



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in SCIENZE E BIOTECNOLOGIE MEDICHE SPERIMENTALI APPLICATE -

Indirizzo - PNEUMOLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA

Dipartimento Biomedico di medicina interna e specialistica (Di.Bi.M.I.S)

Settore Scientifico Disciplinare: MED/10 (Malattie dell'apparato respiratorio)

MECCANISMI DI INVECCHIAMENTO DELLE CELLULE EPITELIALI DELLE VIE AEREE

IL DOTTORE

Dott.ssa Serena Di Vincenzo



IL COORDINATORE

Prof.ssa Carla Giordano

IL TUTOR

Prof. Salvatore Battaglia

IL CO TUTOR

Dott.ssa Elisabetta Pace

CICLO XXVI
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2016

***“Life is like riding a bicycle.
To keep your balance,
you must keep moving.”***

Albert Einstein

INDICE

1. INTRODUZIONE	11
1.1 BRONCO PNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA (BPCO)	11
1.1.1 IL RUOLO DEL FUMO DI SIGARETTA	17
1.2 STRESS OSSIDATIVO E ANTI OSSIDANTI	22
1.3 CICLO CELLULARE, APOPTOSI O SENESCENZA	26
1.3.1 IL CICLO CELLULARE.....	26
1.3.2 MECCANISMI DI MORTE CELLULARE	30
1.3.3 MECCANISMI DI SENESCENZA	33
1.4 PATHWAY SIRT1/FOXO3 E LA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE	36
1.4.1 LE SIRTUINE	36
SIRT1	39
1.4.2 FORKHEAD BOX TYPE O FAMILY	40
FoxO3	43
1.4.3 SIRT1 E FOXO3: RESISTENZA ALLO STRESS E SOPRAVVIVENZA CELLULARE	44
1.5 OBIETTIVI DI QUESTO LAVORO	46
2. MATERIALI E METODI	48
2.1 COLTURE DI CELLULE EPITELIALI BRONCHIALI	48
2.2 PREPARAZIONE DEGLI STIMOLI	49
2.2.1 ESTRATTO DI FUMO DI SIGARETTA (CSE).....	49
2.2.2 CARBOCISTEINA	50
2.3 VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE	51
2.3.1 SAGGIO CFSE.....	51
2.3.2 SAGGIO CLONOGENICO	52
2.4 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI P21 E SURVIVINA	53
2.5 VALUTAZIONE DELLA SENESCENZA CELLULARE: SAGGIO β-GALATTOSIDASE	55

2.6 ANALISI WESTERN BLOT PER VALUTARE L'ESPRESSIONE DI SIRT1 E FOXO3.....	56
2.7 ANALISI ATTIVITÀ DEACETILASICA DI SIRT1.....	58
2.8 IMMUNOCITOCHIMICA.....	59
2.9 IMMUNOFLUORESCENZA.....	60
2.10 CHROMATIN IMMUNO-PRECIPITATION (CHIP).....	61
2.10 STATISTICA DEI DATI.....	62
3. RISULTATI	63
3.1 IL CSE RIDUCE LA PROLIFERAZIONE CELLULARE.....	63
3.2 IL CSE AUMENTA L'ESPRESSIONE DI P21 E DI SURVIVINA	64
3.3 IL CSE AUMENTA L'ATTIVITÀ DELLA BETA-GALATTOSIDASI A PH6 ...	66
3.4 IL CSE RIDUCE L'ESPRESSIONE E L'ATTIVITÀ DEACETILASICA DI SIRT1	67
3.5 IL CSE RIDUCE L'ESPRESSIONE DI FOXO3	69
3.5 IL CSE RIDUCE L'ESPRESSIONE DI SIRT1 NELLE 16HBE E CONTEMPORANEAMENTE AUMENTA LA TRASLOCAZIONE DI FOXO3 NEL CITOPLASMA	70
3.4 IL CSE RIDUCE IL LEGAME DI FOXO3 AL PROMOTORE DI SURVIVINA	71
4. DISCUSSIONE.....	72
BIBLIOGRAFIA.....	78

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1: Ipotesi di sviluppo della BPCO da un accelerato invecchiamento del polmone.....	15
Figura 2: Schema sintetico delle sostanze contenute nel fumo di sigaretta.....	18
Figura 3: Schema rappresentativo del ruolo del fumo nel determinismo dell'ostruzione delle vie aeree (1).	20
Figura 4: Le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (RNOS), derivate insieme da fonti esogene ed endogene, guidano molte delle vie sia per la BPCO che per l'invecchiamento precoce.	25
Figura 5: Schema del ciclo cellulare e la sua regolazione.	27
Figura 6: ROS come attivatori di fattori di trascrizione redox-sensitive in grado di produrre citochine e chemochine pro infiammatorie responsabili a loro volta di produzione di ROS e di fenomeni infiammatori cronici.	33
Figura 7: La famiglia delle sirtuine.	37
Figura 8: L'attività enzimatica delle sirtuine (46).....	38
Figura 9: Rappresentazione schematica della struttura proteica e delle modifiche post-traduzionali di SIRT1 (51).	39
Figura 10: Rappresentazione schematica della struttura dei fattori FoxO e dei siti conservati di fosforilazione ad opera di Akt.	42
Figura 11: Rappresentazione schematica della struttura proteica e delle modifiche post-traduzionali di FoxO3.....	43
Figura 12: SIRT1 nella regolazione dell'infiammazione e della senescenza cellulare sotto stress ossidativo.	45
Figura 13: Visione all'invertoscopio delle 16HBE.....	48
Figura 14: Beuta da vuoto durante l'aspirazione del fumo di sigaretta.	49
Figura 15: Effetti del CSE e della carbocisteina sulla proliferazione cellulare di 16HBE utilizzando il saggio CFSE.....	63
Figura 16: Effetti del CSE e della carbocisteina sulla proliferazione cellulare di 16HBE utilizzando il saggio clonogenico.....	64
Figura 17: Effetti del CSE e della carbocisteina sull'espressione di p21 in 16HBE. ..	65
Figura 18: Effetti del CSE e della carbocisteina sull'espressione di Survivina in 16HBE.....	66
Figura 19: Immagini al microscopio ottico di 16HBE per il test della β -galattosidasi.	67
Figura 20: Effetti del CSE e della carbocisteina sull'espressione della proteina SIRT1 in 16HBE.....	68

Figura 21: Effetto del CSE e della carbocisteina sull'attività deacetilasi di SIRT1 in 16HBE.....	68
Figura 22: Effetti del CSE e della carbocisteina sull'espressione della proteina FoxO3 in 16HBE.....	69
Figura 23: Immunocitochimica di 16HBE marcate con anticorpo specifico per FoxO3.	70
Figura 24: Immunofluorescenza di 16HBE marcate con anticorpo fluorescenti specifici per FoxO3 (verde) e SIRT1 (rosso).	71
Figura 25: DNA corrispondente alla regione del promotore di survivina alla quale si lega il fattore di trascrizione FoxO3 ottenuto tramite CHIP e amplificato tramite PCR.	71

ELENCO ABBREVIAZIONI

BPCO: Broncopneumopatia cronica ostruttiva.

COPD: Chronic Obstructive Pulmonary disease

GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.

ROS: Specie Reattive dell'Ossigeno

IL: Interleuchina

TNF: Tumor Necrosis Factor.

SOD: superossido dismutasi

NAC: N-acetyl-L-cysteine

DNA: acido desossiribonucleico

RNA: acido ribonucleico

PMN: cellule polimorfonucleate

Cdk: chinasi ciclina-dipendente

INK: inhibitor of Cdk

Bcl: proteine B cell leukemia

IAP: Proteine Inibitrici dell'apoptosi

HAT: istone acetiltransferasi

HDAC: istone deacetilasi

SIRT: sirtuina

NAD+: nicotinammide adenin dinucleotide

FoxO: forkhead box O

NLS: Segnale di Localizzazione Nucleare

NES: segnale di esportazione nucleare

16HBE: Human Bronchial Epithelial cell line

CSE: Cigarette Smoke Extract

CARBO: Carbocisteina

CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl ester

ABSTRACT

Cigarette smoke is the major risk factor for chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a disease where inflammation and aging are intertwined. Sirtuin (SIRT)1 is an anti-aging factor that removes acetyl moieties and activates FoxO3, a transcriptional factor which controls cell cycle progression, cell death and inflammation and protects the cell from oxidative stress. In the present study we investigated the effects of cigarette smoke and carbocysteine, a molecule with antioxidant activity, on mechanisms of accelerated aging in bronchial epithelial cells.

16HBE cells were stimulated with increasing concentrations of cigarette smoke extracts (CSE) and with or without carbocysteine 10^{-4} M. Cell proliferation and β -galactosidase activity were evaluated as senescence markers. p21 and survivin were selected as molecules involved in the regulation of cell cycle and apoptosis. Furthermore nuclear protein expression of SIRT1 and FoxO3 and their cellular localization, deacetylase activity of SIRT1 and FoxO3 binding on Survivin promoter were evaluated.

The obtained results showed that:

- (i) CSE decreases the cellular proliferation and induces β -galactosidase activity;
- (ii) CSE increases p21 and survivin expression;
- (iii) CSE decreases the activity and nuclear levels of Sirt1;
- (iv) CSE decreases the nuclear expression of FoxO3 and its binding on Survivin promoter.

Co-treatment with Carbocysteine counteracts these CSE effects.

These data suggest that cigarette smoke induces cellular senescence through the block of cell cycle and an upregulation of anti-apoptotic mechanism. Cigarette smoke also impairs the pathway of SIRT1/FoxO3, an anti-aging mechanism. These effects are counteracted by carbocysteine that reduces the oxidative stress cigarette smoke induced.

RIASSUNTO

La Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) è una malattia caratterizzata da una ostruzione del flusso delle vie aeree non reversibile, da una infiammazione cronica e da un accelerato invecchiamento cellulare. Il fumo di sigaretta è il principale fattore di rischio che causa forte stress ossidativo. Una nuova molecola coinvolta nei meccanismi anti-aging è Sirtuin (SIRT)1, una deacetilasi istonica che rimuove gruppi acetili e attiva FoxO3, un fattore di trascrizione che controlla la progressione del ciclo cellulare, la morte cellulare, l'infiammazione e protegge le cellule dallo stress ossidativo attivando geni coinvolti nella detossificazione da ROS. In questo studio abbiamo voluto investigare gli effetti del fumo di sigaretta sui meccanismi di invecchiamento precoce nelle cellule epiteliali bronchiali, prima barriera di difesa da questo agente tossico. Inoltre abbiamo valutato se gli effetti del fumo di sigaretta venivano contrastati da una molecola con attività anti-ossidante, la Carbocisteina.

16HBE, una linea di cellule epiteliali bronchiali, sono state stimulate con crescenti concentrazioni di estratto di fumo di sigaretta (CSE) e con o senza Carbocisteina (10^{-4} M). Sono state valutate la proliferazione cellulare e l'attività dell'enzima β -galattosidasi, come markers di senescenza. p21 and survivina sono stati selezionati come molecole coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Inoltre sono stati valutati l'espressione proteica nucleare di SIRT1 e FoxO3 e la loro localizzazione cellulare, e ancora l'attività deacetilasi di SIRT1 e il legame di FoxO3 al promotore del gene di survivina.

I risultati ottenuti hanno mostrato che:

- il CSE riduce la proliferazione cellulare e aumenta l'attività della β -galattosidasi;
- il CSE aumenta l'espressione di p21 e di survivina;
- il CSE riduce l'espressione nucleare e l'attività deacetilasi di SIRT1;
- il CSE riduce l'espressione nucleare di FoxO3 e il suo legame al promotore del gene di survivina.

Il co-trattamento con Carbocisteina contrasta questi effetti del fumo di sigaretta.

Questi risultati suggeriscono che il fumo di sigaretta è sicuramente coinvolto nell'induzione della senescenza in cellule epiteliali bronchiali bloccando il ciclo cellulare e impedendo l'apoptosi cellulare. Inoltre altera il pathway SIRT1/FoxO3 che è un tipico meccanismo anti-aging. Tutto questo viene contrastato dalla carbocisteina, che riduce lo stress ossidativo indotto dal fumo di sigaretta.

1. INTRODUZIONE

1.1 BRONCO PNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA (BPCO)

Negli anni '60 è stata introdotta l'espressione *BroncoPneumopatia Cronica Ostruttiva* o BPCO per comprendere quadri patologici, quali bronchite cronica semplice, bronchite cronica mucopurulenta, bronchite cronica ostruttiva ed enfisema, che pur apparentemente eterogenei, di fatto condividono i medesimi fattori eziologici e spesso costituiscono tappe diverse dello stesso percorso patogenetico (1). La BPCO viene definita dalle recenti linee guida del Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), come *“una frequente malattia prevenibile e trattabile, caratterizzata da una persistente limitazione al flusso aereo, che è solitamente evolutiva e associata ad una aumentata risposta infiammatoria cronica delle vie aeree e del polmone a particelle nocive o gas. Le riacutizzazioni e la presenza di comorbidità contribuiscono alla gravità complessiva nei singoli pazienti.”* (2).

La Broncopneumopatia cronica ostruttiva, oggi, costituisce un problema sociale assai preoccupante infatti rappresenta la *quarta causa di morte* al mondo e si prevede un aumento della sua prevalenza nei prossimi anni (3) (4). La prevalenza, la morbilità e la mortalità della BPCO variano tra i diversi Paesi e tra i diversi gruppi di popolazione nell'ambito di una stessa nazione. La BPCO è il risultato di un'esposizione persistente ai fattori di rischio nel corso del tempo e anche se spesso la sua prevalenza è direttamente correlata alla prevalenza dell'abitudine tabagica, oggi in molti Paesi l'inquinamento ambientale, professionale e quello degli ambienti interni dovuto alla combustione di legna o altri biocombustibili stanno rivestendo un ruolo importante come fattori di rischio prevalenti di malattia. Anche se la prevalenza e la morbosità della BPCO sono notevolmente sottostimate in quanto la patologia è generalmente riconosciuta e diagnosticata solo quando si manifesta clinicamente quindi in una fase avanzata, il suo potenziale di malattia fortemente disabilitante implica un'elevata spesa sanitaria per il suo trattamento e costi indiretti di morbosità che gravano sul sistema socio-economico

(3). Nei prossimi decenni è previsto un aumento della prevalenza e dell'impatto della BPCO dovuto alla persistente esposizione ai fattori di rischio e al progressivo invecchiamento della popolazione mondiale, con presenza di persone che vivono più a lungo e quindi manifestano gli effetti a lungo termine dell'esposizione ai fattori di rischio della malattia.

Dati epidemiologici mostrano che la prevalenza di questa malattia nella popolazione adulta è stimata nella misura del 6-8%, con una prevalenza nel sesso maschile, evidentemente dipendente, almeno in parte, dalla maggiore diffusione del fumo di tabacco presso quest'ultimo anche se le cose stanno cambiando infatti, oggi, il tabagismo è molto diffuso anche tra le donne (3) (5). L'esposizione cronica al fumo di sigaretta incrementa di circa 10 volte il rischio di contrarre la BPCO ma si ritiene che solo il 15-20% dei fumatori presenta la malattia in forma conclamata. Il fumo di sigaretta, però, condiziona gradi diversi del danno broncopolmonare, per cui la percentuale di soggetti affetti dalla malattia rappresenta di fatto una sottostima dei reali effetti del fumo (1).

Sebbene il fumo di sigaretta sia il fattore di rischio meglio studiato della BPCO, non è l'unico fattore. Questa malattia, infatti, è una malattia ad *eziologia multifattoriale*, cioè è dovuta a una serie di fattori di rischio esogeni ed endogeni (Tabella 1) che, singolarmente o in sinergia, determinano il grado di suscettibilità del soggetto allo sviluppo della malattia. I **fattori di rischio esogeni** che presentano un ruolo certo nell'insorgenza della malattia sono: in primo luogo il *fumo di sigaretta*, ma anche l'*esposizione professionale* a polveri organiche e inorganiche, a determinati agenti chimici e fumi; elevati livelli d'*inquinamento degli ambienti interni* (a causa di legno, escrementi animali, stufe malfunzionanti e all'uso di combustibili di biomasse per cucinare e riscaldare abitazioni scarsamente ventilate); e ovviamente *elevati livelli di inquinamento urbano*. Ma l'ipotesi che, insieme alla componente patogenetica esogena ve ne sia una endogena di *predisposizione individuale (fattori di rischio endogeni)*, è confermata dal fatto che non tutti i fumatori, anche tra i più forti, sviluppano la malattia e riceve ulteriore supporto dall'evidenza di una certa familiarità riscontrata in studi condotti su gemelli (1).

FATTORI DI RISCHIO ENDOGENI	FATTORI DI RISCHIO ESOGENI
<ul style="list-style-type: none"> • Razza • Sesso • Anamnesi familiare positiva per BPCO • Pattern genico predisponente lo sviluppo di BPCO • Deficit di α-1-antitripsina • Basso peso alla nascita • Malattie respiratorie durante l'infanzia • Atopia (elevati livelli di IgE) • Iper-reattività bronchiale • Suscettibilità individuale ai fattori di rischio 	<ul style="list-style-type: none"> • Fumo di tabacco • Esposizione lavorativa • Inquinamento outdoor • Inquinamento indoor • Esposizione a fumo di tabacco ambientale • Abuso di alcool • Dieta povera di frutta • Basso livello di stato socio-economico

Tabella 1: *Fattori esogeni ed endogeni in relazione allo sviluppo della broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO).*

La BPCO deriva da un'interazione gene-ambiente. Tra le persone con la medesima storia di fumo non tutti svilupperanno la malattia a causa delle differenze di predisposizione genetica verso la malattia o della durata di vita. Oggi, molti studi sono volti a mettere in relazione determinati *fattori genetici* con la patogenesi della broncopneumopatia cronica ostruttiva. Il fattore di rischio genetico meglio documentato è il deficit ereditario grave di alfa-1 antitripsina, un importante inibitore delle proteasi sieriche. Sebbene il deficit di alfa-1 antitripsina sia rilevante solo per una piccola parte della popolazione mondiale, è un esempio di interazione tra i geni e l'esposizione ambientale che conduce alla BPCO. Un rischio familiare significativo di ostruzione al flusso aereo è stato osservato nei fratelli fumatori di pazienti affetti da BPCO grave suggerendo che i fattori genetici possono influenzare questa suscettibilità. Singoli geni, come il gene che codifica per la metalloproteinasi 12 (*MMP12*), presentano una relazione con il declino della funzionalità polmonare. Poiché lo stress ossidativo gioca un ruolo rilevante nella patogenesi della BPCO è evidente che anche anomalie nell'espressione di enzimi coinvolti nell'attività antiossidante, come la Glutazione S-trasferasi o anche l'Eme ossigenasi-1, è stato visto avere un ruolo nella predisposizione a questa malattia. Inoltre, sebbene numerosi studi di

associazione sull'intero genoma indichino un ruolo per il gene del recettore alfa-nicotinico dell'acetilcolina, così come per il gene della proteina *hedge-hog* e possibilmente uno o due altri, rimane comunque una discrepanza tra i risultati dell'analisi di BPCO e della funzionalità polmonare così come tra l'analisi di studi sull'intero genoma e l'analisi di geni candidati (2).

I fattori di rischio per la BPCO possono anche essere correlati in un modo più complesso. Per esempio, il *sex* può influenzare il fatto che una persona cominci a fumare o sia esposta a determinati inquinanti professionali oppure ambientali; lo *status socio-economico* può correlarsi al peso del bambino alla nascita (questo influisce sulla crescita e sullo sviluppo polmonare e a sua volta sulla suscettibilità a sviluppare la malattia); una più lunga aspettativa di vita permetterà una maggiore esposizione ai fattori di rischio e così via.

La broncopneumopatia cronica ostruttiva è una malattia progressiva caratterizzata dal peggioramento nel tempo della funzione polmonare. La valutazione del decadimento della funzione respiratoria è effettuata tramite misurazioni periodiche della spirometria del soggetto a rischio che permettono quindi di fare diagnosi. La complessità di questa malattia deriva dal fatto che comporta un coinvolgimento di *alterazioni strutturali* sia delle vie aeree centrali e periferiche che del parenchima polmonare, causate dai processi infiammatori cronici e dal *remodeling* (6) (7). In conseguenza a ciò si ha l'ostruzione delle piccole vie aeree e la riduzione del ritorno elastico polmonare. Da queste alterazioni strutturali nascono le *alterazioni fisiologiche* che comprendono la riduzione del flusso aereo espiratorio e l'iperinflazione polmonare, l'ipersecrezione di muco, le alterazioni della funzionalità ciliare, le alterazioni degli scambi gassosi, l'ipertensione polmonare ed il cuore polmonare (6) (7) (8). Inoltre, in stadi avanzati, la BPCO si associa a una infiammazione sistemica e ad alterazioni della muscolatura liscia scheletrica che possono contribuire alla limitata tolleranza allo sforzo e al deperimento dello stato di salute (8) (9). Quindi il *quadro clinico* caratteristico di un soggetto affetto da broncopneumopatia cronica ostruttiva è caratterizzato da una tosse produttiva, con espettorazione mucosa o mucopurulenta, e da dispnea da sforzo. La tosse e l'espettorazione precedono a volte di molti anni la comparsa della riduzione del flusso aereo respiratorio, sebbene non tutti gli individui con questi sintomi svilupperanno poi la malattia. Insieme ai sintomi respiratori cronici si osserva una diffusa infiltrazione nel parenchima polmonare di cellule

infiammatorie, prevalentemente mononucleate, quali i neutrofili, ma anche di linfociti, le quali sono responsabili del remodeling del parenchima bronchiale (9). La BPCO è stata anche descritta come caratterizzata da un accelerato invecchiamento del polmone, e il ruolo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) sta emergendo nella regolazione dell'infiammazione aging-associata e nei cambiamenti strutturali dei polmoni. L'accelerata senescenza cellulare è dovuta all'esposizione al fumo di sigaretta che porta a una frammentazione mitocondriale e all'aumento della produzione dei ROS ad opera dei mitocondri nel tessuto polmonare dei soggetti con BPCO (10) (11) (12) (Figura 1).

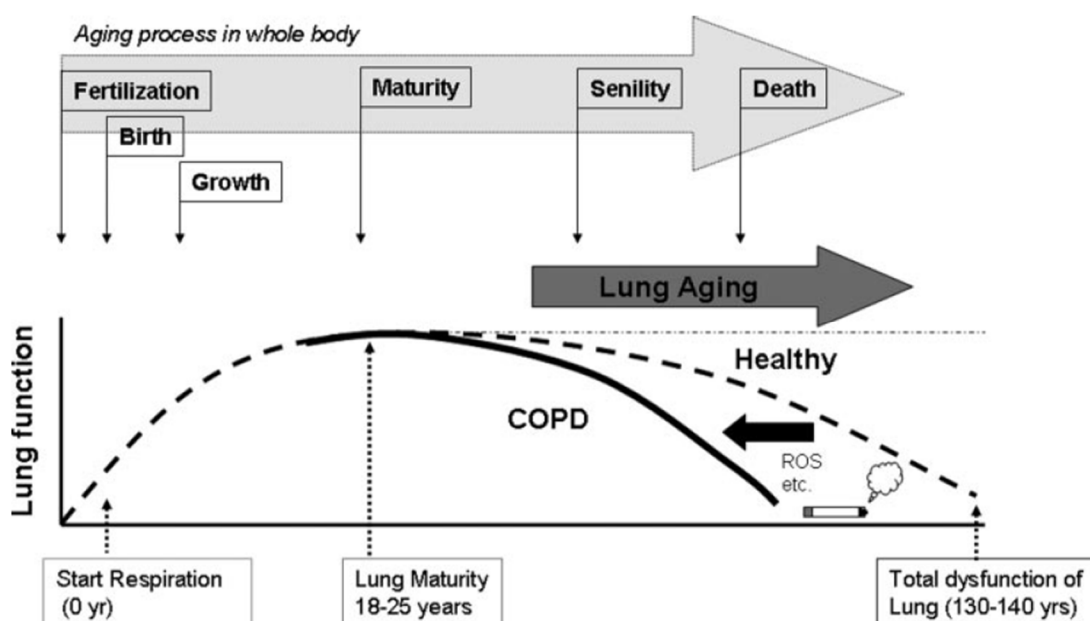


Figura 1: *Ipotesi di sviluppo della BPCO da un accelerato invecchiamento del polmone.* L'invecchiamento è definito come il progressivo declino dell'omeostasi, e questo è il risultato del fallimento dei sistemi di protezione dal danno al DNA, dallo stress ossidativo e dall'accorciamento dei telomeri. Durante l'invecchiamento, la funzione polmonare si deteriora progressivamente e l'infiammazione polmonare è incrementata con cambiamenti strutturali nel parenchima del polmone e nelle piccole vie aeree. L'esposizione a inquinanti ambientali, come principalmente il fumo di sigaretta, potrebbero accelerare la perdita di funzione polmonare dipendente dall'invecchiamento (11).

La *classificazione della BPCO* in stadi di diversa gravità può essere di ausilio nella valutazione pratica clinica, soprattutto se si tiene conto che l'approccio terapeutico del paziente può essere diversificato in relazione al livello di gravità della malattia (8). A tal

proposito le linee guida GOLD (2) indicano i seguenti stadi di gravità della malattia, basati su una valutazione spirometrica:

- **GOLD 1: BPCO lieve.** Lieve riduzione del flusso aereo espiratorio e di solito, ma non sempre, presenza di tosse ed espettorazione ($FEV_1 \geq 80\%$ del predetto).
- **GOLD 2: BPCO moderata.** Peggioramento della broncostruzione e di solito aggravamento dei sintomi, quali la dispnea da sforzo. Si tratta dello stadio in cui tipicamente il paziente richiede l'intervento del medico ($50\% \leq FEV_1 < 80\%$ del predetto).
- **GOLD 3: BPCO grave.** Grave riduzione del flusso aereo espiratorio ($30\% \leq FEV_1 < 50\%$ del predetto).
- **GOLD 4: BPCO molto grave.** Broncostruzione molto grave, e/o insufficienza respiratoria, e/o segni clinici di scompenso cardiaco ($FEV_1 < 30\%$ del predetto).

Un fattore importante, che è stato visto essere in grado di accelerare il declino della funzionalità respiratoria, è la frequenza delle *riacutizzazioni*. Una riacutizzazione può essere definita clinicamente come il peggioramento dei sintomi cronici, quali dispnea, tosse ed espettorazione e nelle forme gravi si ha anche una marcata riduzione della funzionalità respiratoria. Queste possono essere causate da diversi fattori eziologici tra cui vi sono le infezioni sia batteriche che virali. È stato visto che le riacutizzazioni della BPCO sono associate ad una marcata neutrofilia e ad una aumentata presenza di IL-8 (con azione chemiotattica dei neutrofili) e $TNF\alpha$ (capace di aumentare l'espressione di molecole di adesione sulle cellule epiteliali) negli espettorati e nei lavaggi bronco-alveolari (BAL) dei pazienti. Tutto questo correla con le conte batteriche avvalorando l'ipotesi che le infezioni batteriche siano coinvolte nelle riacutizzazioni. Ma è stato visto anche che la neutrofilia è associata a una eosinofilia e ad un aumento delle chemochine: eotossina e RANTES (*Regulated upon activation Normal T cell Expressed and Secreted*), la secrezione delle quali si sa essere promossa dalle infezioni virali (13). Nella BPCO il 27-56% delle esacerbazioni sono dovute a infezioni virali dell'apparato respiratorio le quali nella maggior parte dei casi sono causate da Rhinovirus. Questi sono virus a singolo filamento di RNA positivo e ne sono stati individuati più di 100 sierotipi dei quali il 90% utilizza come recettori sulla membrana delle cellule, *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) (13).

La *terapia farmacologica* per la broncopneumopatia cronica ostruttiva prevede l'utilizzo di antiinfiammatori, quali corticosteroidi inalatori o orali, e anche l'uso di broncodilatatori. L'obiettivo di questi farmaci è di prevenire e controllare la sintomatologia, diminuire la frequenza e la gravità delle riacutizzazioni ma non è in grado di modificare la progressiva diminuzione della funzionalità respiratoria che caratterizza questa patologia. L'unico intervento che si è dimostrato in grado di ridurre la progressione della BPCO è la sospensione dell'abitudine al fumo di sigaretta (9) (14). In aggiunta a questo, oggi è sempre più diffusa l'idea che l'utilizzo di farmaci anti-ossidanti potrebbe svolgere un ruolo protettivo sul bilancio ossidativo e di conseguenza sull'infiammazione sistemica ma la loro efficacia deve essere ancora confermata da più studi clinici randomizzati e controllati su larga scala. In ogni caso vengono utilizzati sempre più spesso superossido dismutasi (SOD) mimetici, agenti mucolitici come N-acetyl-L-cysteine (NAC) e carbocisteina sale di lisina (SCMC-Lys) associati ai tradizionali farmaci usati per la BPCO. (15)

1.1.1 IL RUOLO DEL FUMO DI SIGARETTA

Il *fumo di sigaretta* gioca un ruolo principale nell'eziopatogenesi della broncopneumopatia cronica ostruttiva, infatti è ritenuto responsabile della malattia nel 90% dei casi (5). Ogni aspetto, nell'abitudine tabagica, assume un peso importante nel determinare la malattia: l'età di inizio, gli anni di fumo trascorsi, il tipo e la media di sigarette fumate.

Il fumo di sigaretta è una miscela di gas (87%), vapore (5%) e particelle solide (8%) e può quindi essere definito un aerosol concentrato, nel quale si trova disperso materiale corpuscolato di piccolissime dimensioni. La deposizione di queste particelle nelle vie respiratorie dipende dalla loro grandezza e dalla forza d'aspirazione del fumo: quelle di dimensioni più piccole penetrano profondamente nell'albero respiratorio fino ai bronchioli e agli alveoli, mentre quelle più grandi si fermano nelle prime vie respiratorie. Il fumo di tabacco viene definito "aerosol ideale" in quanto gran parte della componente corpuscolata ha un diametro medio tale da poter penetrare in profondità e raggiungere le medie e piccole vie respiratorie.

Una volta nell'albero respiratorio, la potenzialità lesiva di questo aerosol è dovuta alle sue numerosissime *componenti tossiche* (Figura 2) sia volatili, quali ossido di carbonio, anidride carbonica, acetone, aldeidi, ossidi di azoto, nitrosamine, idrocarburi; che particellate, quali catrame, nicotina, fenolo (1). La composizione chimica del fumo di sigaretta, però, è complessa e variabile. Essa dipende principalmente da due fattori:

- la **composizione chimica delle foglie del tabacco**, che cambia in relazione al tipo di piante selezionate e ai metodi di coltivazione, ai disinfettanti utilizzati, ai processi di cura e di concia, all'aggiunta di sostanze a scopo umettante od aromatizzante;
- le **condizioni della combustione**, cioè la temperatura di combustione, la forza e la durata dell'aspirazione (che condizionano l'ossigenazione della combustione e indirettamente anche la temperatura della combustione), la lunghezza della sigaretta e del mozzicone, la presenza o meno del filtro e il tipo di filtro che ha una notevole importanza nel trattenere una parte dei costituenti del fumo.

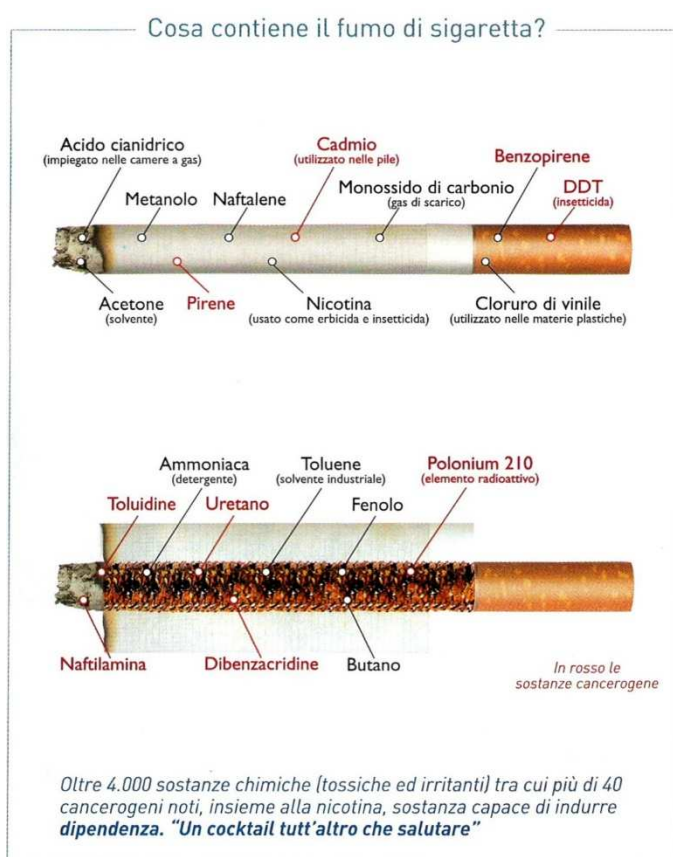


Figura 2: Schema sintetico delle sostanze contenute nel fumo di sigaretta.

Il fumo derivante dalla combustione di una sigaretta contiene oltre 4.000 composti di cui circa 3900 sono gravemente dannosi per gli organismi viventi.

Quando si parla della composizione del fumo di sigaretta, un altro aspetto fondamentale da considerare è la presenza, oltre che alle sostanze tossiche già citate, di grandi quantità di **radicali liberi dell'ossigeno, perossidi e perossinitriti** (16).

Si stima che la quantità di radicali liberi introdotta nelle vie respiratorie, per ogni sigaretta fumata, sia nell'ordine di 10^{13} - 10^{18} radicali (16). Nella miscela di fumo di sigaretta si possono distinguere due differenti gruppi di radicali liberi: *radicali a lunga emivita* presenti nella fase corpuscolata (o fase tar) e *radicali a breve emivita* della fase aeriforme (o fase gas). Nella "fase tar", il principale radicale riscontrato è il complesso chinone-idrochinone, un sistema redox molto attivo ed in grado di ridurre l'ossigeno molecolare a radicale superossido e quindi a perossido di idrogeno e a radicale idrossilico (16) (17). Il ciclo può essere sostenuto da equivalenti riducenti biologici (ascorbato, NAD(P)H e glutatione) che riducono le sostanze chinonoidi ossidate ai loro stati ridotti, rendendole capaci di riprodurre il radicale superossido. Per quanto riguarda la "fase gas", in essa sono presenti alte concentrazioni di ossidanti/radicali liberi ($>10^{15}$ molecole/puff) (16), come piccoli radicali alchilici e alcossilici, dotati di una reattività di gran lunga superiore ai radicali della fase corpuscolata, $O_2^{\cdot-}$ ed ossido nitrico. L'ossido nitrico e l' $O_2^{\cdot-}$ reagiscono immediatamente a formare la molecola altamente reattiva del perossinitrito. Il fumo di sigaretta, inoltre, ha la capacità di generare H_2O_2 anche se in soluzione acquosa (17). La generazione di ossidanti a livello respiratorio può essere incrementata dalla reazione dell' O_2 in presenza di piccole quantità di ioni metallici, come il ferro libero. Questo, sotto forma ferrosa (Fe^{++}), catalizza la reazione di Fenton ($Fe^{++} + H_2O_2 \rightarrow Fe_3 + OH \cdot + OH \cdot$), dando origine al radicale idrossile ($OH \cdot$) (18).

Il fumo di sigaretta, carico di tutte queste sostanze tossiche, i ROS e con il suo potenziale di generazione di altre molecole nocive una volta raggiunto l'ambiente respiratorio, agisce da potente stimolo flogogeno sulle componenti cellulari e tissutali delle vie respiratorie, scatenando una serie di meccanismi patogenetici che sono schematizzati ed esemplificati nella figura 3.

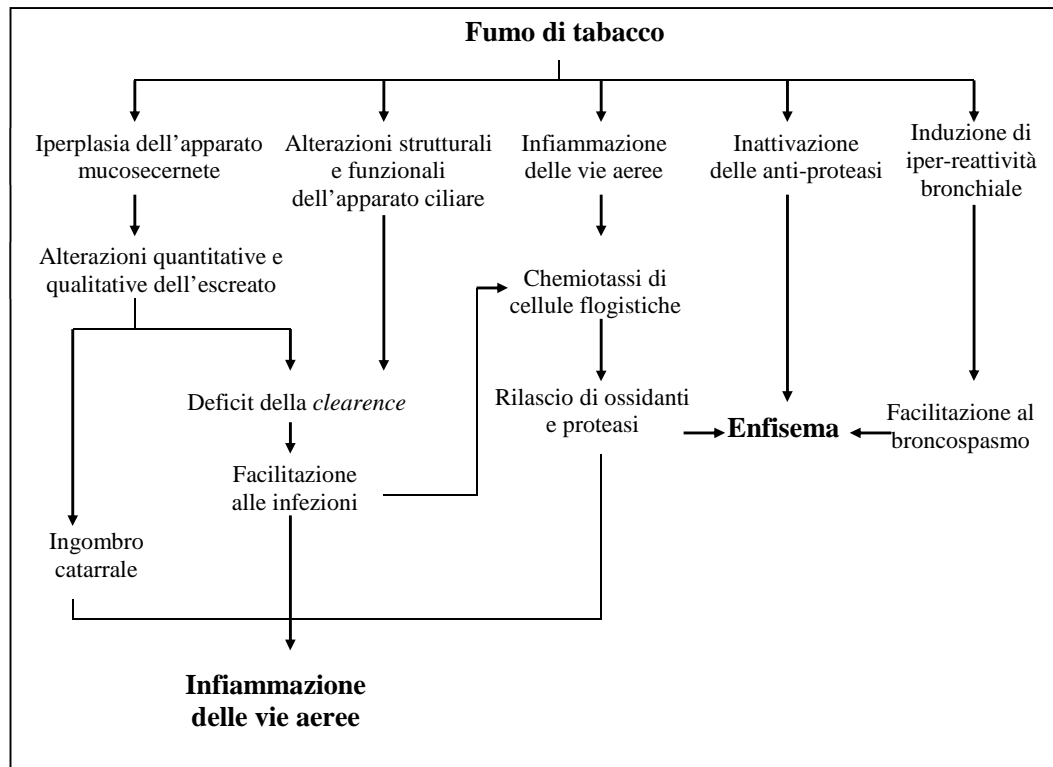


Figura 3: Schema rappresentativo del ruolo del fumo nel determinismo dell'ostruzione delle vie aeree (1).

Il primo effetto dovuto al fumo di sigaretta è la *stimolazione all'ipersecrezione mucosa* per irritazione cronica e la conseguente iperplasia delle ghiandole presenti nella sottomucosa delle vie aeree maggiori, nonché l'aumento di numero e l'estensione della distribuzione delle cellule caliciformi (1). Successivamente si ha un'induzione di flogosi poiché il fumo *richiama i macrofagi* dagli alveoli nelle vie aeree periferiche. Queste cellule, a causa della prolungata esposizione al fumo, mostrano caratteri funzionali anormali, rappresentati da un'accentuata tendenza al rilascio di enzimi proteolitici, di radicali ossidanti e di fattori chemiotattici per i neutrofili (1), quali il leucotriene B₄ (LTB₄) e l'interleuchina-8 (IL-8), ma anche di *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF α) che promuove l'espressione di molecole di adesione. Questi fattori, insieme all'effetto chemiotattico della nicotina, conducono al richiamo di neutrofili nel polmone i quali rilasciano, in modo non controllato, enzimi proteolitici e radicali ossidanti. Quindi il fumo di sigaretta, oltre a contenere già al suo interno un grande quantità di specie reattive dell'ossigeno, contribuisce alla produzione endogena di radicali. Questo porta alla creazione di uno *sbilancio negli equilibri proteasi-antiproteasi e ossidanti-antiossidanti*

a favore del danno parenchimale (19). Le alterazioni infiammatorie e lo squilibrio del rapporto proteasi/antiproteasi si riscontrano già nei fumatori senza BPCO ma nei soggetti che manifestano la malattia, i quali si trovano in stadi di gravità più avanzati, questi effetti del fumo sono molto più accentuati. Questo suggerisce che l'accelerato declino della funzione respiratoria nella BPCO è dovuto a un'amplificazione della normale risposta infiammatoria contro l'agente irritante quale il fumo, o per eccessiva produzione di agenti flogistici o per il deficit dei principali meccanismi di difesa (19). Inoltre il fumo di sigaretta induce *iper-reattività bronchiale* e *alterazione dell'efficienza della clearance mucociliare* per lesione dell'integrità strutturale dell'epitelio, paralisi del battito ciliare, aumento di densità delle secrezioni e ridotta efficienza della tosse (1).

L'effetto complessivo di questi fenomeni non è soltanto un ingombro delle vie aeree ma anche una facilitazione alle *infezioni batteriche*, i cui agenti eziologici prevalenti sono in primo luogo lo *Streptococcus pneumoniae* e, secondariamente, l'*Haemophilus influenzae* (1). La presenza di questi batteri può essere evidenziata anche nelle più basse vie aeree che normalmente sono sterili e non preparate a contrastare con efficienza una infezione. Per questo motivo può rimanere una infezione latente che si pensa sia una delle cause delle riacutizzazioni della malattia.

1.2 STRESS OSSIDATIVO E ANTI OSSIDANTI

Il polmone è continuamente soggetto all'azione di ossidanti inalati dall'ambiente o prodotti durante le reazioni biochimiche del nostro organismo. Queste sostanze tendono a strappare elettroni da altre molecole con cui vengono in contatto generando così una coppia ossido-riduttiva. I metaboliti ossidanti di maggiore interesse biologico sono centrati su pochi elementi: ossigeno, azoto, carbonio, cloro, zolfo (20).

Un radicale libero è una specie chimica che contiene uno o più elettroni che occupano da soli un orbitale molecolare o atomico. Sono radicali liberi dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species* - ROS): l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), il radicale idrossile ($OH \cdot$) e il radicale perossidrile ($OH_2 \cdot$). Il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e gli acidi ipoalosi, come l'acido ipocloroso ($HOCl$), non sono ROS ma vengono classificati come tali, in quanto derivano dall'ossigeno e prendono parte alla tossicità dell'ossigeno. Esistono inoltre anche altri metaboliti derivati dall'ossigeno, come l'ossigeno singoletto, l'ozono e i radicali perossili ($R-OO \cdot$) ed alcossili ($R-O \cdot$) (20). La presenza di uno o più elettroni spaiati rende l'atomo o la molecola altamente instabili, per cui la reattività chimica dei radicali è generalmente molto elevata. A temperatura intorno a $37^\circ C$ la maggior parte dei radicali è notevolmente reattiva così che la loro concentrazione diventa bassissima. Le principali fonti di ossidanti o radicali liberi sono:

- **Endogene**, come: autossidazione di biomolecole, ossidazione enzimatica, durante la catena di reazioni della fosforilazione ossidativa ad opera di un sistema multienzimatico (complessi I-V) le cui subunità proteiche sono in parte sintetizzate dal genoma mitocondriale, e anche ad opera di cellule fagocitiche, organelli subcellulari, enzimi intracellulari come la NADPH ossidasi, xantina ossidasi, etc oppure durante fenomeni flogistici.
- **Esogene**, come: alcuni farmaci, radiazioni, transizioni di ioni metallo, danno da alterazioni circolatorie polmonari (ischemia-riperfusion), inquinamento ambientale con particelle inorganiche come asbesto, quarzo, silice, gas di scarico, pesticidi ma anche e soprattutto a causa del fumo di sigaretta.

La vita dei radicali liberi è molto breve e si svolge nelle immediate vicinanze della sede di produzione. In condizioni fisiologiche la cellula mantiene al suo interno uno stato

riducente grazie ad un bagaglio di enzimi e molecole che controbilanciano la produzione di ROS, questi vengono definiti **sistemi antiossidanti**.

Si conoscono due classi di antiossidanti:

- *antiossidanti non-enzimatici* come: la vitamina A, C ed E, ma anche i polifenoli come flavonoidi e procianidine, e inoltre fanno parte di questo gruppo anche β -carotene e glutazione;

- *antiossidanti enzimatici* come: la superossido dismutasi (SOD), la catalasi, l'eme ossigenasi-1, le perossiredossine, le tioredossine e le glutaredossine e poi vi è il sistema redox del glutazione-perossidasi che comprende glutammato cistein-ligasi, glutazione reductasi, glutazione perossidasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi.

Queste due classi di antiossidanti spesso lavorano in tandem.

Il tessuto polmonare e diverse cellule infiammatorie mostrano differenti profili antiossidanti. Tutte le principali malattie infiammatorie come asma, BPCO, fibrosi polmonare idiopatica, ARDS, interstiziopatie e displasie broncopolmonari condividono la caratteristica comune di un alterato rapporto ossidanti/antiossidanti. Questo avviene perché se la generazione di ROS eccede la capacità antiossidante della cellula stessa, o si verifica una diminuzione dei meccanismi di detossificazione, si viene ad instaurare una condizione patologica che prende il nome di **stress ossidativo** (20). L'espressione "stress ossidativo" è stata introdotta per la prima volta nel 1989 da Sies che lo definì proprio come: *uno squilibrio tra la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno e i sistemi di difesa antiossidanti*.

Tutte le classi di molecole biologiche sono potenziali *targets* per l'attacco dei radicali liberi: proteine, lipidi, basi azotate del DNA possono essere ossidate o comunque subire modifiche dovute ai meccanismi innescati dallo stress ossidativo.

L'anione superossido e i suoi derivati possono danneggiare i costituenti extracellulari del tessuto connettivo inducendo la depolimerizzazione dell'acido ialuronico e la frammentazione di proteoglicani e collagene; e questo è considerato il più significativo danno tissutale di tutto il processo infiammatorio. Anche l' α 1-antitripsina può diventare substrato di sostanze ossidanti che rapidamente ossidano un residuo di metionina portando alla sua inattivazione (21), e se questo è associato ad un'attivazione dell'elastasi, espone i tessuti all'azione non controllata di questo enzima. A livello delle

cellule endoteliali ed epiteliali, il danno da ossidanti può deteriorare anche la funzione di barriera alle macromolecole. Inoltre l' H_2O_2 e l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ possono causare la produzione di potenti chemotossine o aumentare l'adesione dei leucociti all'endotelio attraverso l'attivazione della trascrizione genica delle integrine mediata dal fattore nucleare Nf-kappaB. L' H_2O_2 , inoltre, essendo una molecola dotata di stabilità maggiore rispetto alle altre specie reattive dell'ossigeno, è stato visto essere causa specificamente di un danno al DNA attraverso un meccanismo ferro e rame dipendente (22), ioni metallici indispensabili per la produzione di ROS dannosi. In base all'entità del danno ossidativo a carico del DNA, le cellule possono andare incontro a necrosi o apoptosi. I ROS infatti possono portare alla rottura dei filamenti (doppi e singoli), o alla formazione di legami crociati DNA-DNA o DNA-proteine, allo scambio dei cromatidi fratelli, o anche alla modificazione delle basi azotate. Tutti e quattro i nucleotidi, infatti, possono subire modificazioni ossidative, anche se le pirimidine (citosina e timidina) sembrano essere le più suscettibili ai processi di idrossilazione, saturazione, apertura o condensazione dell'anello imidazolico. Quindi il DNA, oggetto di ossidazione, può subire svariati tipi di alterazioni ossidative e queste inibiscono irreversibilmente i processi di trascrizione, traduzione e replicazione del DNA portando anche alla prematura senescenza o alla morte cellulare.

Il fumo di tabacco, come già citato, è già di per sé una potente sorgente di ROS e in più numerosi studi suggeriscono che i fagociti, ma anche i macrofagi alveolari e i PMN del sangue periferico dei fumatori producono, in certe condizioni, quantità maggiori di specie reattive dell'ossigeno e questo non può che ridurre ulteriormente le capacità anti-ossidanti delle cellule. La BPCO, abbiamo già detto essere caratterizzata da un forte infiltrato di cellule immunocompetenti come neutrofili e macrofagi quindi nei fumatori la maggiore produzione localizzata di ossidanti può dar origine ad una cascata che propaga la risposta infiammatoria e culmina nella distruzione del tessuto, nel malfunzionamento d'organo e nell'accelerato invecchiamento polmonare che sono caratteristici proprio di questa malattia (23) (24) (25) (26) (20) (Figura 3).

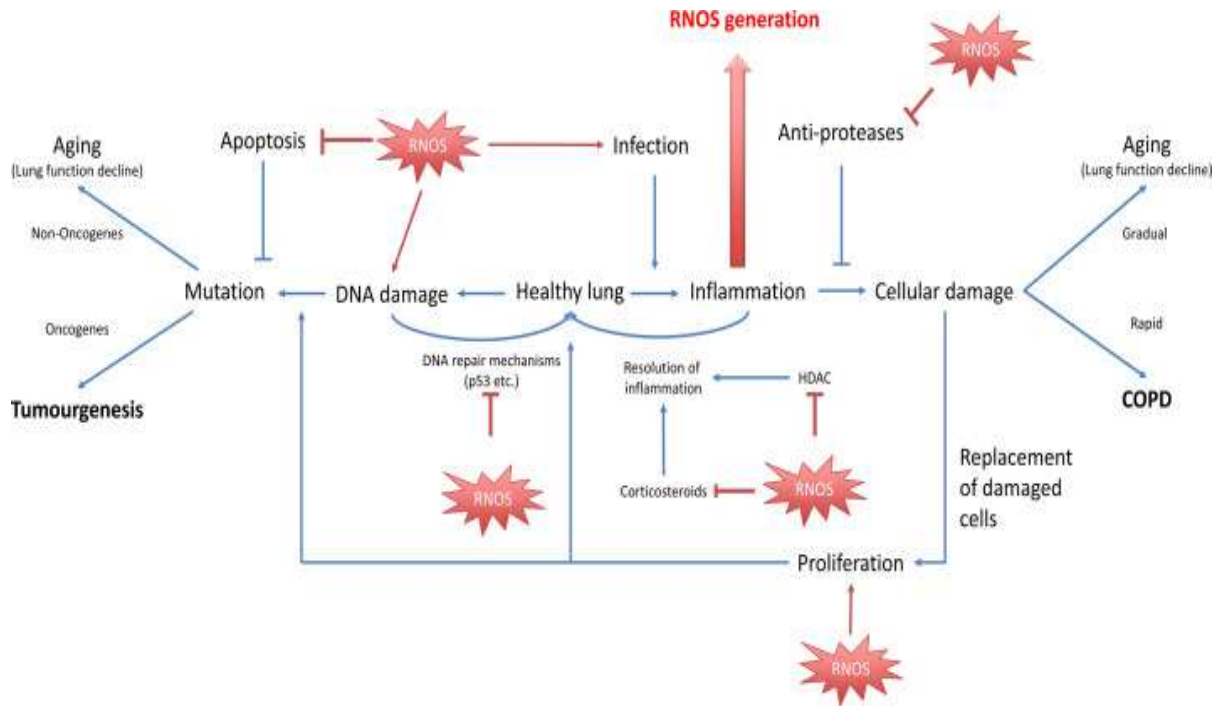


Figura 4: Le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (RNOS), derivate insieme da fonti esogene ed endogene, guidano molte delle vie sia per la BPCO che per l'invecchiamento precoce.

RNOS possono reagire con il DNA, portando a danni, i quali se non corretti inducono a mutazioni. I meccanismi che impediscono la mutazione, come i meccanismi di riparazione del DNA e l'apoptosi, possono essere inibiti dall'attività dei RNOS. Inoltre RNOS possono contribuire alla suscettibilità alle infezioni e guidare l'infiammazione dei polmoni. L'infiammazione può portare a ulteriori danni cellulari e al DNA, sia attraverso la generazione di ulteriori RNOS e anche attraverso l'azione di citochine e proteasi. RNOS sono in grado di inibire i meccanismi di protezione, come anti-proteasi. Il danno ai polmoni è riparato da processi inclusi nella proliferazione cellulare, che può a sua volta promuovere la senescenza o la tumorigenesi (87).

1.3 CICLO CELLULARE, APOPTOSI O SENESCENZA

1.3.1 IL CICLO CELLULARE

La capacità di una cellula di dividersi rappresenta un processo biologico fondamentale per la vita e lo sviluppo degli organismi viventi. Una cellula si riproduce svolgendo una sequenza ordinata di eventi in cui duplica i suoi contenuti e poi si divide in due cellule figlie. Con la definizione “**ciclo cellulare**” si indica proprio il complesso degli eventi molecolari che portano una cellula a dividersi in due cellule geneticamente identiche attraverso il processo della *mitosi* (Figura 4). Sebbene sia continuo, il processo può essere suddiviso in una serie di fasi ognuna delle quali presenta caratteristiche peculiari pur continuandosi nella successiva (27):

- **Fase M:** in questa fase si rompe l’involucro nucleare, si forma il fuso mitotico e i cromosomi, già duplicati, dopo essersi disposti sullo stesso piano (piastra mitotica), vengono tirati verso le parti opposte della cellula in modo da costituire due nuovi set completi. A questo punto si forma attorno a ogni set di cromosomi una nuova membrana nucleare, mentre una strozzatura sempre più profonda del citoplasma finisce per dividere la cellula nelle due cellule figlie, ognuna delle quali sarà fornita di un corredo cromosomico completo e identico a quello della cellula madre.
- **Fase G1:** subito dopo essere stata prodotta per mitosi, una cellula entra nella fase G1 in cui viene completato il corredo di RNA e proteine, che era ridotto rispetto a quello presente nella cellula precursore prima che questa andasse incontro alla divisione;
- **Fase S:** terminata la fase G1, la cellula è pronta a iniziare la duplicazione del DNA passando nella fase S. In questa fase, oltre a sintetizzare il proprio DNA la cellula continua anche a produrre quantità significative di RNA e proteine;
- **Fase G2:** la cellula continua a sintetizzare proteine e va incontro a un rilevante aumento di volume, che quasi raddoppia. Al termine di questa fase la cellula è pronta a iniziare di nuovo il processo di divisione entrando nella fase M.

L'insieme delle fasi G1, S e G2 è collettivamente identificato come *interfase*. Cellule vitali e metabolicamente attive che si trovano in una condizione quiescente, per quanto riguarda la divisione mitotica (non proliferativa) e quindi al di fuori del ciclo cellulare, sono dette **in fase G0**. Al termine della fase G1 una cellula può “scegliere” se proseguire nel ciclo oppure entrare in una *fase quiescente (G0)* di durata variabile da ore a giorni all'intera vita cellulare, a seconda del tipo di cellula.

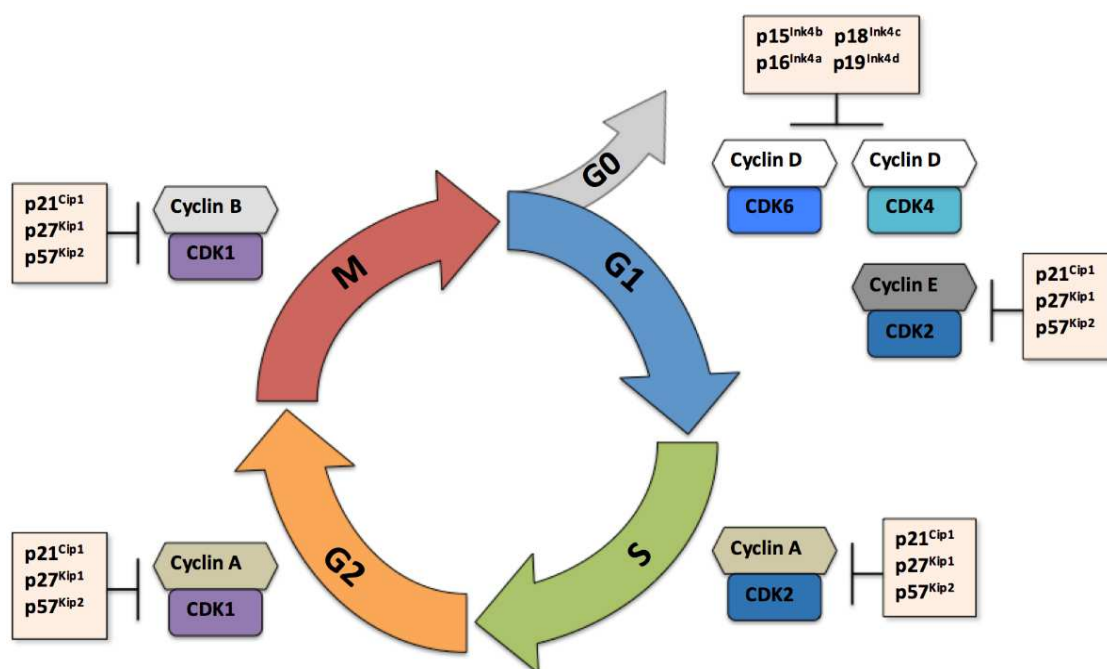


Figura 5: Schema del ciclo cellulare e la sua regolazione.

Sono molto importanti i periodi di tempo della fase G1, fra la fine della mitosi (o lo stato G0) e l'inizio della fase S, e della fase G2, fra il termine della fase S e l'inizio della fase M poichè qui intervengono i principali **meccanismi di regolazione**. Vi sono dei punti precisi, definiti *checkpoints*, localizzati proprio a livello delle **transizioni G1/S e G2/M**, che impediscono l'inizio della fase successiva se non è stata completata in modo corretto quella precedente. In questi punti il ciclo cellulare è regolato sia da segnali intracellulari che da segnali extracellulari provenienti da altre cellule e che possono favorire o inibire la proliferazione cellulare (27).

Le cellule eucariotiche hanno evoluto una rete complessa di proteine regolatrici note come “**sistema di controllo del ciclo cellulare**” che governa la corretta proliferazione

cellulare, in questo modo le diverse fasi e gli eventi molecolari ad esse associate sono cronologicamente determinati e regolati (28).

I tempi e la successione delle varie fasi del ciclo cellulare sono regolati da una famiglia di proteine chinasi, a loro volta regolate da segnali extracellulari che permettono alla cellula di adattare il proprio stato proliferativo alle condizioni esterne. Questi enzimi sono costituiti da una *subunità regolatrice*, la **ciclina**, e da una *subunità catalitica*, la proteina **chinasi ciclina-dipendente (Cdk)**. Le Cdk sono piccole serina/treonina protein chinasi che richiedono l'associazione in complesso con una ciclina per essere attivate (28). Nelle cellule animali sono note almeno dieci diverse cicline e almeno otto diverse Cdk, che agiscono in varie combinazioni in momenti particolari del ciclo cellulare, fosforilando e quindi attivando o inattivando specifiche proteine che svolgono funzioni particolari nelle varie fasi del ciclo. Accanto a questi enzimi, specifiche **proteina fosfatasi**, defosforilando le proteine fosforilate, le riportano alla condizione funzionale di partenza.

Nelle cellule in divisione l'attività dei vari tipi di Cdk mostra notevoli oscillazioni. Queste variazioni di attività sono causate da **quattro diversi tipi di regolazione** dell'attività di questi enzimi (27) (28):

- I. **fosforilazione/defosforilazione:** spesso innescato dalla presenza di danni sul DNA, richiede l'intervento di specifiche chinasi che fosforilano la subunità Cdk a livello di specifici residui di tirosina con effetti opposti sull'attività e di specifiche fosfoproteina fosfatasi che riportano le Cdk nella condizione di partenza;
- II. **degradazione controllata della subunità ciclina:** questo avviene ad opera di un complesso proteolitico cellulare noto come *proteasoma* che degradando la subunità regolatrice ne impedisce l'attività;
- III. **sintesi controllata di Cdk e cicline:** questo richiede l'intervento di specifici fattori di trascrizione che favoriscono la trascrizione dei geni che codificano per specifiche cicline e Cdk. A sua volta, la trascrizione dei geni che codificano per questi fattori di trascrizione è controllata da specifici stimoli extracellulari come quelli rappresentati da *fattori di crescita o induttori della divisione cellulare* come le *citochine*.
- IV. **azione di specifiche proteine che inibiscono le Cdk:** questo è legato alla presenza di specifici inibitori delle Cdk capaci di legarsi a queste inattivandole. Le **proteine**

Cdk inibitorie (CdkI), si dividono in due classi: la prima classe, denominata anche “*inhibitor of Cdk*” o *INK*, comprende le proteine p16, p15, p18 e p19 che sono specifiche per Cdk4 e Cdk6 e ne inibiscono il legame alle cicline D; la seconda classe include le proteine p21, p27 e p57 che sono inibitori generali delle Cdk, ma sono in grado di bloccare specificatamente l’attività chinasi di Cdk4 e Cdk2. In particolare, la proteina p16 determina il blocco del ciclo cellulare in fase G1, prima del punto di restrizione R, andando a inibire l’attività del complesso ciclina D1-Cdk4/6. I livelli della proteina p16 impongono la soglia dei livelli di espressione della ciclina D necessari per la fosforilazione della proteina pRb. La proteina p21 e la proteina p27 svolgono invece la loro funzione controllando la transizione G1/S, a valle del punto R e facilitando l’entrata nel nucleo dei complessi ciclina D-Cdk.

L’insieme di questi quattro meccanismi di controllo modula la presenza e l’attività di specifici complessi Cdk-ciclina che determineranno, a loro volta, lo stato proliferativo o di riposo, temporaneo o permanente, di una cellula.

Un altro fattore chiave nella regolazione del ciclo cellulare è **la proteina p53**. Il gene oncosoppressore p53 ha un’attività anti-proliferativa e può causare l’arresto del ciclo cellulare in fase G1 o indurre apoptosi (27). La proteina p53 entra in gioco, come freno di emergenza, quando il DNA è danneggiato da radicali liberi dell’ossigeno, radiazioni ionizzanti, luce UV o sostanze chimiche mutagene, in tali circostanze la proteina si attiva e va incontro ad importanti modificazioni post-traduzionali. È stato visto, infatti, che la proteina p53, normalmente espressa a bassi livelli, viene fosforilata in residui aminoacidici specifici e questo inibisce il trasporto della proteina dal nucleo al citoplasma causandone così l’accumulo nel nucleo e un aumento della sua attività trascrizionale oppure la sua espressione può essere regolata dal grado di ubiquitinizzazione tramite l’ubiquitin-ligasi Mdm2. La proteina p53 integra i segnali provenienti da una serie di stimoli diversi. Le risposte cellulari indotte da questa proteina sono così diverse e possono includere l’arresto del ciclo cellulare, l’induzione di senescenza, apoptosi o differenziamento e il riparo del DNA. La maggior parte di queste risposte cellulari dipendono dalla capacità di p53 di agire da fattore trascrizionale. Questa proteina media l’inibizione della crescita cellulare inducendo l’espressione di p21, 14-3-3s, Cdc25C e GADD45, stimola il riparo del DNA sostenendo l’espressione di p21, GADD45 e la proteina dello xeroderma pigmentoso p48, induce l’apoptosi regolando

positivamente la trascrizione di Bax, PUMA, Noxa, p53-AIP, PIG3, Fas/APO1/CD95 e KILLER/DR5. Bassi livelli di stress o di danno al DNA inducono livelli di p53 in grado di provocare l'arresto della crescita cellulare. Al contrario, in condizioni di severo stress cellulare, gli alti livelli di espressione e stabilità di p53 attivano la morte cellulare. È stato anche proposto che il tipo di attività di p53 sia mediato da specifiche modificazioni post-traduzionali. Il target trascrizionale preferito di p53 è la proteina **p21** che inibisce l'attività del complesso ciclina E-Cdk2 causando il blocco della transizione fase G1/fase S. p21 si lega anche al complesso ciclina D-Cdk4 prevenendo la fosforilazione di pRb e sopprimendo così il pathway pRb/E2F (27). Quindi, p53, tramite l'espressione di p21, provoca l'arresto della cellula in fase G1 o in fase G2. Recentemente, è stato dimostrato che p53 è in grado di attivare anche la senescenza cellulare e di impedire la formazione di cellule aneuploidi. Infine, p53 può interagire direttamente con le proteine coinvolte nella riparazione del DNA e con strutture specifiche del DNA stesso. Quindi possiamo affermare che la proteina p53 rappresenta un sensore della normale progressione del ciclo cellulare determinandone il blocco in caso di malfunzionamento, per consentire il ripristino della normalità. Per questo motivo p53 è stata definita "guardiano del genoma" (27).

La divisione cellulare è quindi essenziale per la sopravvivenza degli organismi. Per produrre due cellule figlie geneticamente identiche, il DNA di ciascuna cellula deve prima essere fedelmente replicato producendo due copie complete, che devono poi essere equamente distribuite nelle due cellule figlie, così che ciascuna riceva una copia dell'intero genoma. Ma il genoma è continuamente danneggiato dal metabolismo ossidativo, da errori nella replicazione del DNA e nella mitosi cellulare. In base al livello ed al tipo di danno, le cellule quindi promuovono meccanismi di riparazione, muoiono per apoptosi o, altresì, possono diventare senescenti o potenzialmente oncogeniche (27).

1.3.2 MECCANISMI DI MORTE CELLULARE

Un delicato bilancio regola decisioni di vita o di morte in una data popolazione cellulare. L'apoptosi è caratterizzata da alcuni cambiamenti morfologici: restringimento della membrana, condensazione della cromatina nucleare, frammentazione del DNA e

formazione di corpi apoptotici. È un processo regolato da un gruppo di vie di segnale che possono essere indotte da stimoli interni o esterni. Stimoli extracellulari sono rappresentati da ligandi specifici che legano i recettori responsabili di morte sulla superficie cellulare e determinano la morte cellulare. Stimoli intracellulari sono rappresentati da stress genotossico, ipossia e carenza di nutrienti, i quali inducono specifici segnali intracellulari che scatenano l'apoptosi o la necrosi. Il principale organulo cellulare responsabile dell'apoptosi intrinseca è rappresentato dai mitocondri, che influenzano le caratteristiche morfologiche cellulari per la necrosi o l'apoptosi.

Gli effettori chiave della morte cellulare sono le *caspasi*, una famiglia di proteine chinasi che tagliano substrati proteici in corrispondenza di residui di acido aspartico (29). Nei mammiferi sono state identificate 14 proteine appartenenti a questa famiglia. L'attivazione delle caspasi avviene in genere grazie all'azione proteolitica di un'altra caspasi e il sistema si attiva attraverso un meccanismo a cascata che culmina nell'attivazione di proteine che sono essenziali per la sopravvivenza cellulare (30).

I meccanismi di apoptosi sono ovviamente finemente regolati. Una famiglia di regolatori dell'apoptosi sono le *proteine B cell leukemia* (Bcl) che possono stimolare o prevenire la morte cellulare. Questa differente azione dipende dai livelli effettivi dei membri pro- e anti-apoptotici di questa famiglia presenti nella cellula. Quando le proteine Bcl-2 o Bcl-XL sono iperespresse, esse possono eterodimerizzare con una proteina pro-apoptotica conosciuta come Bax e prevenire l'apoptosi. Se invece l'espressione di queste proteine è bassa, si ha l'omodimerizzazione di Bax, che determina l'apoptosi delle cellule tramite la formazione di un poro di permeabilità di transizione nella membrana mitocondriale. In questo modo vengono liberati il citocromo C e alcune caspasi.

Le caspasi possono essere attivate da due distinti meccanismi: l'apoptosi indotta da recettori di morte o da un segnale intrinseco (mitocondriale) di morte. Entrambi i meccanismi portano all'attivazione di simili caspasi effettrici a valle (29). Nel primo caso, il legame di segnali esterni quali il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), FAS-L e *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) ai recettori di morte localizzati sulla superficie cellulare, trasduce segnali di morte nelle cellule. Questi segnali apoptotici estrinseci provocano l'apoptosi direttamente attraverso l'attivazione della caspasi-8, tramite meccanismo autocatalitico o attraverso un segnale mediato dai mitocondri.

L'attivazione della caspasi-8 attiva a sua volta altre caspasi effettrici, come le caspasi-9 e 3. Il secondo meccanismo di attivazione dell'apoptosi è denominato segnale intrinseco mitocondriale. I mitocondri sono gli organuli che producono la maggior parte dell'energia delle cellule e giocano un ruolo primario nella morte cellulare, induzione dell'apoptosi e necrosi. L'aumento della permeabilità della membrana mitocondriale provoca il rilascio di proteine apoptogeniche, come ad esempio il Citocromo C (*Cyt C*), dallo spazio intermembrana dei mitocondri nel citosol. Il *Cyt C*, insieme al fattore 1 attivante le proteasi dell'apoptosi (Apaf-1) e la pro-caspasi 9, forma un complesso che promuove l'attivazione delle caspasi a valle che provocano l'apoptosi. Questo complesso è chiamato apoptosoma e, una volta attivato da segnali che inducono l'apoptosi, taglia e attiva la pro-caspasi 3. La caspasi-3 attivata cliva, a sua volta, specifiche proteine cellulari e acidi nucleici scatenando l'apoptosi (29) (30).

L'apoptosi è anche regolata dai membri della famiglia delle *Proteine Inibitrici dell'apoptosi*, le **IAPs**. Fra le proteine che hanno attività anti-apoptotica recentemente è stata descritta la **survivina**, un omodimero di 142 aminoacidi, la più piccola delle IAPs. Il gene della survivina è localizzato nel cromosoma 17 in posizione 17q25 e la sua trascrizione risulta essere dipendente dal ciclo cellulare (31). La survivina è coinvolta in varie funzioni essenziali per la cellula, come la mitosi, l'apoptosi, la risposta allo stress cellulare e in diversi meccanismi chiave per l'integrità genomica. L'espressione di questa proteina si riscontra soprattutto durante la fase G2/M del ciclo cellulare (31); essa svolge un ruolo importante nel controllo della divisione cellulare attraverso l'associazione con la chinasi Aurora B, la proteina INCENP (*Inner Centromere Protein*) e la proteina Borealin/Dasra B nel "*chromosomal passenger complex*" (32), in cui la survivina è essenziale per la corretta segregazione cromosomica e la citochinesi (32) (33). La survivina è inoltre coinvolta nella formazione del fuso mitotico, dove può influenzare la stabilità dei microtubuli (33), e nella progressione del ciclo cellulare delle cellule tumorali, promuovendo la transizione G1/S (32). Numerosi studi hanno infatti dimostrato che l'espressione della survivina protegge le cellule normali o trasformate dall'apoptosi (33) (34) (35). Il meccanismo con cui la proteina antagonizza la morte cellulare non è ancora ben chiaro; sembra che la sua funzione di inibizione dell'apoptosi, innescata dalla via estrinseca o intrinseca, sia legata alla sua capacità di inibire direttamente o indirettamente le caspasi. Probabilmente, in risposta a stimoli apoptotici, la survivina

viene rilasciata dai mitocondri nel citoplasma dove si lega alle caspasi, come la caspasi-9, bloccando in questo modo il processo dell'apoptosi (36).

1.3.3 MECCANISMI DI SENESCENZA

Oggi si ritiene che alla base dei processi di invecchiamento cellulare esistano dei *pathway* redox-mediati e mitocondrio-dipendenti. Alti livelli di radicali liberi e di prodotti della perossidazione delle membrane lipidiche, infatti, sono in grado di modulare l'attivazione di alcuni fattori di trascrizione, direttamente, mediante la modificazione di alcuni residui aminoacidici o indirettamente, mediante la formazione di ponti sulfidrilici in prossimità dei *binding domains* a livello del DNA; tali modificazioni possono tradursi nell'attivazione o disattivazione dei fattori di trascrizione interessati (Figura 6). È noto che fattori di trascrizione legati ai processi di invecchiamento cellulare ed alla longevità come p53, AP-1 e NF-kappaB sono altamente sensibili allo stato redox cellulare (37).

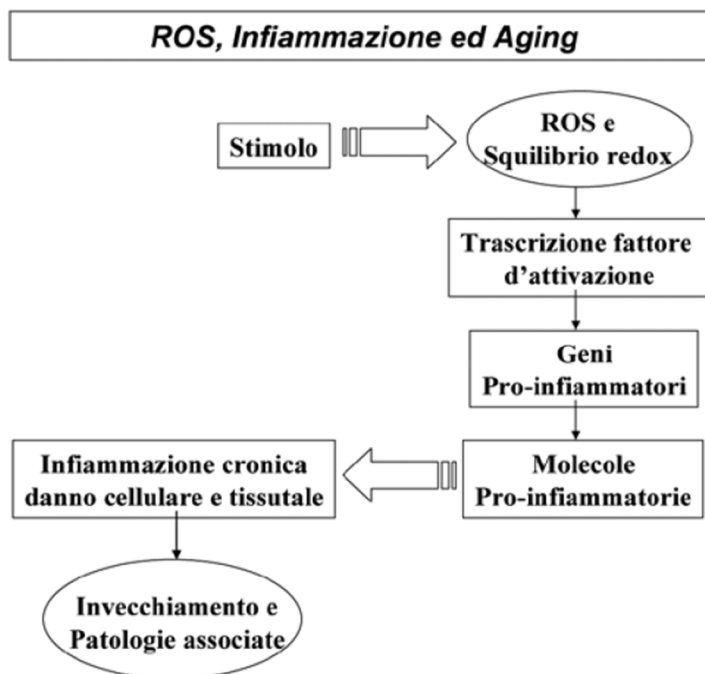


Figura 6: ROS come attivatori di fattori di trascrizione redox-sensitive in grado di produrre citochine e chemochine pro infiammatorie responsabili a loro volta di produzione di ROS e di fenomeni infiammatori cronici.

La *teoria radicalica*, formulata da Harman nel 1956, e successivamente corroborata da numerose osservazioni, sostiene infatti che l'invecchiamento sarebbe il prodotto della

serie di reazioni ossidative di natura radicalica (non più bilanciate da un efficiente sistema antiossidante) in grado di accelerare la degradazione dei sistemi biologici determinando un'usura somatica. La longevità dipenderebbe dunque dall'efficienza dei sistemi di protezione antiossidante (38).

La **senescenza cellulare** si presenta come un processo cellulare in grado di indurre l'arresto della proliferazione in risposta a diversi stimoli quali accorciamento progressivo dei telomeri, danno al DNA, stimoli oncogenici, stress ossidativi, esposizione a radiazioni ionizzanti, mantenendo al contempo la cellula metabolicamente attiva. Tale arresto irreversibile della crescita ha lo scopo di prevenire la trasmissione del danno alle cellule figlie. La sua prima definizione arriva nel 1956, ad opera di Leonard Hayflick e colleghi, i quali dimostrarono che fibroblasti umani primari in coltura possono andare incontro solo ad un numero limitato di divisioni (circa 55) prima dell'arresto irreversibile della crescita cellulare. Tale limite replicativo fu poi denominato "Limite di Hayflick" ed è stata la prima dimostrazione che le cellule vanno incontro a quella che viene definita "senescenza replicativa", che oggi sappiamo essere direttamente collegata all'accorciamento telomerico (39) (40).

I **telomeri** sono una sorta di orologio interno della cellula. Essi sono complessi dinamici costituiti da DNA e proteine posti all'estremità dei cromosomi ed hanno lo scopo di proteggere le parti terminali del DNA conferendo stabilità cromosomica. I telomeri si sono sviluppati come risposta ad un "malfunzionamento" della DNA polimerasi- α che agisce durante la replicazione. Infatti, la DNA polimerasi richiede un innesco per l'inizio della replicazione, rappresentato da un RNA primer costituito da 4-6 bp di RNA. Dopo che il DNA viene replicato, il primer viene degradato, ma la polimerasi non è in grado di riempire il gap, lasciando un tratto mancante all'estremità 5', con conseguente perdita di materiale genetico. Va da sé che, con l'avanzare della proliferazione cellulare, il numero di repliche effettuate aumenta di pari passo con la perdita di tratti di DNA, portando alla possibile morte della cellula. I telomeri impediscono che questa "erosione" arrivi al DNA.

I pathway di regolazione della senescenza cellulare sono diversi, i più conosciuti sono quelli regolati da p53 e pRB, geni soppressori tumorali iperattivati nelle cellule senescenti, che sembrano essere dei veri e propri controllori del traffico delle vie che

regolano il ciclo cellulare. I segnali di attivazione della senescenza, abbiamo detto, possono essere di varia natura e talvolta cumulativi: infatti, livelli combinati di stress intra o extracellulari possono determinare quanto velocemente le cellule vanno incontro a senescenza. Anche se diversi stimoli possono indurre la senescenza, essi appaiono convergere su uno o entrambi i pathway che instaurano e mantengono attivo l'arresto della crescita cellulare. p53 e pRB sono dei regolatori trascrizionali che hanno il compito di gestire una pletora di effettori, a monte e a valle, dei rispettivi pathway di attivazione della senescenza. Oltre a p53 e pRB, molti sono i geni che subiscono un'alterazione della loro espressione e molteplici sono i cambiamenti funzionali e morfologici adottati dalle cellule senescenti.

1.4 PATHWAY SIRT1/FOXO3 E LA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE

L'invecchiamento è un fenomeno complesso, eterogeneo e multifattoriale il quale è conseguenza di differenti interazioni tra geni e ambiente. La senescenza o *aging* è definita come il progressivo declino dell'omeostasi che si verifica dopo che la fase riproduttiva della vita si è conclusa, portando a un incrementato rischio di malattie o di morte. Nel caso della BPCO, è stato visto che questo naturale processo risulta accelerato dal continuo insulto causato dal fumo di sigaretta che porta a stress ossidativo e ad una esacerbazione del processo infiammatorio. Quindi l'accelerato *aging* è il risultato del fallimento nell'eliminazione dei ROS, del fallimento dei processi di riparazione del DNA e dell'accorciamento dei telomeri (41) (42).

Negli ultimi anni, molte molecole anti-aging sono state identificate e il mal funzionamento o la riduzione dell'espressione di queste sono considerate proprio una delle cause del progressivo invecchiamento. Sono ben documentate molecole anti-aging le **sirtuine**, una famiglia di proteine istone deacetilasi che controllano l'espressione di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, dell'apoptosi, del metabolismo, dei sistemi di riparazione del DNA e della senescenza (43) (44). Altre molecole con azione anti-invecchiamento sono i fattori di trascrizione appartenenti alla **Forkhead box O family (FoxO)** che regolano l'espressione di molecole importanti per il processo di riparazione del DNA e per la regolazione del ciclo cellulare e di molecole anti-ossidanti come la superossido dismutasi e la catalasi (45).

1.4.1 LE SIRTUINE

Negli eucarioti la regolazione dell'espressione genica avviene mediante meccanismi di compattamento e decompattamento della cromatina nucleare. Nella forma compatta, *eterocromatina*, si ha una repressione della trascrizione genica che, invece, è attivata quando la cromatina è decompattata (in questo caso si parla di *eucromatina*) attraverso modifiche post-trascrizionali delle code N-terminali degli istoni. Queste modificazioni sono reazioni di acetilazione e ubiquitinazione delle lisine, di metilazione delle lisine e delle arginine, o di fosforilazione delle serine e probabilmente delle treonine.

L'**acetilazione** è un processo reversibile, catalizzato dagli *enzimi istone acetiltransferasi* (HAT) che, trasferendo il gruppo acetile dall'acetil coenzima A ai residui di lisina presenti nelle code N-terminali degli istoni, determinano il decompattamento della cromatina e quindi la formazione di una struttura trascrizionalmente permissiva. La **deacetilazione**, invece, è catalizzata dagli *enzimi istone deacetilasi* (HDAC) che, aumentando l'interazione DNA-istoni e istone-istone, inducono un maggiore compattamento della cromatina e quindi generano una struttura trascrizionalmente inattiva.

Una famiglia di proteine ad attività deacetilasica sono le **sirtuine (SIRT)**. La prima sirtuina è stata scoperta nel 1984 in lievito ma l'interesse su questa famiglia di proteine non è realmente decollato fino a quando è stato osservato un effetto sulla durata della vita, prima nel lievito nel 1997, e poi negli eucarioti superiori, come in *Caenorhabditis elegans* nel 2001 e in *Drosophila melanogaster* nel 2004. La natura delle sirtuine come deacetilasi Nicotinammide Adenin Dinucleotide (NAD⁺) - dipendenti, però, è stata riconosciuta nel 2000 e subito è stato riscontrato un loro intervento nello stato metabolico della cellula. Negli Eucarioti, la famiglia delle sirtuine è formata da sette proteine chiamate SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7. Le SIRT sono costituite da un dominio centrale catalitico di 275 amminoacidi, altamente conservato nelle cellule eucariotiche, capace di legare NAD⁺, e da una sequenza N-terminale e/o C-terminale di variabile lunghezza (Figura 7) che sono responsabili delle diverse proprietà biologiche e funzionali di ciascuna di esse (46).

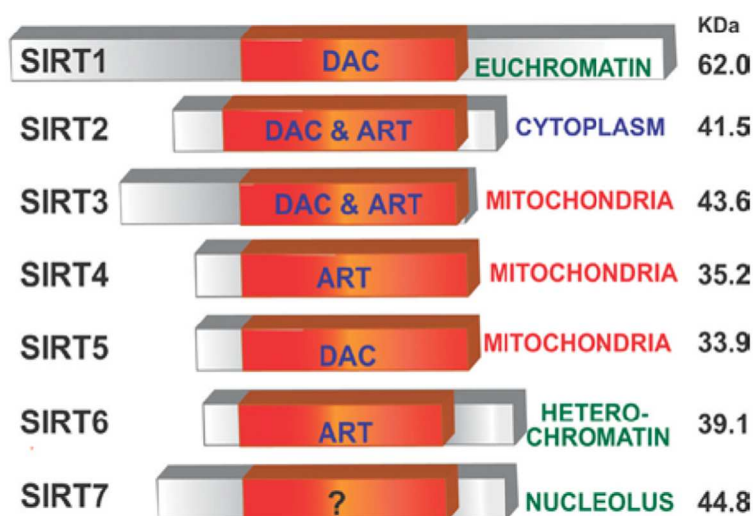


Figura 7: La famiglia delle sirtuine.

Le sirtuine 1-7 hanno un dominio catalitico NAD⁺-dipendente che può agire preferenzialmente come mono-ADP-ribosyl transferase (ART) e/o NAD⁺-dependent deacetylase (DAC). Le sequenze N-terminale e/o C-terminale hanno una lunghezza variabile. Le sette sirtuine mostrano differenti localizzazioni cellulari (46).

Le sirtuine sono enzimi ad attività deacetilasica che agiscono rimuovendo un gruppo acetile da residui di lisina di substrati proteici o di istoni in presenza del cofattore NAD⁺. I prodotti di questa reazione sono la nicotinammide (NAM), il substrato proteico o istonico deacetilato sui residui lisinici e la molecola 2'-O-acetil-ADP-ribosio (Figura 8).

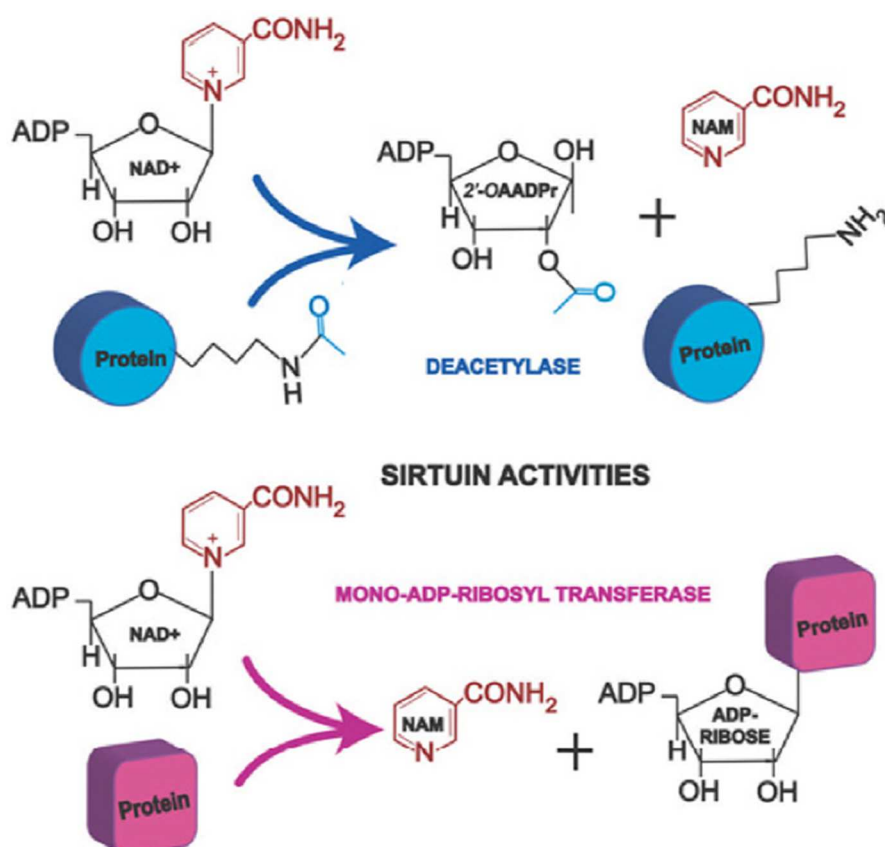


Figura 8:
L'attività enzimatica delle sirtuine (46).

Le diverse sirtuine differiscono nella localizzazione subcellulare e nella funzione. SIRT1, SIRT6 e SIRT7 sono principalmente proteine nucleari con una precisa compartimentalizzazione subnucleare. SIRT3, SIRT4 e SIRT5 sono localizzate nei mitocondri mentre SIRT2 è prevalentemente citoplasmatica (47). Inoltre ogni sirtuina ha una caratteristica attività enzimatica (Tabella 2). SIRT 1, 2, 3, 5 e 6 hanno attività deacetilasi NAD⁺-dipendente (48). Se SIRT7 è o non è una deacetilasi, è stato chiarito da prove recenti indicando un ruolo importante per SIRT7 nella deacetilazione degli istoni H3K18 (49). La deacetilazione è l'attività più importante di SIRT1 e SIRT2, mentre SIRT4 e SIRT6 hanno un'attività per lo più mono-ADP-ribosyl transferase. SIRT3 e SIRT6 possiedono entrambe le attività (48) (46).

Sirtuin	Activity	Location	Targets
SIRT1	Deacetylation	Nucleus Cytosol	FOXO1, FOXO3, PGC-1 α , p53, NF- κ B, Notch, HIF1 α , LXR, FXR, SREBP1c, etc
SIRT2	Deacetylation	Cytosol	FOXO1, PEPCK, tubulin, PAR-3
SIRT3	Deacetylation ADP- Ribosylation	Mitochondria	OXPHOS complexes, SOD2, LCAD, HMGCS2, GDH, IDH2, PIP2, ACADL, FOXO3, ACS2, OTC, GLUD1, NDUFA9, SDHA, ATP5A1, ALDH2, MRPL10, STK11, HISTH3, XRCC6
SIRT4	ADP-ribosylation	Mitochondria	GDH
SIRT5	Deacetylation Demalonylation Desuccinylation	Mitochondria	CPS1
SIRT6	ADP-ribosylation	Nucleus	H3K9, H3K56
SIRT7	deacetylation	Nucleolus	

Tabella 2: Attività e localizzazione di tutte le sirtuine (46).

SIRT1

SIRT1 è una proteina di 747 aminoacidi e presenta tre regioni (Figura 9): un core centrale che contiene il dominio con attività deacetilasi (aminoacidi 273-517), ai lati la regione C-terminale, che contiene una sequenza di 25 aminoacidi che potenzia l'attività catalitica del core, ed N-terminale che presenta elementi regolatori e domini di legame per coattivatori o corepressori di SIRT1 (50) (51).

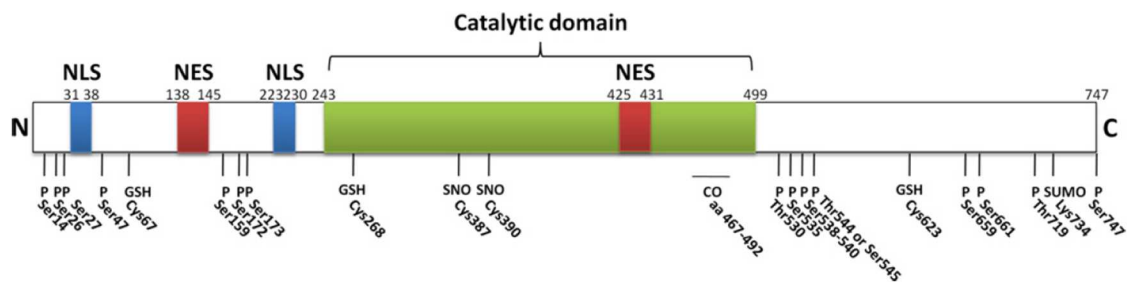


Figura 9: Rappresentazione schematica della struttura proteica e delle modifiche post-traduzionali di SIRT1 (51).

SIRT1 è localizzata prevalentemente nel nucleo ma, in risposta a particolari condizioni fisiologiche o a stimoli, può essere traslocata nel citoplasma attraverso il segnale di esportazione nucleare (NES). Il successivo trasporto dal citoplasma al nucleo avviene attraverso il segnale di localizzazione nucleare (NLS).

SIRT1 preferibilmente deacetila specifici residui aminoacidici in subunità istoniche quali la lisina 16 dell'istone 4 (H4K16), la lisina 9 dell'istone 3 (H3K9), la lisina 56 dell'istone 3 (H3K56) e la lisina 26 dell'istone 1 promuovendo così la formazione dell'eterocromatina e il silenziamento trascrizionale (51).

Le sirtuine hanno la capacità di deacetilare, oltre che gli istoni, anche fattori di trascrizione con conseguente interferenza sull'espressione genica. Nella maggior parte dei casi, questi fattori controllano geni legati alla crescita, al ciclo cellulare, all'apoptosi e al metabolismo energetico. SIRT1 è in grado di deacetilare fattori nucleari e citoplasmatici coinvolti in un complesso *pattern* proteico implicato nei meccanismi di riparazione cellulare, dunque il potenziale ruolo *anti-aging* di questo enzima sembra essere valido. Inoltre, una caratteristica dell'invecchiamento è l'accorciamento dei telomeri che proteggono le estremità dei cromosomi e si accorciano con ogni evento di replicazione cellulare, fenomeno alla quale si oppongono le telomerasi. È stato visto che SIRT1 interagisce con le sequenze ripetute telomeriche e promuove la ricombinazione in diverse regioni cromosomiche, tra cui i telomeri, i centromeri e le braccia cromosomiche. Questo effetto dipende dall'attività della telomerasi (52).

Le proteine non istoniche substrato di SIRT1 sono p53, *nuclear factor-kappaB* (NF-kappaB), *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α), i fattori di trascrizione *Forkhead box protein O* (FoxO), *liver X receptor* (LXR), PARP, Ku70 e *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 α (53) (54) (55) (56) (57)[77-81]. SIRT1 gioca un ruolo importante nella regolazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare deacetilando p53 e inibendo la sua attività di trascrizione durante lo stress cellulare. Questa deacetilasi agisce anche selettivamente sul residuo di Lys 310 della componente p65 del fattore di trascrizione Nf-kappaB, portando alla sua inattivazione. Questa proteina è un fattore dimerico di trascrizione che regola l'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria e infiammatoria, nella proliferazione e nel differenziamento cellulare.

1.4.2 FORKHEAD BOX TYPE O FAMILY

Le proteine Forkhead sono caratterizzate da un dominio conservato di 100 aminoacidi chiamato "forkhead box". Queste proteine funzionano come fattori di trascrizione, e

partecipano in diversi processi biologici. La Forkhead family nell'uomo è costituita da 39 distinti membri i quali sono divisi in 19 sottogruppi: Forkhead box (Fox) A-S (58).

Il sottogruppo FoxO risulta essere molto studiato nei mammiferi perché i suoi membri controllano varie funzioni biologiche: l'arresto del ciclo cellulare ai *checkpoints* G1/S e G2/M, la detossificazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la riparazione del DNA danneggiato, l'apoptosi, il metabolismo del glucosio e la regolazione delle dimensioni cellulari (59) (45). Poiché la capacità di detossificazione dai ROS e di riparare i danni al DNA è correlata con una maggiore longevità negli organismi di diverse specie (45) (60), queste funzioni particolari dei fattori di trascrizione FoxO potrebbero essere rilevanti per il loro coinvolgimento in processi di controllo della longevità.

Il prototipo della famiglia FoxO è stato descritto per la prima volta in *Caenorhabditis elegans* come *daf16*, un fattore che è necessario per i processi di sviluppo. Successivamente, i fattori FoxO hanno mostrato di svolgere un ruolo simile in organismi superiori. Nei mammiferi i fattori di trascrizione del sottogruppo O sono 4: FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX), and FoxO6. FoxO1, FoxO3 e FoxO4 sono ampiamente distribuiti e sono presenti nella maggior parte dei tessuti (61), mentre FoxO6 è in gran parte specifico per i neuroni. È stato visto che l'attività trascrizionale di questi tre fattori è abbastanza sovrapponibile, ma le conseguenze del non funzionamento di uno dei fattori FoxO nei topi sono diverse. Se il topo è FoxO1 *knock out* si ha la morte dell'embrione a causa di una insufficienza nell'angiogenesi; invece i topi FoxO3 *knock out* hanno una insufficienza ovarica prematura, e i FoxO4 *knock out* non hanno un fenotipo particolare (62). Alcune evidenze, inoltre, mostrano che ciascuno di questi fattori può compensare, in una certa misura, la perdita degli altri infatti il non funzionamento di tutti e tre i fattori porta a linfomi e angiosarcomi ma questo non si verifica se uno dei tre fattori continua ad essere espresso correttamente (62). Ogni fattore FoxO ha comunque delle attività specifiche: FoxO1 ha un ruolo principale nella regolazione della sensibilità all'insulina, mentre FoxO3 è un fattore importante per la longevità in invertebrati, topi e uomo (63) (64) ed è anche associato con la risposta allo stress ossidativo ed è considerato un oncosoppressore (62) (63).

L'attività trascrizionale dei membri del sottogruppo FoxO è regolata da una complessa serie di modifiche post-traduzionali. In molti casi, vengono regolati dal pathway di segnale di insulina/PI3K/Akt. Molti studi, infatti, confermano che Akt può fosforilare tre aminoacidi 2 serine e 1 treonina, conservati nei diversi fattori FoxO. (Figura 10).

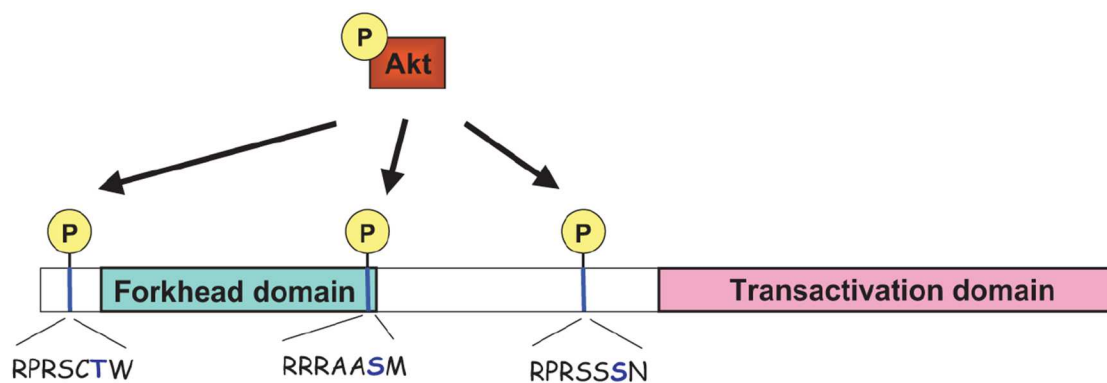


Figura 10: Rappresentazione schematica della struttura dei fattori FoxO e dei siti conservati di fosforilazione ad opera di Akt.

I fattori FoxO sono regolati dalla proteina chinasi Akt. La fosforilazione di questi residui serina/treonina è considerato inibitoria perché facilita l'esportazione nucleare e citoplasmatica e la ritenzione/degradazione dei fattori FoxO. Sono illustrati il dominio *forkhead/winged helix*, necessario per il legame al DNA, e il dominio di transattivazione, necessario per le interazioni con altre proteine DNA associate (65).

I fattori FoxO possono essere regolati anche attraverso la fosforilazione da *serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1* (SGK1) e *IkappaB kinase* (IKK). Dopo la loro fosforilazione i fattori FoxO nucleari sono contrassegnati per l'esportazione nel citoplasma. Diversi meccanismi mediano questi passaggi di regolazione: la fosforilazione su un residuo di serina (per FoxO1 in S256) situata al C-terminale del dominio forkhead si verifica all'interno del segnale di localizzazione nucleare (NLS) e questo interferisce con la capacità di NLS di interagire con un membro della famiglia delle importine e quindi viene ridotta la possibilità che FoxO rientri nel nucleo. Inoltre, i membri della famiglia di proteine 14-3-3, che si legano ai motivi di fosfo-serina e fosfo-treonina, è stato visto essere implicati nello *shuttling* nucleo-citoplasma di FoxO. Un altro livello di regolazione può essere la fosforilazione di un motivo conservato all'N-terminale del dominio forkhead (ad esempio, T24 in FoxO1), che porta al legame delle proteine 14-3-3, presenti nel nucleo (45) (65).

Ci sono altri livelli di regolazione comuni ai membri del sottogruppo FoxO. È stato visto che l'attività trascrizionale di questi fattori è regolata da eventi di acetilazione/deacetilazione. È stato riportato che l'acetilazione da parte di p300 riduce l'affinità di legame al DNA dei fattori FoxO solo marginalmente (45), mentre destabilizza significativamente il loro legame ai nucleosomi ai quali è avvolto il DNA. Un legame stabile al nucleosoma è essenziale per un efficiente rimodellamento della cromatina FoxO-mediato, poiché questi funzionano come fattori di trascrizione pionieri in grado di legare la cromatina ipoacetilata e compattata (45). E ancora, recenti evidenze suggeriscono che i fattori FoxO possono essere anche regolati da microRNA: mir155, mir96 e mir21 si pensa possano regolare direttamente FoxO3A, mentre mir205 regola FoxO3A tramite il suo target a monte, PTEN (66).

FoxO3

La struttura primaria di **FoxO3** contiene residui altamente conservati dell'elica H3 (motivo NXXRHXXS/T), il principale elemento di riconoscimento del DNA, che lega il DNA nel solco maggiore, il quale contiene la maggior parte dei contatti base-specifici diretti. Recenti studi inoltre hanno rivelato che la proteina FoxO3 riconoscono due sequenze consenso: 5'-GTAAA(T/C)AA-3', conosciuta come l'elemento che lega i membri della famiglia Daf-16 e 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3', noto come la sequenza *insulin-responsive* (IRE). La struttura cristallina rivela che l'elica H3 è ancorata in modo perpendicolare al solco maggiore prendendo ampi contatti con il DNA. FoxO3 contiene diversi domini cruciali (Figura 11) come un segnale di localizzazione nucleare (NLS), un segnale di esportazione nucleare (NES) e un dominio di transattivazione (TA) (67).

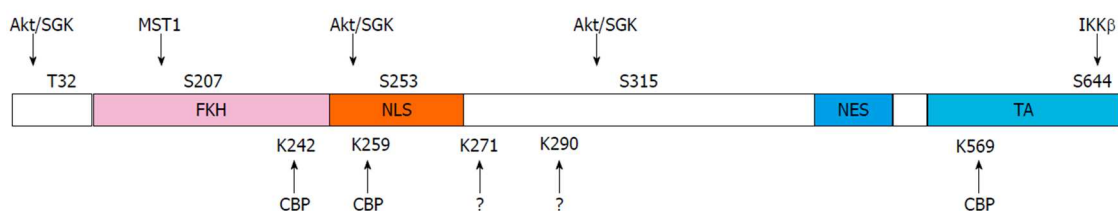


Figura 11: Rappresentazione schematica della struttura proteica e delle modifiche post-traduzionali di FoxO3.

Sono mostrati i siti di fosforilazione di serina/treonina ad opera di Akt/SGK, MST1, IKK β e i residui di acetilazione ad opera di CBP o di non definite acetil trasferasi. FKH: Forkhead DNA binding domain; NLS: Nuclear localization signal; NES: Nuclear export sequence; TA: Transactivation domain (67).

Come gli altri membri della famiglia FoxO, l'attività di FoxO3 è modulata da modificazioni post-traduzionali, quali fosforilazione e acetilazione. La traslocazione nel nucleo e la degradazione di questo fattore ad opera del proteosoma sono regolate dalla sua fosforilazione tramite vie di segnalazione cellulare divergenti (67). Inoltre FoxO3 può essere acetilato su 5 residui aminoacidi (K242, K259, K271, K290 e K569) in presenza di diversi stimoli. L'acetilazione ad opera di *CREB-binding protein* (CBP) può modificare la sua attività di legame al DNA e quindi la sua attività di fattore di trascrizione, che può essere reinstaurata dalla deacetilazione SIRT1 mediata (67) (68). FoxO3 regola positivamente l'espressione di enzimi *ROS scavenger* quali superossido dismutasi 2 (SOD2, noto anche come MnSOD) e catalasi (67). FoxO3 risponde allo stress cellulare (compreso lo stress ossidativo) inducendo l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione di danni al DNA e l'apoptosi mediante l'aumento dell'espressione dei geni che controllano questi processi (67). Queste funzioni sono simili a quelle della proteina soppressore del tumore p53, con cui FoxO3 condivide alcuni target anti-stress a valle (69). Inoltre FoxO3 è coinvolto nella regolazione di alcuni aspetti del processo infiammatorio: controlla la risposta delle cellule T e regola l'attivazione dei neutrofili (70), regola RelA/p65, una subunità di NF-kappaB (71). FoxO3 regola anche l'adattamento all'ipossia causata dalla riduzione della massa mitocondriale e dal consumo di ossigeno durante l'attivazione di HIF-1 α . È stato visto che FoxO3 ha un ruolo anche nella regolazione dell'apoptosi indotta da stress ossidativo. Bim, Bcl XI, Bcl 2, Survivina sono target di questo fattore di trascrizione (72). È stato visto che FoxO3 regola negativamente l'espressione del gene della survivina (73).

1.4.3 SIRT1 E FOXO3: RESISTENZA ALLO STRESS E SOPRAVVIVENZA CELLULARE

La presenza non controllata dei ROS è associata a diverse malattie e all'invecchiamento. La Sirtuina-1 (SIRT1) favorisce la resistenza agli stress ambientali, diminuisce i livelli di ROS, promuove la sopravvivenza delle cellule in condizioni di stress ossidativo e sopprime l'apoptosi attraverso la regolazione di FoxO3, p53, p21 e di altre molecole coinvolte nel danno al DNA e nella sua riparazione (68) (51) (74). È interessante notare che FoxO3 e altri membri della famiglia FoxO aumentano l'espressione genica dell'enzima superossido dismutasi (SOD) e proteggono le cellule dallo stress ossidativo

in maniera Sirt1-dipendente (68). FoxO3, come abbiamo già detto, è acetilato su almeno 5 residui di lisina e proprio il suo stato di acetilazione regola il suo legame al DNA e quindi la sua attività di fattore di trascrizione. Recenti studi hanno dimostrato che SIRT1 e FoxO3 formano un complesso all'interno delle cellule in risposta allo stress ossidativo e la deacetilazione di FoxO3 ad opera di SIRT1 aumenta la sua capacità di indurre l'arresto del ciclo cellulare e la resistenza allo stress ossidativo ma va ad inibire la sua funzione di indurre la morte cellulare (68).

Ciò è confermato da un recente studio il quale dimostra che il potenziamento dell'attività di SIRT1 protegge il polmone dalla senescenza cellulare indotta dal fumo di sigaretta/stress ossidativo regolando FoxO3 e p21, un gene pro-senescenza (75). Il fumo di sigaretta e lo stress ossidativo inducono una riduzione significativa della proteina SIRT1 e FoxO3. FoxO3, a causa del fumo di sigaretta, risulta essere più acetilato e questo proprio per la ridotta attività di SIRT1 (Figura 12).

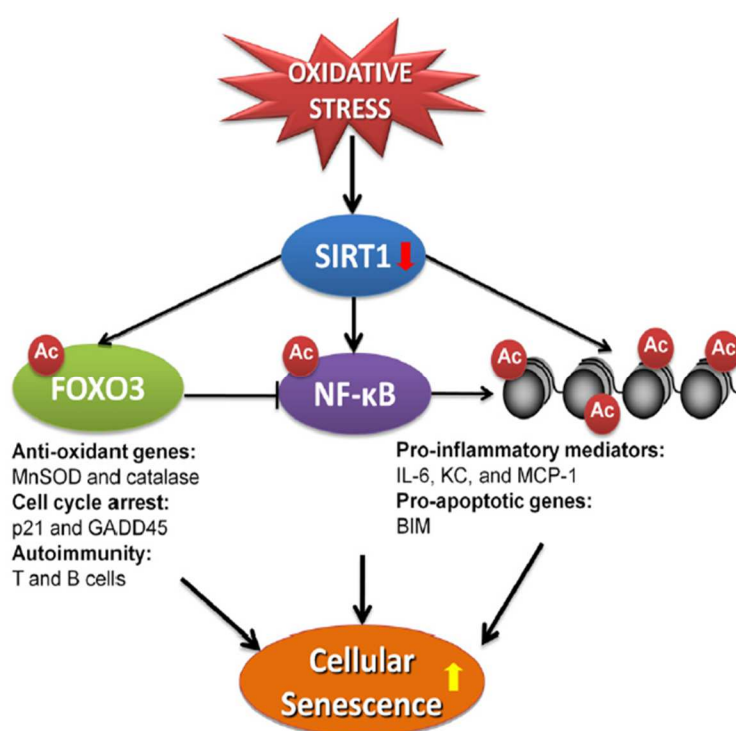


Figura 12: *SIRT1* nella regolazione dell'infiammazione e della senescenza cellulare sotto stress ossidativo.

Le molecole ossidanti derivate dal fumo di sigaretta inibiscono l'attività di SIRT1 e riducono i suoi livelli di espressione a causa di modifiche post-traduzionali. La riduzione di SIRT1 porta a una maggiore acetilazione di RelA/p65 e FoxO3, così come a modifiche degli istoni H3 e H4. L'acetilazione di queste molecole porta alla anormale trascrizione di geni pro-infiammatori, antiossidanti, pro-senescenza e pro-apoptosi coinvolti nello stress ossidativo e nella prematura senescenza cellulare (51).

1.5 OBIETTIVI DI QUESTO LAVORO

Il fumo di sigaretta è il principale fattore di rischio per la BPCO e le sostanze tossiche e i radicali liberi che compongono la sua miscela, una volta raggiunto l'ambiente respiratorio attivano una serie di meccanismi patogenetici.

L'obiettivo di questo lavoro è stato verificare il ruolo del fumo di sigaretta e dello stress ossidativo da esso indotto nei meccanismi di accelerato invecchiamento polmonare caratteristico della BPCO. Per questo motivo è stata valutata la proliferazione cellulare delle cellule epiteliali bronchiali stimulate con diverse dosi di estratto di fumo di sigaretta (*Cigarette Smoke Extract* - CSE). Inoltre per evidenziare le cellule senescenti eventualmente trasformate dal CSE è stato studiato un marker di senescenza, la β -galattosidase.

A questo punto sono stati verificati alcuni markers coinvolti direttamente nei meccanismi di regolazione della sopravvivenza cellulare, quindi è stato visto se il CSE agisce sull'espressione di p21, una proteina Cdk inibitoria (CdkI) coinvolta nel blocco del ciclo cellulare, e di survivina, una proteina inibitrice dell'apoptosi (IAP). In questo modo è stato valutato se effettivamente il fumo di sigaretta ha un ruolo nell'accelerato invecchiamento delle cellule epiteliali controllando in modo diretto sia molecole che inducono il blocco cellulare ma nello stesso tempo impedendo i meccanismi di apoptosi regolando molecole con azione anti-apoptotica.

Una volta studiato il ruolo del CSE nella regolazione della sopravvivenza cellulare si è passati allo studio dei meccanismi anti-invecchiamento delle cellule epiteliali bronchiali e del coinvolgimento del CSE in questi. Quindi è stato studiato il pathway Sirt1/FoxO3. È stata valutata l'espressione di questi due fattori nel nucleo di cellule epiteliali bronchiali trattate e non con CSE ed è stata valutata anche l'attività deacetilase di SIRT1.

Nel passo successivo si è cercato di mettere in relazione l'interferenza del CSE nella regolazione della sopravvivenza cellulare e nei meccanismi di anti-invecchiamento nelle cellule epiteliali bronchiali. FoxO3 è un fattore di trascrizione che regola l'espressione di diversi geni coinvolti nei meccanismi studiati in questo lavoro. Tra questi è stato scelto il gene della survivina la cui espressione è regolata negativamente dal legame di FoxO3

al promotore di questo. Per questo motivo si è studiato proprio come varia il legame di FoxO3 al promotore della survivina in cellule stimulate con CSE.

Gli effetti del fumo di sigaretta sulle cellule epiteliali bronchiali sappiamo essere mediati anche dallo stress ossidativo da esso indotto. Per verificare il coinvolgimento del CSE in questi meccanismi attraverso proprio l'eccessiva produzione di radicali, è stato utilizzato come stimolo una molecola con attività anti-ossidante, la carbocisteina sale di lisina (SCMC-Lys), valutando se questa andava a contrastare gli effetti del CSE.

2. MATERIALI E METODI

2.1 COLTURE DI CELLULE EPITELIALI BRONCHIALI

Per lo studio sono state utilizzate cellule 16HBE (*Human Bronchial Epithelial cell line*), linea cellulare di epitelio bronchiale umano (Figura 13) ottenuta per trasfezione con il virus a DNA, SV40. Nella cellula trasfettata, questo virus esprime un antigene, chiamato T, il quale si lega alla proteina p53 cellulare, inibendola e quindi causando la deregolazione del ciclo cellulare. In tal modo le cellule risultano essere immortalizzate, cioè acquisiscono la capacità di moltiplicarsi indefinitamente.



Figura 13: *Visione all'invertoscopio delle 16HBE.*

Il terreno di coltura utilizzato per questo tipo di cellule è il *Minimum Essential Medium* (MEM) (Gibco, BRL, Germany) più *additivi* (*HEPES*, *MEM aminoacidi non essenziali*, *glutammina*), 0.5% di *gentamicina* e 10% di *siero di vitello fetale* (FBS) scomplementato in bagno termostato a 56°C per 30 minuti. Una volta preparato, il terreno deve essere filtrato prima di poter essere utilizzato.

Le colture cellulari sono mantenute in un'atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ e a una temperatura costante di 37°C. In queste condizioni le cellule sono fatte crescere per 3 giorni e, una volta raggiunto l'80-90%, il MEM con additivi e il 10% di FBS è stato sostituito con un terreno contenente soltanto l'1% di FBS. Le cellule sono state trattate

con estratto di fumo di sigaretta (CSE) a diverse concentrazioni (10-20%) e con o senza Carbocisteina (CARBO) per 24 ore. Il tempo di stimolazione è stato scelto sulla base di esperimenti preliminari condotti precedentemente.

Allo scadere del tempo previsto per la stimolazione sono stati raccolti, i pellet cellulari e i lisati cellulari per effettuare le successive valutazioni.

2.2 PREPARAZIONE DEGLI STIMOLI

2.2.1 ESTRATTO DI FUMO DI SIGARETTA (CSE)

Gli esperimenti in vitro hanno previsto la stimolazione con fumo di sigaretta. Il fumo derivato dalla combustione della sigaretta si trova allo stato gassoso, difficile da utilizzare per la stimolazione, per cui è necessario solubilizzarlo in un solvente liquido. Per far questo occorre una *pompa ad acqua* montata ad un rubinetto in modo da creare il vuoto, una *beuta da vuoto* ad essa collegata (Figura 14) e un *solvente*, in questo caso è stato utilizzato PBS 1X sterile.



Figura 14: Beuta da vuoto durante l'aspirazione del fumo di sigaretta.

La beuta deve essere pulita e lasciata sotto gli UV per almeno un'ora in modo da garantire la *sterilità*, poiché la soluzione preparata dovrà essere aggiunta a colture cellulari che rischierebbero la contaminazione. In essa si versano 10ml di PBS 1X sterile per sigaretta. All'interno della beuta, grazie alla pompa ad acqua alla quale è collegata, si creerà il vuoto che permetterà di aspirare al suo interno il fumo generato dalla combustione della

sigaretta. La sigaretta deve esaurirsi in 3-4 minuti. Quando il fumo di sigaretta si è solubilizzato, si procede con la *filtrazione* del CSE tramite filtri da 0.22 µm in modo da eliminare eventuali particelle solide derivate dalla combustione della sigaretta e i microrganismi eventualmente presenti.

L'estratto di fumo di sigaretta deve essere preparato poco prima dell'uso perché è stato dimostrato, tramite prove sperimentali, che già dopo un paio di ore la potenzialità di stimolazione della soluzione decade.

Questa soluzione di fumo di sigaretta è considerata concentrata al 100%, quindi verrà diluita in modo da ottenere la concentrazione richiesta (10-20%) direttamente nel terreno con cui le cellule cresceranno durante il tempo di stimolazione. Il CSE prodotto viene normalizzato valutando la *densità ottica* allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 320nm. Questa analisi è stata fatta su tutti gli estratti di fumo di sigaretta prodotti. Dal confronto dei dati ottenuti è stato visto che le differenze di assorbanza tra le diverse soluzioni analizzate erano veramente piccole e la media delle densità ottiche osservate era di 1.37 ± 0.16 . Quindi possiamo considerare le variazioni di concentrazione trascurabili.

Il fumo di sigaretta potrebbe essere contaminato dall'endotossina batterica e questo inficerebbe i risultati ottenuti dalla stimolazione. Per questo motivo, tramite dei comuni kit commerciali (Cambrex Corporation, East Rutherford, New Jersey, USA) è stata valutata la presenza di LPS contaminante il CSE non diluito ed è stato visto che era sotto il limite di 0.1 EU/ml per cui non è stata ritenuta rilevante.

2.2.2 CARBOCISTEINA

Diversi recenti studi hanno preso in considerazione le proprietà antiossidanti della carbocisteina sale di lisina (SCMC-Lys). Quest'ultimo è un farmaco mucoattivo la cui efficacia terapeutica è comunemente attribuita alla capacità di normalizzare le caratteristiche reologiche del muco incrementando le sialomucine rispetto alle fucomucine. Tuttavia è stato visto che questo farmaco ha anche effetti antiossidanti come scavenger di radicali liberi. In questa molecola l'atomo di zolfo non è di natura tiolica, ma è impegnato in un legame tioetereo che non lo rende disponibile per l'equilibrio tiolo-

disolfuro. D'altra parte anche i tioeteri presentano notevole reattività nei confronti degli ossidanti, generando solfoossidi e solfuri.

Il farmaco utilizzato ha una formulazione in polvere ed è stato sciolto in acqua distillata sterile a una concentrazione di 10^{-2} M. La concentrazione utilizzata per la stimolazione delle cellule epiteliali bronchiali è di 10^{-4} M (concentrazione corrispondente al range terapeutico comunemente utilizzato), diluendo la soluzione madre direttamente nel terreno di stimolazione.

2.3 VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

2.3.1 SAGGIO CFSE

La proliferazione a breve termine delle 16HBE è stata valutata mediante il **saggio di proliferazione con CFSE**. Il CFSE (*Carboxyfluorescein Succinimidyl ester*) è una molecola fluorescente lipofilica, in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana cellulare. All'interno della cellula i gruppi acetati vengono rimossi da esterasi, convertendo la CFSE in una molecola non più in grado di attraversare la membrana. Durante la divisione cellulare, quindi, ogni cellula figlia eredita una quantità di CFSE che corrisponde esattamente alla metà di quella presente nella cellula madre, quindi la sua fluorescenza sarà la metà rispetto a quella della cellula da cui deriva. Ad ogni successiva divisione il livello di fluorescenza dimezzerà, permettendo così di monitorare, tramite citofluorimetria, il numero di divisioni cellulari.

Per effettuare il saggio, le 16HBE sono state staccate, contate e portate a una concentrazione di 10^7 cellule/ml in PBS 1X sterile e freddo. A questa sospensione cellulare è stato aggiunto CFSE (Invitrogen, Molecular Probes) ad una concentrazione finale di 10μ M ed è stato incubato per 10 minuti a 37°C . Allo scadere dei 10 minuti è stato aggiunto un volume di FBS uguale al volume di PBS 1X nella quale erano risospese le cellule, in questo modo viene bloccata la marcatura. Quindi le cellule sono state centrifugate a 1100 rpm per 5 minuti e scartato il surnatante. Le 16HBE sono state

risospese in terreno completo con 10% FBS e portate a una concentrazione di 800.000 cellule/ml. A questo punto è stato dispensato 1ml di sospensione cellulare per ogni pozzetto di una piastra a 6 pozzetti e poste in incubatore per almeno 5 ore, in modo da far aderire le cellule al pozzetto. Dopodiché si può procedere con la stimolazione per 24 ore.

Allo scadere delle 24 ore il terreno con gli stimoli è stato sostituito con terreno completo al 10% di FBS e la piastra è stata nuovamente posta in incubatore per 72 ore. A questo punto le cellule sono state raccolte in tubi FACS e acquisite con citofluorimetro *Facs Calibur*.

2.3.2 SAGGIO CLONOGENICO

Per osservare la crescita a lungo termine delle cellule epiteliali bronchiali 16HBE è stato eseguito il saggio clonogenico. Questo test permette di seguire per 21 giorni la crescita delle cellule precedentemente trattate con gli stimoli.

Per la valutazione della proliferazione occorrono colture separate in cui analizzare le diverse condizioni di stimolazione. Quindi le cellule sono state seminate in piastre a 6 pozzetti, 200.000 cellule in 2 ml di terreno MEM completo con FBS al 10% per ogni pozzetto. Le piastre sono state poste in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata con il 5% CO₂ e dopo tre giorni, quando la coltura cellulare ha raggiunto il giusto grado di confluenza, si è proceduto con la stimolazione di 24 ore come precedentemente descritto.

È stata preparata una soluzione madre di Agar al 3% sciogliendo in autoclave (Temperatura: 170°C e Pressione 1 atm) 6 g di Bacto-Agar DIFCO in 200 ml di acqua distillata. Il saggio clonogenico è stato eseguito in piastre da coltura a 6 pozzetti (diametro 35 mm) e ogni pozzetto è stato coattato con 2 ml di terreno di coltura con il 10% di FBS e lo 0.5% di Agar, quindi è stata effettuata una diluizione 1:6 della soluzione madre di Agar al 3% con MEM completo contenente FBS al 10%. Le piastre così preparate sono state opportunamente sigillate, al fine di mantenere la sterilità, e poste a 4°C per 24 ore per favorire la solidificazione dell'Agar.

Una volta scadute le 24 ore necessarie per la stimolazione, è stata effettuata la semina delle 16HBE sui pozzetti coattati con l'Agar. Per prima cosa è stata effettuata la tripsinizzazione delle colture cellulari presenti nei diversi pozzetti. Le sospensioni cellulari ottenute da ogni pozzetto sono state raccolte in tubi da centrifuga da 15 ml e centrifugati a 1100 rpm per 5 min. Quindi è stato eliminato il surnatante e le cellule sono state risospese in 1 ml di PBS 1X. Per effettuare il saggio clonogenico sono necessarie 50.000 cellule per condizione di stimolazione in 2 ml di terreno di coltura al 10% FBS allo 0,3% Agar. Pertanto è stata effettuata la conta cellulare di ogni condizione. Poiché è necessario ottenere una soluzione di Agar allo 0,3% partendo da una soluzione madre di Agar al 3%, è stata effettuata una diluizione 1:10 della soluzione madre di Agar al 3%. Prima della solidificazione dell'Agar, si dispensano per condizione 2 ml della sospensione cellulare allo 0,3% di Agar con 50.000 cellule nel rispettivo pozzetto precedentemente coattato. Avvenuta la solidificazione dell'Agar, le piastre sono state incubate a 37°C, in atmosfera umidificata con il 5% CO₂ per 21 giorni e ogni 7 giorni è stato aggiunto terreno di coltura. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

Alla fine del periodo, è stata effettuata, da due investigatori indipendenti in cieco, la conta delle colonie cellulari formatesi. Per la conta sono state scelte le colonie cellulari composte da almeno 40 cellule. Lo strumento d'indagine per la conta delle colonie è l'invertoscopia (phase-contrast microscope Leitz, Wetzlar, Germany).

2.4 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI P21 E SURVIVINA

L'espressione di p21 e Survivina nelle 16HBE è stata valutata tramite citofluorimetria utilizzando lo strumento FACS Calibur. I dati sono espressi come percentuale di cellule positive.

La *citometria a flusso* o *citofluorimetria* è un sistema analitico che consente l'analisi automatica di sospensioni cellulari monodisperse, misurandone le caratteristiche fisiche e/o biochimiche all'interno di un flusso laminare che interseca una sorgente di eccitazione. Per valutare l'espressione di questi due marker proteici abbiamo utilizzato,

per ognuno di questi, due anticorpi: un *anticorpo primario* che si lega in modo specifico alla proteina d'interesse e un *anticorpo secondario*, coniugato con un fluorocromo, che va a riconoscere l'anticorpo primario. In questo modo l'intensità della fluorescenza, rilevata tramite il citofluorimetro, è proporzionale alla quantità di proteina presente nella cellula, per cui possiamo valutare se vi è una differenza di espressione nelle cellule cresciute con stimoli diversi.

Le 16HBE sono state seminate in piastre a 12 pozzetti ad una concentrazione di 100.000 cellule/ml e lasciate crescere per tre giorni fino al raggiungimento dell'80-90% di confluenza. Dopodiché le cellule sono state stimolate come precedentemente descritto per 24 ore. Allo scadere delle 24 ore sono state raccolte in tubi FACS e quindi iniziata la marcatura secondo il seguente protocollo:

- le cellule sono state fissate con Paraformaldeide al 4% e tenute al buio e a temperatura ambiente per 20 minuti;
- sono stati effettuati lavaggi con Permeabilization Buffer (PBS1X, FBS 10%, sodio azide 0.1%, saponina 0.1%; pH 7.4-7.6) e questo permette la permeabilizzazione delle cellule e quindi il legame dell'anticorpo primario alle proteine di nostro interesse che sono localizzate all'interno della cellula;
- è stato aggiunto 1µl di anticorpo opportunamente diluito: 1:40 l'anticorpo monoclonale creato in topo anti-p21 (Santa Cruz) e 1:10 l'anticorpo policlonale creato in coniglio anti-survivina (Novus Biologicals); ed è lasciato ad incubare per 30 min a 4°C;
- è stato effettuato un lavaggio con Staining buffer (PBS1X, sodio azide 0.1%, FBS 10%);
- è stato aggiunto l'anticorpo secondario: per p21, 1µl di anticorpo anti-mouse IgG coniugato con FITC (Dako) e per survivina, 1µl di anticorpo anti-rabbit IgG coniugato con FITC (Dako); ed è lasciato a incubare per 30 min a 4°C.
- è stato effettuato un lavaggio con Staining buffer e le cellule sono state risospese in PBS1X pronte per essere acquisite al citofluorimetro.

2.5 VALUTAZIONE DELLA SENESCENZA CELLULARE: SAGGIO β -GALATTOSIDASE

La limitata capacità di replicare è una definizione caratteristica della maggior parte delle cellule normali e culmina nella senescenza, uno stato arrestato in cui la cellula rimane vitale. Le cellule senescenti non sono stimolate a dividersi e hanno uno specifico profilo del ciclo cellulare che si differenzia da processi di arresto danno-indotto o dall'inibizione da contatto. Altre caratteristiche di queste cellule sono: una dimensione maggiore, espressione di attività β -galattosidasi pH-dipendente, ed un alterato pattern di espressione genica.

Il saggio della β -galattosidasi è un saggio colorimetrico ampiamente utilizzato per individuare le cellule senescenti all'interno di una popolazione cellulare. Si basa sull'espressione dell'enzima β -galattosidasi, un enzima idrolitico che catalizza l'idrolisi dei residui terminali di β -D-galattosio nei polisaccaridi tramite la rottura dei legami beta-glicosidici. Tale enzima risulta sovraespresso a pH 6.0 nelle cellule in fase di senescenza ed è definito come SA- β gal (*senescence-associated β -galattosidasi*). L'attività di questo enzima è diversa dall'attività della β -galattosidasi acida che è rilevabile solo a pH 4.0. Il rilevamento della SA- β gal è molto semplice e si basa sull'utilizzo del substrato cromogenico 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopiranoside anche detto X-gal. L'X-gal viene scisso dalla β -galattosidasi producendo galattosio e 5-bromo-4-cloro-3-idrossindolo. Quest'ultimo è quindi ossidato in 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indaco, un composto blu insolubile facilmente osservabile al microscopio ottico.

Il saggio è stato condotto utilizzando il kit Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling). Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti a una concentrazione di 20.000 cellule/ml. Trascorsi 3 giorni le cellule non devono essere a confluenza poiché l'inibizione da contatto impedisce l'attivazione della β -galattosidase. Quindi viene rimosso il terreno di coltura e viene effettuato un lavaggio con PBS 1X. A ogni pozzetto viene aggiunto 1ml di *Fixative Solution 1X* (10X: 20% formaldeide, 2% glutaraldeide in PBS 10X) per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente vengono effettuati due lavaggi con PBS 1X. A questo punto può essere aggiunta la soluzione per la

visualizzazione dell'attività β -galattosidasi contenente il substrato per l'enzima X-gal, la *β -galactosidase Staining Solution*. Ogni ml di soluzione contiene:

- 930 μ l di *Staining solution 1X* (10X = 400 mM citric acid/sodium phosphate (pH 6.0), 1.5 M NaCl, 20 mM MgCl₂);
- 10 μ l di *Staining Supplement A* (100X = 500 mM potassium ferrocyanide);
- 10 μ l di *Staining Supplement B* (100X = 500 mM potassium ferricyanide);
- 50 μ l 20 mg/ml X-gal in DMF.

Le cellule sono state poi incubate a 37°C per tutta la notte, lavate con PBS 1X e analizzate al microscopio. Lo sviluppo di una colorazione bluastro, dovuta al prodotto di reazione ottenuto dall'idrolisi di X-gal ad opera dell'enzima β -galattosidasi, è un indice di senescenza.

2.6 ANALISI WESTERN BLOT PER VALUTARE L'ESPRESSIONE DI SIRT1 E FOXO3

L'espressione della deacetilasi istonica SIRT1 e del fattore di trascrizione FoxO3 è stata valutata tramite la tecnica del Western Blot utilizzando gli estratti proteici, differenziati per nucleo e citoplasma, delle cellule epiteliali bronchiali diversamente stimulate.

Le 16 HBE, dopo essere state stimulate per 24 ore con CSE a diverse concentrazioni e Carbocisteina, sono state staccate dal substrato di crescita con tripsina e raccolte in provette a fondo conico. Sul pellet cellulare è stata effettuata la separazione differenziale delle proteine nucleari e citoplasmatiche utilizzando il *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific; Waltham, MA-USA) seguendo il protocollo della casa produttrice. Questo kit utilizza tre soluzioni: CER I (*Cytoplasmic Extraction Reagent I*), CER II (*Cytoplasmic Extraction Reagent II*), NER (*Nuclear Extraction Reagent*). Al fine di impedire la degradazione enzimatica delle proteine alla soluzione CER I e NER sono stati aggiunti il cocktail degli inibitori di proteasi e fosfatasi (Roche). I pellet asciutti sono stati risospesi in 100 μ l di CER I, sono stati vortexati alla massima velocità per 15 secondi e posti in ghiaccio per 10 minuti. Sono stati aggiunti 5,5 μ l di CER II in ogni provetta e i pellet sono stati vortexati per 5 secondi e posti in ghiaccio

per 1 minuto. Successivamente sono stati vortexati per 5 secondi e centrifugati a 16.000 g per 5 minuti a 4°C. I surnatanti, contenenti l'estratto di proteine citoplasmatiche sono stati trasferiti in provette pulite, posti in ghiaccio e poi conservati a - 80°C. Ai pellet, ormai contenenti soltanto i nuclei, sono stati aggiunti 50 µl di NER, sono stati vortexati alla massima velocità per 15 secondi e messi in ghiaccio per 10 minuti. Questo trattamento è stato ripetuto per 4 volte. I campioni in fine sono stati centrifugati a 16.000 g per 10 minuti a 4°C e i surnatanti, contenenti l'estratto proteico nucleari, sono stati trasferiti in provette pulite, poste in ghiaccio e poi conservati a -80°C.

I diversi campioni proteici ottenuti sono stati dosati tramite metodo Bradford e la loro concentrazione è stata ottenuta dalla misurazione dell'assorbanza a 595nm con *Wallac Victor multilabel counter* (Wallac, Turku, Finland).

Gli estratti proteici nucleari, successivamente, sono stati sottoposti a una elettroforesi su un gel di sodio dodecilsolfato-poliacrilamide (SDS-PAGE). I campioni proteici, con una concentrazione di 30 µg, sono stati caricati su gel (Novex, San Diego, CA) con un gradiente di concentrazione dal 4 al 12% e fatti migrare su un campo elettroforetico di 150V costanti. Al termine dell'elettroforesi è stato effettuato un elettro-blotting a 80V ad amperaggio costante e in questo modo le proteine sono state fissate su una membrana di nitrocellulosa.

Le membrane così ottenute sono state poste in una soluzione di blocking per 1 ora [milk al 5% in PBS-T (PBS 1X + Tween 20 0.1%)], in modo da saturare tutti i siti aspecifici. Dopodiché le membrane sono state incubate con l'anticorpo policlonale anti-FoxO3 (Santa Cruz) (1:750, overnight) e, il giorno successivo dopo opportuni lavaggi le membrane sono state incubate per 1 ora con l'anticorpo anti-goat (Santa Cruz) (1:2000). Dopo stripping (soluzione di stripping: Tris-HCl 0.5mM, NaCl 1.5M, 0.01% β-mercaptoetanolo; posta in bagnetto termostato a 65°C per 30 min), le membrane sono state incubate con un anticorpo policlonale anti-SIRT1 (Santa Cruz) (1:500; overnight) e in questo caso l'anticorpo secondario usato è anti-rabbit (1:10000; 1 ora) (Sigma).

Per visualizzare la banda alla quale si sono legati gli anticorpi è stato utilizzato un sistema di rivelazione per chemiluminescenza (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) e quindi è stata effettuata una auto-radiografia.

Per normalizzare le differenze del loading proteico è stata utilizzata la proteina Lamin B1 (Santa Cruz; 1:500, overnight; anti-Rabbit 1 ora) la quale può essere considerata un *house-keeping* per le proteine nucleari in quanto è una proteina componente nella membrana nucleare.

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi densitometrica e sono espressi come unità densitometriche arbitrarie in rapporto alla densità della banda ottenuta con Lamin B1.

2.7 ANALISI ATTIVITÀ DEACETILASICA DI SIRT1

L'attività deacetilasica di SIRT1 è stata valutata utilizzando il kit *HDAC Fluorimetric Assay/Drug Discovery Kit* (Enzo Lifesciences, Farmingdale, NY, USA) seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice. Questo Kit è un sistema di dosaggio completo progettato per misurare l'attività degli enzimi istone deacetilasi (HDAC) da estratti proteici, immunoprecipitati o enzimi purificati, utilizzando la combinazione del substrato, Fluor de Lys®, e della soluzione di sviluppo, Developer Fluor de Lys®.

Gli estratti proteici nucleari (preparati e dosati come precedentemente descritto) sono stati immunoprecipitati incubando 100µg di proteine con 10µg di anticorpo policlonale anti-SIRT1 (Santa Cruz) overnight a 4°C in agitazione e poi incubato per 1 ora in agitazione con la protein G-agarose beads (Santa Cruz).

Quindi gli immunoprecipitati così ottenuti sono stati posti in una piastra a 96 pozzetti e, a questi è stato aggiunto il substrato Fluor de Lys®, una molecola che presenta una catena laterale contenente una lisina acetilata. È lasciato a incubare per 15 minuti, tempo nel quale gli enzimi attivi del campione rimuovono il gruppo acetile dalla molecola. A questo punto è stato aggiunto il Developer Fluor de Lys® che stoppa la reazione enzimatica poiché contiene Sirtinolo (un inibitore dell'attività deacetilasica di SIRT1) e produce un fluoroforo. La fluorescenza è stata misurata grazie a un lettore per micropiastre utilizzando una fluorescenza di eccitazione di 355nm e una fluorescenza di emissione di 460 nm.

La quantità di substrato deacetilato dall'enzima contenuto negli immunoprecipitati, alla quale si risale utilizzando una curva standard di substrato deacetilato a concentrazioni note, è direttamente proporzionale all'attività dell'enzima stesso.

2.8 IMMUNOCITOCHIMICA

Nel lavoro abbiamo anche utilizzato la tecnica dell'immunocitochimica allo scopo di evidenziare la localizzazione del fattore di trascrizione FoxO3 nelle 16HBE e l'effetto del fumo di sigaretta sull'espressione dello stesso.

Le 16HBE sono state seminate in piastre a 12 pozzetti ad una concentrazione di 100.000 cellule/ml e lasciate crescere per tre giorni fino al raggiungimento dell'80-90% di confluenza. Dopodiché le cellule sono state stimolate come precedentemente descritto per 24 ore. Quindi le cellule sono state staccate, contate e 100.000 cellule sono state spottate su vetrini utilizzando la tecnica del citospin. I vetrini così preparati sono stati fissati per 1 ora con Paraformaldeide al 4%. Dopodiché è stato effettuato un lavaggio in TBS1X (Tris-HCl 0.5M - pH 7.6, NaCl 1.5M) e poi le cellule sono state permeabilizzate trattando i vetrini con una soluzione di TBS+Triton X 0,2% per 10 minuti. Quindi sono stati effettuati due lavaggi con TBS1X e i vetrini sono stati immersi in una *soluzione di blocking* (0,5% BSA, TBS1X) per saturare i siti aspecifici. A questo punto è stato messo al centro del vetrino l'anticorpo policlonale creati in capra per FoxO3 (Santa Cruz) diluito 1:20 e lasciato ad incubare *over night* a 4°C. Il giorno seguente, dopo opportuni lavaggi, per la rivelazione è stato utilizzato LSAB2 Dako kit (Code N° K0674) (Dako, Glostrup, Denmark) e Fuchsin Substrate-Chromogen System (Dako). Quindi è stata effettuata una contro-colorazione con ematossilina per evidenziare i nuclei delle cellule.

L'immunoreattività è stata valutata da due indipendenti operatori usando un microscopio Leica (Wetzlar, Germany) a un ingrandimento di 40X.

2.9 IMMUNOFLUORESCENZA

L'immunofluorescenza, come l'immunocitochimica, è un metodo altamente specifico per la rilevazione di determinati antigeni presenti nel tessuto o nelle cellule da esaminare. Su una sezione di tessuto o su cellule opportunamente preparate, si pone l'anticorpo specifico per l'antigene da analizzare. Si possono utilizzare sia anticorpi direttamente coniugati a molecole fluorescenti (fluorocromi, ad es. FITC, TRITC, PE, ecc.) ed in questo caso si parla di immunofluorescenza diretta, oppure la reazione antigene anticorpo viene evidenziata utilizzando un secondo anticorpo, coniugato ad un fluorocromo, specifico per il primo anticorpo, in questo caso si parla di immunofluorescenza indiretta. Il campione così "colorato" sarà poi analizzato mediante microscopio a fluorescenza o microscopio confocale.

Nello studio questa tecnica è stata utilizzata per evidenziare la colocalizzazione di FoxO3 e SIRT1 nelle 16HBE stimulate e non con CSE al 20% e co-stimate con carbacisteina.

Le 16HBE sono state stimulate e spottate su vetrini tramite la tecnica dei citospin come descritto precedentemente. Le cellule sono state fissate in acetone e cloroformio e poi permeabilizzate immergendole in una soluzione con 3% BSA e 0,05% Saponina in PBS1X per 5 minuti. Dopo opportuni lavaggi i vetrini sono posti per 40 minuti in una *soluzione di blocking* (3% BSA in PBS1X) per saturare i siti aspecifici. Quindi è stato messo al centro del vetrino l'anticorpo policlonale creato in capra per FoxO3 (Santa Cruz) diluito 1:100 e lasciato ad incubare 1 ora a 4°C. Successivamente è stato posto sul vetrino un anticorpo anti-goat coniugato con il fluorocromo FITC per 1 ora a 4°C. A questo punto i vetrini sono stati incubati con il secondo anticorpo primario per SIRT1 (anticorpo policlonale anti-SIRT1 in coniglio Santa Cruz) diluito 1:100 e lasciato ad incubare 1 ora a 4°C e dopo è stato utilizzato un anticorpo anti-rabbit coniugato con il fluorocromo TRIC.

I vetrini sono stati montati con DAPI, che permette di visualizzare i nuclei, e le immagini sono state acquisite grazie al microscopio a fluorescenza (ZEISS).

2.10 CHROMATIN IMMUNO-PRECIPIATION (CHIP)

La *Chromatin ImmunoPrecipitation* (ChIP) è una tecnica che permette di valutare il legame di una proteina, generalmente un fattore di trascrizione, ad un sito specifico di DNA. Essa può essere riassunta brevemente nelle seguenti tappe: in primo luogo vengono fissate le proteine al DNA, dopodichè le cellule sono lisate in modo da liberare la cromatina con le proteine ad essa associate dagli involucri cellulari, quindi si effettua una frammentazione della cromatina tramite sonicazione, a questo punto si immunoprecipita la proteina di interesse mediante l'uso di anticorpi specifici e biglie di agarosio, successivamente vengono degradate le proteine in modo da liberare e purificare il DNA e infine si procede con una amplificazione del tratto specifico di DNA alla quale il fattore di trascrizione d'interesse si è legato.

Questa tecnica è stata utilizzata per determinare se nelle 16HBE stimulate con fumo di sigaretta il fattore trascrizionale FoxO3 si lega al promotore del gene che codifica per Survivina in modo diverso rispetto alle cellule non trattate.

È stato utilizzato il kit EZ-ChIP (Upstate - Millipore Corporate - Billerica, MA) seguendo il protocollo della casa produttrice. Le 16HBE stimulate e non con CSE al 20% per 24 ore sono state trattate direttamente su piastra con una soluzione all'1% di formaldeide per 10 minuti a 37°C, in questo modo la proteina legata al DNA viene fissata. Poi le cellule sono state lisate per liberare la cromatina dall'interno della cellula e l'estratto viene sonicato in modo da spezzettare la cromatina legata alle proteine in frammenti con una lunghezza di 200-1000bp.

A questo punto è stata effettuata una immunoprecipitazione. Sono stati aggiunti ai campioni 60 µl di Protein G Agarose e incubati per 1 ora a 4°C in rotazione, questo serve a pulire la cromatina da legami aspecifici con le biglie di agarosio. Al termine di questo i campioni sono stati centrifugati a 4000 g per 1 minuto e sono stati prelevati 10µl di surnatante, considerati INPUT, cioè l'intera cromatina sonicata e non immunoprecipitata con l'anticorpo di interesse. Il resto del campione è stato incubato in agitazione a 4°C overnight con l'anticorpo policlonale anti-FoxO3 [10µg] (Santa Cruz). Il giorno successivo sono stati aggiunti 60µl di Protein G Agarose e incubati per 1 ora a 4°C in

rotazione. Dopo dei lavaggi con una serie di soluzioni saline differenti, i frammenti di DNA sono stati isolati e purificati attraverso colonne cromatografiche.

Il DNA così ottenuto è stato sottoposto a PCR usando primer specifici per la regione del promotore del gene di Survivina alla quale si lega FoxO3. I primer sono stati così costruiti: FORWARD, 5' TGA GCT GAG ATC ATG CCA CT 3' , e REVERSE, 5' CTG GTG CCT CCA CTG TCT TT 3'.

Sono stati effettuati 35 cicli di amplificazione con il seguente programma:

- denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti;
- denaturazione a 94°C per 30 secondi;
- annealing a 55°C per 35 secondi;
- extension a 72°C per 45 secondi;
- final extension a 72°C per 5 minuti.

I campioni sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio al 2% e le bande evidenziate tramite SYBR Green (Invitrogen) e lampade UV.

2.10 STATISTICA DEI DATI

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software StatView. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard. La comparazione tra le diverse condizioni sperimentali sono valutate tramite paired T test. $P < 0.05$ sono accettate come statisticamente significative.

3. RISULTATI

3.1 IL CSE RIDUCE LA PROLIFERAZIONE CELLULARE

Il primo obiettivo di questo lavoro è stato la valutazione dell'effetto del fumo di sigaretta sulla proliferazione cellulare. Quindi è stato effettuato un saggio di proliferazione a breve termine (72 ore) utilizzando la molecola lipofila CFSE (*Carboxyfluorescein Succinimidyl ester*). Dall'analisi citofluorimetrica delle cellule trattate per 24 ore con CSE, è stata riscontrata una riduzione della crescita cellulare in modo dose-dipendente rispetto alle cellule non trattate. I campioni di cellule co-stimate con CSE al 10% e carbocisteina (CARBO) hanno mostrato un significativo aumento della crescita cellulare rispetto alle cellule stimulate esclusivamente con CSE (Figura 15) ma ciò non avviene se le cellule sono stimulate con CSE 20%.

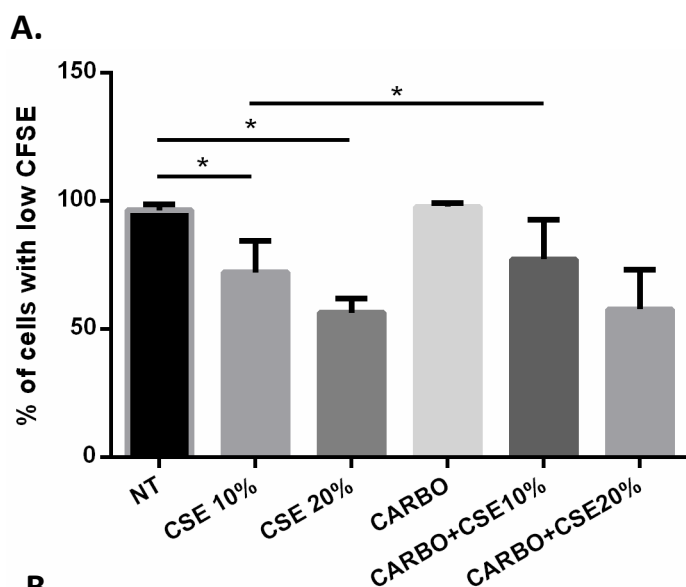
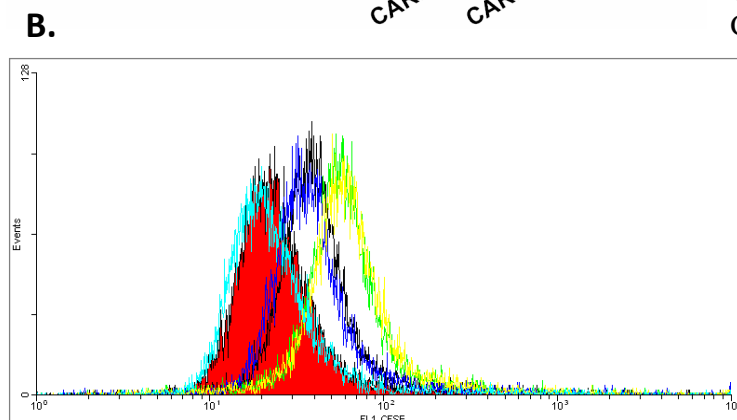


Figura 15: Effetti del CSE e della carbocisteina sulla proliferazione cellulare di 16HBE utilizzando il saggio CFSE.

(A) Istogramma con la % di cellule con meno CFSE. I risultati sono ottenuti da 5 esperimenti replicati e sono espressi come media±DS. *P<0,05. (B) Histogram plots rappresentativo dell'analisi citofluorimetrica: curva rossa = non trattato (NT); curva nera = CSE 10%; curva verde = CSE 20%; curva azzurra = Carbocisteina 10⁻⁴M; curva blu = Carbocisteina + CSE 10%; curva gialla = Carbocisteina + CSE 20%. Gli istogrammi citofluorimetrici vanno letti al contrario poiché la crescita cellulare è inversamente proporzionale alla % di cellule positive per CFSE.



Sulla base di questi risultati è stata valutata la crescita cellulare nel medio termine (21 giorni di coltura) attraverso la tecnica del saggio clonogenico. I dati ottenuti confermano una riduzione della proliferazione cellulare, in modo dose-dipendente, nelle cellule stimulate con CSE. La presenza di un anti-ossidante, la carbocisteina, risulta essere efficace nel contrastare gli effetti del CSE sia al 10% che al 20%, incrementandone il numero di colonie cellulari (Figura 15).

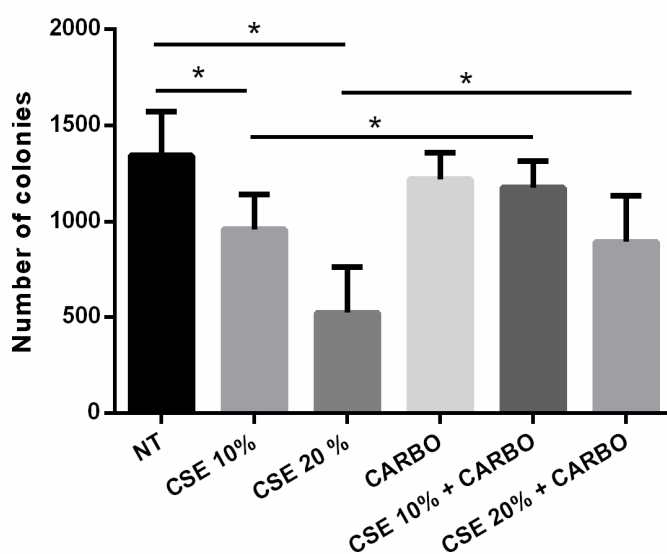


Figura 16: Effetti del CSE e della carbocisteina sulla proliferazione cellulare di 16HBE utilizzando il saggio clonogenico.

L'istogramma mostra il numero di colonie contate per singola condizione. I risultati sono ottenuti da 5 esperimenti replicati e sono espressi come media \pm DS. * P < 0,05

3.2 IL CSE AUMENTA L'ESPRESSIONE DI P21 E DI SURVIVINA

Il fumo di sigaretta quindi induce un arresto della crescita cellulare. Per capire in che modo il CSE entra in gioco in questi meccanismi, abbiamo scelto di valutare, nelle 16HBE stimulate e non con differenti concentrazioni di CSE, l'espressione di p21, un inibitore di Cdk e quindi un regolatore della progressione del ciclo cellulare. I dati mostrano un aumento di espressione di questa proteina nelle cellule stimulate con CSE in modo dose-dipendente. Diversamente, se le cellule sono co-stimate con CSE e carbocisteina, i livelli di p21 si riducono rispetto alla condizione col solo CSE, confermando che il fumo di sigaretta regola il ciclo cellulare promuovendone l'arresto attraverso un'attività ossidante (Figura 17).

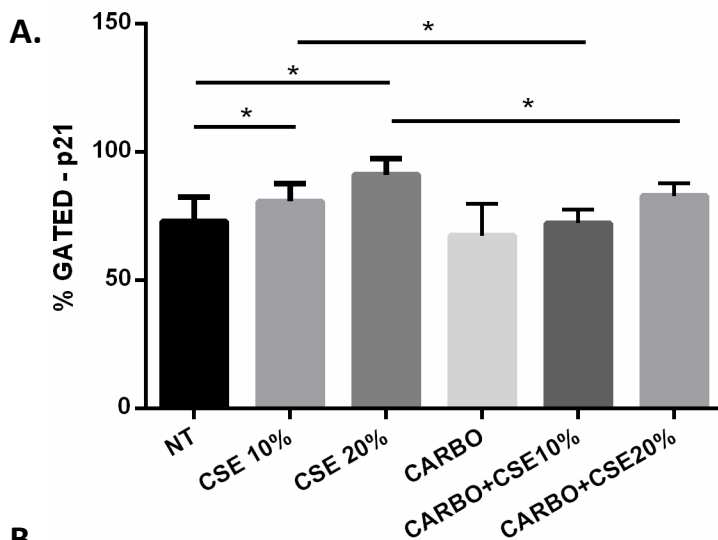
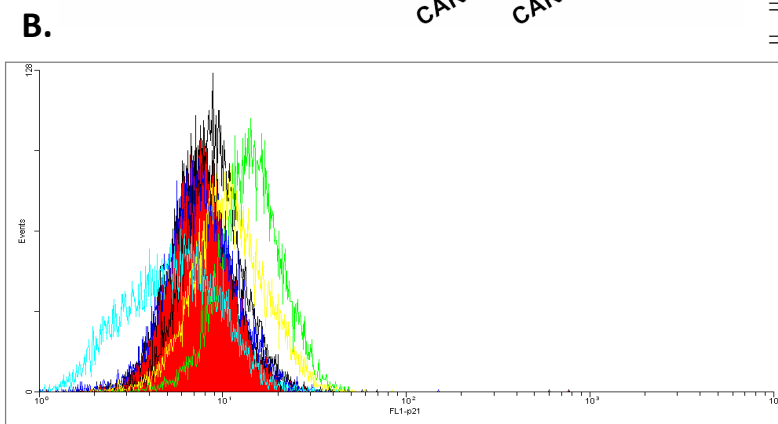


Figura 17: Effetti del CSE e della carbocisteina sull'espressione di p21 in 16HBE.

(A) Istogramma che rappresenta la % di cellule positive a p21. I risultati sono ottenuti da 8 esperimenti replicati e sono espressi come media \pm DS. *P<0,05. (B) Histogram plots rappresentativo dell'analisi citofluorimetrica: curva rossa = non trattato (NT); curva nera = CSE 10%; curva verde = CSE 20%; curva azzurra = Carbocisteina 10^{-4} M; curva blu = Carbocisteina + CSE 10%; curva gialla = Carbocisteina + CSE 20%.



La cellula che subisce un danno innesca, come protezione, meccanismi che bloccano il ciclo cellulare. Una volta che essa è arrestata nella crescita, il danno può essere riparato con successo e quindi la cellula ricomincia a moltiplicarsi ma se il danno non viene riparato essa può andare in apoptosi oppure rimanere in fase Go e assumere le caratteristiche di cellula senescente. Detto questo, risulta fondamentale anche indagare i meccanismi apoptotici e quindi abbiamo scelto di valutare l'espressione di Survivina, un membro della famiglia degli Inibitori dell'Apoptosi (IAP), nelle 16HBE stimulate e non con differenti concentrazioni di CSE. I risultati dell'analisi citofluorimetrica mostrano che l'espressione di questa molecola aumenta in modo significativo nelle cellule stimulate con CSE rispetto a quelle non trattate. La co-stimolazione delle 16HBE con CSE e carbocisteina porta a una riduzione dei livelli di survivina rispetto alla condizione

col solo CSE mostrando ancora una volta che la carbocisteina è in grado di contrare gli effetti del fumo di sigaretta. (Figura 18)

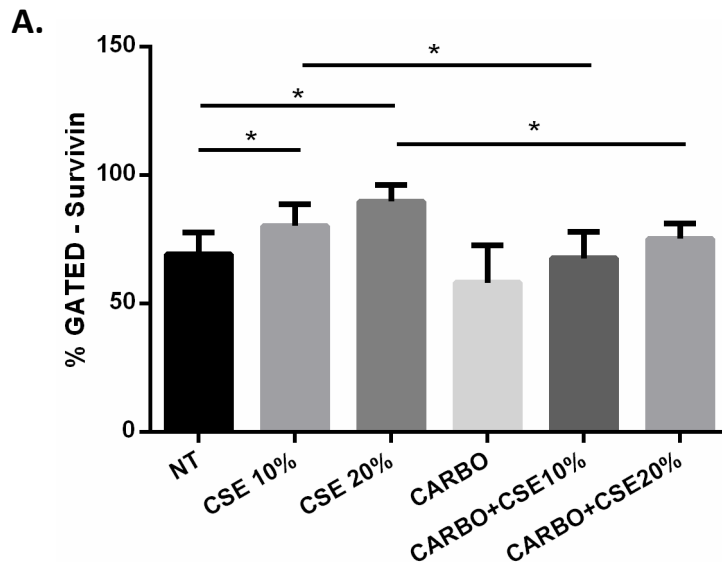
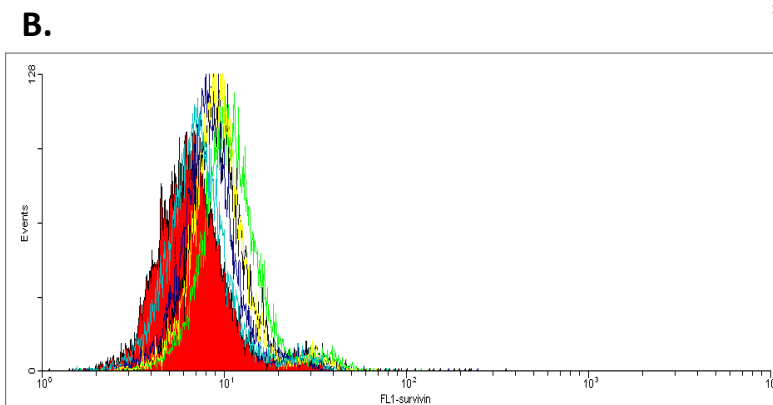


Figura 18: Effetti del CSE e della carbocisteina sull'espressione di Survivin in 16HBE.

(A) Istogramma che rappresenta la % di cellule positive a p21. I risultati sono ottenuti da 8 esperimenti replicati e sono espressi come media \pm DS. *P<0,05. (B) Histogram plots rappresentativo dell'analisi citofluorimetrica: curva rossa = non trattato (NT); curva nera = CSE 10%; curva verde = CSE 20%; curva azzurra = Carbocisteina 10^{-4} M; curva blu = Carbocisteina + CSE 10%; curva gialla = Carbocisteina + CSE 20%.



3.3 IL CSE AUMENTA L'ATTIVITÀ DELLA BETA-GALATTOSIDASI A PH6

Una volta appurato che il fumo di sigaretta ha effetti sulla proliferazione cellulare, il passo successivo è stato capire se questo avesse come risvolto l'innescare di meccanismi di senescenza. Per questo è stata valutata l'attività della β -galattosidasi, un enzima che catalizza l'idrolisi dei residui terminali di β -D-galattosio nei polisaccaridi e la cui attività a pH 6 è associata alla senescenza. Stimolando, quindi, le 16HBE con il 20 % di CSE è

stato visto un aumento dell'attività β -galattosidasi mentre aggiungendo al fumo di sigaretta la carbocisteina si è vista una riduzione di questa attività (Figura 19).

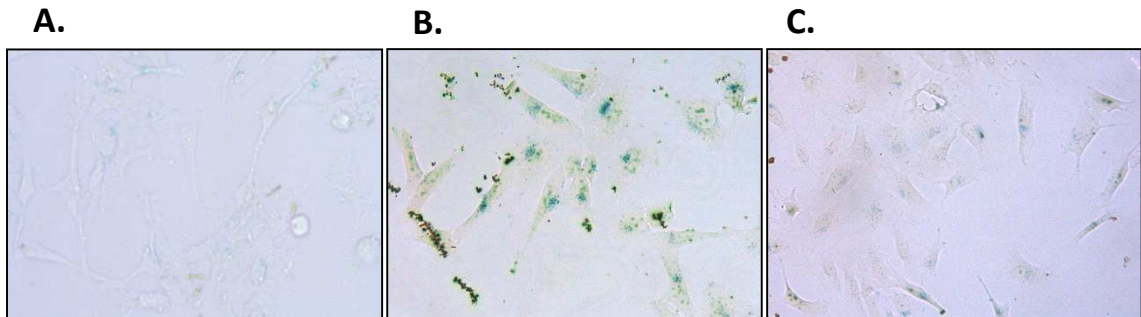


Figura 19: Immagini al microscopio ottico di 16HBE per il test della β -galattosidasi. Il colore blu indica l'attività della β -galattosidasi. (A) NT. (B) CSE 20%. (C) CARBO+CSE 20%

3.4 IL CSE RIDUCE L'ESPRESSIONE E L'ATTIVITÀ DEACETILASICA DI SIRT1

Le fasi successive di questo studio hanno anche previsto un approfondimento dei meccanismi molecolari mediante i quali può agire il fumo di sigaretta. Per questo, è stata studiata una proteina largamente conosciuta come “proteina anti-aging”, SIRT1. Effettuando estrazioni proteiche differenziali nucleo-citoplasma e valutando tramite western blot l'espressione di questa proteina, ne è stata riscontrata una riduzione di espressione della quota proteica nucleare nelle cellule stimolate con alte concentrazioni di CSE e invece si ha un recupero di espressione nelle cellule stimolate con CSE e carbocisteina (Figura 20).

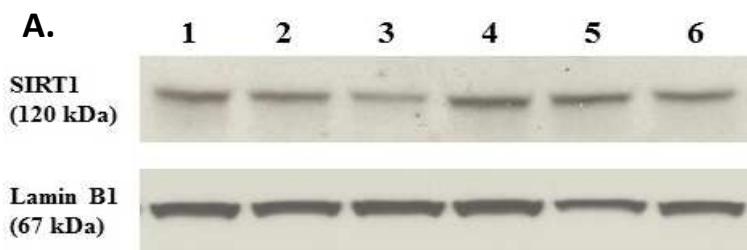
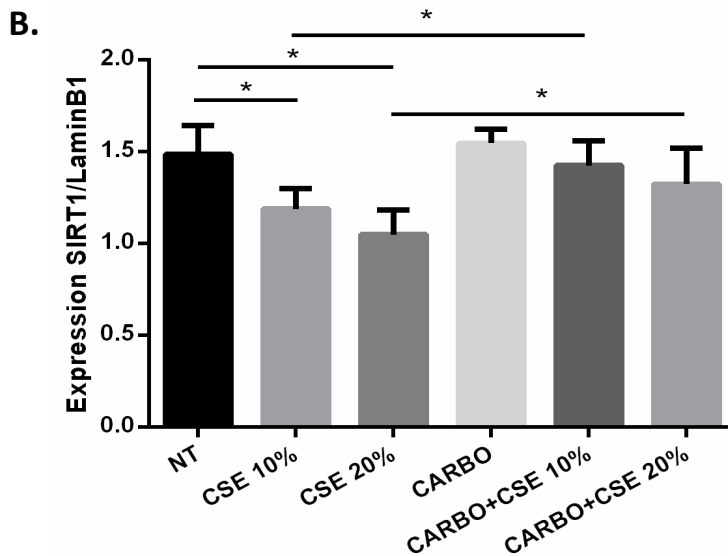


Figura 20: Effetti del CSE e della carbocisteina sull'espressione della proteina SIRT1 in 16HBE.

(A) Immagine rappresentativa di un Western Blot per SIRT1 e LaminB1 (Lane 1: NT, Lane 2-3: CSE 10% e CSE20%, Lane 4: Carbocisteina 10⁻⁴M, Lane 5-6: Carbocisteina + CSE 10% e +CSE 20%).

(B) Il segnale corrispondente a SIRT1 è stato semi-quantificato mediante scansione densitometrica e normalizzato con LaminB1. I risultati sono ottenuti da 5 esperimenti replicati. I risultati sono espressi media ± DS. * P < 0,05



Successivamente è stato valutato anche l'effetto del fumo di sigaretta sull'attività deacetilasi di questo enzima e i risultati ottenuti mostrano che le cellule stimulate con crescenti concentrazioni di CSE presentano una riduzione dell'attività di SIRT1 in modo dose-dipendente e che la carbocisteina riesce a contrastare l'effetto del fumo di sigaretta (Figura 21).

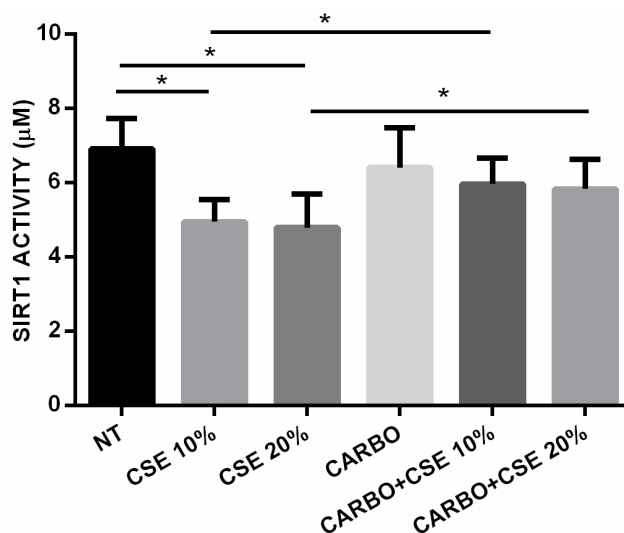


Figura 21: Effetto del CSE e della carbocisteina sull'attività deacetilasi di SIRT1 in 16HBE.

Le proteine nucleari sono state immunoprecipitate con un anticorpo specifico per SIRT1 e poi utilizzate per valutare l'attività di questa deacetilasi istonica. I dati sono espressi come micromoli±SD (n=5) utilizzando come riferimento una curva dello standard Fluor-de-Lys deacetilato (fornito dal kit). * P < 0,05

3.5 IL CSE RIDUCE L'ESPRESSIONE DI FOXO3

Dalla letteratura attuale si evince che l'attività di SIRT1 è strettamente collegata alla funzionalità di FoxO3. Per questo motivo è stata valutata, tramite western blot, la sua espressione all'interno del nucleo di 16HBE stimulate e non con CSE, riscontrando una riduzione della quota nucleare di questo fattore di trascrizione in relazione all'esposizione al fumo di sigaretta. Le cellule co-stimolate con carbocisteina e CSE, invece, hanno mostrato una minore riduzione dell'espressione nucleare di FoxO3 (Figura 22).

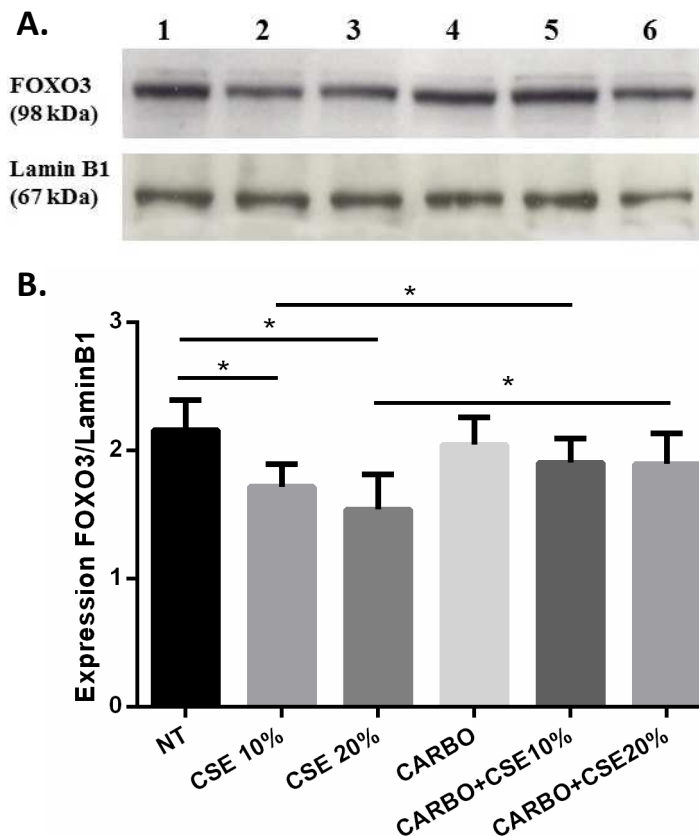


Figura 22: Effetti del CSE e della carbocisteina sull'espressione della proteina FoxO3 in 16HBE.

(A) Immagine rappresentativa di un Western Blot per SIRT1 e LaminB1 (Lane 1: NT, Lane 2-3: CSE 10% e CSE20%, Lane 4: Carbocisteina $10^{-4}M$, Lane 5-6: Carbocisteina + CSE 10% e + CSE 20%). (B) Il segnale corrispondente a FoxO3 è stato semi-quantificato mediante scansione densitometrica e normalizzato con LaminB1. I risultati sono ottenuti da 5 esperimenti replicati e sono espressi come media \pm DS. *P<0.05

Inoltre è stata valutata la localizzazione di questo fattore di trascrizione utilizzando la tecnica dell'immunocitochimica. Le immagini (Figura 22) mostrano che nelle 16HBE non stimulate con CSE, FoxO3 si trova prevalentemente nel nucleo ma nelle cellule esposte al CSE 20% per 24 ore questa proteina è notevolmente ridotta.

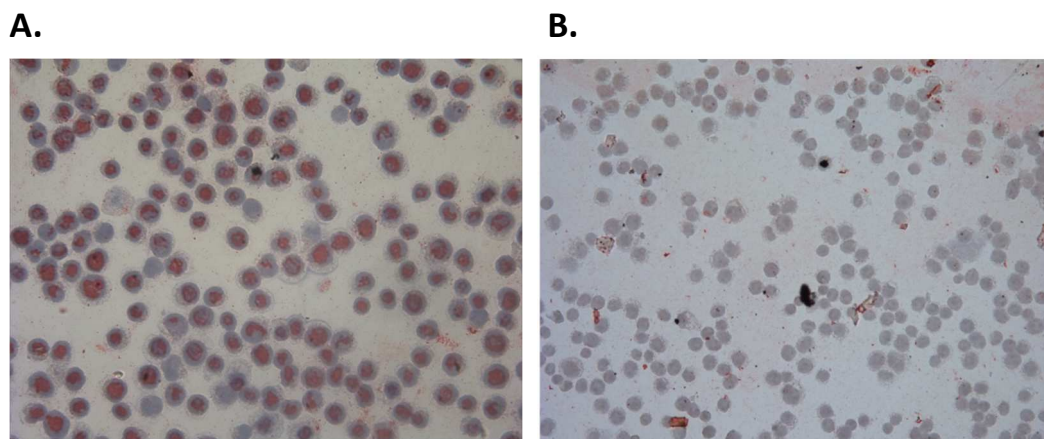


Figura 23: *Immunocitochimica di 16HBE marcate con anticorpo specifico per FoxO3. Valutazione dell'espressione di FoxO3 in 16HBE NT (A) e stimulate con CSE al 20% (B).*

3.5 IL CSE RIDUCE L'ESPRESSIONE DI SIRT1 NELLE 16HBE E CONTEMPORANEAMENTE AUMENTA LA TRASLOCAZIONE DI FOXO3 NEL CITOPLASMA

Utilizzando la tecnica dell'immunofluorescenza è stato possibile vedere contemporaneamente la localizzazione di SIRT1 e FoxO3 nelle 16HBE stimulate e non con CSE al 20% e nelle cellule co-stimate con CSE e Carbocisteina. Le immagini (Figura 24.A) mostrano che le 16HBE non trattate con fumo di sigaretta presentano SIRT1 (colorato in rosso) ben evidente nel nucleo e FoxO3 (colorato in verde) sia nel nucleo che nel citoplasma. Nelle cellule stimulate per 24 ore con CSE al 20% SIRT1 scompare dal nucleo mentre FoxO3 risulta maggiormente espresso nel citoplasma (Figura 24.B). Il trattamento con carbocisteina contrasta l'effetto del fumo di sigaretta tanto che le cellule mostrano SIRT1 nel nucleo e FoxO3 normalmente espresso nel nucleo e nel citoplasma (Figura 24.B).

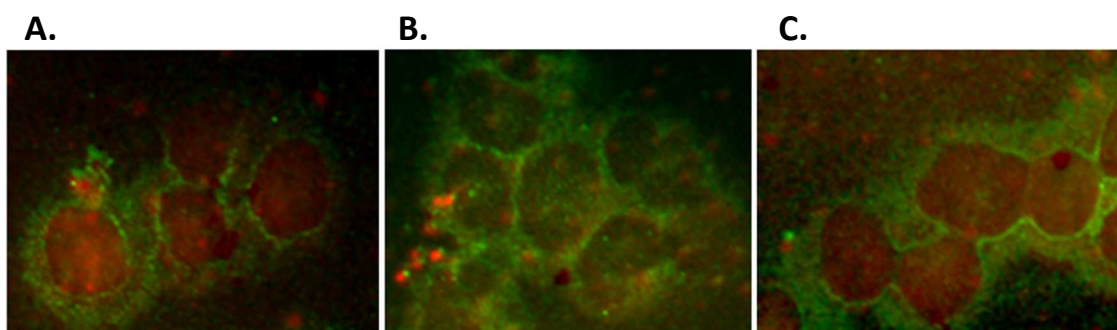


Figura 24: *Immunofluorescenza di 16HBE marcate con anticorpo fluorescenti specifici per FoxO3 (verde) e SIRT1 (rosso).*

Valutazione della localizzazione di FoxO3 e SIRT1 in 16HBE NT (A), stimulate con CSE al 20% (B), stimulate con CSE 20% e carbocisteina (C).

3.4 IL CSE RIDUCE IL LEGAME DI FOXO3 AL PROMOTORE DI SURVIVINA

I risultati finora mostrati hanno evidenziato che il CSE è direttamente coinvolto sia nei meccanismi di regolazione della sopravvivenza cellulare che nei meccanismi anti-invecchiamento. I diversi pathway coinvolti in questi processi spesso si intrecciano gli uni con gli altri ed è quello che succede con FoxO3 e Survivina. Il primo infatti legandosi al promotore del gene di Survivina regola negativamente la sua espressione. Per questo motivo, utilizzando la ChIP si è studiato proprio come varia il legame di FoxO3 al promotore della survivina in cellule stimulate con CSE. L'immagine (Figura 25) mostra che FoxO3 si lega in modo meno efficiente al promotore di Survivina nelle cellule stimulate con CSE al 20%.

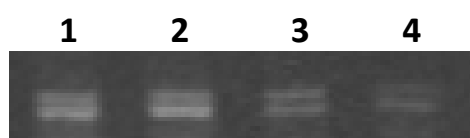


Figura 25: *DNA corrispondente alla regione del promotore di survivina alla quale si lega il fattore di trascrizione FoxO3 ottenuto tramite ChIP e amplificato tramite PCR.*

Lane 1: INPUT NT; Lane 2: INPUT CSE 20%; Lane 3: NT; Lane 4: CSE 20%

4. DISCUSSIONE

La Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) è una delle principali cause di morbilità e mortalità a livello mondiale tanto da essere considerata la quarta causa di morte nel mondo. Rappresenta un importante problema di sanità pubblica poiché molte persone soffrono di questa malattia per anni e muoiono prematuramente a causa della stessa o delle sue complicanze. L'inalazione del fumo di sigaretta e di altre particelle nocive causa infiammazione polmonare che si cronicizza nei pazienti che sviluppano la BPCO (26). Questa risposta infiammatoria cronica può indurre distruzione del tessuto parenchimale (che determina enfisema) e può deprimere i normali meccanismi di difesa e riparazione. Queste alterazioni patologiche portano a intrappolamento dell'aria nei polmoni e a una progressiva e non reversibile ostruzione bronchiale (1) (2).

La BPCO, però, presenta diversi fenomeni patologici che intervengono nell'apparato respiratorio ma che si estendono ad altri distretti corporei i quali la portano ad assumere carattere di malattia sistemica (24). Gli effetti sistemici più comunemente associati alla BPCO comprendono: infiammazione sistemica, stress ossidativo, disfunzione della muscolatura scheletrica, perdita di peso, anomalie dello stato nutritivo ed osteoporosi (24) (25). Per stress ossidativo si intendono le alterazioni funzionali e strutturali causate dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Il fumo di tabacco è già di per sé una potente sorgente di ROS ma a questi si vanno a sommare le specie reattive prodotte, in particolare, dai neutrofili iper-attivati nei pazienti con BPCO (16). Tutto questo non fa che ridurre ulteriormente la capacità antiossidante dei tessuti colpiti oltre che a causare danno epiteliale, attivazione dei macrofagi residenti nelle vie aeree, squilibrio tra proteasi ed anti-proteasi ed aumentato rischio di sviluppare cancro polmonare. Numerosi studi hanno riportato alterazioni nei livelli di stress ossidativo, citochine circolanti, proteine della fase acuta e nel livello di attivazione delle cellule circolanti nella BPCO (20) (25). In particolare durante le esacerbazioni acute della BPCO è stato dimostrato un marcato squilibrio tra ossidanti ed antiossidanti. Tuttavia, l'ossidazione è presente anche in condizioni stabili di malattia, come dimostrato dagli elevati livelli di perossidazione lipidica, un marker dello stress ossidativo, riportati nel siero dei pazienti con BPCO stabile.

L'insulto dovuto alle sostanze nocive e ossidanti contenute nel fumo di sigaretta è subito in prima istanza dall'epitelio bronchiale che rappresenta la prima barriera di difesa delle vie aeree. Le cellule che compongono questo tessuto agiscono rilasciando defensine e muco, il quale risulta essere citoprotettivo poichè possiede proprietà antiossidanti che forniscono uno schermo protettivo contro il fumo di sigaretta e gli inquinanti atmosferici, ma anche coordinando l'infiammazione locale e la risposta immune tramite il rilascio di citochine e chemochine. L'insulto dovuto al contatto con queste sostanze tossiche crea danni alla singola cellula che reagisce innescando dei meccanismi di riparo quali detossificazione da ROS, blocco del ciclo cellulare e riparo del DNA ma il protrarsi nel tempo della presenza del fumo porta a un rallentamento di questi meccanismi di difesa interni e quindi la cellula potrebbe subire delle modificazioni strutturali e morfologiche che la condurrebbero a morte per apoptosi oppure a trasformarsi in cellula tumorale o a diventare una cellula senescente.

L'*aging* è un complesso processo multifattoriale per cui gli eventi in grado di determinare la senescenza della cellula si sovrappongono a diversi livelli: le modificazioni molecolari occorrenti in corso di invecchiamento conducono ad alterazioni cellulari le quali, a loro volta, contribuiscono all'insufficienza del sistema a cui appartiene ed alla senescenza dell'organo. Una delle principali cause che concorrono a determinare le numerose alterazioni morfo-funzionali proprie dell'*aging* sembra essere proprio il danno ossidativo che si instaura a causa di uno squilibrio tra la produzione di ROS e l'attività di difesa dei sistemi antiossidanti (di tipo enzimatico e non) i quali possono risultare deficitari sia per consumo degli stessi che per una loro ridotta sintesi (38).

Nostri studi precedenti (76) (77) (78) hanno avuto come obiettivo proprio lo studio degli effetti del fumo di sigaretta su una linea di cellule epiteliali bronchiali, le 16HBE, e di dimostrare se una molecola con attività mucolitica come la carbocisteina sale di lisina (SCMC-Lys) può contrastarli. Diversi recenti studi hanno dimostrato l'effetto antiossidante della carbocisteina nei confronti dell'acido ipocloroso (79), quest'ultimo capace direttamente di ossidare i residui di metionina presenti nell' α 1-antitripsina, inattivando così il principale meccanismo di regolazione dell'elastasi. La carbocisteina si è dimostrata inoltre in grado di proteggere la funzione mucociliare dal danno provocato dall'azione ossido-riducente dell'ozono (80). Uno studio clinico condotto su 40 soggetti con BPCO riacutizzata, di cui 15 trattati con SCMC-Lys 2,7 g/die per via orale per 6

mesi, ha dimostrato una marcata riduzione dello 8-isoprostano, un marcatore dello stress-ossidativo, e della IL-6, un marcatore dell'infiammazione, nell'esalato condensato dei pazienti trattati con SCMC-Lys, rispetto ai livelli riscontrati al momento della riacutizzazione ed ai controlli non trattati (81). Questo è il primo studio clinico che ha messo in evidenza le proprietà non solo mucoregolatrici, ma anche anti-ossidanti della SCMC-Lys. Dato il riconosciuto ruolo oncogenetico dei ROS contenuti nel fumo di tabacco queste osservazioni sul ruolo antiossidante, oltre che muco regolatore ed antinfiammatorio della SCMC-Lys rivestono una particolare importanza nell'ottica di una possibile prevenzione della BPCO e del cancro del polmone nei soggetti fumatori ed ex-fumatori. Proprio a partire da queste evidenze oggi è sempre più diffusa l'idea che l'utilizzo di farmaci anti-ossidanti, agendo sul bilancio ossidativo, potrebbero avere effetti benefici sull'infiammazione sistemica e quindi sull'evoluzione della BPCO. Anche i nostri studi hanno dimostrato che, nelle cellule epiteliali bronchiali stimulate con CSE, la carbocisteina contrasta gli effetti del fumo di sigaretta riducendo la produzione di ROS, aumentando eventi citoprotettivi nella quale si inseriscono GSH e HO-1, e neutralizzando la riduzione dell'attività di HDAC-2 dovuta al CSE, meccanismo coinvolto nella corticoresistenza CSE mediata (78). Inoltre abbiamo riscontrato anche un'attività antinfiammatoria poiché questo farmaco riduce l'espressione/attivazione del TLR4 e l'espressione/rilascio di IL-8, ma anche la chemiotassi dei neutrofili e l'espressione di p21 sempre in cellule epiteliali bronchiali stimulate con CSE (77). La secrezione di IL-8 e la iper-espressione di p21 sono entrambe caratteristiche di un fenotipo senescenza-associato (82). p21 è molto sensibile allo stress ossidativo e può giocare un ruolo nei processi cellulari che coinvolgono lo squilibrio della proliferazione cellulare/apoptosi (83). È stato precedentemente dimostrato che i macrofagi alveolari e le cellule epiteliali bronchiali di fumatori hanno una ridotta morte cellulare, così come una maggiore espressione p21 citoplasmatica (84). Nelle vie aeree bronchiali di fumatori con e senza BPCO, il fumo di sigaretta altera l'espressione e la distribuzione sub-cellulare di p21 (85). Questo evento, a sua volta, può svolgere un ruolo importante nello squilibrio tra apoptosi, proliferazione e differenziazione delle cellule epiteliali bronchiali che portano a metaplasia squamosa, un'alterazione associata ad un aumento dell'ostruzione delle vie aeree e quindi alla BPCO e un aumento del rischio di cancro al polmone nei fumatori (85). Il fatto che il CSE aumenti l'espressione di p21 nelle cellule epiteliali bronchiali mentre la carbocisteina è in grado di ridurla sostiene il concetto che

questo farmaco può anche essere utile per limitare la senescenza indotta da esposizione al fumo di sigaretta.

L'obiettivo di questo studio è stato proprio quello di indagare ulteriormente su questi meccanismi valutando precisi marker di senescenza cellulare e meccanismi molecolari associati ad attività anti-aging, come il pathway SIRT1/FoxO3, ma anche l'attività proliferativa e i processi apoptotici delle cellule stimulate con fumo di sigaretta e di verificare se anche in questo caso la carbocisteina è in grado di contrastare l'effetto del fumo di sigaretta.

Per prima cosa è stata valutata la proliferazione delle cellule epiteliali bronchiali sottoposte a estratto di fumo di sigaretta (CSE) per 24 ore. Sono state usate due diverse tecniche: il saggio CFSE e il saggio clonogenico. Nel primo caso viene valutata una crescita a breve termine (72 ore) mentre nel secondo caso le cellule vengono monitorate nella crescita per 21 giorni. In entrambi i casi è stata osservata una significativa riduzione della crescita cellulare dovuta alla stimolazione con CSE dimostrando in questo modo che il fumo di sigaretta induce un blocco del ciclo cellulare e che questo blocco è stabile nel tempo (Figura 15-16). Andando ad analizzare l'effetto della co-stimolazione con carbocisteina è stato riscontrato un aumento della proliferazione delle cellule che erano state stimulate con CSE al 10% sia nel breve termine che in tempi più lunghi. Per quanto riguarda invece le cellule stimulate con concentrazioni di CSE più elevate, nel breve termine non sono riscontrabili significativi miglioramenti nella crescita cellulare grazie alla carbocisteina ma nel lungo termine la cellula riesce a recuperare il danno. Tutto questo concorda con l'aumento, CSE mediato, dell'espressione di p21, un inibitore delle Cdk che è direttamente coinvolto nel blocco del ciclo (77) e con la riduzione di questo regolatore grazie all'azione della carbocisteina. Quindi possiamo dire che il fumo può intervenire direttamente nel controllo della progressione del ciclo innescando meccanismi che portano al suo blocco (Figura 17). Il blocco del ciclo cellulare dà alla cellula tempo per poter riparare il danno e quindi poi ricominciare a riprodursi dando vita a cellule figlie non contenenti errori. In base al livello ed al tipo di danno, però, le cellule potrebbero non riuscire a ripararlo e quindi possono promuovere meccanismi di morte per apoptosi oppure possono diventare senescenti o potenzialmente oncogeniche. Proprio per questo motivo in questo lavoro è stato esplorato anche il meccanismo apoptotico prendendo in esame l'espressione di una proteina anti-apoptotica, la Survivina. Questa

proteina è risultata essere maggiormente espressa nelle cellule stimulate con CSE quindi sembra che il fumo intervenga negli eventi apoptotici impedendo la morte cellulare. Anche questo meccanismo, però, viene contrastato dal co-trattamento con carbocisteina che va a ridurre l'espressione di survivina (Figura 18).

Poiché le cellule epiteliali bronchiali a causa del fumo di sigaretta risultano essere bloccate nella crescita e non in apoptosi, si è voluto valutare se queste presentavano un fenotipo senescente. L'attività dell'enzima beta-galattosidasi a pH 6 è considerato un marker della senescenza cellulare. I risultati ottenuti mostrano che le cellule trattate col fumo presentano un'aumentata attività di questo enzima ma nello stesso tempo la carbocisteina riduce l'effetto del CSE (Figura 19).

È stato dimostrato che SIRT1, una proteina anti-aging, è coinvolta nei meccanismi che aumentano la resistenza allo stress ossidativo (75) e che anche FoxO3 regola l'espressione genica antiossidante nei polmoni di topo esposti a CSE, tanto che alterazioni dell'espressione e dell'attività di questo fattore di trascrizione riducono l'espressione di geni antiossidanti (86). SIRT1, a sua volta, controlla l'attività e i livelli di espressione di FoxO3 deacetilando specifici suoi residui aminoacidici (75) (86). È interessante notare che la proteina FoxO3 è anche sottoposta ad ossidazione, e questo può essere un altro meccanismo di alterazione FoxO3-dipendente della trascrizione genica in risposta all'esposizione al fumo di sigaretta (86). Quindi in questo lavoro abbiamo valutato se il fumo di sigaretta riduce l'espressione e l'attività di SIRT1 nel nostro modello sperimentale ma anche se ha effetti sull'espressione e l'attività trascrizionale di FoxO3. Come era atteso, le 16HBE stimulate con CSE mostrano una riduzione dell'espressione nucleare e della attività deacetilasica di SIRT1 in modo dose-dipendente (Figura 20-21). Per quanto riguarda FoxO3, anche l'espressione di questo fattore di trascrizione è risultata sensibile alla stimolazione con CSE (Figura 22). Gli effetti negativi del CSE su SIRT1 e FoxO3 sono contrastati dalla carbocisteina, la quale ne aumenta l'espressione e l'attività (Figura 20, 21, 22). Diversi studi mostrano anche il ruolo di FoxO3 nella regolazione dell'apoptosi indotta da stress ossidativo. Bim, Bcl XI, Bcl 2, Survivina sono target di questo fattore di trascrizione (72). È stato visto che FoxO3 regola negativamente l'espressione del gene della survivina (73) e in questo lavoro abbiamo voluto verificare se il fumo di sigaretta interferisse con questa regolazione giustificando anche il riscontrato aumento dell'espressione di questa molecola anti-

apoptotica in relazione alla stimolazione con CSE. In effetti, i dati ottenuti dalla ChIP (Figura 25) mostrano proprio che il fumo di sigaretta riduce il legame di FoxO3 al promotore del gene della survivina la cui trascrizione in questo modo non viene bloccata. Poiché la maggiore acetilazione del fattore di trascrizione FoxO3 ha come conseguenza l'assunzione di una conformazione proteica meno affine al legame col DNA possiamo speculare che la riduzione dell'attività deacetilasica di SIRT1, ad opera del CSE, che ha come target anche FoxO3 porta ad avere un aumento dell'acetilazione di questo fattore il quale non può svolgere correttamente la sua attività di regolazione della trascrizione.

Possiamo concludere dicendo che il fumo di sigaretta è sicuramente coinvolto nell'induzione della senescenza in cellule epiteliali bronchiali bloccando il ciclo cellulare e impedendo l'apoptosi cellulare. Inoltre va ad alterare anche il pathway SIRT1/FoxO3 che è un tipico meccanismo anti-aging. Tutto questo viene contrastato dalla carbocisteina, un farmaco con effetti anti-ossidanti e questo porterebbe a pesare che l'effetto deleterio del CSE su questi meccanismi sia mediato dallo stress-ossidativo da esso indotto. Nel loro insieme i dati qui presentati supportano un ruolo del farmaco carbocisteina come anti-aging nei fumatori anche se questi risultati dovrebbero essere confermati da studi in vivo su soggetti fumatori affetti e non da BPCO.

BIBLIOGRAFIA

1. **Bonsignore G., Bellia V.** *Broncopneumopatia cronica ostruttiva. Tratto da Malattie dell'apparato respiratorio.* McGraw-Hill.
2. **National Institutes of Health.** *Global Initiative for Chronic Lung Disease (GOLD).* 2015.
3. **World Health Report.** Geneva: World Health Organization. Available. <http://www.who.int/whr/2000/en/statistics.htm>; 2000. [Online]
4. **Murray C. J. L., Lopez A. D.** *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study.* The Lancet. 1997; 394(9064): 1498–1504.
5. **Scognamiglio A., Matteelli G., Pistelli F., Baldacci S., Carrozzi L., Viegi G.** *L'epidemiologia della broncopneumopatia cronica ostruttiva.* Ann. Ist. Super. Sanità 2003; 39(4): 467-484.
6. **Turato G., Zuin R., Baraldo S., Badin C., Beghè B., Sietta M.** *Aspetti istopatologici della broncopneumopatia cronica ostruttiva.* Ann. Ist. Super. Sanità. 2003; 39(4): 507-517.
7. **Maestrelli P.** *Fisiopatologia della Broncopneumopatia cronica ostruttiva.* Ann. Ist. Super. Sanità. 2003; 39(4): 495-506.
8. **Romagnoli M., Fabbri L.** *Broncopneumopatia cronica ostruttiva: definizione e classificazione di gravità.* Ann. Ist. Super. Sanità. 2003; 39(4): 461-466.
9. **Simpson J.L., Phipps S., Gibson P.G.** *Inflammatory mechanisms and treatment of obstructive airway diseases with neutrophilic bronchitis.* Pharmacology & Therapeutics. 2009; 124: 86–95.
10. **Hara H., Araya J., Ito S.** *Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke induced bronchial epithelial cell senescence.* Lung Cellular and Molecular Physiology. 2013, 305(10):L737–L746.
11. **Ito K., Barnes P.J.** *COPD as a disease of accelerated lung aging.* Chest. 2009; 135(1):173-80.
12. **MacNee W.** *Aging, inflammation, and emphysema.* Am J Respir Crit Care Med 2011; 184(12):1327-9.
13. **Sethi S., Murphy T.F.** *Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review.* Clin Microbiol Rev, 2001; 14: 336-63.
14. **Montuschi P.** *Terapia farmacologica della broncopneumopatia cronica ostruttiva.* Ann. Ist. Super. Sanità 2003; 39(4): 557-572.
15. **Dekhuijzen P.N.** *Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease.* Eur Respir J. 2004; 23(4):629-36.
16. **Church D.F., Pryor W.A.** *Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications.* Environ. Health Perspect. 1985; 64:111-126.
17. **Nakayama T., Church D.F., Pryor W.A.** *Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts.* Free Radic. Biol. Med. 1989; 7:9-15.
18. **Alliwell B., Gatteridge J.M.** *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.* Methods Enzymol 1990; 86: 1-85.

19. **Repine J.E., Bast A.A., Lankhorst I.** *Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Resp Crit Care Med 1997; 156:341-357.
20. **Langen R.C., Korn S.H., Wouters E.F.** *ROS in the local and systemic pathogenesis of COPD.* Free Radic Biol Med 2003; 35: 226-235.
21. **Brot N., Weissbach H.** *The biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins.* Trends Biochem. Sci. 1982; 7: 137-140.
22. **Jornot L., Petersen H., Junod A.F.** *Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-activations.* Biochem J 1998; 335: 85-94.
23. **Postma D.S., Renkema T.E.J., Noordhoek J.A., Faber H., Sluiter H.J., Kauffman H.** *Association between non specific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by poly-morphonuclear leukocytes in chronic airflow obstruction.* Am Rev Respir Dis 1988; 137:57-61.
24. **Wouters E.F., Creutzberg E.C., Schols A.M.** *Systemic effects in COPD.* Chest, 2002; 121:127S-130S.
25. **Rahman I., Morrison D., Donaldson K., MacNee W.** *Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers.* Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1996; 154: 1055-1060.
26. **Morrison D., Rahman I., Lannan S., MacNee W.** *Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers.* Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1999; 159:473-479.
27. **Schwartz G.K., Dickson M.A.** *Cell cycle, Cdks and cancer: a changing paradigm.* Nature Reviews Cancer, 2009; 9(3): 153-66.
28. **Bloom J., Cross F.R.** *Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007; 8: 149-160.
29. **Franklin R.A., McCubrey J.A.** *Kinases: positive and negative regulators of apoptosis.* Leukemia. 2000; 14, 2019-2034.
30. **Leist M., Jaattela M.** *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.* Nature Reviews Molecular Cell Biology 2001; 2, 1-10,.
31. **Li F., Ambrosini G., Chu E.Y., Plescia J., Tognin S., Marchisio P.C., Altieri D.C.** *Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin.* Nature, 1998; 396:580-4.
32. **Li F., Ling X.** *Survivin study. An update of "What is the Next Wave?".* J Cell Physiol, 2006; 208:476-86.
33. **Altieri D.C.** *The case for Survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions.* Curr Opin Cell Biol, 2006; 18:609-15.
34. **Altieri D.C.** *Validating survivin as a cancer therapeutic target.* Nat Rev Cancer, 2003; 3:46-54.
35. **Wheatley S.P., McNeish I.A.** *Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis.* Int Rev Cytol, 2005; 247:35-88.
36. **Dohi T., Beltrami E., Wall N.R., Plescia J., Altieri D.C.** *Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis.* J Clin Invest, 2004; 114:1117-27.
37. **Yang S.R., Park J.R., Kang K.S.** *Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Aging: Implication to Lung Diseases.* Oxid Med Cell Longev. 2015; 2015:486263.
38. **Harman D.** *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.* J Gerontol, 1956; 11:298-300.

39. **Hayflick. L.** *The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.* Exp Cell Res, 1965; 37:614-36.
40. **Campisi J.** *Cellular Senescence and Cell Death.* Physiological Basis of Aging and Geriatrics. Boca Raton: CRC Press 2003:47-59.
41. **Ito K., Colley T., Mercado N.** *Geroprotectors as a novel therapeutic strategy for COPD, an accelerating aging disease.* Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2012;7:641-52.
42. **Fukuchi Y.** *The aging lung and chronic obstructive pulmonary disease: similarity and difference.* Proc Am Thorac Soc. 2009;6(7): 570–572.
43. **Grubisha O., Smith B.C., Denu J.M.** *Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases.* FEBS J. 2005;272(18):4607–4616.
44. **Rahman S., Islam R.** *Mammalian Sirt1: insights on its biological functions.* Cell Commun Signal. 2011;9:11.
45. **Lam E.W., Francis R.E., Petkovic M.** *FOXO transcription factors: key regulators of cell fate.* Biochem Soc Trans. 2006;34(Pt 5):722-6.
46. **Michan S., Sinclair D.** *Sirtuins in mammals: insights into their biological function.* Biochem. J 2007; 404:1–13.
47. **Michishita E., Park J.Y., Burneskis J.M., Barrett J.C, Horikawa I.** *Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins.* Mol. Biol. Cell. 2005; 16:4623–4635.
48. **Imai S., Armstrong C.M., Kaeberlein M., Guarente L.** *Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase.* Nature 2000; 403:795–800.
49. **Barber M.F., Michishita-Kioi E., Xi Y., Tasselli L., Kioi M., Moqtaderi Z.** *SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation.* Nature. 2012; 487:114–118.
50. **Sauve A.A., Wolberger C., Schramm V.L., Boeke J.D.** *The biochemistry of sirtuins.* Annu. Rev. Biochem. 2006; 75:435–465.
51. **Hwang J.W., Yao H., Caito S., Sundar I.K., Rahman I.** *Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence.* Free Radic Biol Med. 2013;61:95-110.
52. **Palacios J.A., Herranz D., DeBonis M.L., Velasco S., Serrano M., Blasco M.** *SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination.* J. Cell Biol. 2010; 191:1299–1313.
53. **Vaziri H., Dessain S.K., Eaton E. , Imai S.I., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L., Weinberg R.A.** *hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase.* Cell. 2001; 107:149–159.
54. **Kauppinen A., Suuronen T., Ojala J., Kaarniranta K., Salminen A.** *Antagonistic crosstalk between NF-kappaB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders.* Cell. Signal. 2013; 25:1939–1948.
55. **A. Van der Horst A., Tertoolen L.G., De Vries-Smits L.M., Frye R.A., Medema R.H., Burgering B.M.** *FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1).* J. Biol. Chem. 2004; 279:28873–28879.
56. **Nemoto S., Fergusson M.M, Finkel T.** *SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}.* J. Biol. Chem. 2005; 280:16456–16460.

57. **Lim J.H., Lee Y.M., Chun Y.S., Chen J., Kim J.E., Park J.W.** *Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha*. Mol. Cell. 2010; 38:864–878.
58. **Kaestner K.H., Knochel W., Martinez D.E.** *Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors*. Genes Dev. 2000;14:142–146.
59. **Zhang Y., Gan B., Liu D., Paik J.H.** *FoxO family members in cancer*. Cancer Biol Ther. 2011;12(4):253-9. .
60. **Klotz L.O., Sánchez-Ramos C., Prieto-Arroyo I., Urbánek P., Steinbrenner H., Monsalve M.** *Redox regulation of FoxO transcription factors*. Redox Biol. 2015; 6:51-72. .
61. **Biggs W.H., Cavenee W.K., Arden K.C.** *Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse*. Mamm Genome 2001;12:416– 425.
62. **Paik J.H., Kollipara R., Chu G., Ji H., Xiao Y., Ding Z., Miao L., Tothova Z., Horner J.W., Carrasco D.R., Jiang S., Gilliland D.G., Chin L., Wong W.H., Castrillon D.H., DePinho R.A.** *FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis*. Cell. 2007;128(2):309-23.
63. **Sedding. D.G.** *FoxO transcription factors in oxidative stress response and ageing—a new fork on the way to longevity?* Biol Chem. 2008; 389:279–83.
64. **Willcox B.J., Donlon T.A., He Q., Chen R., Grove J.S., Yano K., Masaki K.H., Willcox D.C., Rodriguez B., Curb J.D.** *FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(37):13987-92.
65. **Papanicolaou K.N., Izumiya Y., Walsh K.** *Forkhead transcription factors and cardiovascular biology*. Circ Res. 2008;102(1):16-31.
66. **Babar I.A., Czochor .J, Steinmetz A., Weidhaas J.B., Glazer P.M., Slack F.J.** *Inhibition of hypoxia-induced miR-155 radiosensitizes hypoxic lung cancer cells*. Cancer Biol Ther. 2011; 12:908-914.
67. **Richard Seonghun Nho, Polla Hergert.** *FoxO3a and disease progression*. World J Biol Chem. 2014; 5(3): 346–354. .
68. **Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y., Hu L.S., Cheng H.L., Jedrychowski M.P., Gygi S.P., Sinclair D.A., Alt F.W., Greenberg M.E.** *Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase*. Science. 2004;303(5666):2011-5.
69. **You H., Mak T.W.** *Crosstalk between p53 and FOXO transcription factors*. Cell Cycle. 2005; 4:37–38.
70. **Dejean A.S., Beisner D.R., Ch'en I.L., Kerdiles Y.M., Babour A., Arden K.C., Castrillon D.H., DePinho R.A., Hedrick S.M.** *Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells*. Nat Immunol. 2009;10(5):504-13.
71. **Hu MC1, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F., Yang J.Y., Zou Y., Bao S., Hanada N., Saso H., Kobayashi R., Hung M.C.** *IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a*. Cell. 2004;117(2):225-37.
72. **Hagenbuchner J., Ausserlechner M.J.** *Mitochondria and FOXO3: breath or die*. Front Physiol. 2013;4:147.

73. **Obexer P1, Hagenbuchner J, Unterkircher T, Sachsenmaier N., Seifarth C., Böck G., Porto V., Geiger K., Ausserlechner M.** *Repression of BIRC5/survivin by FOXO3/FKHRL1 sensitizes human neuroblastoma cells to DNA damage-induced apoptosis.* Mol Biol Cell. 2009;20(7):2041-8.
74. **Motta M.C., Divecha N., Lemieux M., Kamel C., Chen D., Gu W., Bultsma Y., McBurney M., Guarente L.** *Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors.* Cell 2004;116:551–563.
75. **Yao H., Sundar I.K., Ahmad T., Lerner C., Gerloff J., Friedman A.E., Phipps R.P., Sime P.J., McBurney M.W., Guarente L., Rahman I.** *SIRT1 protects against cigarette smoke-induced lung oxidative stress via a FOXO3-dependent mechanism.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014;306(9):L816-28. .
76. **Pace E., Ferraro M., Di Vincenzo S., Gerbino S., Bruno A., Lanata L., Gjomarkaj M.** *Oxidative stress and innate immunity responses in cigarette smoke stimulated nasal epithelial cells.* Toxicol In Vitro. 2014;28(2):292-9. .
77. **Pace E., Ferraro M., Siena L., Scafidi V., Gerbino S., Di Vincenzo S., Gallina S., Lanata L., Gjomarkaj M.** *Carbocysteine regulates innate immune responses and senescence processes in cigarette smoke stimulated bronchial epithelial cells.* Toxicol Lett. 2013;223(2):198-204. .
78. **Pace E., Ferraro M., Di Vincenzo S., Cipollina C., Gerbino S., Cigna D., Caputo V., Balsamo R., Lanata L., Gjomarkaj M.** *Comparative cytoprotective effects of carbocysteine and fluticasone propionate in cigarette smoke extract-stimulated bronchial epithelial cells.* Cell Stress Chaperones. 2013;18(6):733-43.
79. **Brandolini L., Allegretti M., Berdini V., Cervellera M.N., Mascagni P., Rinaldi M., Melillo G., Ghezzi P., Mengozzi M., Bertini R.** *Carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-LYS) is a selective scavenger of reactive oxygen intermediates (ROIs).* Eur Cytokine Netw. 2003; 14(1): 20-6.
80. **Rampoldi C., Caminiti G., Centanni S., Noavero N.E., Abraham W.M., Allegra L.** *Contributo personale sulla protezione da esposizione all'ozono da parte della Carbocisteina (SCMC).* Giorn. It. Mal. Tor. 2000; 54, Supp. 3.
81. **Carpagnano G.E., Resta O., Foschino-Barbaro M.P., Spanevello A., Stefano A., Di Gioia G., Serviddio G., Gramiccioni E.** *Exhaled Interleukine-6 and 8-isoprostane in obstructive pulmonary disease: effect of carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-Lys).* Eur J Pharmacol. 2004;505(1-3):169-75.
82. **Fujii S., Hara H., Araya J., Takasaka N., Kojima J., Ito S., Minagawa S., Yumino Y., Ishikawa T., Numata T., Kawaishi M., Hirano J., Odaka M., Morikawa T., Nishimura S., Nakayama K., Kuwano K.** *Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease.* Oncoimmunology. 2012;1(5):630-641.
83. **Tomita K., Caramori G., Lim S., Ito K., Hanazawa T., Oates T., Chiselita I., Jazrawi E., Chung K.F., Barnes P.J., Adcock I.M.** *Increased p21(CIP1/WAF1) and B cell lymphoma leukemia-x(L) expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers.* Am J Respir Crit Care Med. 2002;166(5):724-31.
84. **Steinman R.A., Hoffman B., Iro A., Guillouf C., Liebermann D.A., el-Houseini M.E.** *Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation.* Oncogene. 1994;9(11):3389-96.
85. **Chiappara G., Gjomarkaj M., Virzì A., Sciarrino S., Ferraro M., Bruno A., Montalbano A.M., Vitulo P., Minervini M.I., Pipitone L., Pace E.** *The role of p21 Waf1/Cip1 in large airway epithelium in smokers with and without COPD.* Biochim Biophys Acta. 2013;1832(10):1473-81. .

86. **Hwang J.W., Rajendrasozhan S., Yao H., Chung S., Sundar I.K., Huyck H.L., Pryhuber G.S., Kinnula V.L., Rahman I.** *FOXO3 deficiency leads to increased susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation, airspace enlargement, and chronic obstructive pulmonary disease.* J Immunol. 2011; 187: 987–998.
87. **Durham A.L., Adcock I.M.** *The relationship between COPD and lung cancer.* Lung Cancer. 2015; 90(2):121-7