell'età. Pertanto, i risultati ottenuti dall'analisi della zinchemia nei soggetti nonagenari che hanno partecipato allo studio confermano tale tendenza: la maggior parte di questi, infatti, mostra valori di zinco nel siero al di sotto del range di normalità. Inoltre, è stato dimostrato che la zinchemia risente dei cambiamenti ormonali che si verificano durante le fasi del ciclo mestruale e ciò potrebbe spiegare perché anche alcune giovani donne presenti nella nostra casistica manifestano livelli di zinco al di sotto della norma (Das and Chowdury, 1997).

### 5.3 APOPTOSI, ZINCO E INVECCHIAMENTO

I dati presentati in questa tesi dimostrano che:

- Lo zinco sembra essere in grado di ridurre l'apoptosi spontanea nei soggetti giovani e anziani già dopo 48 ore di coltura e tale effetto è presente anche nei nonagenari, sebbene si manifesti con un certo ritardo temporale (72 ore);
- Lo zinco sembra diminuire il rilascio del Cyt C dal mitocondrio durante l'apoptosi spontanea in tutte le classi di età considerate;
- Lo zinco sembra inibire l'attivazione della caspasi-3, un enzima chiave del processo apoptotico, tramite l'inibizione del taglio proteolitico della procaspasi-3. Tale dato, evidenziato mediante l'analisi del Western Blotting e confermato dal test FLICA, risulta evidente nei soggetti giovani e nei soggetti anziani. Numerosi studi dimostrano che la caspasi-3 può essere inibita o, al contrario, attivata dallo zinco, a seconda della concentrazione con cui questo micronutriente è utilizzato: tali effetti opposti sono osservati entro un piccolo range di concentrazioni (20-100  $\mu\text{M}$ ) (Truong-Tran et al., 2001; Schrantz et al., 2001). In questa tesi si dimostra che una concentrazione di zinco più bassa e più vicina ai valori fisiologici (12,5  $\mu\text{M}$ ) diminuisce l'attivazione della caspasi-3 nei PBMCs di soggetti giovani e anziani. D'altra parte, lo zinco non sembra avere un effetto analogo sull'attivazione della caspasi-3 nei nonagenari;
- Lo zinco sembra inibire la proteolisi di PARP durante l'apoptosi spontanea nei soggetti anziani e nonagenari. Il cleavage di PARP viene effettuato *in vitro* dalle caspasi-3 e -7 e può essere considerato un importante marker di apoptosi;
- Lo zinco sembra indurre aumento dell'espressione di Bcl-2, una delle principali proteine ad azione anti-apoptotica. Questo effetto è evidente soprattutto nei soggetti giovani. Ciò supporta l'ipotesi che lo zinco svolga un'azione anti-apoptotica su più bersagli contemporaneamente.

Pertanto, sembra chiaro il ruolo protettivo dello zinco nei confronti dell'apoptosi spontanea. In letteratura molti lavori riportano che lo zinco è in grado di inibire la digestione del DNA, l'attività e l'attivazione della caspasi-3 (Shimizu et al.,

1990; Barbieri et al., 1992; Wolf et al., 1997; Perry et al., 1997; Aiuchi et al., 1998; Truong-Tran et al., 2000; Ostan et al., 2006). Non è ancora chiaro il passaggio esatto in cui lo zinco interviene durante l'apoptosi. Comunque, è probabile che questo micronutriente rappresenti un elemento essenziale per contrastare l'ambiente non ottimale tipico delle condizioni di coltura.

Inoltre, per quanto riguarda l'apoptosi indotta da stress ossidativo, i dati presentati in questa tesi dimostrano che:

- Nei soggetti anziani, lo zinco induce una diminuzione nell'apoptosi precoce indotta da stress ossidativo e un parallelo aumento dell'apoptosi tardiva/necrosi. Nei nonagenari, lo zinco aumenta l'apoptosi tardiva/necrosi e la depolarizzazione della membrana mitocondriale. Al contrario lo zinco non sembra avere effetto sull'apoptosi indotta da stress ossidativo nei giovani;
- Lo zinco sembra aumentare il rilascio del Cyt C durante l'apoptosi indotta da stress ossidativo in tutte le classi di età considerate;
- Lo zinco aumenta l'attivazione della caspasi-3 nei soggetti anziani e in modo meno evidente nei nonagenari. Tale azione dello zinco non è invece presente nei soggetti giovani;
- In tutte le classi di età considerate, invece, lo zinco sembra aumentare la proteolisi di PARP e diminuire l'espressione di Bcl-2 durante l'apoptosi indotta da stress ossidativo.

Lo zinco è, quindi, in grado di influenzare l'apoptosi indotta da stress ossidativo, nel corso della quale tale microelemento può portare le cellule verso una necrosi secondaria, in maniera età-dipendente (Ostan et al., 2006). Una spiegazione possibile potrebbe essere rappresentata dal fatto che lo zinco *in vitro* possa interferire con i sistemi anti-ossidanti cellulari, ad esempio con il sistema GSH/GSSG, come osservato da Steinebach e Wolterbeek nel 1993 su linee cellulari di epatociti di ratto o, che, al contrario il dRib, inducendo una deplezione dei livelli intracellulari di GSH (Klestas et al., 1998), sia in grado di regolare la biodisponibilità di zinco e il suo rilascio da proteine zinco-dipendenti, tra cui le MTs (Jiang et al., 1998). Lo zinco libero potrebbe quindi raggiungere alte concentrazioni intracellulari e un'ulteriore aggiunta di zinco nel mezzo potrebbe

portare a livelli intracellulari tossici. In questo contesto, lo zinco aggiunto *in vitro*, potrebbe potenziare l'effetto apoptotogeno del dRib accelerando il processo di morte cellulare. Le cellule necrotiche possono attivare la risposta da parte di cellule implicate nel processo di infiammazione, come macrofagi e granulociti, e la necrosi zinco-dipendente, se si verificasse anche *in vivo*, potrebbe causare delle risposte infiammatorie non volute. In questo contesto, la diminuzione età-correlata dei livelli sierici di zinco potrebbe essere interpretata come un meccanismo compensatorio atto a contrastare lo stato infiammatorio tipico dell'invecchiamento. Tale ipotesi trova conferma anche da studi precedenti, in cui è stato dimostrato che lo zinco promuove la produzione di citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 (Driessen et al., 1994; Chang et al., 2006; Mocchegiani et al., 2006; Mariani et al., 2006).

Il trattamento con lo zinco *in vitro* in genere mostra effetti positivi sulla sopravvivenza cellulare, ma questo dipende dal tipo di cellula considerata, dalla dose di zinco somministrata e dallo stimolo apoptotico impiegato. Sembra che sia la prevenzione che l'induzione dell'apoptosi siano mediate da pathways che coinvolgono lo zinco e/o enzimi zinco dipendenti (Clegg et al., 2005; Wiseman et al., 2006). Pertanto, la modulazione dell'omeostasi dello zinco gioca un ruolo chiave non solo nella prevenzione dell'apoptosi quando lo stress ossidativo è lieve ma anche nell'induzione dell'apoptosi quando lo stress ossidativo e il danno cellulare sono alti per down-regolare le risposte immuni ed eliminare cellule infettate o maligne (Fraker e Lill-Elghanian, 2004). I risultati ottenuti in questo lavoro con le varie prove indicano inoltre che concentrazioni fisiologiche di zinco sono in grado di influire sia sull'apoptosi spontanea che su quella indotta da stress ossidativo in maniera età-dipendente, dal momento che tali effetti sono visibili soprattutto nei PBMCs dei soggetti nonagenari. Ciò potrebbe essere dovuto ad una diversa suscettibilità allo zinco delle sottopopolazioni dei linfociti T dei nonagenari: è, infatti, noto che nei soggetti molto anziani, rispetto ai giovani, c'è una grande prevalenza di cellule T di memoria non proliferanti e resistenti all'apoptosi (Franceschi et al., 1996; Salvioli et al., 2003; Gupta et al., 2005). Sarebbe, pertanto, interessante approfondire lo studio presentato in questa tesi sulle sottopopolazioni di linfociti T di soggetti giovani e nonagenari, per

comprendere come effettivamente lo zinco agisca e su quali sottopopolazioni linfocitarie eserciti un effetto maggiore.

## 5.4 ESPRESSIONE DELLE METALLOTIONEINE INTRACELLULARI

Per capire se l'espressione delle MTs nel sistema immunitario in risposta allo zinco possa subire modificazioni con l'invecchiamento, sono stati valutati i livelli di MTs intracellulari a seguito di una supplementazione *in vitro* con diverse concentrazioni di zinco (12,5-125 $\mu$ M) nei linfociti totali e nelle due principali sottopopolazioni linfocitarie: T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> in un gruppo di soggetti giovani e in un gruppo di soggetti anziani. I risultati ottenuti mostrano che:

- ✓ LINFOCITI TOTALI: dopo 24 ore di coltura i linfociti dei i soggetti anziani mostrano una maggiore espressione di MTs per concentrazioni di ZnSO<sub>4</sub> pari a 31,25 e 62,5  $\mu$ M. Questa differenza tra i due gruppi di età si annulla quando la concentrazione di zinco aumenta (93 e 125  $\mu$ M). Dopo 48 ore di coltura l'andamento delle curve di espressione non mostra differenze tra soggetti giovani e anziani.
- ✓ LINFOCITI T CD4<sup>+</sup>: dopo 24 ore di coltura, i linfociti T CD4<sup>+</sup> dei soggetti anziani mostrano una maggiore espressione di MTs per concentrazioni di ZnSO<sub>4</sub> pari a 31,25 e 62,5  $\mu$ M. Questa differenza viene mantenuta dopo 48 ore: i linfociti T CD4<sup>+</sup> dei soggetti anziani esprimono livelli maggiori di MTs intracellulari con concentrazioni di zinco pari a 62,5 e 93  $\mu$ M.
- ✓ LINFOCITI T CD8<sup>+</sup>: dopo 24 ore di coltura i linfociti T CD8<sup>+</sup> dei soggetti anziani mostrano una maggiore espressione di MTs per concentrazioni di ZnSO<sub>4</sub> pari a 31,25 e 62,5  $\mu$ M. Questa differenza tra i due gruppi di età si annulla quando la concentrazione di zinco aumenta (93 e 125  $\mu$ M). Dopo 48 ore di coltura l'andamento delle curve di espressione non mostra differenze tra soggetti giovani e anziani.

In particolare, sia per quanto riguarda i linfociti totali, sia per quanto riguarda le sottopopolazioni linfocitarie considerate, si osserva che a 24 ore nei soggetti giovani le concentrazioni più basse di zinco (12,5 e 31,25  $\mu$ M) non inducono un

aumento dell'espressione delle MTs rispetto a quella osservata nelle cellule non trattate. Al contrario, nei soggetti anziani, già con concentrazioni di zinco molto basse si osserva un'induzione dell'espressione di queste metallo-proteine a 24 ore. Questa differente espressione viene mantenuta nei CD4<sup>+</sup> anche dopo 48 ore di coltura, mentre per i CD8<sup>+</sup> si osserva una sostanziale sovrapposizione delle due curve di espressione. Questo potrebbe significare che nei linfociti totali, nei CD4<sup>+</sup> e nei CD8<sup>+</sup> le MTs vengono espresse più velocemente e in risposta ad una più bassa concentrazione di zinco nei soggetti anziani rispetto ai soggetti giovani. Questi dati potrebbero supportare il ruolo pleiotropico delle MTs durante l'invecchiamento, quando in risposta all'infiammazione cronica e allo stress ossidativo i livelli di queste metallo-proteine aumentano. Le MTs negli anziani, inoltre, possiedono una ridotta capacità di rilasciare lo zinco (Mocchegiani et al., 2000). Questo, unitamente alla carenza di zinco che si osserva nei soggetti anziani, riduce la bio-disponibilità di zinco e, di conseguenza, una risposta immunitaria compromessa a livello timico ed extra-timico. Pertanto, queste metallo-proteine non rappresentano più proteine donatrici, ma assumono, al contrario il ruolo di sequestratrici di zinco (Mocchegiani et al., 2004; Mocchegiani et al., 2006) trasformandosi da fattori protettivi in età giovane adulta ad agenti nocivi per la funzione immunitaria durante l'invecchiamento e nelle malattie età-associate (Mocchegiani et al., 2006).

## 5.5 EFFETTI DELLO ZINCO SUL CICLO CELLULARE

I risultati presentati in questa tesi indicano che:

- Nei soggetti giovani, lo zinco solfato 125  $\mu$ M aumenta la percentuale di cellule in fase G0/G1: ciò potrebbe essere correlato con un eventuale ruolo dello zinco nel blocco della progressione del ciclo cellulare in corrispondenza del G1/S checkpoint. Lo zinco 125  $\mu$ M riduce la percentuale di cellule in fase S e aumenta la percentuale di cellule in fase G2/M, suggerendo un ruolo nella progressione delle cellule dalla fase S alla fase G2/M;
- Nei soggetti anziani, a differenza di quanto accade per i giovani, lo zinco solfato 125  $\mu$ M non è in grado di arrestare le cellule in fase G0/G1. A tale concentrazione, tuttavia, si osservano la riduzione della percentuale di cellule

in fase S e l'aumento della percentuale di cellule in fase G2/M. Inoltre, dal confronto con la percentuale relativa alla fase G2/M ottenuta per i soggetti giovani, emerge un dato interessante: rispetto a questi ultimi, infatti, negli anziani tale popolazione risulta più che raddoppiata. Pertanto, si può ipotizzare che nei soggetti anziani lo zinco alla concentrazione 125  $\mu\text{M}$  favorisca e acceleri la progressione delle cellule dalla fase S alla successiva fase G2/M;

- Nei soggetti nonagenari, lo stesso effetto osservato per gli anziani è evidente già alla concentrazione di  $\text{ZnSO}_4$  62,5  $\mu\text{M}$ . Ciò indica che gli individui più anziani sono maggiormente sensibili allo zinco anche in concentrazioni più basse;
- In conseguenza del trattamento con zinco e in maniera dose-dipendente, inoltre, è stata osservata una quarta popolazione cellulare S/BrdU<sup>-</sup>: non siamo ancora in grado, tuttavia, di stabilire se le cellule appartenenti a tale popolazione sono state bloccate e/o morte. In ogni caso, lo zinco aumenta in maniera dose-dipendente la percentuale di cellule nella fase S/BrdU<sup>-</sup> e tale effetto è particolarmente evidente nei soggetti nonagenari.

Lo zinco è importante per il controllo della crescita e della proliferazione cellulare, ma gli studi volti alla comprensione dei meccanismi di regolazione del ciclo cellulare su cui tale ione agisce sono ancora troppo pochi perché sia possibile fare delle ipotesi concrete. Sembra, tuttavia, che lo zinco sia richiesto nel corso della fase G1 per consentire alla cellula l'ingresso nella fase S (Chesters et al., 1989), anche se non è ulteriormente richiesto per il corretto svolgimento della fase S (Chesters et al., 1999). Questo potrebbe significare che le proteine del complesso di sintesi del DNA siano in grado di conservare gli ioni zinco ad esse associati e di mantenere la loro funzione metabolica anche quando la disponibilità di zinco libero viene drasticamente ridotta. Lo zinco libero, pur non essendo richiesto direttamente nella sintesi del DNA, sembra comunque necessario nelle fasi conclusive del ciclo cellulare, in quanto la sua carenza blocca le cellule in fase G2 e ne impedisce il passaggio alla fase M (Chesters et al., 1999).

I risultati ottenuti nel presente studio confermano il ruolo svolto dallo zinco a livello dei checkpoint G1/S e, in particolare, G2/M: sono tuttavia necessari

ulteriori approfondimenti allo scopo di individuare i bersagli specifici dell'azione di questo microelemento. Da alcuni studi è emerso che in presenza di ZnCl<sub>2</sub> alla concentrazione 100 µM aumenta l'espressione e la localizzazione nucleare di p21, un fattore di regolazione coinvolto in più punti della regolazione del ciclo cellulare: parallelamente a tale aumento è stato osservato, in linee tumorali umane, un blocco delle cellule in fase S (Park et al., 2002). Alcuni lavori hanno, inoltre, dimostrato che p53 e p21 sono necessarie per mantenere l'arresto in G2 in seguito a danno al DNA (Flatt et al., 2000): sarebbe, pertanto, interessante studiare l'espressione di questi fattori di regolazione in presenza di varie concentrazioni di zinco. Da alcuni studi, infine, è emerso che l'induzione dell'espressione di p21 p53-mediata causa la comparsa di un fenotipo senescence-like (Chang et al., 1999); nei fibroblasti di soggetti centenari, inoltre, si osserva un'augmentata espressione basale di tale fattore (Salvioli et al., 2005). L'over-espressione di p21 nei soggetti più anziani potrebbe, pertanto, spiegare perché in questi ultimi il blocco in fase G2/M è osservato anche a concentrazioni di zinco più basse.

## **5.6 RUOLO DELLE VARIANTI GENICHE DI P53 NELL'APOPTOSI E NEL CICLO CELLULARE IN PRESENZA DI ZINCO**

### **5.6.1 p53 E APOPTOSI**

Studi precedenti effettuati su fibroblasti di soggetti anziani e centenari (Bonafè et al., 2004) riportano che il polimorfismo al codone 72 del gene p53 (Arg72 o Pro72) influisce sulla suscettibilità all'apoptosi. Infatti, è stato dimostrato che nei soggetti anziani esiste una diversa propensione all'apoptosi indotta da stress ossidativo in dipendenza dal genotipo di p53; i soggetti anziani Pro<sup>-</sup> (Arg/Arg), in particolare, risultano essere molto più suscettibili all'apoptosi indotta da stress ossidativo rispetto ai soggetti anziani Pro<sup>+</sup> (Arg/Pro; Pro/Pro). Tale differenza sembra avere origine dal fatto che la variante Arg72 di p53 è in grado di legare con maggiore efficienza MDM2 per il trasporto al mitocondrio, dove interagisce con Bcl-2/Bcl-xL inducendo il taglio proteolitico della procaspasi-3 (Bonafè et al., 2004). Il polimorfismo al codone 72 di p53 sembra, quindi, contribuire a determinare una

variabilità genetica nella suscettibilità all'apoptosi negli anziani, che riveste un ruolo fondamentale nell'insorgenza di numerose patologie età-correlate.

Anche i dati raccolti in questa tesi evidenziano e confermano l'esistenza di una diversa propensione all'apoptosi nei soggetti con diverso polimorfismo al codone 72 di p53: alla luce di ciò, abbiamo voluto valutare se lo zinco possa interferire con i processi sopra menzionati e, quindi, modulare in modo diverso la sensibilità all'apoptosi nei soggetti Pro<sup>+</sup> e Pro<sup>-</sup> di diverse classi di età. Dai dati raccolti è emerso che:

- La presenza di zinco diminuisce l'apoptosi spontanea nei soggetti Pro<sup>-</sup> giovani e anziani. Non sembrano invece esserci differenze significative tra i soggetti nonagenari Pro<sup>-</sup> e Pro<sup>+</sup>;
- Per quanto riguarda l'apoptosi indotta da stress ossidativo lo zinco sembra aumentare l'apoptosi tardiva/necrosi nei soggetti anziani Pro<sup>-</sup>.

Pertanto, l'effetto dello zinco sembrerebbe essere correlato al genotipo. In particolare, tale microelemento sembra influenzare l'apoptosi solo nei soggetti Pro<sup>-</sup>: si potrebbe pertanto ipotizzare che, alla luce di quanto riportato in letteratura, lo zinco agisca in qualche punto a livello del trasporto di p53 al mitocondrio, rafforzando, quindi, il meccanismo responsabile della maggiore propensione all'apoptosi osservata negli soggetti Pro<sup>-</sup>.

### **5.6.2 p53 e ciclo cellulare**

Da studi recenti è emerso che il polimorfismo al codone 72 di p53 sembra essere coinvolto nella proliferazione cellulare: in particolare è stato dimostrato che, in fibroblasti di centenari, i soggetti Pro<sup>-</sup> superano più facilmente il checkpoint G1/S del ciclo cellulare in confronto ai soggetti Pro<sup>+</sup> (Salvioli et al., 2005). Tale comportamento sembra essere correlato con l'espressione del fattore di regolazione p21 indotta da p53: sembra, infatti, che la forma Pro72 di p53 sia in grado di legarsi al promotore del gene di p21 con maggiore efficienza rispetto alla forma Arg72 (Thomas et al., 1999; Salvioli et al., 2005). Alla luce di ciò, abbiamo voluto valutare se lo zinco possa avere un ruolo nei processi sopra menzionati e, quindi, modulare in modo diverso il ciclo cellulare nei soggetti Pro<sup>+</sup> e Pro<sup>-</sup> di diverse classi di età. I risultati presentati in questa tesi indicano che:

- L'aumento della percentuale di cellule in fase G0/G1 osservato a 48 ore nei giovani in presenza di zinco 125  $\mu\text{M}$  sembra essere un effetto dovuto soprattutto ai soggetti Pro<sup>+</sup>. Dopo 72 ore, invece, l'accumulo in G0/G1 non dipende dalla natura del polimorfismo;
- La diminuzione della fase S e l'aumento della fase G2/M osservati in presenza di zinco in entrambe le classi di età non sembrano essere correlati con la natura del polimorfismo di p53;
- La comparsa di una popolazione cellulare S/BrdU<sup>-</sup> nei soggetti giovani in presenza di zinco a 48 e 72 ore sembra essere strettamente correlata alla variante polimorfica Pro<sup>-</sup>: nei soggetti Pro<sup>+</sup>, infatti, non si osservano aumenti significativi della percentuale di cellule in tale fase in presenza di zinco. I giovani con genotipo Arg/Arg sembrano, quindi, più suscettibili all'effetto dello zinco durante la duplicazione del DNA. Nei soggetti anziani, invece, l'aumento della fase S/BrdU<sup>-</sup> non dipende dalla natura del polimorfismo.

I dati raccolti nel presente lavoro non sembrano confermare quanto riportato in letteratura, in quanto non sono state riscontrate differenze nelle varie fasi del ciclo cellulare nei soggetti anziani in relazione alla variante polimorfica. Inoltre non è stato osservato un diverso comportamento proliferativo nei soggetti anziani in relazione al polimorfismo nemmeno in presenza di zinco, a indicare che tale ione nell'anziano non sembra influenzare il ciclo cellulare in maniera polimorfismo-correlata. Un aumento della percentuale di cellule in fase G0/G1 in presenza di zinco 125  $\mu\text{M}$  è stato osservato solo per i soggetti giovani Pro<sup>+</sup>. Studi precedenti riportano che lo zinco induce aumento dell'attività di p21 in linee cellulari tumorali causando un blocco del ciclo cellulare (Park et al., 2002). L'accumulo di cellule in fase G0/G1 da noi osservato in presenza di zinco nei soggetti giovani Pro<sup>+</sup>, pertanto, potrebbe essere un effetto imputabile alla maggiore attività di p21, dovuta in parte all'aumentata attivazione trascrizionale indotta dalla variante Pro72 di p53 e in parte all'aumento zinco-correlato dell'attività di p21 stesso. Si rendono, comunque, necessari approfondimenti per meglio comprendere le ragioni del differente comportamento osservabile nei giovani tra le due varianti polimorfiche di p53 in relazione alla presenza di zinco in coltura.

## 5.7 EFFETTI DELLA SUPPLEMENTAZIONE *IN VIVO* DI ZINCO

In aggiunta agli studi sull'effetto dello zinco *in vitro*, è stato analizzato anche l'effetto di una supplementazione *in vivo* di zinco sull'apoptosi e sulla proliferazione dei linfociti su un gruppo di soggetti anziani prima e dopo 6 settimane di supplementazione orale di zinco (10 mg al giorno).

### 5.7.1 Effetti della supplementazione *in vivo* di zinco sull'apoptosi

I dati ottenuti in questa tesi indicano che la supplementazione *in vivo* di zinco è in grado di ridurre efficacemente l'apoptosi spontanea e indotta da stress ossidativo e la conseguente depolarizzazione mitocondriale nei PBMCs dei soggetti anziani reclutati. I dati presenti in letteratura sugli effetti di una supplementazione di zinco sulla risposta immune risultano discordanti a causa delle diverse dosi di zinco utilizzate e della diversa durata dei trattamenti (Duchateau et al., 1981; Sanstead et al., 1982; Boden et al., 1990; Prasad et al., 1993; Boukaiba et al., 1982; Cakman et al., 1997; Fortes et al., 1998). In questo contesto è utile ricordare che è stato riportato che alti dosi di zinco possano indurre apoptosi in presenza di stress ossidativo. Nel nostro caso, la supplementazione è stata somministrata ad una dose (10 mg al giorno) inferiore a quella raccomandata dalla RDA (dai 15 ai 25 mg al giorno) e per un periodo relativamente breve. E' possibile, pertanto, che in queste condizioni lo zinco possa esercitare un effetto anti-apoptotico e anti-ossidante promuovendo la sopravvivenza cellulare. E' importante però sottolineare che dai risultati ottenuti in questa tesi la supplementazione di zinco *in vitro* e *in vivo* sembrano avere effetti opposti sull'apoptosi e sulla depolarizzazione mitocondriale indotte da stress ossidativo nei PBMCs dei soggetti anziani. Questo potrebbe dipendere dal fatto che, a seguito dei due diversi tipi di supplementazione, i livelli di zinco bio-disponibile potrebbero essere diversi e/o questo ione potrebbe essere differentemente compartimentalizzato nella cellula e pertanto agire in modo diverso sui targets molecolari della via apoptotica. Sono necessari ulteriori esperimenti e analisi cliniche per chiarire il reale effetto di una supplementazione orale di zinco nell'invecchiamento, anche se questi dati preliminari potrebbero incoraggiare nell'utilizzo di questo oligoelemento in tutte quelle malattie età-correlate con una patogenesi dovuta allo stress ossidativo.

### 5.7.2 Effetti della supplementazione *in vivo* di zinco sul ciclo cellulare

La supplementazione *in vivo* di zinco non sembra aver effetto sul ciclo cellulare dei soggetti anziani da noi considerati. Questi risultati sembrano discordare con dati presenti in letteratura che indicano che il trattamento con 15 mg di zinco per un mese in pazienti affetti da sindrome di Down, in soggetti anziani e pazienti anziani con infezioni ripristina la funzionalità endocrina del timo, migliora la risposta proliferativa dei linfociti ai mitogeni, aumenta il numero di CD4<sup>+</sup>, ristabilisce la citotossicità delle cellule Natural Killer (Mocchegiani et al., 1999; Franceschi et al., 1988). Inoltre, anche per quanto riguarda lo studio del ciclo cellulare, i risultati ottenuti a seguito della supplementazione *in vitro* e *in vivo* di zinco potrebbero apparire sostanzialmente diversi se non si considerasse che l'effetto dello zinco sul ciclo cellulare è osservato in presenza di alte concentrazioni (62,5-125  $\mu$ M) di zinco *in vitro*. E' ovvio che una supplementazione *in vivo* non può portare la concentrazione di zinco a livelli così alti. In questo contesto, assume una particolare importanza la misura della bio-disponibilità di zinco libero (Malavolta et al., 2006).

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Mageed A, Agrawal KC. Antisense down-regulation of metallothionein induces growth arrest and apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Gene Ther.* 1997; May-Jun;4(3):199-207.

Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J.* 2001; 20: 6627-6636.

Akbar AN, Salmon M. Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T-cell death. *Immunol Today.* 1997; Feb;18(2):72-6.

Aiuchi T, Mihara S, Nakaya M, Masuda Y, Nakajo S, Nakaya K. Zinc ions prevent processing of caspase-3 during apoptosis induced by geranylgeraniol in HL-60 cells. *J Biochem.* 1998 Aug;124(2):300-3.

Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science.* 1997; 277: 370-372.

Arion D, Meijer L, Brizuela L, Beach D. cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell.* 1988; 55:371-378.

Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe J, Cecconi F, Youle R. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* 2003; 22:385-4399.

Arsenault JE, Brown KH. Zinc intake of US preschool children exceeds new dietary reference intakes. *Am J Clin Nutr.* 2003; Nov;78(5):1011-7.

Ashok BT, Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol.* 1999; 34(3):293-303.

Aspinall R, Andrew D, Pido-Lopez J. Age-associated changes in thymopoiesis. *Springer Semin Immunopathol.* 2002; 24(1):87-101.

Balducci L, Ersler WB, Krantz S. Anemia in the elderly-clinical findings and impact on health. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006; 58(2):156-65.

Barbagallo M, Bellavia G, Dominguez a, Galioto A, Ferlisi A, Putignano E, Belvedere M, Costanza g, Di Sciacca A. Anemia e decline funzionale nell'anziano. *G Gerontol.* 2004; 52:283-289.

Barbieri D, Troiano L, Grassilli E, Agnesini C, Cristofalo EA, Monti D, Capri M, Cossarizza A, Franceschi C. Inhibition of apoptosis by zinc: a reappraisal. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;187(3):1256-61.

Basanez G, Nechushtan A, Drozhinin O, Chanturiya A, Choe E, Tutt S, Wood KA, Hsu Y-T, Zimmerberg J, Youle RJ. Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *PNAS.* 1999; 96:5492-5497.

Baserga R. *The Biology of Cell Reproduction.* Cambridge, MA:Harvard University Press, 1985.

Bauer MK, Schubert A, Rocks O, Grimm S. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol.* 1999; 147:1493-1502.

Bedwal RS, Bahuguna A: Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia.* 1994; 50:626-640.

Berg JM and Shi Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science*. 1996; Feb 23;271(5252):1081-5.

Bettger WJ and O'Dell BL. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci*. 1981; 28:1425-1438.

Beattie JH, Kwun IS. Is zinc deficiency a risk factor for atherosclerosis? *Br J Nutr*. 2004; Feb;91(2):177-81.

Bhardwaj, A. and Aggarwal, B. Receptor-mediated choreography of life and death. *J. Clin. Immunol*. 2003; 23:317-332.

Bogden JD, Oleske JM, Lavenhar MA, Munves EM, Kemp FW, Bruening KS, Holding KJ, Denny TN, Guarino MA, Holland BK. Effects of one year of supplementation with zinc and other micronutrients on cellular immunity in the elderly. *J Am Coll Nutr*. 1990; 9(3):214-25.

Boltze C, Roessner A, Landt O, Szibor R, Peters B, Schneider-Stock R. Homozygous proline at codon 72 of p53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Oncol*. 2002; Nov;21(5):1151-4.

Bonafè M, Olivieri F, Mari D, Baggio G, Mattace R, Berardelli M, Sansoni P, De Benedictis G, De Luca M, Marchegiani F, Cavallone L, Cardelli M, Giovagnetti S, Ferrucci L, Amadio L, Lisa R, Tucci MG, Troiano L, Pini G, Gueresi P, Morellini M, Sorbi S, Passeri G, Barbi C, Valensin S, Monti D, Deiana L, Pes GM, Carru C, Franceschi C. P53 codon 72 polymorphism and longevity: additional data on centenarians from continental Italy and Sardinia. *Am J Hum Genet*. 1999; Dec;65(6):1782-5.

Bonafè M, Olivieri F, Cavallone L, Giovagnetti S, Mayegiani F, Cardelli M, Pieri C, Marra M, Antonicelli R, Lisa R, Rizzo MR, Paolisso G, Monti D, Franceschi C. A

gender--dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol.* 2001; Aug;31(8):2357-61.

Bonafè M, Salvioli S, Barbi C, Trapassi C, Tocco F, Storci G, Invidia L, Vannini I, Rossi M, Marzi E, Mishto M, Capri M, Olivieri F, Antonicelli R, Memo M, Uberti D, Nacmias B, Sorbi S, Monti D, Franceschi C. The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death. *Cell Death Differ.* 2004; Sep;11(9):962-73.

Bonomini M, Di Paolo B, De Risio F, Niri L, Klinkmann H, Ivanowich P, Albertazzi A. Effects of zinc supplementation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1993; 8:1166-1168.

Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 1998; 17:37-49.

Boukaïba N, Flament C, Acher S, Chappuis P, Piau A, Fusselier M, Dardenne M, Lemonnier D. A physiological amount of zinc supplementation: effects on nutritional, lipid, and thymic status in an elderly population. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57(4):566-72.

Böyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97:51-76.

Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *Embo J.* 2001; 20:998-1009.

Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol.* 2003; 160:1115-1127.

Brenner C and Grimm S. The permeability transition pore complex and cancer cell death. *Oncogene.* 2006; Aug 7;25(34):4744-56.

Brustovetsky N, Klingenberg M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry.* 1996; 35:8483-8488.

Bui LM, Dressendorfer RH, Keen CL, Summary JJ, Dubick MA. Zinc status and interleukin-1 beta-induced alterations in mineral metabolism in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994; 206(4):438-44.

Cakman I, Kirchner H, Rink L. Zinc supplementation reconstitutes the production of interferon- $\alpha$  by leukocytes of elderly persons. *J Interferon Cytokine Res.* 1997; 17:469-472.

Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian MG. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology.* 1999; 132(2-3):85-98.

Calhoun NR, Smith JC, Becker KL. The role of zinc in bone metabolism. *Orthopedics.* 1974; 103:212-234.

Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp. Gerontol.* 2003; 38:5-11.

Canman CE, Lim DS. The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene.* 1998; Dec 24;17(25):3301-8.

Capri M, Salvioli S, Sevini F, Valensin S, Celani L, Monti D, Pawelec G, De Benedictis G, Gonos ES, Franceschi C. The genetics of human longevity. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067:252-63.

Castedo M, Ferri K, Roumier T, Metivier D, Zamzami N, Kroemer G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods.* 2002; 265: 39-47.

Chai F, Truong-Tran AQ, Evdokiou, A Young GP, Zalewski PD. Intracellular Zinc Depletion Induces Caspase Activation and p21Waf1/Cip1 Cleavage in Human Epithelial Cell Lines. *J Infect Diseases.* 2000; 182, S85-S92.

Chai F, Truong-Tran AQ, Ho LH, Zalewski PD. Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: A review. *Immunol Cell Biol.* 1999; Jun;77(3):272-8.

Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 $\sigma$  is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature.* 1999; Oct 7;401(6753):616-20.

Chang KL, Hung TC, Hsieh BS, Chen YH, Chen TF, Cheng HL. Zinc at pharmacologic concentrations affects cytokine expression and induces apoptosis of human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition.* 2006; May;22(5):465-74.

Chao Y, Shih YL, Chiu JH, Chau GY, Lui WY, Yang WK, Lee SD, Huang TS. Overexpression of cyclin A but not Skp 2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 1998; 58:985-990.

Chavakis T, May AE, Preissner KT, Kanse SM. Molecular mechanism of zinc-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor and  $\beta$ 2-integrins. *Blood.* 1999; 93:2976-2983.

Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem*. 2001; Aug 17;276(33):30724-8.

Chene P, Mittl P, Grutter M. *In vitro* structure-function analysis of the beta-strand 326-333 of human p53. *J Mol Biol*. 1997; Nov 7;273(4):873-81.

Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*. 2003; 301:513-517

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. 2001; 8:705-711.

Chesters JK, Petrie L, Vint H. Specificity and timing of the Zn<sup>2+</sup> requirement for DNA synthesis by 3T3 cells. *Exp Cell Res*. 1989; 184:499-508.

Chesters JK, Petrie L. A possible role for cyclins in the zinc requirements during G1 and G2 phases of the cell cycle. *J Nutr Biochem*. 1999; May;10(5):279-90.

Chevion M. A site specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radic Biol Med*. 1988; 5:27-37.

Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004; 303:1010-1014

Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*. 1995; 374:733-736.

Clarke PG, Clarke S. Historic apoptosis. *Nature*. 1995; 378(6554):230.

Clegg MS, Hanna LA, Niles BJ, Momma TY, Keen CL. Zinc deficiency-induced cell death. *IUBMB Life*. 2005; 57(10):661-9.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997; Aug 15;326 (Pt 1):1-16.

Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 2003; Nov 24;22(53):8590-607.

Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; Nov 30;197(1):40-5.

Costantini P, Belzacq AS, Vieira HL, Larochette N, de Pablo MA, Zamzami N, Susin SA, Brenner C, Kroemer G. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene*. 2000; 19:307-314.

Coto JA, Hadden EM, Sauro M, Zorn N, Hadden JW. Interleukin 1 regulates secretion of zinc-thymulin by human thymic epithelial cells and its action on T-lymphocyte proliferation and nuclear protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; Aug 15;89(16):7752-6.

Crea A, Guerin V, Ortega F, Hartemann P. Zinc et système immunitaire. *Ann Med Interne*. 1990; 141:447-451.

Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*. 2004; 95(10):957-70.

Cui L, Takagi Y, Wasa M, Iiboshi Y, Inoue M, Khan J, Sando K, Nezu R, Okada A. Zinc deficiency enhances interleukin-1 $\alpha$ -induced metallothionein-1 expression in rats. *J Nutr.* 1998; 128(7):1092-8.

Cui L, Takagi Y, Sando K, Wasa M, Okada A. Nitric oxide synthase inhibitor attenuates inflammatory lesions in the skin of zinc-deficient rats. *Nutrition.* 2000; 16:34-41.

Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; Jun;115(6):1119-28; quiz 1129.

Dakshinamurti K, Paulose C, Viswanathan M, Siow Y, Sharma S. Neurobiology of piridoxine. *Ann NY Acad Sci.* 1990; 585:128-44.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004; 116:205-219.

Dardenne M, Boukaiba N, Gagnerault MC, Homo-Delarche F, Chappuis P, Lemonnier D, Savino W. Restoration of the thymus in aging mice by in vivo zinc supplementation. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993; 66(2):127-35.

Dardenne M. Zinc and immune function. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56 Suppl 3:S20-3.

Das DK, Chowdury JR. The use of glycogen studies in the evaluation of treatment for carcinoma of the cervix uteri. *Acta Cytol.* 1981; Sep-Oct;25(5):566-71.

De Oliveira F, Chauvin C, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, Fontaine E. Effects of permeability transition inhibition and decrease in cytochrome c content on doxorubicin toxicity in K562 cells. *Oncogene.* 2006; 25:2646-2655.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*. 1998; 17:2215-2223

Didenko VV, Hornsby PJ. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J Cell Biol*. 1996; 135:1369-76.

Dou QP, Fridovich Keil JL, Pardee AB. Inducible proteins binding to the murine thymidine kinase promoter in late G1/S phase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:1157-1161.

Dreosti IE. Recommended dietary intakes of iron, zinc, and other inorganic nutrients and their chemical form and bioavailability. *Nutrition*. 1993; Nov-Dec;9(6):542-5.

Driessen C, Hirv K, Rink L, Kirchner H. Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. *Lymphokine Cytokine Res*. 1994; 13: 15-20.

Duchateau J, Delespesse G, Vereecke P. Influence of oral zinc supplementation on the lymphocyte response to mitogens of normal subjects. *Am J Clin Nutr*. 1981a; 34:88-93.

Duchateau J, Delepesse G, Vrijens R, Collet H. Beneficial effects of oral zinc supplementation on the immune response of old people. *Am J Med*. 1981b; 70(5):1001-4.

Dulic V, Stein GH, Far DF, Reed SI. Nuclear accumulation of p21 PC at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol*. 1998; 18:546-557.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003; Mar;33(3):357-65.

Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol Today.* 1986; 7:115-119.

Ebadi M, Swanson S. The status of zinc, copper, and metallothionein in cancer patients. *Prog Clin Biol Res.* 1988; 259:161-75.

Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science.* 1996; 274:1664-1672.

Erikson E, Maller JL. Biochemical characterization of the p34cdc2 protein kinase component of purified maturation-promoting factor from *Xenopus* eggs. *J Biol Chem.* 1989; 264:19577-19582.

Ershler WB. Biological interactions of aging and anemia: a focus on cytokines. *J Am Geriatr Soc.* 2003; 51(3 Suppl):S18-21.

Ettinger WH, Wahl PW, Kuller LH, Bush TL, Tracy RP, Manolio TA, Borhani NO, Wong ND, O'Leary DH. Lipoprotein lipids in older people. Results from the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group. *Circulation.* 1992; 86(3):858-69.

Fabris N, Mocchegiani E, Amadio L, Zannotti M, Licastro F, Franceschi C. Thymic hormone deficiency in normal ageing and Down's syndrome: is there a primary failure of the thymus? *Lancet.* 1984; May 5;1(8384):983-6.

Fagiolo U, Cossarizza A, Santacaterina S, Ortolani C, Monti D, Paganelli R, Franceschi C. Increased cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from healthy elderly people. *Ann N Y Acad Sci.* 1992; Nov 21;663:490-3.

Faleiro L, Kobayashi R, Fearnhead H, Lazebnik Y. Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO J.* 1997; 16, 2271-2281.

Farrow SN, White JH, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, Martinou JC, Brown R. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature.* 1995; 374: 731-733.

Favier AE. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. *Biol Trace Elem Res.* 1992; 32:363-382.

Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; Jul 23;93(15):7464-7469.

Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem.* 1994; Dec 9;269

Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2003; 10:76-100

Flatt PM, Tang LJ, Scatena CD, Szak ST, Pietenpol JA. p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol.* 2000; Jun;20(12):4210-23.

Floersheim GL, Christ A, Koenig R, Racine C, Gudat F. Radiation-induced lymphoid tumors and radiation lethality are inhibited by combined treatment with small doses of zinc aspartate and WR 2721. *Int J Cancer.* 1992; 52, 604-608.

Fortes C, Forastiere F, Agabiti N, Fano V, Pacifici R, Virgili F, Piras G, Guidi L, Bartoloni C, Tricerri A, Zuccaro P, Ebrahim S, Perucci CA. The effect of zinc and vitamin A supplementation on immune response in an older population. *J Am Geriatr Soc.* 1998; 46(1):19-26.

Fosmire GJ. Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr.* 1990; 51(2):225-7.

Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demaurex N, Krause KH. Bcl-2 decreases the free Ca<sup>2+</sup> concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:5723–5728.

Fraker PJ, Gershwin ME, Good RA, Prasad A. Interrelationships between zinc and immune functions. *Fed Proc.* 1986; 45:1474-1479.

Fraker PJ, King LE, Laakko T, Vollmer TL. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr.* 2000; 130:1399S-1406S.

Fraker PJ, Telford WG. A reappraisal of the role of zinc in life and death decisions of cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997; 215:229–236.

Fraker PJ, Lill-Elghanian DA. The many roles of apoptosis in immunity as modified by aging and nutritional status. *J Nutr Health Aging.* 2004; 8(1):56-63.

Franceschi C, Chiricolo M, Licastro F, Zannotti M, Masi M, Mocchegiani E, Fabris N. Oral zinc supplementation in Down's syndrome: restoration of thymic endocrine activity and of some immune defects. *J Ment Defic Res.* 1988; 32 ( Pt 3):169-81.

Franceschi C, Monti D, Sansoni D. The immunology of exceptional individuals : the lessons of centenarians. *Immunology Today.* 1995a; 16:12-16.

Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Grassilli E, Troiano L. Immunosenescence in humans: deterioration or remodelling. *Intern Rev Immunol*. 1995b; 12:57-74.

Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Grassilli E, Troiano L. Immunosenescence in humans: deterioration or remodelling?. *Intern Rev Immunol*. 1995b; 12:57-74.

Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafè M. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol*. 1999; 34:911-921.

Franceschi C, Motta L, Valensin S, Rapisarda R, Franzone A. Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevità. *Aging Clin Exp Res*. 2000a; 12:77-84.

Franceschi C, Valensin S, Bonafè M, Paolisso G, Yashin AI. The network and the remodelling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol*. 2000b; 35:879-896.

Franceschi C, Bonafè M, Valensin S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine*. 2000; Feb 25;18(16):1717-20.

Frasca D, Pucci S e Goso G. Regulation of cytokine production in aging: use of recombinant cytokines to up regulate mitogen-stimulated spleen cells. *Mech Aging Dev*. 1997; 93:157-169.

Frederickson CJ. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol*. 1989; 31:145-238.

French LE and Tschopp J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ*. 2003; 10:117-123

Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25:319–324.

Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell.* 2006; 126:177–189.

Fukamachi Y, Karasaki Y, Sugiura T, Itoh H, Abe T, Yamamura K, Higashi K. Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 246:364–369.

Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol.* 1992; 12:2866–2871.

Gallant P, Nigg EA. Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol.* 1992; Apr;117(1):213–24.

Gallant P, Nigg EA. Identification of a novel vertebrate cyclin: cyclin-B3 shares properties with both A- and B-type cyclins. *EMBO J.* 1994; 13:595–605.

Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J.* 2005; 24:1546–1556.

Germain M, Mathai JP, Shore GC. BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J Biol Chem.* 2002; 277:18053–18060

Giacconi R, Cipriano C, Muzzioli M, Gasparini N, Orlando F, Mocchegiani E. Interrelationships among brain, endocrine and immune response in ageing and successful ageing: role of metallothionein III isoform. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124(4):371-8.

Gibbs PNB, Gore MG, Jordan PM. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiols groups in humans: aminolevulinate dehydratase. *Biochem J.* 1985; 225:573-580.

Ginaldi L, De Martinis M, Monti D, Franceschi C. The immune system in the elderly: activation-induced and damage-induced apoptosis. *Immunol Res.* 2004; 30(1):81-94.

Glucksmann A. *Biol Rev Cambridge Phil Soc.* 1951; 26:59-86

Goldstein AL. *Thymic hormones and lymphokines.* Plenum Press, New York. 1984.

Goode HF, Kelleher J, Walker B. Zinc concentration in pure populations of peripheral blood neutrophils, lymphocytes and monocytes. *Ann Clin Biochem.* 1989; 26:89-95.

Green DR, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 1998; 8:267-271.

Grekas D, Alivannis P, Kotzadamis N, Kiriazopoulos M, Tourkantonis A. Influenza vaccination in chronic haemodialysis patients. The effect of zinc supplementation. *Ren Fail.* 1992; 14:575-578.

Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* 2000; 69:2957-2964.

Gupta S. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Exp Gerontol.* 2002; 37:293–299.

Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways *in vivo*. *Cell.* 1998; 94:339–352.

Halestrap AP, Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem.* 2003. 10:1507–1525.

Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* 2002; 84:153–166.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: an overview. in: Packer L, Glazer AN, editors. *Method in enzymology*. New York: Academic Press. 1990; 1-85.

Hambidge M, Krebs NF. Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis: relevance to dietary zinc requirements. *Annu Rev Nutr.* 2001; 21:429-52.

Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res.* 2003; 533(1-2):211-26.

Hard T, Rak A, Allard P, Kloo L, Garber M. The solution structure of ribosomal protein L36 from *Thermus thermophilus* reveals a zinc-ribbon-like fold. *J Mol Biol.* 2000; 296:169–180.

Hempe JM, Cousins RJ. Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats. *J Nutr.* 1992; Jan;122(1):89-95.

Hengartner MO and Horovitz HR. Programmed cell death in *Caenorabidtis elegans*. *Curr Opin Genet Dev.* 1994; 4:581-586.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407:770-776.

Hennig B, McClain CJ, Diana JN. Function of vitamin E and zinc in maintaining endothelial integrity. Implications in atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci.* 1993; 686:99-109.

Herold A, Bucurenci N, Mazilu E, Szegli G, Sidenco L, Baican I. Zinc aspartate *in vivo* and *in vitro* modulation of reactive oxygen species production by human neutrophils and monocytes. *Rom Arch Microbiol Immunol.* 1993; 52:101-108.

Hesketh JE. Zinc-stimulated microtubule assembly and evidence for zinc binding to tubulin. *Int J Biochem.* 1982; 14:83-990.

Hicks SE, Wallwork JC. Effect of dietary zinc deficiency on protein synthesis in cell-free systems isolated from rat liver. *J Nutr.* 1987; 117:1234-1240.

Ho E, Courtemanche C, Ames BN. Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblast. *J Nutr.* 2003; 133(8):2543-8.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991; Jul 5;253(5015):49-53.

Hsu YT, Youle RJ. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem.* 1997; 272:13829-13834

Hujanen ES, Seppa ST, Virtanen K. Polymorphonuclear leucocyte chemotaxis induced by zinc, copper and nickel *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1245:145-152.

Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function, permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 1976; 251:5069-5077.

Hwang A and Muschell RJ. Radiation and the G2 phase of the cell cycle. *Radiat Res*. 1998; 150:S52-S59.

Ibs KH, Rink L. Zinc-altered immune function. *J Nutr*. 2003; 133(5 Suppl 1):1452S-6S.

Iwata T, Incefy GS, Tanaka T, Fernandes G, Menendez-Botet CJ, Pih K, Good RA. Circulating thymic hormone levels in zinc deficiency. *Cell Immunol*. 1979; 47(1):100-5.

Jaattela M and Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol*. 2003; May;4(5):416-23.

Jackman M, Firth M, Pines J. Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J*. 1995; 14:1646-1654.

Jiang LJ, Maret W, Vallee BL. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(7):3483-8.

Jiang X and Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*. 2000; 275:31199-31203.

Johnson CL, Rifkind BM, Sempos CT, Carroll MD, Bachorik PS, Briefel RR, Gordon DJ, Burt VL, Brown CD, Lippel K, et al. Declining serum total cholesterol levels among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys. JAMA. 1993; 269(23):3002-8.

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature. 2001; 410:549-554.

Kagi JH and Schaffer A. Biochemistry of Metallothionein. Biochemistry. 1988; Nov 15;27(23):8509-15.

Karin M, and Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. Nat Immun. 2002; 3:221-227

Kastan MB, Onyekere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res. 1991; 51:6304-6311.

Keen CL and Gershwin ME. Zinc deficiency and immune function. Ann Rev Nutr. 1990; 10:415-431.

Kelly EJ, Quaife CJ, Froelick GJ, Palmiter RD. Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. J Nutr. 1996; Jul;126(7):1782-90.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Br J Cancer. 1972; 26:239-257.

Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. Nature. 1995; 374:736-739.

Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 304:463–470.

King JC. Assessment of zinc status. *J Nutr.* 1990; 120(suppl. 11):1474-1479.

King LM, Banks WA, George WJ. Differential zinc transport into testis and brain of cadmium-sensitive and -resistant murine strains. *J Androl.* 2000; Sep-Oct;21(5):656-63.

Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature.* 2002; 419:367-374.

Kletsas D, Barbieri D, Stathakos D, Botti B, Bergamini S, Tomasi A, Monti D, Malorni W, Franceschi C. The highly reducing sugar 2-deoxy-D-ribose induces apoptosis in human fibroblasts by reduced glutathione depletion and cytoskeletal disruption. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Feb 13;243(2):416-25.

Knudson CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet.* 1997; 16:358–363.

Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M, Roberts JM. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell.* 1991; 66:1217-1228.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000; 7: 1166-1173.

Kown MH, Van Der Steenhoven T, Blankenberg FG, Hoyt G, Berry GJ, Tait JF, Strauss HW, Robbins RC. Zinc-mediated reduction of apoptosis in cardiac allografts. *Circulation*. 2000; 102(Suppl 3):228-232.

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*. 1993; 53:4701-4714

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000; 407:789-795.

Kraus A, Roth HP, Kirchgessner M. Supplementation with vitamin C, vitamin E or beta-carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats. *J Nutr*. 1997; 127:1290-1296.

Kreft B, Fischer A, Kruger S, Sack K, Rink L, Kirchner H. The impaired immune response to diphtheria vaccination in elderly chronic hemodialysis patients is related to zinc deficiency. *Biogerontology*. 2000; 1:61-66.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007; Jan;87(1):99-163.

Kröncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Apr 29;200(2):1105-10.

Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*. 1998; 94:325-337.

Kumar S and Harvey NL. Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death. *FEBS Lett.* 1995; 375(3):169-173

Kuo IC, Seitz B, LaBree L, McDonnell PJ. Can zinc prevent apoptosis of anterior keratocytes after superficial keratectomy? *Cornea.* 1997; 16:550-555.

Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD. Bid, Bax, and Lipids Cooperate to Form Supramolecular Openings in the Outer Mitochondrial Membrane. *Cell.* 2002; 111:331-342.

Lambert JC, Wang GW, Kang YJ. Zinc inhibition of caspase-3 activation does not protect HeLa cells from apoptotic cell death. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001; 175(1):89-93.

Larner JM, Lee H, Hamlin JL. Radiation effects on DNA synthesis in a defined chromosomal replicon. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:1901-1908.

Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science.* 2002; 297:1352-1354.

Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signalling. *J Cell Sci.* 2005; 118(Pt 2):265-7.

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 1994; 371(6495):346-347.

Lazo JS, Kuo SM, Woo ES, Pitt BR. The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs. *Chem Biol Interact.* 1998; Apr 24;111-112:255-62.

Lesourd BM. Nutrition and immunity in the elderly: modification of immune responses with nutritional treatments. *Am J Clin Nutr.* 1997; 66(2):478S-484S.

Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol.* 2004; 6:443-450.

Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X, Williams RS. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell.* 2000; 101:389-399.

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001; 412:95-99.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997; 91:479-489.

Liang JY, Liu YY, Zou J, Franklin RB, Costello LC, Feng P. Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth. *Prostate.* 1999; 40(3):200-7.

Lighart GJ, Coberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, Miller-Hermelink HK, Steinmann GG. Admission criteria for immunogerontological studies in man: The Senior Protocol. *Mech Ageing Dev.* 1984; 28:47-55.

Lin J, Chen J, Elenbaas B, Levine AJ. Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev.* 1994; 8(10):1235-46.

Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene.* 2003; 22:8568-8580.

Liuzzi JP and Cousins RJ. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr.* 2004; 24:151-72.

Lockshin RA and Williams CM. *J Insect Physiol.* 1965; 11:123-133.

Lowe NM, Green A, Rhodes JM, Lombard M, Jalan R, Jackson MJ. Studies of human zinc kinetics using the stable isotope  $^{70}\text{Zn}$ . *Clin Sci (Lond).* 1993; 84(1):113-7.

Magner LN. *A History of Medicine.* New York, Marcel Dekker, 1992.

Majno G and Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995; 146:3-15.

Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Muti E, Bernardini G, Tesesi S, Cipriano C, Mocchegiani E. Single and three-color flow cytometry assay for intracellular zinc ion availability in human lymphocytes with Zinpyr-1 and double immunofluorescence: relationship with metallothioneins. *Cytometry A.* 2006; 69(10):1043-53.

Mann JJ and Fraker PJ. Zinc pyrithione induces apoptosis and increases expression of Bim. *Apoptosis.* 2005; 10(2):369-79.

Mannella CA. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762:140-147.

Maret W and Vallee BL. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(7):3478-82.

Mariani E, Cattini L, Neri S, Malavolta M, Mocchegiani E, Ravaglia G, Facchini A. Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly

subjects by multiplex technology: relationship with zinc status. *Biogerontology*. 2006; 7(5-6):449-59.

Martin SJ, Mazdai G, Strain JJ, Cotter TG, Hannigan BM. Programmed cell death (apoptosis) in lymphoid and myeloid cell lines during zinc deficiency. *Clin Exp Immunol*. 1991; 83:338-343.

Marx J. How p53 suppresses cell growth. *Science*. 1993; 262(5140):1644-5.

Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol*. 1987; 7(2):961-3.

Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. *Cell*. 1991; 65:701-713.

Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1994; 14(3):2066-2076.

Matsushita K, Kitagawa K, Matsuyama T, Ohtsuki T, Taguchi A, Mandai K, Mabuchi T, Yagita Y, Yanagihara T, Matsumoto M. Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Brain Res*. 1996; 743:362-365.

Meerarani P, Ramadass P, Toborek M, Bauer HC, Bauer H, Hennig B. Zinc protects against apoptosis of endothelial cells induced by linoleic acid and tumor necrosis factor alpha. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71:81-87.

Metivier D, Dallaporta B, Zamzami N, Larochette N, Susin SA, Marzo I, Kroemer G. Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunol Lett*. 1998; 61:157-163.

Meyerson M, Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:2077-2086.

Micheau O and Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003; 114:181-190.

Mihara M and Moll UM. Detection of mitochondrial localization of p53. *Methods Mol Biol.* 2003; 234:203-9.

Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell.* 1993; 75(4):653-660.

Moccheggiani E, Santarelli L, Muzzioli M, Fabris N. Reversibility of the thymic involution and age-related peripheral immune dysfunction by zinc supplementation in old mice. *Int J Immunopharmacol.* 1995; 17:703-718.

Moccheggiani E, Verbanac D, Santarelli L, Tibaldi A, Muzzioli M, Radosevic-Stasic B, Milin C. Zinc and metallothioneins on cellular immune effectiveness during liver regeneration in young and old mice. *Life Sci.* 1997; 61(12):1125-45.

Moccheggiani E, Muzzioli M, Gaetti R, Veccia S, Viticchi C, Scalise G. Contribution of zinc to reduce CD4<sup>+</sup> risk factor for 'severe' infection relapse in aging: parallelism with HIV. *Int J Immunopharmacol.* 1999; 21(4):271-81.

Moccheggiani E, Muzzioli M, Giacconi R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21(6):205-8.

Moccheggiani E, Giacconi R, Cipriano C, Muzzioli M, Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Isani G, Zambenedetti P, Zatta P. Zinc-bound metallothioneins as potential biological markers of ageing. *Brain Res Bull.* 2001; 55(2):147-53.

Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Muzzioli M, Gasparini N, Moresi R, Stecconi R, Suzuki H, Cavalieri E, Mariani E. MTmRNA gene expression, via IL-6 and glucocorticoids, as potential genetic marker of immunosenescence: lessons from very old mice and humans. *Exp Gerontol.* 2002a; 37(2-3):349-57.

Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Gasparini N, Orlando F, Stecconi R, Muzzioli M, Isani G, Carpenè E. Metallothioneins (I+II) and thyroid-thymus axis efficiency in old mice: role of corticosterone and zinc supply. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123(6):675-94.

Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R, Cipriano C, Gasparini N, Franceschi C, Gaetti R, Cavalieri E, Suzuki H. Metallothioneins/PARP-1/IL-6 interplay on natural killer cell activity in elderly: parallelism with nonagenarians and old infected humans. Effect of zinc supply. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124(4):459-68.

Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Gasparini N, Malavolta M. Are zinc-bound metallothionein isoforms (I+II and III) involved in impaired thymulin production and thymic involution during ageing? *Immun Ageing.* 2004; 1(1):5.

Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Malavolta M. Zinc-binding proteins (metallothionein and alpha-2 macroglobulin) and immunosenescence. *Exp Gerontol.* 2006; 41(11):1094-107.

Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Tesi S, Malavolta M. Nutrient-gene interaction in ageing and successful ageing. A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response. *Mech Ageing Dev.* 2006b; 127(6):517-25.

Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol.* 2006; 16:264-272.

Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997; 13:261-291.

Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature.* 1996; 381:335-341.

Murali-Krishna K, Lau LL, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J. Persistence of CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science.* 1999; 286:1377-1381.

Nakagawa T and Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000; 150:887-894.

Nakano K and Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 2001; 7:683-694.

Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:14681-14686.

Nasi M, Troiano L, Lugli E, Pinti M, Ferraresi R, Monterastelli E, Mussi C, Salvioli G, Franceschi C, Cossarizza A. Thymic output and functionality of the IL-7/IL-7 receptor system in centenarians: implications for the neolymphogenesis at the limit of human life. *Aging Cell.* 2006; 5(2):167-75.

Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science.* 1996; 274(5293):1643-1645.

Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol.* 2001; 153:1265-1276.

Neldner KH and Hambidge KM. Zinc therapy in acrodermatitis enteropathica. *N Engl J Med.* 1975; 292:879-882.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 1995; 376(6535):37-43.

Nicholson DW. ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nat Biotechnol.* 1996; 14(3):297-301.

Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* 1995; 17(6):471-480.

Nociari MM, Telford W, Russo C. Post-thymic development of CD28<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subset: age associated expansion and shift from memory to naive phenotype. *J Immunol.* 1999; 162:3327-3335.

Nodera M, Yanagisawa H, Wada O. Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats. *Life Sci.* 2001; 69(14):1639-49.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993; 74(4):609-19.

Ostan R, Alberti S, Bucci L, Salvioli S, Pasi S, Cevenini E, Capri M, Di Iorio A, Ginaldi L, De Martinis M, Franceschi C, Monti D. Effect of zinc ions on apoptosis in PBMCs from healthy aged subjects. *Biogerontology.* 2006; 7(5-6):437-47.

Oteiza PI, Olin KL, Fraga CG, Keen CL. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J Nutr.* 1995; 125:823-829.

Palmiter RD. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(4):1219-23.

Papadakis ED, Soultzis N, Spandidos DA. Association of p53 codon 72 polymorphism with advanced lung cancer: the Arg allele is preferentially retained in tumours arising in Arg/Pro germline heterozygotes. *Br J Cancer.* 2002; 87(9):1013-8.

Parat MO, Richard MJ, Beani JC, Favier A. Involvement of zinc in intracellular oxidant/anti-oxidant balance. *Biol Trace Elem Res.* 1997; 60: 187-204.

Pardee AB, Dubrow R, Hamlin JL, Kletzien RF. Animal cell cycle. *Annu Rev Biochem.* 1978; 47:715-750.

Park KS, Ahn Y, Kim JA, Yun MS, Seong BL, Choi KY. Extracellular zinc stimulates ERK-dependent activation of p21(Cip/WAF1) and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. *Br J Pharmacol.* 2002; 137(5):597-607.

Pawelec G and Solana R. Immunosenescence. *Immunol Today.* 1997; 18: 514-516.

Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstein B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev.* 2005; 205:257-68.

Peeper DS, Parker LL, Ewen ME, Toebes M, Hall FL, Xu M, Zantema A, Van der Eb AJ, Piwnicka- Worms H. A-Type and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-Cdk complexes. *EMBO J.* 1993; 12:1947-1954.

Perfettini J, Roumier T, Kroemer G. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2005; 15:179-183.

Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997; 272(30):18530-3.

Peter ME and Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003; 10:26-35.

Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J.* 1999; 76:725-734.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1644(2-3):83-94.

Pim D and Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer.* 2004; 108(2):196-9.

Pines J and Hunter T. Human cyclin A is adenovirus E1 A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature (Lond).* 1990; 346:760-763.

Pines J and Hunter T. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol.* 1991; 115:1-17.

Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. Reduced loading of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and downregulation of capacitative Ca<sup>2+</sup> influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol.* 2000; 148:857-862.

Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutrition.* 2000; 130:1447S-1454S.

Prasad AS, Miale Jr A, Farid Z, Sandstead HH, Schubert AR, Darby WJ. Biochemical studies on dwarfism, hypogonadism and anemia. *Arch Int Med.* 1963; 111:407-28.

Prasad AS, Fitzgerald JT, Hess JW, Kaplan J, Pelen F, Dardenne M. Zinc deficiency in elderly patients. *Nutrition.* 1993; 9(3):218-24.

Priault M, Chaudhuri B, Clow A, Camougrand N, Manon S. Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. *Eur J Biochem.* 1999; 260:684-691

Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science.* 2001; 293:1829-1832.

Quan LT, Tewari M, O'Rourke K, Dixit V, Snipas SJ, Poirier GG, Ray C, Pickup DJ, Salvesen GS. Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(5):1972-1976.

Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science.* 1993; 262(5134):695-700.

Ragimov N, Krauskopf A, Navot N, Rotter V, Oren M, Aloni Y. Wild-type but not mutant p53 can repress transcription initiation in vitro by interfering with the binding of basal transcription factors to the TATA motif. *Oncogene.* 1993; 8:1183-1193.

Rajagopalan S, Winter CC, Wagtmann N, Long EO. The Ig related killer cell inhibitory receptor binds zinc and requires zinc for recognition of HLA-C on target cells. *J Immunol.* 1995; 155:4143-4146.

Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277:21836-21842.

Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* 2004; 11:372-380.

Raulin J. Etude chimique sur la vegetation. *Ann Scu Natl Botan Biol Veget.* 1869; 11:293-299.

Rawer P, Willems WR, Breindenbach T, Guttman W, Pabst W, Schutterle G. Seroconversion rate, hepatitis B vaccination, haemodialysis, and zinc supplementation. *Kidney Int S.* 1987; 22:149-152.

Reers M, Smith TW, Chen LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry.* 1991; 30(18):4480-6.

Reid LS, Gray HB, Dalvit C, Wright PE, Saltman P. Electron transfer from cytochrome b5 to iron and copper complexes. *Biochemistry.* 1987; 26:7102-7.

Reimertz C, Kogel D, Rami A, Chittenden T, Prehn JH. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol.* 2003; 162:587-597.

Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech Ageing Dev.* 1998; 102:199-210.

Rosenblatt J, Gu Y, Morgan DO. Human cyclindependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:2824-2828.

Roth HP and Kirchgessner M. Influence of alimentary zinc deficiency on the concentration of growth hormone (GH), insulinlike growth factor I (IGF-I) and insulin in the serum of force-fed rats. Horm Metab Res. 1994; 26:404-408.

Rowe DJ, Bobilya DJ. Albumin facilitates zinc acquisition by endothelial cells. Proc Soc Exp Biol Med. 2000; 224(3):178-86.

Rudolf E, Cervinka M, Cerman J. Zinc has ambiguous effects on chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis. J Trace Elem Med Biol. 2005; 18(3):251-60.

Safie-Garabedian B, Ahmed K, Khamashta MA, Taub NA, Huges GRV. Thymulin modulate cytokine release by peripheral blood mononuclear cells: a comparison between healthy volunteers and patients with systemic lupus erythematoses. Int Arch Allergy Immunol. 1993; 101:126-136.

Saha AR, Hadden EM, Hadden JW. Zinc induces thymulin secretion from human thymic epithelial cells *in vitro* and augments splenocyte and thymocyte responses *in vitro*. Inter J Immunopharmacol. 1995; 17:729-733.

Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. Nat Cell Biol. 2000; 2:553-555.

Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. Oncogene. 1997; 15(8):887-98.

Salas M, Kirchner H. Induction of interferon- $\gamma$  in human leukocyte cultures stimulate by Zn<sup>2+</sup>. Clin Immunol Immunopathol 1987; 45:139-142.

Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, Huyck M, Srinivasula SM, Alnemri ES, Steinberg MH, Nolan V, Baldwin CT, Hotchkiss RS, Buchman TG, Zehnbauser BA, Hayden MR, Farrer LA, Roy S, Nicholson DW. Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature*. 2004; 429:75–79.

Salvioli S, Capri M, Valensin S, Tieri P, Monti D, Ottaviani E, Franceschi C. Inflamm-aging, cytokines and aging: state of the art, new hypotheses on the role of mitochondria and new perspectives from systems biology. *Curr Pharm Des*. 2006; 12(24):3161-71.

Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*. 1993; 14(3):131-6.

Sandstead HH, Henriksen LK, Greger JL, Prasad AS, Good RA. Zinc nutriture in the elderly in relation to taste acuity, immune response, and wound healing. *Am J Clin Nutr*. 1982; 36(5 Suppl):1046-59.

Sandstead HH. Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am J Clin Nutr*. 1995; 61(3 Suppl):621S-624S.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 1998; 17:1675-1687.

Schranz N, Auffredou MT, Bourgeade MF, Besnault L, Leca G, Vazquez A. Zinc-mediated regulation of caspases activity: dose-dependent inhibition or activation of caspase-3 in the human Burkitt lymphoma B cells (Ramos). *Cell Death Differ*. 2001; 8(2):152-61.

Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*. 2002; 2:55-67.

Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ : a control point for apoptosis. *Science*. 2003; 300:135-139.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin-D/CDK4. *Nature*. 1993; 366:704-707.

Seve M, Favier A, Osman M, Hernandez D, Vaitaitis G, Flores NC, McCord JM, Flores SC. The human immunodeficiency virus-1 tat protein increases cell proliferation, alters sensitivity to zinc chelator-induced apoptosis, and changes Sp1 DNA binding in HeLa cells. *Arch Biochem Biophys*. 1999; 361: 165-172.

Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect*. 1999; 107 Suppl1:5-24.

Shama S, Lai CY, Antoniazzi JM, Jiang JC, Jazwinski SM. Heat stress-induced life span extension in yeast. *Exp Cell Res*. 1998; 245:368-378.

Shankar AH e Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*. 1998; 68(suppl):447S-63S.

Shimizu T, Kubota M, Tanizawa A, Sano H, Kasai Y, Hashimoto H, Akiyama Y, Mikawa H. Inhibition of both etoposide-induced DNA fragmentation and activation of poly(ADP-ribose) synthesis by zinc ion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 169(3):1172-7.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 1999; 399:483–487.

Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry*. 2001; 40(4):1117-23.

Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*. 2003; 11:519–527.

Simkin PA. Oral zinc sulphate in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1976; 2:629-633.

Solomons NW. Biochemical, metabolic, and clinical role of copper in human nutrition. *J Am Coll Nutr*. 1985; 4(1):83-105.

Sprick M, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand M, Walczak H. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J*. 2002; 21:4520-4530.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(25):14486-91.

Stadtman ER. Metal-ion catalysed oxidation of protein: biochemical mechanism and consequences. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9:315-325.

Stewart ZA and Pietsenpol JA. p53 signaling and cell cycle checkpoints, *Chem Res Toxicol*. 2001; 14:243–263.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. 1998; 393(6682):229-34.

Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics* 2. 1998; Ch. 18, Cancer Genetics.

Sunderman FW. The influence of zinc on apoptosis. *Ann Clin Lab Sci*. 1995; 25:134-142.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebbersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999; 397:441-446.

Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*. 2000; 103:645-654.

Swain SL, Hu H, Huston G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science*. 1999; 286:1381- 1383.

Takemura G, Fujiwara H. Morphological aspects of apoptosis in heart diseases. *J Cell Mol Med*. 2006; 10(1):56-75.

Tanaka Y, Shiozawa S, Morimoto I, Fujita T. Zinc inhibits pokeweed mitogen induced development of immunoglobulin-secreting cell through augmentation of both CD4 and CD8 cells. *Inter J Immunopharmacol*. 1989; 11:673-679.

Tanaka Y, Shiozawa S, Morimoto I. Role of zinc in interleukin 2 (IL-2) mediated T-cell activation. *Scand J Immunol*. 1990; 31:547-552.

Terada Y, Tatsuka M, Jinno S, Okayama H. Requirement for tyrosine phosphorylation of Cdk4 in G<sub>1</sub> arrest induced by ultraviolet irradiation. *Nature*. 1995; 376:359-362.

Terauchia S, Yamamotoa T, Yamashita K, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y. Molecular basis of morphological changes in mitochondrial membrane accompanying induction of permeability transition, as revealed by immunoelectron microscopy. *Mitochondrion*. 2005; 5: 248-254.

Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(2):1092-100.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267(5203):1456-1462

Thut CJ, Chen JL, Klemm R, Tjian R. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*. 1995; 267(5194):100-4.

Truong-Tran AQ, Ruffin RE, Zalewski PD. Visualization of labile zinc and its role in apoptosis of primary airway epithelial cells and cell lines. *Am J Physiol*. 2000a; 279:L1172-L1183.

Truong-Tran AQ, Ho LH, Chai F, Zalewski PD. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J Nutrition*. 2000b; 130 (Suppl):1459S-1466S.

Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals*. 2001; 14(3-4):315-30.

Turnlund JR, Durkin N, Costa F, Margen S. Stable isotope studies of zinc absorption and retention in young and elderly men. *J Nutr*. 1986; 116(7):1239-47.

Ueda N and Shah SV. Apoptosis. *J Lab Clin Med.* 1994; 124(2):169-77.

Valle BL and Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 1993; 73:79-118.

Vallee BL and Auld DS. Active-site zinc ligands and activated H<sub>2</sub>O of zinc enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(1):220-4.

Vasto S, Mocchegiani E, Candore G, Listì F, Colonna-Romano G, Lio D, Malavolta M, Giacconi R, Cipriano C, Caruso C. Inflammation, genes and zinc in ageing and age-related diseases. *Biogerontology.* 2006; 7(5-6):315-27.

Vaziri H, West MD, Allsopp RC, Davison TS, Wu YS, Arrowsmith CH, Poirier GG, Benchimol S. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J.* 1997; 16(19):6018-33.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000; 102:43-53.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995; 184(1):39-51.

Verrier F, Deniaud A, LeBras M, Metivier D, Kroemer G, Mignotte B, Jan G, Brenner C. Dynamic evolution of the adenine nucleotide translocase interactome during chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene.* 2004; 23:8049-8064.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000; 408(6810):307-10.

von Bülow V, Rink L, Haase H. Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF-alpha and IL-1 beta production in monocytes by elevation of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *J Immunol*. 2005; 175(7):4697-705.

Wajant H. Death receptors. *Essays Biochem*. 2003; 39:53-71.

Walker KK and Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(26):15335-40.

Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*. 1996; 10:2859-2869.

Waring P, Egan M, Braithwaite A, Mullbacher A, Sjaarda A. Apoptosis induced in macrophages and T blasts by the mycotoxin sporidesmin and protection by Zn<sup>2+</sup> salts. *Int J Immunopharmac*. 1990; 12:445-457.

Waterhouse NJ, Trapani JA. A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells. *Cell Death Differ*. 2003; 10(7):853-5.

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*. 2000; 14:2060-2071.

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001; 292:727-730.

Wellinghausen N, Driessen C, Rink L. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Cytokine*. 1996a; 18:767-771.

Wellinghausen N, Fischer A, Kirchner H, Rink L. Interaction of zinc ions with human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol*. 1996b; 171:255-261.

West AK, Stallings R, Hildebrand CE, Chiu R, Karin M, Richards RI. Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13. *Genomics*. 1990; 8(3):513-8.

Williams PD and Day T. Antagonistic pleiotropy, mortality source interactions, and the evolutionary theory of senescence. *Evolution Int J Org Evolution*. 2003; 57(7):1478-88.

Williams RJP. The biochemistry of zinc. *Polyhedron*. 1987; 6:61-69.

Wiseman DA, Wells SM, Wilham J, Hubbard M, Welker JE, Black SM. Endothelial response to stress from exogenous  $Zn^{2+}$  resembles that of NO-mediated nitrosative stress, and is protected by MT-1 overexpression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291(3):C555-68.

Wolf CM, Morana SJ, Eastman A. Zinc inhibits apoptosis upstream of ICE/CED-3 proteases rather than at the level of an endonuclease. *Cell Death Differ*. 1997; 4(2):125-9.

Wu FY, Huang WJ, Sinclair RB, Powers L. The structure of the zinc sites of Escherichia coli DNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem*. 1992; 267:25560-25567.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284:555-6.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*. 1995; 80:285–291.

Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*. 2000; 288:874–877.

Ye B, Maret W, Vallee BL. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(5):2317–22.

Yin X, Knecht DA, Lynes MA. Metallothionein mediates leukocyte chemotaxis. *BMC Immunol*. 2005; 6:21.

Yshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*. 1998; 94:739–750.

Yu CW, Chen JH, Lin LY. Metal-induced metallothionein gene expression can be inactivated by protein kinase C inhibitor. *FEBS Lett*. 1997; 420(1):69–73.

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*. 2001; 7:673–682.

Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*. 2002; 297:259–263.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993; 75(4):641–652.

Zalewski PD, Forbes IJ, Giannakis C. Physiological role for zinc in prevention of apoptosis (gene-directed death). *Biochem Inter.* 1991; 24:1093–1101.

Zalewski PD and Forbes IJ. Intracellular zinc and the regulation of apoptosis. In: LavinM,Watters D. eds. *Programmed Cell Death: The Cellular and Molecular Biology of Apoptosis.* Melbourne: Harwood Academic Publishers. 1993.

Zamora M, Granell M, Mampel T, Vinas O. Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells. *FEBS Lett.* 2004; 563:155–160.

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 1996; 183:1533–1544.

Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.* 2003; 162:59–69.

Zoratti M and Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1241:139–176.