



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA  
APPLICATA ALLA BIOMEDICINA

TESI DI LAUREA

“Sirtuine, restrizione calorica ed invecchiamento: importanza  
della stimolazione di SIRT1 in relazione ai suoi rapporti di  
reciproca inibizione con la proteina mTOR”

Relatore:  
**Prof. Luca Giovannini**

Candidato:  
**Walter Pompella**

Anno accademico 2013/2014

Ai miei nonni paterni e materni

Ai miei genitori

E a chi mi vuole bene

Con affetto

*“STUDIO È VITA”*

# Indice

<b>Indice .....</b>	<b>1</b>
<b>Riassunto .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introduzione</b>	
<b>2. Sirtuine</b>	
2.1 Storia.....	6
2.2 Proprietà biochimiche.....	7
2.3 Funzioni .....	8
<b>3. La sirtuina 1</b>	
3.1 Proprietà biochimiche di SIRT1 .....	10
3.2 Regolazione di SIRT1 .....	11
<b>4. mTOR</b>	
4.1 Storia.....	15
4.2 Proprietà biochimiche.....	15
4.3 mTORC1 .....	17
4.4 mTORC2 .....	21
4.5 SIRT1 e mTOR: reciproca inibizione.....	23
<b>5. Sirtuine, Restrizione calorica (RC) e invecchiamento</b>	
5.1 Teorie dell'invecchiamento .....	25
5.2 RC e invecchiamento.....	27
5.3 RC e SIRT1 .....	31
5.4 Nuovi mimetici della RC.....	32

## **6 SIRT1 e telomeri**

## **7 Polifenoli**

7.1 Attività dei composti fenolici .....	37
7.2 Ruolo anti-aging del resveratrolo .....	39
7.3 Quercetina.....	42
7.4 Berberina .....	44
7.5 Catechina .....	45
7.6 Malvidina.....	45

## **8. Scopo della tesi**

## **9. Materiali e metodi**

9.1 Colture cellulari .....	48
9.2 Western Blot.....	50
9.3 Analisi Statistica.....	53

## **10. Risultati**

10.1 Stimolazione di SIRT1 .....	54
10.2 Inibizione di mTOR.....	58

## **11. Discussione**

## **12. Conclusioni**

## **13. Bibliografia**

## Riassunto

**Introduzione.** Le Sirtuine (SIRT) hanno guadagnato nel tempo una notevole attenzione in campo medico grazie al loro ruolo di sensori metabolici e di mediatori della sopravvivenza cellulare in condizioni di stress, quali ad esempio la restrizione calorica (RC) e l'esercizio fisico, nelle quali la loro trascrizione risulta attivata. Negli Eucarioti la famiglia delle Sirtuine è formata da sette proteine (SIRT1,2,3,4,5,6 e 7), tra queste quella su cui si sono concentrati la maggior parte degli studi è la SIRT1. Dalla prima pubblicazione che descrisse SIRT 1 come promotore del lifespan, molti studi si sono focalizzati sulla relazione tra Sirtuine, RC ed invecchiamento. Infatti, per spiegare i meccanismi biologici dell'invecchiamento fisiologico e ottenere una maggiore aspettativa di vita sono state formulate numerose ipotesi e sono stati condotti numerosi studi in diversi organismi, dai batteri all'uomo. Tra i diversi approcci di ricerca e interventi anti-aging, la riduzione dell'intake calorico rimane la via più accreditata. Studi in numerose specie (lieviti, elminti, mammiferi) hanno mostrato che la RC può ridurre l'incidenza e rallentare l'insorgenza di patologie legate all'età (malattie cardiovascolari e neurodegenerative), migliorare la resistenza allo stress, decelerare il declino funzionale ed aumentare il lifespan. Inoltre, la restrizione calorica promuoverebbe la sopravvivenza cellulare mediante induzione di SIRT1, che a sua volta sarebbe in grado di deacetilare proteine citoplasmatiche e nucleari che controllano processi quali l'apoptosi ed il metabolismo cellulare. A questo proposito, negli ultimi anni molti studi hanno evidenziato l'importanza in questo contesto di mTOR, una serina/treonina chinasi che sembra promuovere l'invecchiamento in molti organismi animali, agendo in modo inibitorio rispetto a SIRT1.

**Scopo.** L'importante ruolo che SIRT1 assume nell'invecchiamento è legato, oltre a quanto appena visto, soprattutto alla sua azione inibitoria su mTOR. Ciò è di notevole importanza, soprattutto se si considera che la disregolazione del segnale mTORC1 altera il metabolismo corporeo ed è causa di affezioni età correlate, invecchiamento per inibizione dell'autofagia (processo necessario al prolungamento della vita che tende a ridursi con il procedere dell'età) e affezioni tumorali in cui la proteina è iperegolata. Lo scopo della presente tesi sperimentale è quello di andare a verificare se resveratrolo, berberina, quercetina, catechina e malvidina, determinano, oltre ad una attivazione di SIRT1, anche una inibizione di mTOR.

**Materiali e metodi.** Sono state utilizzate cellule HeLa, cellule tumorali isolate da un cancro della cervice uterina. Le cellule sono state trattate con: 1) Resveratrolo (5;10  $\mu$ M), 2) Berberina (5;10  $\mu$ M), 3) Quercetina (10; 25  $\mu$ M), 4) Catechina (5;10  $\mu$ M), 5) Malvidina (10;20  $\mu$ M). I tempi di esposizione sono stati di 3 e 6 ore. Dopo il trattamento le cellule sono state lisate e l'espressione di SIRT1 e di mTOR è stata valutata mediante Western Blot.

**Risultati.** Inizialmente le cellule sono state trattate con le diverse sostanze, alle diverse concentrazioni (indicate tra parentesi) per un tempo di incubazione di 3 ore. È stato possibile evidenziare, tramite l'analisi con Western Blot, un aumento statisticamente significativo dell'attività di SIRT1 ( $p < 0,0001$ ). Ripetendo gli esperimenti con le medesime sostanze alle stesse concentrazioni e variando solamente il tempo di incubazione (6 ore), è stato possibile evidenziare, anche in queste condizioni, un incremento statisticamente significativo dell'espressione di SIRT1. I dati in letteratura mettono in evidenza che SIRT1 esercita una azione inibitoria sulla proteina mTOR. A questo proposito ci aspettiamo che le sostanze testate, potenziando l'attivazione di SIRT1, abbiano anch'esse un'azione inibitoria su mTOR.

**Conclusioni.** I dati analizzati evidenziano che le sostanze testate sono in grado di attivare SIRT1, determinando così un rallentamento dell'invecchiamento e un aumento del lifespan. In conclusione, queste sostanze potrebbero assumere un ruolo importante nell'insorgenza di tutte quelle patologie correlate all'età, portando così all'ottenimento di benefici per la salute simili a quelli forniti dalla restrizione calorica.

## 1.Introduzione

L'invecchiamento, nella sua definizione più generale, può essere inteso come l'insieme di tutti quei cambiamenti fisiologici e/o patologici che si verificano con l'avanzare dell'età. Con il progredire della senescenza infatti si possono verificare tutta una serie di alterazioni fisiologiche, biochimiche e metaboliche a carico dell'organismo che molto spesso ne mettono a repentaglio l'esistenza. L'integrità morfologica e funzionale dell'organismo è continuamente insidiata da fattori nocivi esogeni ed endogeni (dalle radiazioni ionizzanti e ultraviolette, alle specie reattive dell'ossigeno, dalle sostanze cancerogene e mutagene presenti nell'ambiente e nei cibi ecc.) e perfino da possibili errori metabolici dell'organismo stesso. Per sopravvivere, le cellule hanno sviluppato, fin dall'inizio dell'evoluzione, una serie di meccanismi di difesa e di riparazione per neutralizzare questi danni.

A questo proposito, per spiegare i meccanismi biologici dell'invecchiamento fisiologico e ottenere una maggiore aspettativa di vita sono state formulate numerose ipotesi e sono stati condotti numerosi studi in diversi organismi, dai batteri all'uomo. Tra i diversi approcci di ricerca e interventi anti-aging, la riduzione dell'*intake* calorico rimane la via più accreditata. Il regime restrittivo implica una riduzione del 30-40% delle calorie rispetto all'assunzione considerata "normale" per la specie in questione. Studi in numerose specie (lieviti, elminti, mammiferi) hanno mostrato che la restrizione calorica (RC) può ridurre l'incidenza e rallentare l'insorgenza di patologie legate all'età (malattie cardiovascolari e neurodegenerative), migliorare la resistenza allo stress, decelerare il declino funzionale e determinare un aumento del *lifespan*. Se l'efficacia di tale approccio è documentata da una letteratura piuttosto corposa, dall'altra parte, negli ultimi anni, molti studi hanno evidenziato un potenziale ruolo in questo contesto delle Sirtuine.

Infatti, la RC è in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare proprio mediante induzione della deacetilasi SIRT1, che a sua volta sarebbe in grado di deacetilare proteine citoplasmatiche e nucleari che controllano processi quali l'apoptosi ed il metabolismo cellulare. Inoltre, negli ultimi anni è stata messa in luce l'importanza in questo contesto anche di un'altra proteina, ovvero di mTOR, una serina/treonina chinasi che sembra promuovere l'invecchiamento in molti organismi animali, agendo in modo inibitorio rispetto a SIRT1.

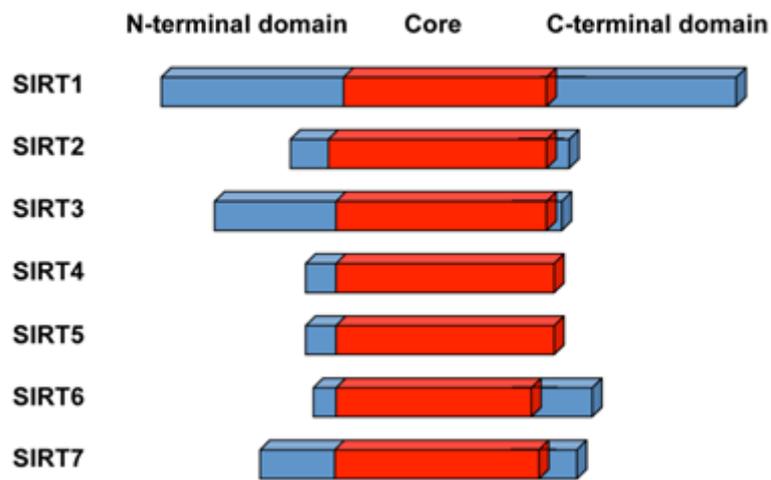
## 2. Sirtuine

### 2.1 Storia

Le sirtuine costituiscono una famiglia di proteine ad attività deacetilasi  $\text{NAD}^+$  dipendenti in grado di deacetilare proteine istoniche e diversi fattori trascrizionali. Originariamente vennero identificate come appartenenti al gruppo di proteine MAR1 (Mating-Type Regulator 1) capaci di agire sulla repressione e/o attivazione genica; Klar e colleghi [1] scoprirono MAR1 in virtù di una mutazione spontanea che causava sterilità in *Saccharomyces Cerevisiae*. Successivamente venne conferito alle sirtuine un importante ruolo biochimico e molecolare nel lievito *Saccharomyces Cerevisiae* da cui derivò il nome di SIR2 (Silent Information Regulator 2) [2]. Gottlieb e Esposito [3] dimostrarono, dieci anni dopo questa iniziale scoperta, che Sir2 era l'unico gene SIR richiesto per sopprimere la ricombinazione tra le 100-200 copie di geni codificanti RNA ribosomale ripetuti in tandem sul cromosoma XII. Dal 1991, grazie soprattutto al lavoro di Gottschling e colleghi [4], era anche noto che Sir2 era in grado di silenziare alcuni geni posti in prossimità dei telomeri. Due anni più tardi, Braunstein et al. dimostrarono che regioni silenti poste al livello dei telomeri e loci mating-type risultavano associate a istoni relativamente ipoacetilati al livello del gruppo  $\epsilon$ -amino di residui di lisina N-terminali [5]. Una overespressione di Sir2 causava una notevole deacetilazione degli istoni, una caratteristica in più che distingueva Sir2 dagli altri geni SIR. Nel 1995, Brachman et al. [6] and Derbyshire et al. [7] individuarono in *S.Cerevisiae* la presenza di altri quattro geni omologhi a SIR2 che chiamarono HST 1-4 (*homologues of Sir2*). Successivamente Sir2 venne identificata nel moscerino della frutta (*Drosophila Melanogaster*) e nel verme *Caenorhabditis elegans*. In questi organismi Sir2 è coinvolta nella regolazione di vari pathway metabolici inclusi quelli riguardanti l'invecchiamento e la longevità.

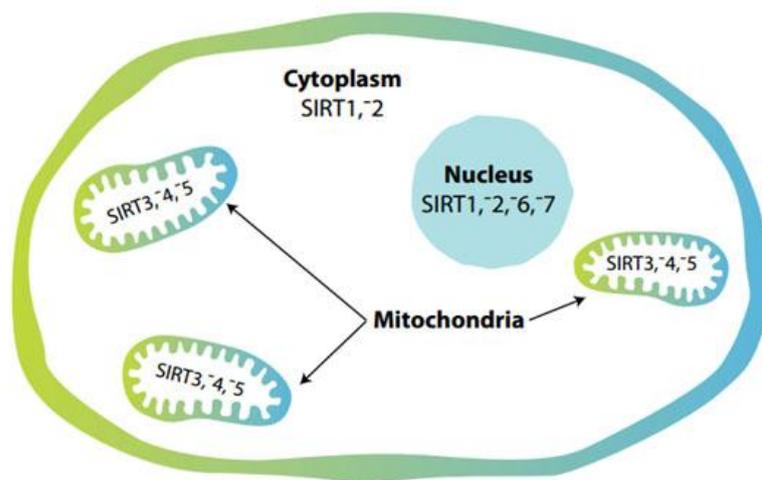
## 2.2 Proprietà biochimiche

Le sirtuine sono presenti sia negli Eucarioti che nei Procarioti. Negli Eucarioti la famiglia delle sirtuine è costituita da sette proteine (SIRT1 – SIRT7), che si differenziano per la specificità tissutale, localizzazione cellulare, attività enzimatica e target molecolari. L'analisi filogenetica delle sequenze amminoacidiche [8] ha consentito di suddividere le sirtuine in quattro classi: SIRT1 – SIRT3 appartengono alla classe I, SIRT4 alla classe II, SIRT5 alla classe III, e SIRT6 e SIRT7 alla classe IV.



**Figura 1.** Domini delle sette sirtuine umane

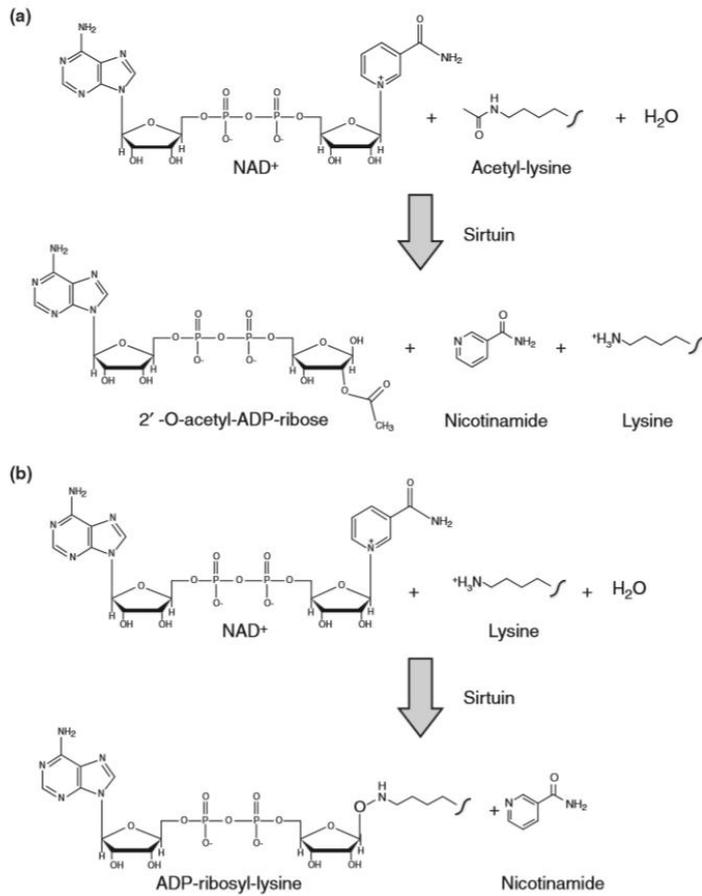
Per quanto riguarda la loro struttura, le sirtuine sono costituite da un dominio centrale catalitico di 275 amminoacidi in grado di legare il NAD<sup>+</sup>, altamente conservato nelle cellule eucariotiche, e da una sequenza N-terminale e/o C-terminale di lunghezza variabile (**Figura 1**) che è responsabile delle diverse proprietà biologiche e funzionali di ciascuna di esse. Dal punto di vista della localizzazione cellulare, le sirtuine dei mammiferi occupano tre differenti compartimenti: SIRT1, -2, -6, -7 sono localizzate nel nucleo; SIRT1 e SIRT2 sono dislocate anche nel citoplasma, mentre SIRT3, -4, -5 sono localizzate nei mitocondri (**Figura 2**).



**Figura 2.** Localizzazione subcellulare delle sirtuine [9]

### 2.3 Funzioni

Le sirtuine accoppiano la deacetilazione di un residuo di lisina alla idrolisi di una molecola di  $\text{NAD}^+$  tramite il trasferimento del gruppo acetile all'ADP ribosio per formare 2'-O-acetil-ADP-ribosio e nicotinamide (NAM) (**Figura 3.a**). Dal momento che questa reazione è  $\text{NAD}^+$  dipendente e il rapporto  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  è determinato dallo stato nutrizionale della cellula, le sirtuine collegano direttamente il signaling metabolico cellulare allo stato di modificazioni post-traduzionali delle proteine. Oltre a influenzare il rapporto  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , questa reazione è anche regolata da uno dei suoi prodotti, la nicotinamide, che è un inibitore non competitivo delle sirtuine. L'altro prodotto della reazione, il 2'-O-acetil-ADP-ribosio, sembra invece facilitare la formazione e il silenziamento dell'eterocromatina, regolare i canali ionici e modulare lo stato cellulare redox [10]. Alcune sirtuine non esibiscono una attività deacetilasica, ma agiscono come mono-ADP-ribosiltransferasi, catalizzando il trasferimento del gruppo ADP-ribosio dal  $\text{NAD}^+$  a proteine accettrici in una modificazione post-traduzionale chiamata ADP-ribosilazione. Questa reazione produce proteine mono-ADP-ribosilate e, similmente alle reazioni di deacetilazione, viene rilasciata anche la nicotinamide (**Figura 3.b**) [11].

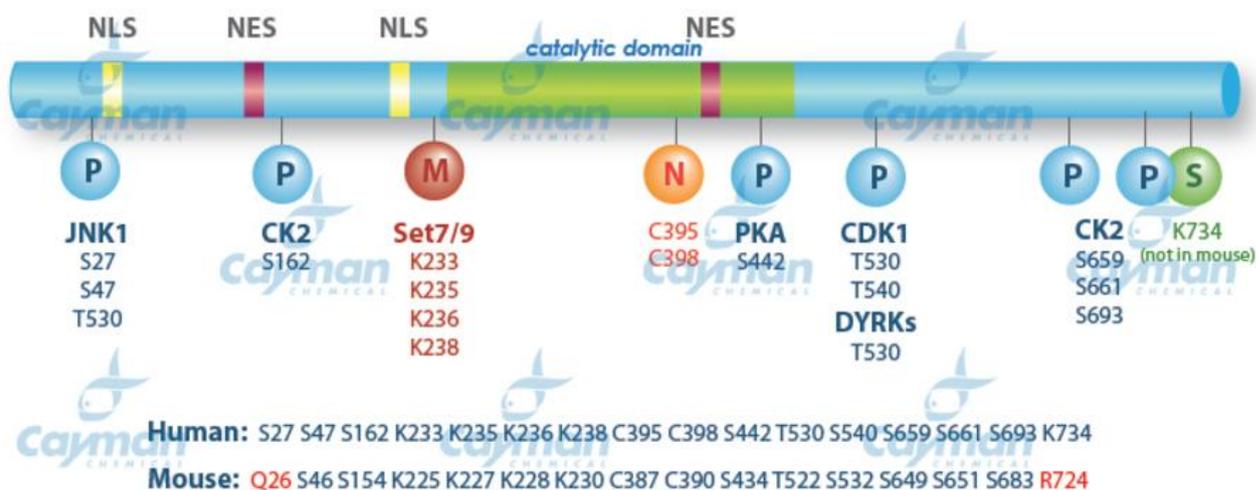


**Figura 3.** Reazioni tipiche catalizzate dalle sirtuine. (a) La deacetilazione di un residuo di lisina richiede il NAD<sup>+</sup> come cofattore, con produzione di una proteina deacetilata, la nicotinamide, e il 2'-O-acetil-ADP-ribosio. (b) Alcune sirtuine sono ADP-ribosiltransferasi, ovvero attaccano il gruppo ADP-ribosio del NAD<sup>+</sup> a un ε-amino gruppo di un residuo di lisina, con rilascio di nicotinamide (NAM).

### 3. Sirtuina 1

#### 3.1 Proprietà biochimiche di SIRT1

Tra le sette sirtuine che ritroviamo nei mammiferi, quella più studiata è la sirtuina 1 (SIRT1), l'omologa di Sir2 del lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Dal punto di vista strutturale, la SIRT1 umana contiene il dominio catalitico altamente conservato delle sirtuine e entrambe le estensioni N- e C- terminali che si estendono per circa 240 amminoacidi. Queste estensioni fungono da piattaforme per l'interazione con proteine regolatorie e vari substrati. In totale, la SIRT1 umana è costituita da 747 amminoacidi (**Figura 4**) e contiene al suo interno due segnali di localizzazione nucleare (NLS) e due segnali di esportazione nucleare (NES)[12]. La funzionalità bilanciata di questi segnali determina la presenza di SIRT1 sia nel compartimento nucleare che in quello citoplasmatico.



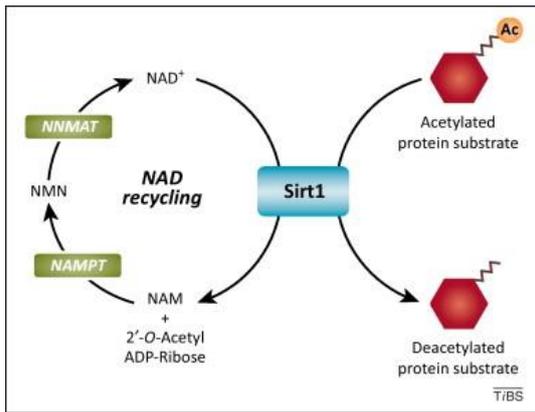
**Figura 4.** I principali domini della SIRT1 umana. La figura schematizza l'estensione del dominio di omologia e i vari segnali di localizzazione nucleare (NLS) e di esportazione nucleare (NES). Nella figura sono anche indicati i residui amminoacidici soggetti a fosforilazione da JNK1 e Ciclina/Cdk1 e il residuo amminoacidico soggetto a sumoilazione.

**Tabella1.** Riassunto dei vari domini della SIRT1 umana

	Regioni/Amminoacidi	Funzioni
Dominio di omologia sirtuinico	Aa 244-498	Attività enzimatica
Segnale di Localizzazione Nucleare	NLS1 (aas 34-44) NLS2 (aas 232-239)	Importazione nucleare
Segnale di Esportazione Nucleare	NES1 (aas 146-?) NES2 (aas 435-443)	Esportazione nucleare
Fosforilazione	(mediata da JNK1) Ser27, Ser47, Thr530  (mediata da Ciclina/cdk1) Thr530, Ser540	Specifica attivazione verso H3, ma non p53  Aumenta l'attività deacetilasica
Sumoilazione	Lys734	Aumenta l'attività deacetilasica

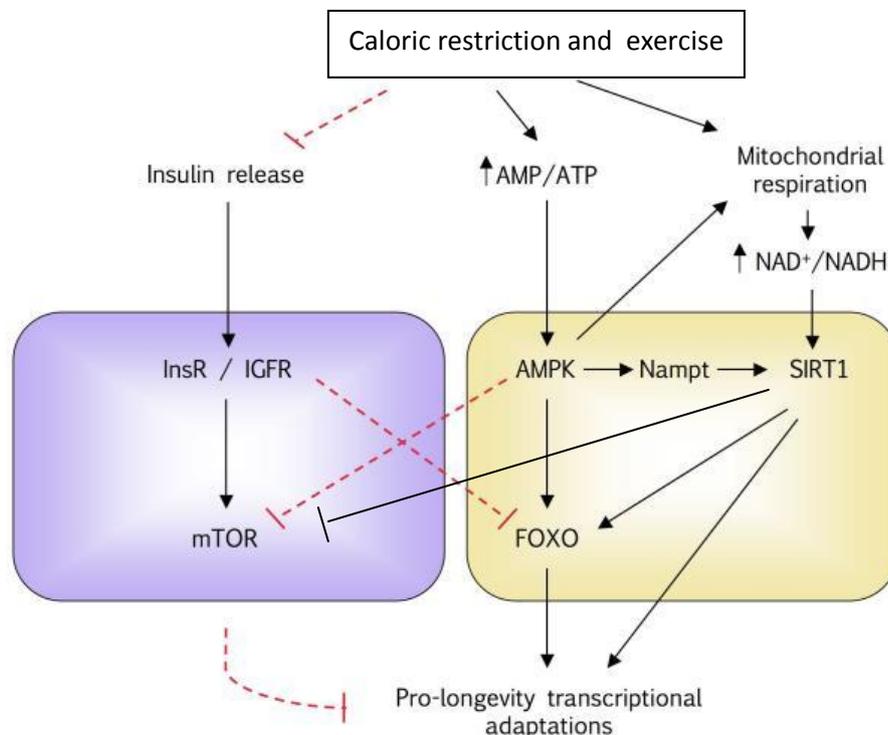
### 3.2 Regolazione di SIRT1

Tra i vari meccanismi di regolazione dell'attività di SIRT1, vi sono quelli che regolano le concentrazioni intracellulari del NAD<sup>+</sup>. Dal momento che l'attività enzimatica di SIRT1 è NAD<sup>+</sup> dipendente [13], cambiamenti nella concentrazione di questo nucleotide possono portare a cambiamenti nell'attività di SIRT1. In particolare, la restrizione calorica (RC) e l'esercizio fisico attivano il NAMPT (nicotinamide fosforibosiltransferasi), una transferasi che favorisce la rigenerazione del NAD<sup>+</sup> a partire dal NAM. Il NAMPT quindi con la sua attività determina una diminuzione della concentrazione di NAM (inibitore non competitivo di SIRT1) e un aumento dei livelli intracellulari di NAD<sup>+</sup>, con conseguente stimolazione dell'attività deacetilasica mediata da SIRT1 (**Figura 5.a**).



**Figura 5.a** Il NAM viene riciclato per rigenerare il NAD<sup>+</sup> grazie all'attività enzimatica del NAMPT (nicotinamide fosforibosiltransferasi), del NNMAT (mononucleotide adenil-transferasi) passando attraverso la formazione dell'intermedio nicotinamide mononucleotide (NMN). Il conseguente aumento dei livelli intracellulari del NAD<sup>+</sup> favoriscono la reazione deacetilasi mediata da SIRT1.

Inoltre, in condizioni di bassa disponibilità di nutrienti e di intenso sforzo fisico si verificano cambiamenti nel rapporto AMP/ATP al livello intracellulare (diminuisce la concentrazione di ATP e aumenta quella di AMP) che portano alla attivazione di una protein chinasi denominata AMPK (AMP-activated protein kinase). L'AMPK agisce infatti da sensore energetico, in quanto percepisce l'aumento della concentrazione dell'AMP e si attiva, portando così a un aumento dei livelli intracellulari del NAD<sup>+</sup> e conseguente stimolazione della attività di SIRT1 [14] (**Figura 5b**).



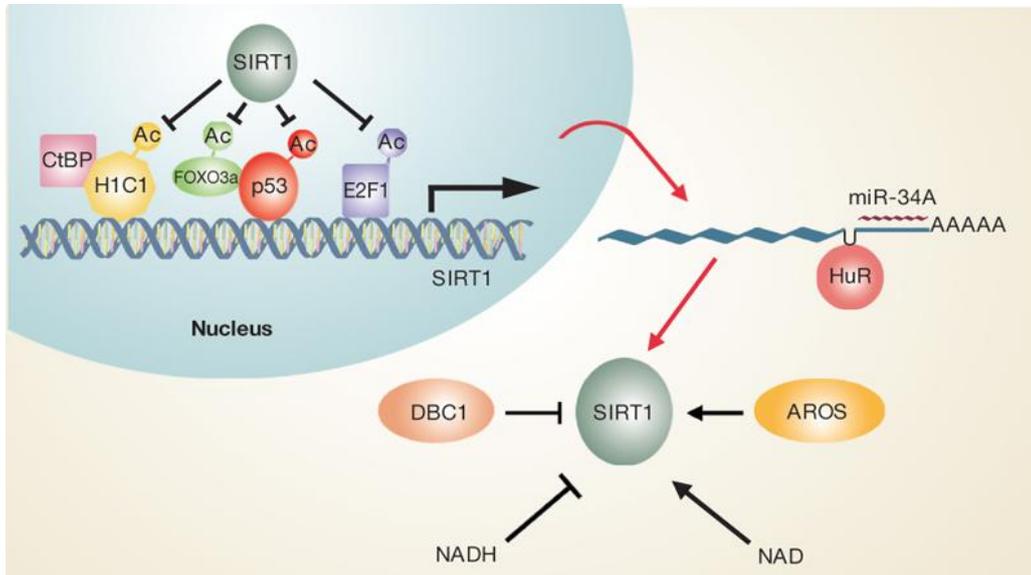
**Figura 5b.** Principali effetti mediati dalla restrizione calorica e dall'esercizio fisico

La RC gioca quindi un ruolo estremamente rilevante nella regolazione positiva dell'attività di SIRT1, comportando inoltre un prolungamento del *lifespan* in numerosi organismi animali modello, dal lievito fino ai primati [15]. Dopo la scoperta che le sirtuine costituiscono una classe di regolatori dell'invecchiamento altamente conservata, studi genetici in organismi semplici, come il lievito e il moscerino della frutta, suggeriscono che le sirtuine sono in grado di mediare gli effetti della RC [16]. In particolare nel lievito, la RC aumenta il rapporto NAD<sup>+</sup>/NADH attraverso elevati livelli di respirazione. Dal momento che la reazione di deacetilazione mediata da Sir2 consuma NAD<sup>+</sup>, un aumentato rapporto NAD<sup>+</sup>/NADH favorisce la reazione deacetilasica. Contemporaneamente, la RC aumenta la via di recupero del NAD<sup>+</sup> upregolando la nicotinamidasi Pnc1, un enzima che converte la nicotinamide in niacina. Dal momento che la nicotinamide è un prodotto della reazione di deacetilazione NAD<sup>+</sup> dipendente e un inibitore non competitivo delle sirtuine, l'attivazione della via di recupero in condizione di ridotto intake calorico è ritenuta essere un'altra importante evidenza che supporta la attivazione delle sirtuine in condizioni di restrizione calorica.

Numerose modificazioni post-trascrizionali possono influenzare l'attività di SIRT1. A tal proposito, dati in letteratura dimostrano che la sumoilazione [17] e la fosforilazione catalizzata da numerose chinasi [18-23] possono aumentare l'attività di SIRT1. La chinasi 1 ciclina dipendente (Cdk1) [24], la caseinchinasi (CK) [25] e la chinasi c-Jun N-terminale (JNK) [26] fosforilano direttamente SIRT1.

Molti autori hanno mostrato che SIRT1 può essere regolata al livello trascrizionale. I primi studi sulla espressione del gene SIRT1 tentarono di capire come i livelli di mRNA di SIRT1 aumentavano in risposta alla deprivazione dei nutrienti. In questi studi, FOXO3a, un membro della famiglia dei fattori di trascrizione FOXO, era in grado di aumentare indirettamente la trascrizione di SIRT1 di roditore attraverso il suo promotore prossimale. E' noto infatti che FOXO3a è in grado di modulare l'attività di SIRT1 mediante la sua interazione con p53 (il guardiano del genoma), e questa interazione è risultata essere dipendente dalla disponibilità dei nutrienti [27]. In assenza di questa interazione, p53 agisce come un repressore del promotore di SIRT1 [27]. A tal proposito è stato costruito un modello nel quale, in condizioni fisiologiche, p53 reprime SIRT1, e, in condizioni di ridotto intake calorico, FOXO3a in forma attiva interagisce con p53 e allevia l'inibizione

della trascrizione di SIRT1, probabilmente cambiando il bilancio dei coattivatori/corepressori sul promotore di SIRT1 (**Figura 6**).



**Figura 6.** Il promotore di SIRT1 viene regolato positivamente e negativamente dal legame di diversi fattori di trascrizione, incluso H1C1, CtBP, p53, FOXO3a e E2F1. L'acetilazione e quindi l'attività di molti di questi fattori sono controllati a turno da SIRT1. L'mRNA di SIRT1 è anche regolato dalla proteina che lega l'RNA HuR e dal microRNA p53-dipendente miR-34A. Infine, l'attività della proteina SIRT1 è regolata positivamente e negativamente tramite l'interazione con proteine come AROS e DBC1, nonché dallo stato metabolico generale, che è rispecchiato nel rapporto NAD/NADH.

Nel contesto della regolazione della attività di SIRT1 è risultato essere particolarmente importante il rapporto di reciproca inibizione tra SIRT1 e la proteina chinasi mTOR.

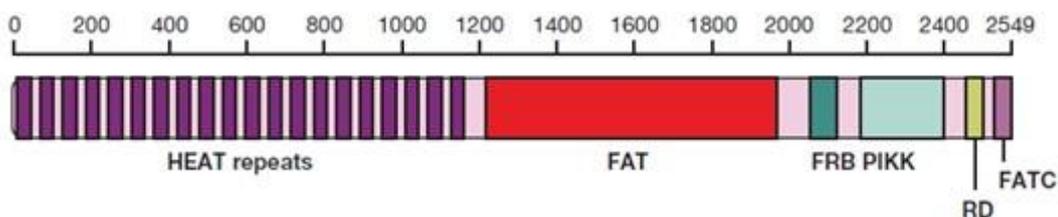
## 4.mTOR

### 4.1 Storia

mTOR (mammalian target of rapamycin) fu identificato e clonato [28-30] poco dopo la scoperta di due geni, TOR1 e TOR2, nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* durante uno screening genetico per la resistenza alla rapamicina [31,32]. La rapamicina fu originariamente scoperta come prodotto di un batterio (*Streptomyces hygroscopicus*) in un campione di terreno proveniente da *Rapa Nui* (isola di Pasqua). Questa tossina batterica agisce formando un complesso inibitorio con il proprio recettore intracellulare, la proteina FKBP12, che si lega a una regione presente all'estremità C-terminale delle proteine TOR denominato FRB, inibendo così l'attività di TOR [33,34].

### 4.2 Proprietà biochimiche

mTOR è una grande serina/treonina proteina chinasi che integra segnali provenienti da fattori di crescita, nutrienti e fattori di stress e controlla molteplici processi a valle, inclusi la traduzione dell'mRNA, la sintesi dei lipidi e dei nucleotidi, la progressione del ciclo cellulare, l'autofagia e la forma e la sopravvivenza delle cellule [35]. Dal punto di vista strutturale mTOR è costituita da 2549 amminoacidi e comprende diversi domini strutturali conservati (Figura 7). L'estremità N-terminale possiede 20 ripetizioni HEAT (da HuntingtinElongationfactor PP2A and Tor kinase) in tandem. Ciascuna ripetizione HEAT è costituita da due  $\alpha$  eliche di circa 40 amminoacidi, ciascuna con un proprio specifico pattern di residui idrofobici e idrofilici. Le ripetizioni HEAT in tandem sono presenti in molte proteine e sono implicate nelle interazioni proteina-proteina [36].

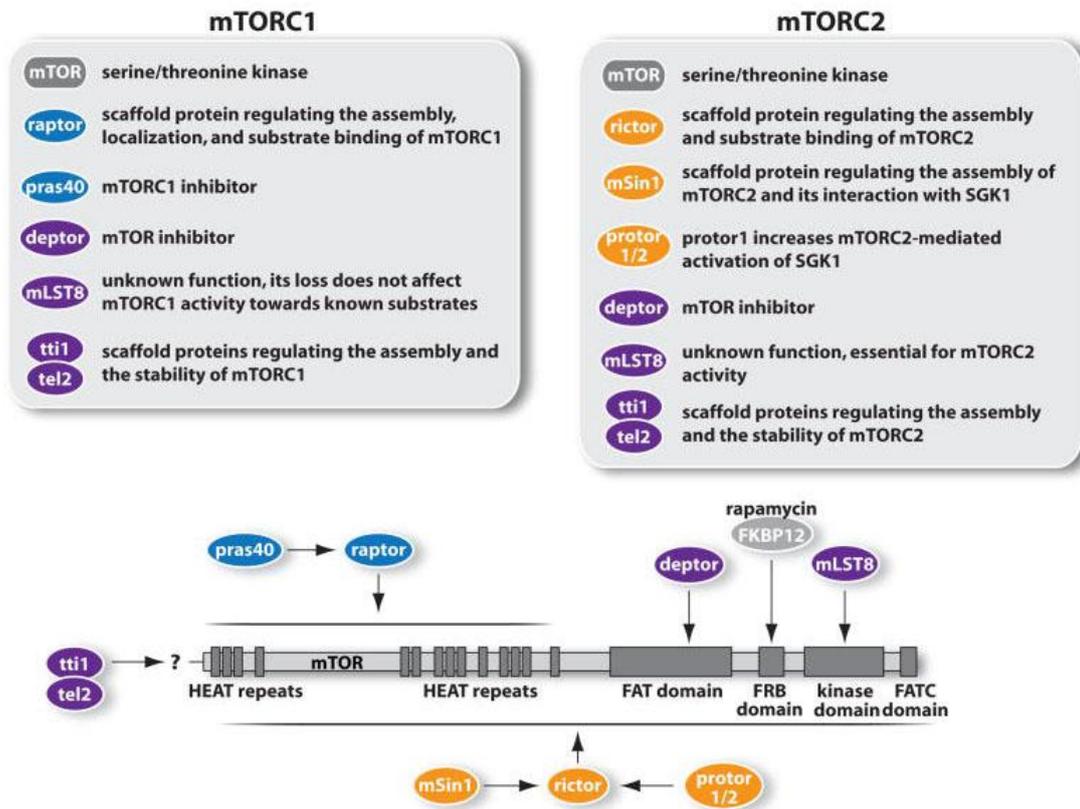


**Figura 7.** Domini strutturali di mTOR

L'estremità C-terminale di mTOR contiene il dominio chinasi PIKK (PI3-kinase-related kinase), che presenta una stretta omologia di sequenza con il dominio chinasi delle fosfoinositide 3-chinasi (PI3K), e il dominio FRB, che si trova subito a monte del dominio catalitico, su cui si va a legare il complesso inibitorio FKBP12-rapamicina. Inoltre mTOR contiene un dominio FAT (FRAP, ATM, TRAP) relativamente grande, che è presente anche in altre proteine PIKK [37] e un dominio regolatorio (RD) posto tra il dominio FAT e il dominio FATC. Il dominio FATC è assolutamente necessario per l'attività di mTOR, e la delezione di anche un solo amminoacido al livello di questo dominio abolisce l'attività di mTOR [38,39].

La proteina mTOR interagisce con diverse proteine per formare due complessi distinti denominati complesso mTOR 1 (mTORC1) e complesso mTOR 2 (mTORC2). mTORC1 e mTORC2 sono costituiti rispettivamente da sei e sette proteine (**Figura 8**):

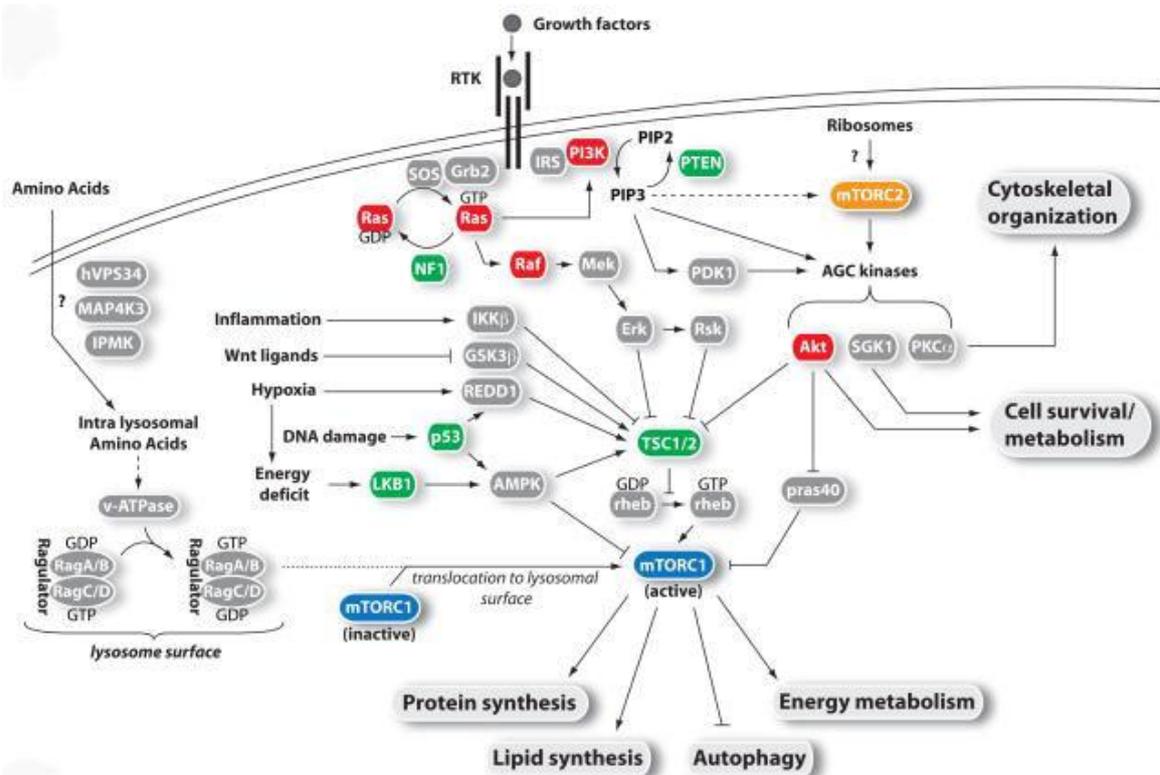
1. Sia mTORC1 che mTORC2 condividono la subunità catalitica di mTOR, una proteina simile alla subunità beta della proteina LST8/G dei mammiferi (mLST8/GβL), DEPTOR (DEP domain containing mTOR-interacting protein) e il complesso Tti1/Tel2;
2. Raptor (regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin) e PRAS40 (proline-richAktsubstrate 40 kDA) sono specifiche solo di mTORC1;
3. Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress activated mapkinase-interacting protein 1) e protor 1/2 (protein observed with rictor 1 e 2) fanno parte solamente di mTORC2.



**Figura 8.** Funzioni note dei vari componenti dei due complessi mTORC1 e mTORC2 [40]

### 4.3 mTORC1

Tra i due complessi mTOR quello maggiormente caratterizzato è mTORC1, e una caratteristica notevole del pathway di mTORC1 è il numero e la diversità dei segnali a monte che questo complesso percepisce. La via di trasduzione del segnale della PI3K/AKT/mTOR integra segnali input da almeno 5 segnali d'azione intracellulari e extracellulari come fattori di crescita (come l'insulina e l'IGF1), stress, stato energetico, ossigeno, e amminoacidi, per controllare diversi processi che vanno dalla sintesi delle proteine e dei lipidi alla autofagia. Tra i regolatori a monte di mTORC1 vi sono l'eterodimero TSC1/2, Akt e AMPK. Nello stato non fosforilato, TSC2 (tuberous sclerosis 2) eterodimerizza con TSC1 per promuovere l'attività GTPasica di Rheb (Ras homologue enriched in brain) il quale, una volta associata a GTP, promuove l'attivazione di mTORC1 [41,42]. L'attività di AKT si esplica, in questo contesto, inibendo TSC2 e provocando in questo modo una diminuzione dell'idrolisi del GTP da parte di Rheb con conseguente aumento dei complessi Rheb-GTP in grado di attivare mTORC1 (**Figura 9a**).



**Figura 9a.** Regolazione a monte di mTORC1 e i vari processi a valle da lui regolati [45].

Akt inoltre è in grado di modulare l'attività di mTORC1 in un meccanismo TSC1/2-indipendente che prevede la fosforilazione di PRAS40 (un inibitore di mTORC1) e la sua dissociazione da raptor con conseguente attivazione di mTORC1 [43-46]. Altre chinasi effettrici di questo pathway, come ERK1/2 (extracellular-signal-regulated kinase 1/2) e RSK1 (ribosomal S6 kinase) fosforilano direttamente il complesso TSC1/2 con conseguente inibizione di quest'ultimo e attivazione di mTORC1 [47-51].

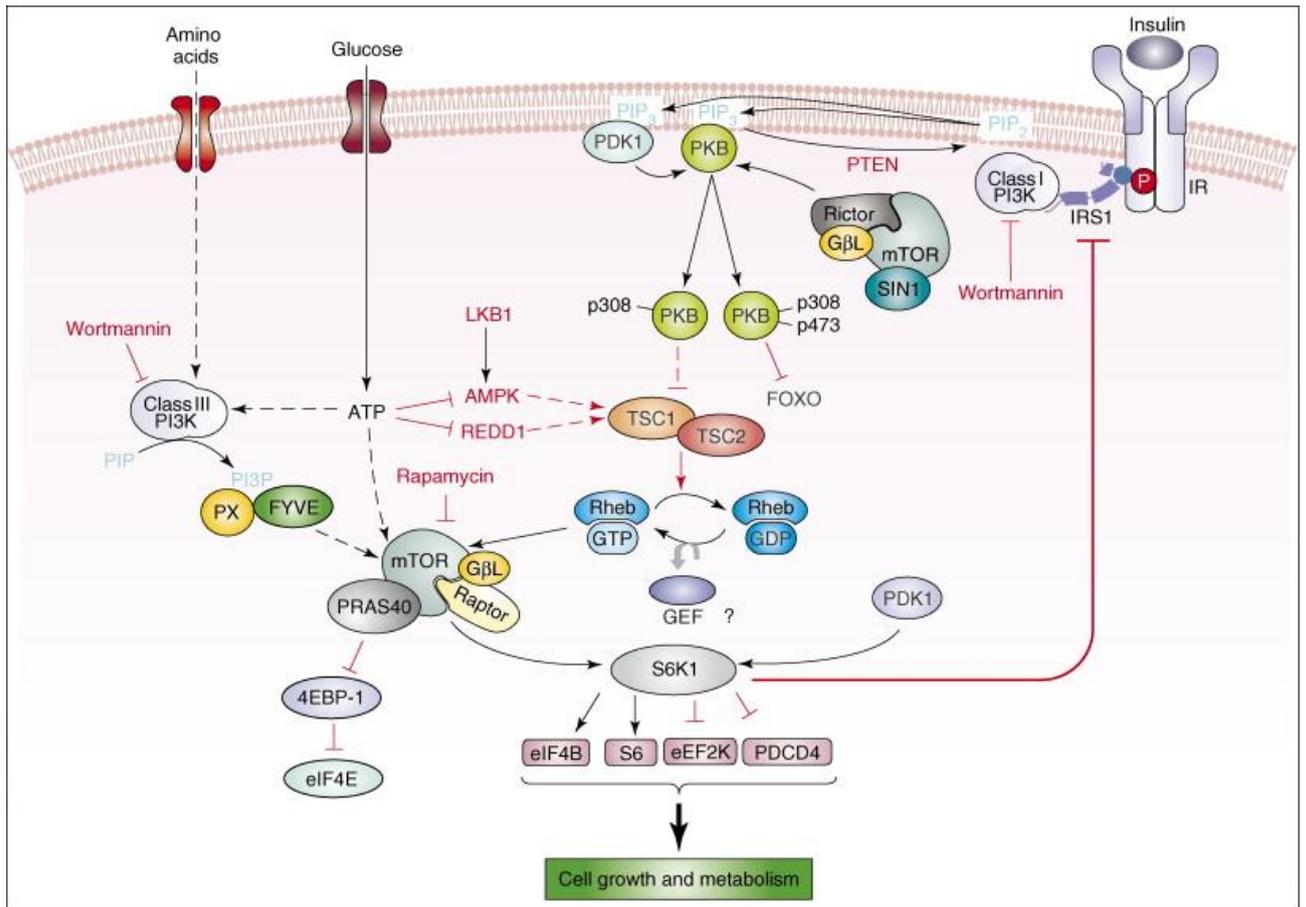
Similmente all'azione dei fattori di crescita, molti stress agiscono inoltre, almeno in parte, attraverso il complesso TSC1/2, come condizioni di bassi livelli di energia, di ipossia e danni al DNA. L'AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase), in risposta all'ipossia o a un basso stato energetico, fosforila TSC2 con conseguente diminuzione dell'idrolisi del GTP da parte di Rheb, aumento dei complessi Rheb-GTP e attivazione del complesso mTORC1 [52]. Come Akt, anche l'AMPK comunica direttamente con mTORC1, in quanto è in grado di fosforilare raptor, portando al legame di una proteina 14-

3-3 e alla inibizione allosterica di mTORC1 [53]. L'ipossia induce inoltre l'espressione di REDD1 (transcriptional regulation of DNA damage response 1) che attiva TSC2 mediante un meccanismo non ancora del tutto chiarito [54-56].

Anche il danno al DNA è in grado di modulare l'attività di mTORC1, in quanto induce l'espressione di TSC2 e di Pten (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), causando una downregolazione dell'intero asse PI3K-mTORC1 [57], e attiva l'AMPK attraverso un meccanismo che dipende dalla induzione della Sestrina1/2 [58]. Alcuni amminoacidi, in particolare leucina e arginina, sono infine in grado di attivare mTORC1 [59,60], ma sebbene sia stato dimostrato che gli amminoacidi agiscono indipendentemente dal complesso TSC1/2, il meccanismo molecolare tramite cui mTORC1 rileva gli amminoacidi intracellulari rimane ancora un grande mistero.

mTORC1 è inibito da un basso livello di nutrienti, da una carenza di fattori di crescita, da stress reduttivo, dalla caffeina, dalla rapamicina, dall'acido farnesiltiosalicilico e dalla curcumina. Per quanto riguarda i target molecolari regolati da mTORC1, i due bersagli meglio caratterizzati sono la proteina chinasi 1 p70-S6 (S6K1) e 4E-BP1, ovvero la proteina che lega il fattore eucariotico di iniziazione 4E. mTORC1 fosforila S6K1 su almeno due residui, causando per lo più la modificazione di un residuo di treonina (T389). Questo evento stimola la successiva fosforilazione di S6K1 ad opera di PDK1. La S6K1 attiva può ora stimolare l'inizio della sintesi proteica attraverso l'attivazione della proteina ribosomiale S6, un componente del ribosoma, e altri componenti dell'apparato trascrizionale. S6K1 può anche partecipare in un circuito di feedback positivo con mTORC1 fosforilando il dominio negativo di regolazione di mTOR su due siti, il che sembra stimolare l'attività di mTOR.

È stato dimostrato che mTORC1 fosforila almeno quattro residui di 4E-BP1 in maniera gerarchica. 4E-BP1 non fosforilato si lega strettamente al fattore iniziante la trascrizione eIF4E e previene il suo legame all'mRNA e il loro reclutamento al complesso di iniziazione ribosomiale. Sotto fosforilazione ad opera di mTORC1, 4E-BP1 rilascia eIF4E, permettendogli di svolgere la sua funzione. L'attività di mTORC1 sembra essere regolata da un'interazione dinamica tra mTOR e Raptor, mediata da GβL. (**Figura 9b**).

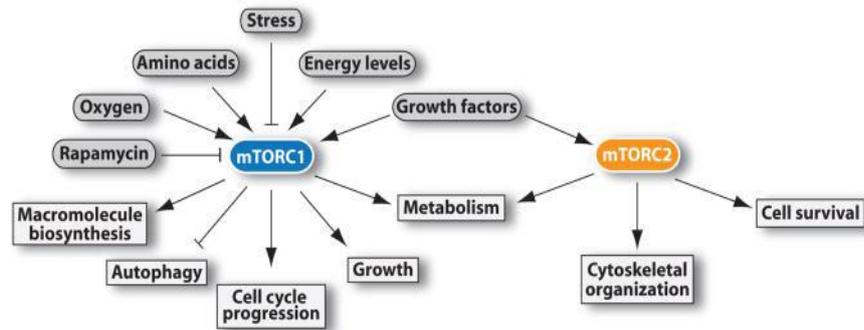


**Figura 9b.** I due bersagli di mTORC1 meglio caratterizzati sono la proteina chinasi 1 p70-S6 (S6K1) e 4E-BP1

Raptor e mTOR condividono una forte interazione nella regione N-terminale e una debole interazione alla estremità C-terminale vicino al dominio chinasi di mTOR. Quando sono avvertiti segnali stimolatori, come alti livelli di nutrienti o di energia, l'interazione tra mTOR e Raptor al C-terminale è indebolita e possibilmente completamente persa, permettendo l'attivazione dell'attività chinasi di mTOR. Quando i segnali stimolatori sono rimossi, ad esempio se vi sono bassi livelli di nutrienti, l'interazione tra mTOR e Raptor all'estremità C-terminale è rinforzata, disattivando fortemente la funzione chinasi di mTOR.

#### 4.4 mTORC2

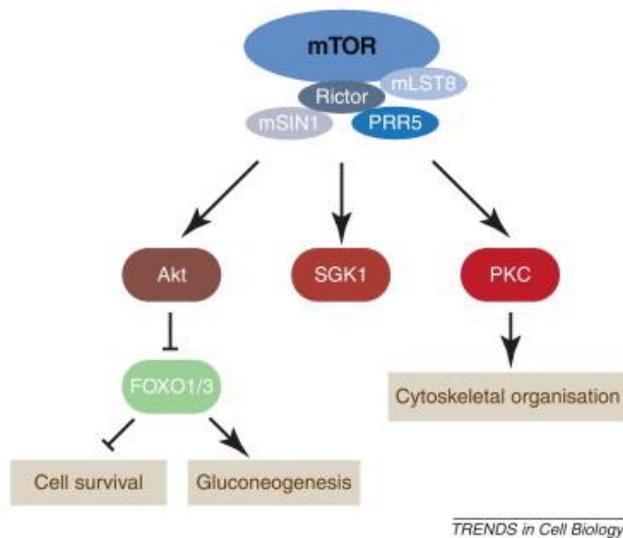
I complessi contenenti mTOR presentano diverse sensibilità nei confronti della rapamicina e nei confronti di segnali input a monte e segnali output a valle (**Figura 10**).



**Figura 10.** I vari segnali input a monte e i vari processi a valle regolati da mTORC1 e mTORC2

Per quanto riguarda mTORC2, esso risponde ai fattori di crescita e regola la sopravvivenza cellulare, l'organizzazione del citoscheletro e il metabolismo. Dal momento che il trattamento acuto con rapamicina non perturba il signaling di mTORC2 e dal momento che il complesso FKBP12-rapamicina non è in grado di legarsi al complesso mTORC2 intatto, originariamente si pensava che questo complesso era insensibile alla rapamicina [61,62]. Tuttavia la situazione è risultata essere poi più complessa dal momento che il trattamento a lungo termine con la rapamicina riduce il signaling di mTORC2 in alcuni, ma non in tutti, tipi cellulari [63,64], ma il motivo per cui solo alcuni tipi cellulari presentano una sensibilità di mTORC2 verso la rapamicina non è stato ancora chiarito.

A differenza del pathway di mTORC1, vi sono meno informazioni riguardo al pathway di mTORC2. Il signaling di mTORC2 è insensibile ai nutrienti ma risponde ai fattori di crescita come l'insulina attraverso meccanismi non ancora del tutto chiariti che richiedono PI3K. Un potenziale meccanismo include un nuovo ruolo dei ribosomi, dal momento che i ribosomi sono richiesti per la attivazione di mTORC2 e mTORC2 li lega tramite un meccanismo PI3K-dipendente [65]. mTORC2 controlla numerosi membri della sottofamiglia delle chinasi AGC incluse Akt, SGK1 (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1), e la PKC- $\alpha$  (protein kinase C- $\alpha$ ) (**figura 11**).

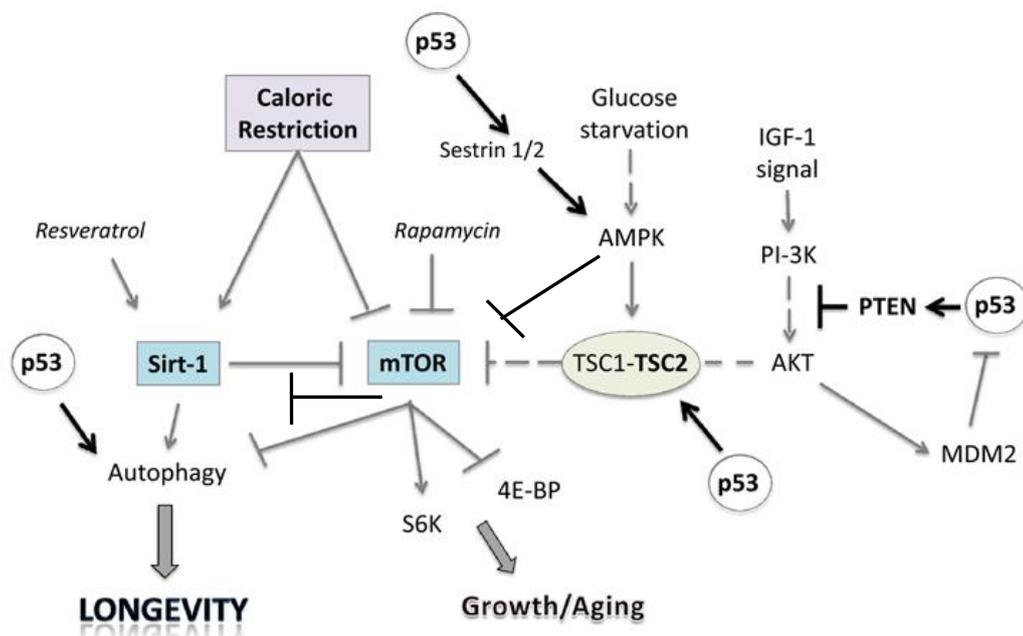


**Figura 11.** Principali chinasi e processi regolate da mTORC2

Akt regola processi cellulari come il metabolismo, sopravvivenza, apoptosi, crescita, e proliferazione attraverso la fosforilazione di diversi effettori. mTORC2 attiva direttamente Akt tramite la fosforilazione del suo motivo idrofobico (Ser473), un sito richiesto per la sua massima attivazione [66]. Una mancata fosforilazione del residuo di serina 473 di Akt associato a una deplezione di mTORC2 danneggia la fosforilazione di alcuni target di Akt, inclusi FOXO1/3a (forkhead box O1/3a), mentre altri target di Akt come TSC2 e GSK3- $\beta$  non vengono influenzati [67,68]. Il fatto che l'attività di Akt non viene completamente abolita in cellule che mancano di mTORC2 probabilmente spiega questi risultati. mTORC2 attiva anche direttamente SGK1, una chinasi che controlla il trasporto ionico e la crescita cellulare [69]. A differenza di Akt, l'attività di SGK1 è completamente bloccata dalla perdita di mTORC2. Dal momento che SGK1 controlla la fosforilazione di FOXO1/3a su residui che vengono fosforilati anche da Akt, la perdita dell'attività di SGK1 è probabilmente responsabile della riduzione della fosforilazione di FOXO1/3a in cellule prive di mTORC2. PKC- $\alpha$  è la terza chinasi AGC attivata da mTORC2, e la sua attivazione regola la forma cellulare influenzando l'actina del citoscheletro [70,71].

#### 4.5 SIRT1 e mTOR: reciproca inibizione

Il sistema sirtuinico e il pathway di mTOR sono implicati entrambi nel pathway della longevità, come evidenziano numerosi studi sperimentali. In particolare mTOR sembra promuovere l'invecchiamento in molti organismi animali, agendo in modo inibitorio rispetto a SIRT1. Nei mammiferi l'asse PI3K/Akt/mTOR viene attivato dalla disponibilità di nutrienti (glucosio, amminoacidi), insulina, citochine, radicali liberi e fattori di crescita. A sua volta mTOR inibisce SIRT1, aumenta la sintesi proteica e inibisce l'autofagia, favorendo così il processo di invecchiamento (**Figura 12**). Inoltre l'iperattivazione cellulare causa un segnale di resistenza a feedback. Ad esempio, con l'attivazione della chinasi S6 (S6K) mediata da mTOR si ha insulino resistenza. Tutte queste alterazioni possono essere connesse all'invecchiamento e alle patologie età-correlate, come tumori benigni e maligni, ipertrofia cardiaca, osteoporosi, sindrome metabolica, aterosclerosi, ipertensione, neuro degenerazione e degenerazione maculare età-correlata [72]. Di contro, la RC, l'esercizio fisico e il resveratrolo (un potente attivatore del sistema sirtuinico) attivano SIRT1 che a sua volta interferisce con il pathway PI3K/Akt/mTOR.



**Figura 12.** mTOR e SIRT1: inibizione reciproca

SIRT1 infatti inibisce mTOR e promuove l'autofagia, ossia quel processo che permette alle cellule di degradare ed eliminare i componenti vecchi o danneggiati prima che questi possano causare gravi danni alle stesse. Inoltre mTOR viene inibito anche dalla RC, dall'esercizio fisico e dall'AMPK. L'AMPK infatti è in grado di fosforilare raptor, portando al legame di una proteina 14-3-3 e alla inibizione allosterica di mTOR. Attraverso la regolazione di tutti questi processi, SIRT1 gioca quindi un ruolo determinante nel contrastare gli effetti pro-aging mediati da mTOR, consentendo così l'ottenimento di benefici per la salute e un miglioramento delle aspettative di vita.

## 5. Sirtuine, Restrizione calorica (RC) e invecchiamento

### 5.1 Teorie dell'invecchiamento

L'invecchiamento è un processo inevitabile che interessa tutti gli organismi viventi e nella sua definizione più generale, può essere inteso come l'insieme di tutti quei cambiamenti fisiologici e/o patologici che si verificano con l'avanzare dell'età. La ricerca sull'invecchiamento affascina da sempre la comunità scientifica e riscuote un crescente interesse da parte dei media a causa di una serie di aspetti quali, lo straordinario aumento dell'aspettativa media di vita nel mondo, il meno straordinario ma più significativo aumento dell'aspettativa di vita massima e l'aumento dei centenari in gruppi selezionati di popolazioni. Nonostante tale argomento sia diffusamente studiato, non sono state ancora completamente chiarite le cause specifiche alla base del processo di invecchiamento. Nel corso degli anni sono state, pertanto, formulate numerose teorie in relazione alla evoluzione delle conoscenze scientifiche:

1. Secondo la **teoria genica**, i geni che compongono il nostro DNA racchiudono in sé alcune caratteristiche che predispongono verso la longevità. Studi sui centenari hanno permesso infatti di identificare alcuni geni promotori della longevità, posti in specifiche posizioni del cromosoma. Questo porta a ipotizzare che, a parità di condizioni ambientali e socio-economiche, l'influenza maggiore sulla longevità sia proprio a carico dei fattori genetici.
2. Secondo invece la controversa **teoria evoluzionistica**, formulata per la prima volta negli anni '40, l'invecchiamento sarebbe dovuto a una riduzione delle capacità di selezione naturale. Dato che l'evoluzione tende a ottimizzare le capacità riproduttive di una specie, sarebbe l'evoluzione stessa a favorire l'invecchiamento via via che il potenziale riproduttivo dell'individuo si riduce, con il fine di aumentare la fertilità di una specie.
3. Secondo la **teoria dei radicali liberi**, formulata agli inizi degli anni '50, lo stress ossidativo sarebbe alla base dell'invecchiamento. Durante le reazioni di ossidazione che avvengono fisiologicamente nell'organismo, vengono prodotte delle sostanze molto reattive, i radicali liberi, in grado di danneggiare le cellule e anche il DNA.

Se viene alterato l'equilibrio tra la produzione e l'eliminazione di queste sostanze (stress ossidativo) i radicali liberi si accumulano causando danni cellulari sempre maggiori che inducono l'invecchiamento e la morte cellulare.

4. La **teoria della senescenza cellulare**, formulata anch'essa agli inizi degli anni '50, sostiene invece che la capacità di replicarsi delle cellule umane è limitata. Con il passare del tempo i tessuti si rigenerano e riparano meno efficacemente e quindi invecchiano.
5. Secondo la **teoria neuroendocrina** l'invecchiamento è la conseguenza della perdita dell'equilibrio nervoso ed ormonale (neuroendocrino-senescenza). Lo squilibrio ormonale che ne consegue sia a livello centrale sia inerente i rapporti tra i vari ormoni (ad esempio estrogeno e progesterone nella donna, estrogeno e testosterone, DHEA e cortisolo in entrambi i sessi), sarebbe alla base dell'aging e di molte patologie ad esso correlate.
6. La **teoria immunitaria** ipotizza invece che l'invecchiamento sarebbe sostenuto da uno squilibrio del sistema immunitario (immuno-senescenza) favorente da un lato una minore efficacia delle difese immunitarie (con un aumento del rischio di infezioni e neoplasie), e dall'altro una tendenza verso infiammazioni croniche a basso grado di intensità che sono causa di molte patologie aging correlate (demenza, sarcopenia, patologie cardiovascolari, cancro etc.) e verso patologie autoimmuni.

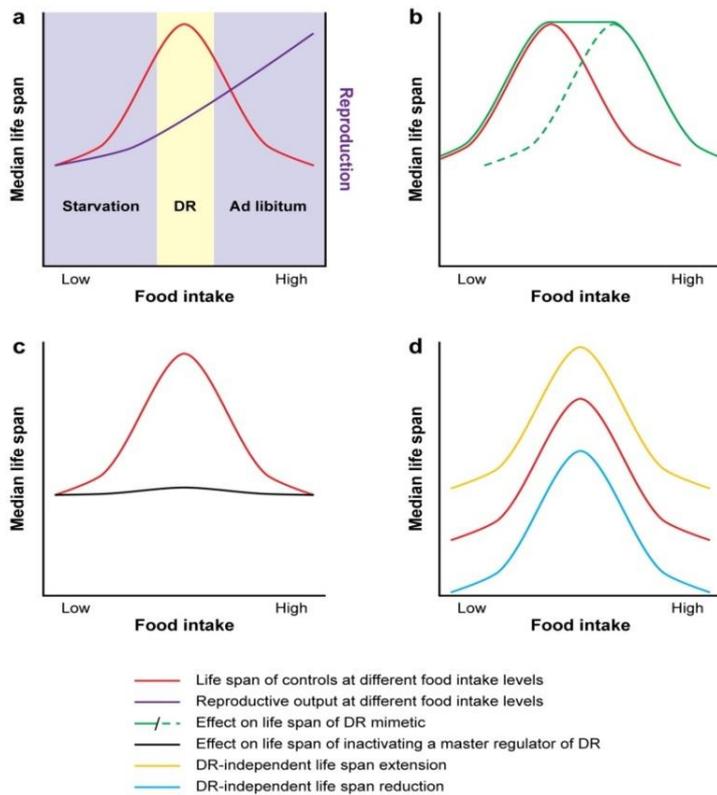
In conclusione, quello che si può dire con certezza è che l'invecchiamento è un processo multifattoriale molto complesso e che ognuna di queste teorie ha un fondamento di verità; pertanto, al fine di elaborare una strategia per rallentare o contrastare il processo di aging, bisogna agire contemporaneamente su più fronti.

Tra i diversi approcci di ricerca e interventi anti-aging, la riduzione dell'*intake* calorico rimane la via più accreditata.

## 5.2 RC e invecchiamento

La RC è l'unico approccio non genetico tra i più efficienti nel rallentare il processo di invecchiamento in diverse specie evolutivamente divergenti, che vanno dai lieviti, vermi, e moscerini fino ai mammiferi. La dimostrazione che la RC è in grado di rallentare il processo di invecchiamento venne presentata per la prima volta negli anni trenta in uno studio condotto da Mac Cay e collaboratori eseguito nei roditori [73]. Da quel momento, simili risultati sono stati ottenuti in una varietà di specie tra cui ratti, topi, pesci, vermi, moscerini e lieviti [74,75]. Questa estensione della longevità scaturisce da una riduzione delle calorie totali derivate da carboidrati, grassi e proteine del 25 % - 60 % rispetto agli animali di controllo alimentati ad libitum [76,77]. L'estensione della vita può raggiungere il 50 % nei roditori [78] e dati emergenti mostrano che gli effetti della RC possono essere osservati nei primati non umani [79].

La risposta del *lifespan* a condizioni di ridotto intake calorico può essere rappresentato da una curva a campana (**Figura 14.a**), dove l'estensione massima del *lifespan* viene raggiunta in un ristretto intervallo di intake calorico. Al di sopra e al di sotto di questo ristretto intervallo gli animali mostrano un *lifespan* ridotto. Questa caratteristica risposta è stata osservata nel lievito [80], *C.elegans* [81-83], e *Drosophila* [84]. Nel topo, la progressiva riduzione dell'intake calorico risulta in un aumento incrementale del *lifespan* [85], rappresentato dalla parte destra della curva a campana. A differenza del *lifespan*, la capacità riproduttiva è correlata ai livelli di cibo e risulta essere massima a livelli di intake calorici ad libitum [82,87,88]. Interventi, genetici o farmacologici, che mimano gli effetti della RC, portano a un aumento del *lifespan* rispetto ai controlli trattati con livelli di cibo ad libitum, ma questo effetto si riduce quando l'intake calorico diminuisce (**Figura 14.b**, linea verde continua). Disabilitando ogni regolatore principale della RC si ottiene un blocco della risposta del *lifespan* ai cambiamenti nell'intake calorico, risultando in un appiattimento della curva a campana (**Figura 14.c**, linea nera). Infine, interventi che influenzano il *lifespan* in maniera RC-indipendente porteranno a un aumento (**linea gialla**) o a una diminuzione (**linea blu**) del *lifespan* della stessa estensione a tutti i livelli di consumazione di cibo (**Figura 14.d**).



**Figura 14.**  
 Gli effetti della RC sul lifespan.

Per quanto riguarda gli effetti fisiologici della RC, la riduzione dell'intake calorico evoca numerosi cambiamenti ormonali: in generale si osserva un calo dei livelli insulinici e nell'attività della tiroide e dell'asse gonadotropo e somatotropo, mentre quella dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene risulta stimolata. Inoltre, la RC altera vari parametri fisiologici: in risposta al deficit energetico, nell'animale da laboratorio si osserva una diminuzione significativa della massa adiposa, della temperatura corporea e della pressione sistolica e diastolica. Inoltre la RC altera l'espressione genica e favorisce l'espressione di geni coinvolti nella riparazione cellulare, nel turnover e sintesi proteica, nella resistenza allo stress e nel metabolismo del glucosio. Numerosi geni implicati nei meccanismi di stress ossidativo e nell'infiammazione risultano essere downregolati.

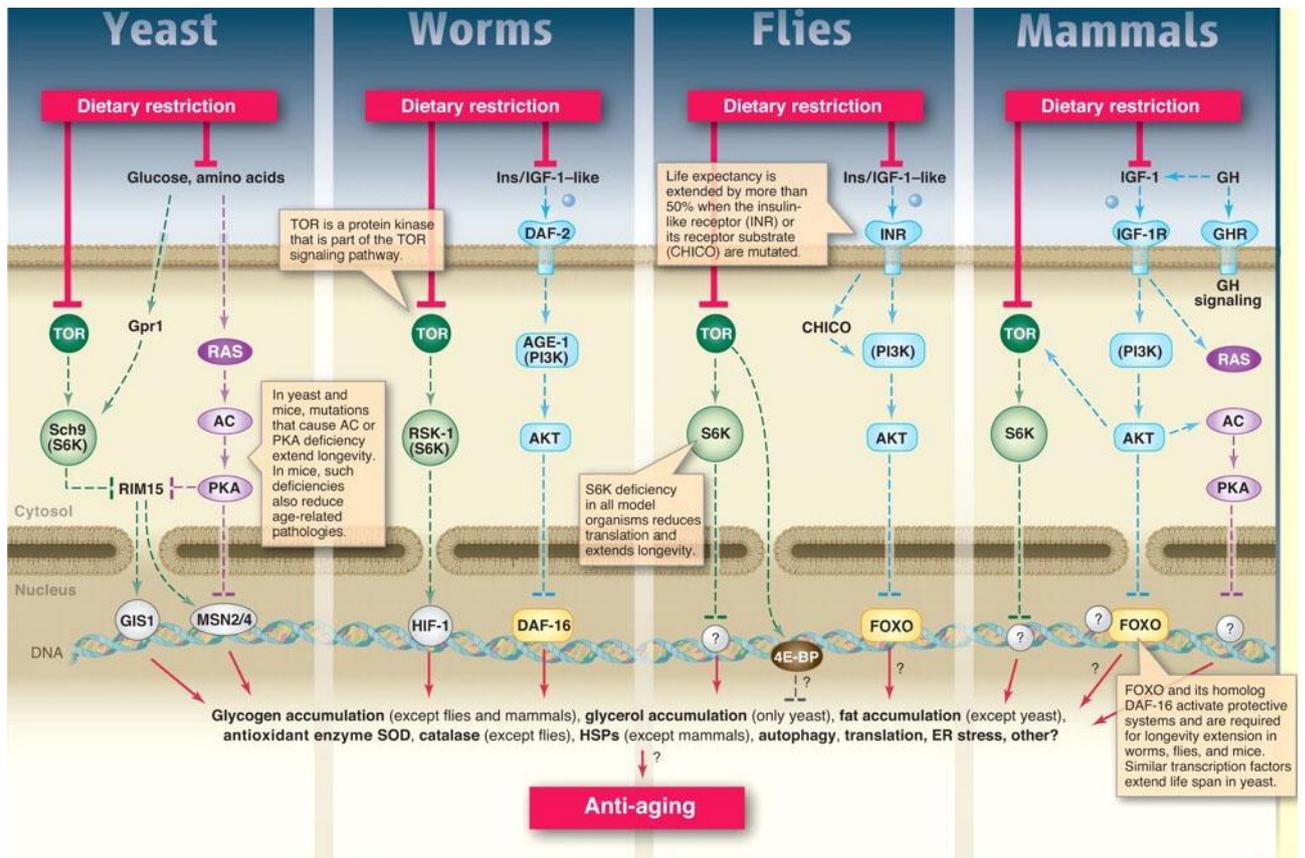
L'isola giapponese di Okinawa da tempo affascina gli studiosi coinvolti nella ricerca antiaging. La particolarità degli abitanti l'arcipelago di Okinawa è nella loro longevità. La durata di vita media è di 81.2 anni, la più alta del mondo e i centenari rappresentano il 20,6% della popolazione. In particolare le donne vivono in media più di 84 anni, contro gli 83 del Giappone e i 79 degli Usa.

Qual è il motivo per cui questa popolazione è così longeva? Perché l'incidenza di malattie come diabete, ictus, cardiopatie, cancro, osteoporosi e altro, è molto inferiore al resto del mondo e persino del Giappone? Gran parte del merito è da attribuire allo "ishokudoghen", che in giapponese significa "il cibo è una medicina". Gli ultracentenari di Okinawa godono generalmente di perfetta salute, sono ancora capaci di lavorare, pescare, ballare e praticare il Kobudo, un'arte marziale locale. I ricercatori che da tempo studiano il fenomeno Okinawa sostengono che, accanto anche ad una componente biologica, il fattore che più incide sulla longevità degli abitanti sarebbe la loro dieta. Dieta associata anche ad uno stile di vita esemplare: niente alcool e fumo, poco stress e senso della spiritualità.

Sebbene i benefici apportati dalla RC siano ormai noti da molti anni, poche informazioni si hanno sui meccanismi di azione tramite cui essa agisce. Originariamente si pensava che RC estendesse il lifespan rallentando la crescita e lo sviluppo dell'animale. Anche se numerosi studi hanno mostrato che animali in RC hanno velocità metaboliche uguali o superiori dopo un calo iniziale nelle prime sei settimane di dieta, una delle possibili prime ipotesi meccanicistiche della RC era quella della riduzione della velocità metabolica. Tra le ipotesi più recenti, quella della cascata dei glucocorticoidi, che afferma che tali ormoni, che giocano un ruolo essenziale nella risposta allo stress, siano causa di invecchiamento e che quindi la RC operi attenuandone le vie di sintesi. L'ipotesi che meglio spiega gli effetti della RC e che assomma tutte le precedenti è l'ipotesi dell'*Hormesis*, che afferma che la RC induce un leggero stress che provoca una risposta di sopravvivenza nell'organismo, che si rafforza nei confronti delle avversità mediante cambiamenti metabolici, riuscendo così a contrastare le cause di invecchiamento.

Numerosi studi sperimentali evidenziano che alcuni pathways di trasduzione del segnale sono regolati negativamente dalla RC sia direttamente, nel lievito, che indirettamente tramite la riduzione dei livelli di fattori di crescita come IGF-1 (vermi, moscerini e mammiferi). Il ruolo della chinasi TOR e di S6K (S6 kinase) nel promuovere l'invecchiamento sembra essere conservato nel lievito, vermi, moscerini e topi (**Figura 15**). Contrariamente a ciò, il pathway di AC-PKA e quello di TOR-S6K promuovono l'invecchiamento nel lievito e nei mammiferi, mentre il recettore insulinico/IGF-1 simile o l'ormone della crescita (nei mammiferi) accelerano l'invecchiamento nei vermi, moscerini e topi. Simili fattori di trascrizione (GIS1, MSN2/4, DAF-16, FOXO) inattivati dai pathways AC/PKA, IGF-1/AKT, o TOR/S6K, influenzano la protezione cellulare e/o

l'invecchiamento nella maggior parte degli organismi modello [81]. In particolare, nei vermi, nei moscerini e nei topi, questi geni potrebbero promuovere l'invecchiamento non solo all'interno delle cellule in cui essi sono espressi ma anche in altre cellule attraverso la regolazione di fattori circolanti.



**Figura 15.** Principali pathways regolati negativamente dalla RC in diversi organismi

I meccanismi proposti per la estensione della longevità causata dalla inibizione di questi pathways sensibili ai nutrienti includono:

1. una diminuzione del radicale libero superossido (mediato in parte dalla superossido dismutasi) e dei suoi danni alle macromolecole;
2. la protezione delle proteine mediata dalle chaperonine (Hsp70);
3. una diminuzione della traduzione;
4. l'attivazione della autofagia;
5. lo switch dei pattern di espressione genica associata all'ipossia (nel lievito e nel topo).

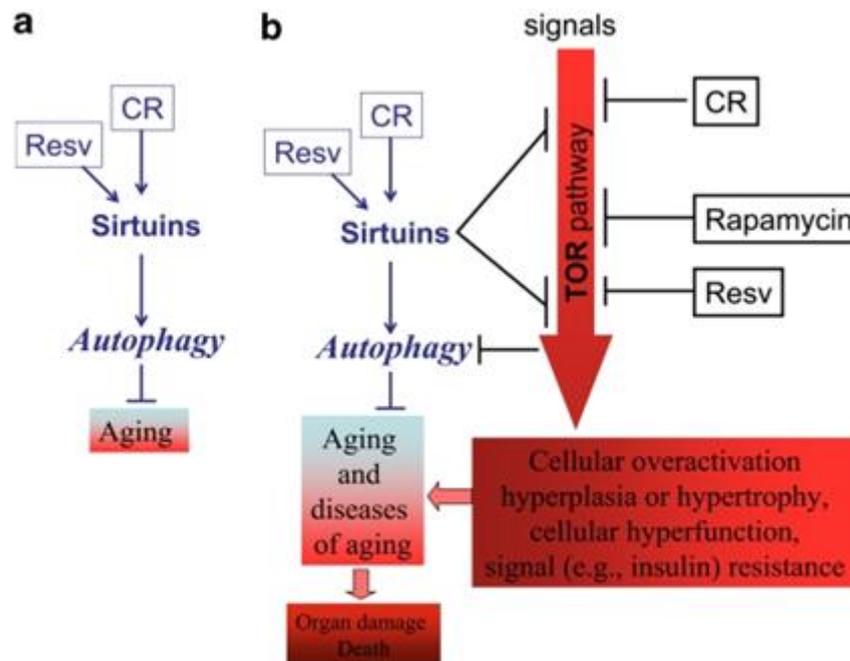
Nel lievito, gli effetti della RC sulla estensione del lifespan sono anche associati a una riduzione delle attività dei pathway Tor-Sch9 and Ras-AC-PKA e richiede la serin-treonin chinasi Rim15 e i fattori di trascrizione Gis1, Msn2, e Msn4. Nei vermi, fattori di trascrizione regolati dai pathways TOR-S6K e AGE-1-AKT sono implicati negli effetti anti-aging della RC e, nei moscerini, la ridotta attività sia di Ins/IGF-1 che di TOR possono proteggere contro l'accorciamento del lifespan tramite l'aumento dell'intake calorico, sebbene nei vermi e nei moscerini la delezione di DAF-2/FOXO accorcia il loro lifespan, ma gli organismi in questione continuano a rispondere alla RC. Nel topo infine gli effetti sulla longevità mediati dalla RC sembrano includere la riduzione della attività del pathway GHR/IGF-1 dal momento che la RC non estende ulteriormente il lifespan di topi GHR-deficienti.

### **5.3 RC e SIRT1**

Negli ultimi dieci anni, le sirtuine hanno suscitato sempre maggiore interesse grazie alla loro capacità di estendere il lifespan in diversi organismi e fornire protezione nei confronti di patologie età-correlate nei mammiferi. Nel lievito, l'integrazione di copie extra di Sir2 porta a una estensione del lifespan fino al 30 % mentre la delezione di questo gene accorcia invece il lifespan di circa il 50 % [89]. La RC ottenuta mediante la limitazione della disponibilità di glucosio nel terreno di crescita del lievito *Saccharomyces cerevisiae* porta a una attivazione di Sir2 e a una estensione del lifespan [90]. Nei mammiferi, l'aumento dell'espressione e della funzione di SIRT1 contribuisce agli effetti benefici della RC ritardando la manifestazione delle patologie correlate all'età, incluso cancro, aterosclerosi, e diabete [91].

Dunque la RC promuoverebbe la sopravvivenza cellulare mediante induzione di SIRT1. Quest'ultima è in grado di deacetilare proteine citoplasmatiche e nucleari che controllano processi quali l'apoptosi ed il metabolismo cellulare. Inoltre, regola la produzione di insulina e di glucosio, il metabolismo lipidico, il metabolismo mitocondriale, la sopravvivenza cellulare e l'autofagia. Tale processo, geneticamente determinato, fa sì che parti di citoplasma, organelli intracellulari e proteine vengano sequestrati in vacuoli (autofagosomi) e destinati alla degradazione nel comparto lisosomiale. I processi autofagici contribuiscono in tal modo al mantenimento dell'omeostasi intracellulare assicurando il turnover delle componenti soprannumerarie, senescenti e/o danneggiate. In

caso di carenza di nutrienti l'autofagia fornisce alle cellule substrati metabolici che sono necessari per la sopravvivenza. Oltre a questo, SIRT1 esplica i propri effetti anti-aging andando a influenzare negativamente il pathway di mTOR, che contrariamente a SIRT1, favorisce il processo di invecchiamento (**Figura 16**).



**Figura 16.** Relazioni fra RC, Sirtuine e mTOR

#### 5.4 Nuovi mimetici della RC

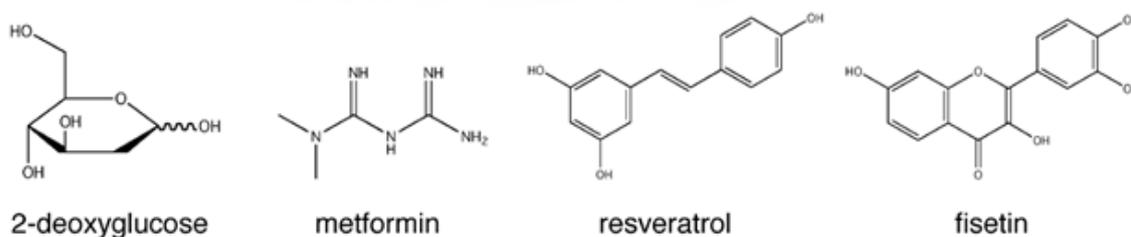
Come già detto in precedenza, l'ipotesi che meglio spiega gli effetti benefici sul lifespan mediati dalla RC è l'ipotesi dell'Hormesis; questa ipotesi afferma che la RC induce un leggero stress che provoca una risposta di sopravvivenza nell'organismo, e questa risposta si rafforza nei confronti delle avversità mediante cambiamenti metabolici, riuscendo così a contrastare le cause di invecchiamento. Questa ipotesi genera un'importante intuizione. Se esistono meccanismi innati che promuovono la salute e la sopravvivenza in condizioni di stress, dovrebbe essere possibile designare piccole molecole in grado di attivare questi meccanismi. Recentemente la ricerca ha focalizzato la sua attenzione solo su molecole che

sono in grado di modulare il metabolismo energetico. Due importanti esempi includono il 2-deossiglucosio (2-DG) e la metformina (**Figura 17**) [92-98].

Il 2-DG è un analogo del glucosio che inibisce l'enzima fosfoesoso isomerasi della via glicolitica. Quando il 2-DG viene iniettato nei roditori esso sopprime la crescita tumorale, riduce i livelli di insulina e la temperatura corporea, e aumenta i glucocorticoidi [94]. Sfortunatamente, la somministrazione cronica del 2-DG ingrandisce il cuore e aumenta la probabilità di uno scompenso cardiaco congestizio, rendendo questo composto inadatto a estendere il lifespan degli animali [94].

La metformina, la buformina e la fenformina sono farmaci appartenenti alla classe delle biguanidi che originano dalla lilla francese (*Galega officinalis*). La metformina è attualmente utilizzata per il trattamento del diabete di tipo II. La somministrazione di queste molecole porta a cambiamenti nel metabolismo e nel pattern di espressione genica simili a quelli ottenuti in animali sottoposti a RC [99,100]. Sembra che la metformina agisca stimolando l'AMPK, il sensore cellulare energetico che modula l'appetito e il metabolismo del glucosio e dell'insulina [101].

La fenformina è risultata essere importante nella inibizione della incidenza di adenocarcinoma mammario nel topo di quattro volte, nel ritardare il declino correlato all'età della funzione riproduttiva e nell'estendere il medio e massimo *lifespan* del 21 % e del 23 % rispettivamente [99,100].



**Figura 17.** Nuovi mimetici della RC

Sebbene gli inibitori delle sirtuine sembrano essere utili nel trattamento di alcune malattie, i composti che attivano le sirtuine (STACs) potrebbero giocare un ruolo chiave nella estensione del *lifespan* negli organismi superiori.

Nel 2003, il team di Sinclair ha descritto 18 molecole derivate da piante in grado di attivare le sirtuine nei lieviti e ne ha studiato gli effetti su SIRT1, l'omologo umano di Sir2. I flavoni quercetina e fisetina, gli stilbeni piceatannolo e resveratrolo e il calcone buteina stimolavano SIRT1 da 5 a 13 volte. La maggioranza di questi composti mostra un gruppo ossidrilico in meta sull'anello fenolico A, trans-orientato ad un anello B. Quando l'anello A non presenta un OH in meta (fisetina), un anello catecolico B è necessario per mantenere un'attività significativa. Un altro fattore importante per l'attività risulta essere la coplanarità tra gli anelli idrossilati A e B. L'attivatore più potente risulta essere il resveratrolo (RSV), un composto sintetizzato da un gran numero di piante in risposta allo stress e presente in quantità apprezzabili nell'uva e nel vino rosso. Questa molecola è già nota per il suo ruolo protettivo nei confronti di numerose patologie, tra cui quelle cardiovascolari, neoplastiche e neurodegenerative.

## 6 SIRT1 e telomeri

I telomeri sono strutture costituite da DNA e proteine, poste all'estremità dei cromosomi, costituite da piccole sequenze nucleotidiche ripetute in tandem (5'-TTAGGG-3' nell'uomo). I telomeri variano in lunghezza da poche decine di coppie di basi, a decine di migliaia di coppie di basi e rappresentano delle regioni di DNA non codificanti.

La loro importanza risiede nella capacità di dare stabilità al DNA, evitando che i cromosomi si avvolgano su se stessi o si ricombinino in corrispondenza delle estremità. In quest'ultimo caso, si verrebbero a creare lunghi cromosomi con due centromeri, che tenderebbero ad impacchettarsi e, non potendo più andare incontro ad eventi mitotici, condurrebbero alla morte cellulare.

Il telomero ha un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi, poiché la DNA polimerasi non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione. A ogni duplicazione del DNA e a ogni conseguente divisione cellulare, i telomeri vanno incontro pertanto a un progressivo accorciamento ma la loro lunghezza originaria viene ristabilita grazie all'intervento di un importante enzima, denominato telomerasi.

Tale enzima non è sempre attivo: nell'uomo, la telomerasi è attiva soltanto durante lo sviluppo embrionale, nelle cellule staminali e nella linea germinale dell'adulto: in tutte le altre cellule, la lunghezza dei telomeri, in mancanza di telomerasi, si riduce progressivamente a ogni divisione cellulare. Si stima che a ogni ciclo replicativo i telomeri si accorcino di 50÷200 paia di basi. Quando viene raggiunta una lunghezza telomerica minima critica, si attivano segnali cellulari che inducono le cellule a entrare in senescenza replicativa, ovvero in una fase di arresto permanente della proliferazione cellulare. Le cellule senescenti, rimangono attive metabolicamente, ma la loro espressione genica è alterata e di conseguenza anche i loro cicli di divisione rallentano.

Sono state fatte diverse ricerche per evidenziare la correlazione tra attività telomerica ed invecchiamento. A tal fine è stata modificata in laboratorio la lunghezza dei telomeri, di cromosomi appartenenti a cellule di individui d'età compresa tra 0 – 93 anni (attraverso l'utilizzo di nucleasi).

I risultati di tali esperimenti mostrarono, come ovvio, una relazione tra attività proliferativa ed età. La proliferazione è normalmente maggiore nelle cellule d'individui giovani, ma la cosa sorprendente, è stata sicuramente la dimostrazione della correlazione tra capacità

replicativa e lunghezza telomerica, valida per l'intero intervallo d'età dei soggetti. Ciò stava ad indicare che le cellule con telomeri accorciati, sperimentalmente, si replicavano meno rispetto a quelle coi telomeri più lunghi.

Queste osservazioni si schierano a supporto dell'ipotesi che la lunghezza telomerica sia un biomarker per l'invecchiamento delle cellule somatiche umane. Infatti, accorciandosi ad ogni divisione cellulare, i telomeri si comportano come veri e propri "orologi molecolari", indicando il numero di volte che la cellula si è divisa.

Oggi molti laboratori di ricerca stanno cercando il modo di resettare l'orologio biologico, al fine di ottenere l'allungamento delle estremità cromosomiche nelle cellule eucariotiche e rallentare quindi i processi di invecchiamento. In questo contesto si inseriscono molti studi che evidenziano come l'espressione di SIRT1 possa preservare l'integrità del genoma e la sua stabilità. Tra questi, uno in particolare ha dimostrato come SIRT1 possa avere un impatto sul mantenimento della lunghezza dei telomeri, analizzando sia la perdita di funzione di SIRT1 (SIRT1  $-/-$  mice), sia l'aumento di funzione, utilizzando topi con una over-espressione di SIRT1 (SIRT1 super mice) [125].

L'over-espressione di SIRT1 nei topi porta ad una diminuzione della percentuale di erosione dei telomeri associata alla divisione cellulare e all'invecchiamento tissutale, mentre la delezione di SIRT1 porta ad un effetto opposto. Gli effetti benefici di SIRT1 sulla lunghezza dei telomeri si manifestano senza nessun effetto negativo sull'integrità dei telomeri.

Questi risultati sono stati confermati da altri studi, in cui vengono evidenziati anche gli effetti benefici di SIRT1 sull'attività della telomerasi e sulla risposta al danno al DNA.

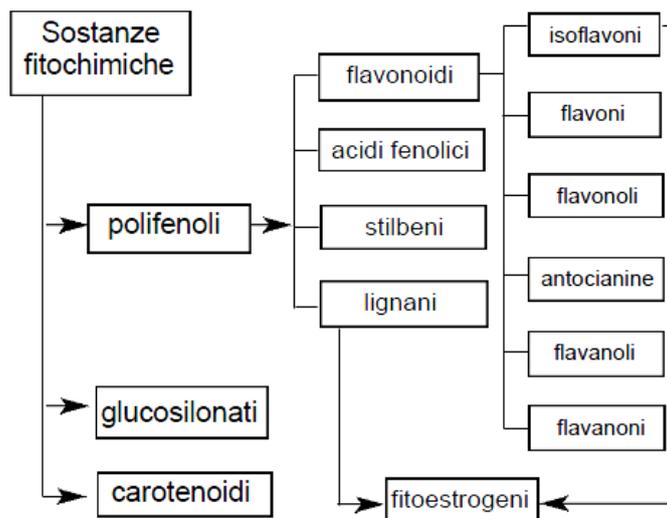
Infatti, la delezione di SIRT1 provoca una notevole diminuzione dell'attività della telomerasi, evidenziando come SIRT1 possa regolarne l'espressione attraverso modifiche post-traduzionali di alcuni istoni. La natura e la posizione di queste modifiche devono ancora essere identificate.

## 7 Polifenoli

### 7.1 Attività dei composti fenolici

L'uomo ingerisce quotidianamente con la dieta circa 500 g di composti chimici di cui la maggior parte sono componenti di piante o di vegetali in genere. Oltre le ben note proteine, grassi, carboidrati e i micronutrienti essenziali quali minerali e vitamine, il mondo vegetale fornisce fenoli, terpeni, terpenoidi, alcaloidi, purine, pirimidine, acidi nucleici, steroidi, e numerose altre molecole che esercitano potenti attività biologiche. Tali componenti vengono denominati genericamente sostanze fitochimiche (phytochemicals) e comprendono decine di migliaia di composti appartenenti a svariate classi chimiche e a famiglie botaniche anche estremamente differenti.

Tra i diversi composti fitochimici che sono assunti quotidianamente con la dieta e per i quali studi recenti hanno provato una attività benefica sulla salute umana assumono un ruolo particolarmente importante i polifenoli. I polifenoli costituiscono una famiglia di circa 5000 molecole organiche naturali, seminaturali o sintetiche largamente presenti nel regno vegetale (**Figura 18**). Sono caratterizzati, come indica il nome, dalla presenza di molteplici gruppi fenolici associati in strutture più o meno complesse generalmente di alto peso molecolare. Le differenze tra gli anelli aromatici primari, lo stato di ossidazione e i gruppi funzionali delineano il singolo polifenolo. Essi si possono dividere in 4 classi che comprendono la maggior parte dei polifenoli presenti negli alimenti: i flavonoidi, gli acidi fenolici, gli stilbeni e i lignani.



**Figura 18.** Suddivisione delle sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale

In linea di massima, l'attività dei polifenoli può essere riassunta nei seguenti punti:

1. **ANTIOSSIDANTE:** proteggono le cellule dai danni causati dai radicali liberi, che si sviluppano con il normale metabolismo cellulare e a causa di eventi stressogeni, come radiazioni, fumo, agenti inquinanti, raggi UV, stress emotivo e fisico, additivi chimici e attacchi virali e batterici;
2. **ANTICANCEROGENICA:** in generale mostrano un impatto sullo step di iniziazione dello sviluppo del cancro, proteggendo le cellule contro l'attacco diretto da carcinogeni o alterando il loro meccanismo di attivazione (in vitro). Queste prove scientifiche spiegano la classica evidenza epidemiologica secondo cui esiste una correlazione tra consumo di vegetali freschi e ridotta incidenza di alcuni tipi di cancro (pelle, polmone, stomaco, esofago, duodeno, pancreas, fegato, seno e colon);
3. **ANTIATEROGENA:** è ampiamente riportato come l'ossidazione dei lipidi ed in particolare delle LDL sia la causa dello sviluppo dell'arteriosclerosi e delle malattie ad essa correlate (ictus, trombosi e malattie cardiovascolari in genere, prima causa di morte nei Paesi occidentali). Il principale meccanismo mediato dai polifenoli è la riduzione della coagulazione delle piastrine e delle LDL; altri

meccanismi sono l'inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine, l'azione radical scavenger e la modulazione del metabolismo degli eicosanoidi;

4. ANTINFIAMMATORIA: inibizione sulla cascata dell'acido arachidonico

5. ANTIBATTERICA e antivirale

Tra i vari polifenoli di origine naturale, il resveratrolo mostra importanti proprietà benefiche e anti-invecchiamento.

## 7.2 Ruolo anti-aging del resveratrolo

Il resveratrolo (RSV) è un polifenolo di origine naturale che si ritrova in basse concentrazioni in oltre 70 specie di piante fra cui l'uva, mirtilli e arachidi, e anche in alcuni composti erboristici [102]. Questo composto venne identificato per la prima volta nel 1940 come costituente delle radici di eleboro bianco (*Veratrum grandiflorum*) e più tardi nelle radici secche di *Polygonum cupidatum*, (chiamato in giapponese Ko-jo-kon) utilizzato nella tradizione cinese e giapponese come medicina per il trattamento della dermatite suppurativa, della gonorrea, del piede d'atleta e della iperlipidemia [103]. Il RSV è ora riconosciuto essere una fitoalessina di origine naturale prodotta da un'ampia varietà di piante in risposta allo stress, a danneggiamenti, a radiazioni UV, e in risposta a infezioni fungine (*Botrytis cinerea*) come parte del loro meccanismo di difesa

Il RSV ha numerose proprietà benefiche. Innanzitutto ha un'azione antinfiammatoria e antiossidante; ha un'azione protettiva contro le patologie cardiovascolari, rallenta le malattie tumorali e abbassa la quantità di colesterolo presente nel sangue (**Figura 19**). Fra le numerose proprietà di questo composto, una di quelle che ha interessato maggiormente le ricerche degli studiosi è quella antiossidante. È noto che la maggior parte dei segni cutanei dell'invecchiamento sono il risultato di fattori indipendenti dal nostro codice genetico: dipendono infatti dal nostro stile di vita, dalle radiazioni, dai raggi ultravioletti, dallo smog e dallo stress. I polifenoli, e tra questi il RSV, sono sostanze di origine naturale in grado di contrastare questa degenerazione cellulare, aiutando a ridonare alla pelle tono e lucidità e a contrastare i segni dell'invecchiamento.

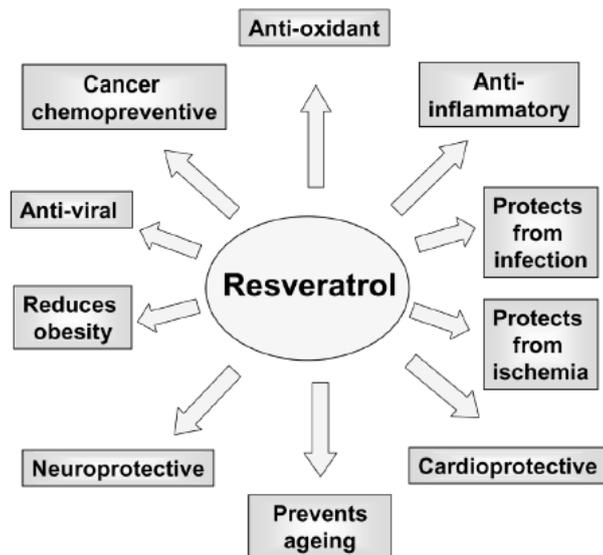


Figura 19. Effetti benefici del

Gli effetti benefici del RSV sembrano derivare dalla sua capacità di stimolare il sistema sirtuinico, e in particolare SIRT1, e dalla sua capacità di interferire con il pathway di mTOR, come evidenziano numerosi studi sperimentali.

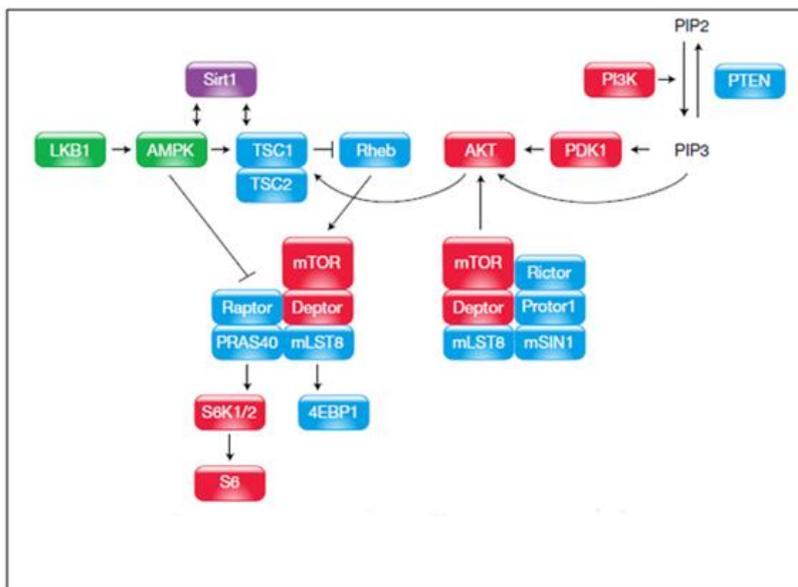
Il RSV attiva il sistema sirtuinico nel nematode *Caenorhabditis elegans* e nella *Drosophila melanogaster*, oltre che nel lievito *S. cerevisiae*. Uno studio apparso su *Nature* nel 2004 mostrava che la somministrazione di resveratrolo a questi organismi, oppure l'utilizzo di una dieta ristretta in calorie, estende la lunghezza della loro vita, ma solo se essi possiedono il gene Sir2. In *S. cerevisiae*, il resveratrolo è in grado di aumentare il *lifespan* fino al 70% e non mostra alcun effetto sull'aspettativa di vita di un mutante privo di Sir2, e questo fa pensare che l'effetto sulla longevità sia dovuto ad una stimolazione diretta di Sir2.

Risulta ampiamente dibattuto il meccanismo tramite cui il RSV regola SIRT1 nei mammiferi. Alcuni ricercatori hanno mostrato che la diretta attivazione di SIRT1 mediata dal RSV è un artefatto *in vitro* [104-107] e che il RSV agisce principalmente attivando l'AMPK tramite l'inibizione delle fosfodiesterasi (PDEs), ATPase o il complesso III [108-111]. In alternativa, il RSV potrebbe portare in primo luogo alla attivazione di SIRT1 in vivo, portando alla attivazione dell'AMPK mediante deacetilazione e alla attivazione della chinasi LKB1 che fosforila l'AMPK [112-114]. mTORC1 è un potente repressore della autofagia, e viene regolato negativamente dall'AMPK [115,116]. Il RSV promuove l'autofagia tramite l'inibizione AMPK-dipendente del pathway di mTOR [117,118].

Puissant e collaboratori hanno scoperto che il RSV aumenta la fosforilazione dell'AMPK, che è accompagnata da una netta diminuzione dello stato di fosforilazione di mTORC1, pS6K, la proteina ribosomale S6 e 4E-BP1, e ciò potrebbe suggerire un blocco al livello dell'eterodimero TSC1/TSC2 [119].

Ulteriori studi hanno evidenziato che il RSV aumenta il livello di espressione di SIRT1 e potrebbe aumentare la disponibilità del NAD<sup>+</sup> tramite l'AMPK [120], suggerendo che il RSV possa aumentare l'attività di SIRT1 tramite una sua attivazione non necessariamente diretta [121,122]. In particolare uno studio recente è giunto alla conclusione che il RSV e altre piccole molecole possono attivare direttamente SIRT1 [123]. Indipendentemente dal meccanismo di attivazione, SIRT1 media la regolazione negativa del signaling di mTORC1 attraverso la sua associazione con TSC2, il prominente inibitore a monte del signaling di mTORC1 [124].

DEPTOR è un regolatore negativo del pathway di mTORC1 e di mTORC2 e inibisce l'attività chinastica di entrambi i complessi. DEPTOR regola la sintesi proteica e la crescita cellulare inibendo la capacità di mTORC1 di fosforilare a valle proteine target come S6K1 e 4E-BP1. DEPTOR è inoltre implicato nella regolazione dell'apoptosi e della dimensione cellulare [125,126]. Recentemente alcuni studi hanno riportato che il RSV aumenta l'associazione tra DEPTOR e mTOR, portando alla possibile evidenza che DEPTOR possa essere coinvolto nella inibizione RSV-dipendente del signaling di mTOR (**Figura 20**).

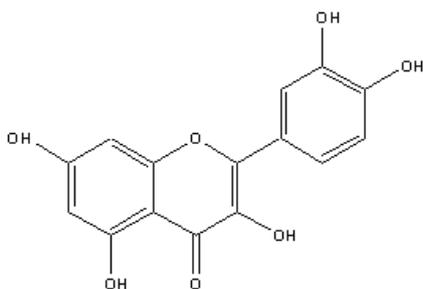


**Figura 20.** Modello per regolatori noti del pathway di mTOR che sono modulati dal RSV. Le proteine in rosso e in verde sono quelle rispettivamente inibite e attivate dal RSV. In relazione a DEPTOR, il RSV esercita un effetto che risulta in una diminuita attività di mTORC1. Le caselle in blu indicano composti che non mostrano una determinata suscettibilità nei confronti del RSV.

In conclusione il RSV, andando a regolare negativamente alcune delle proteine implicate nel pathway di mTOR e stimolando il sistema sirtuinico, potrebbe mediare gli effetti benefici anti-aging delle sirtuine.

### 7.3 Quercetina

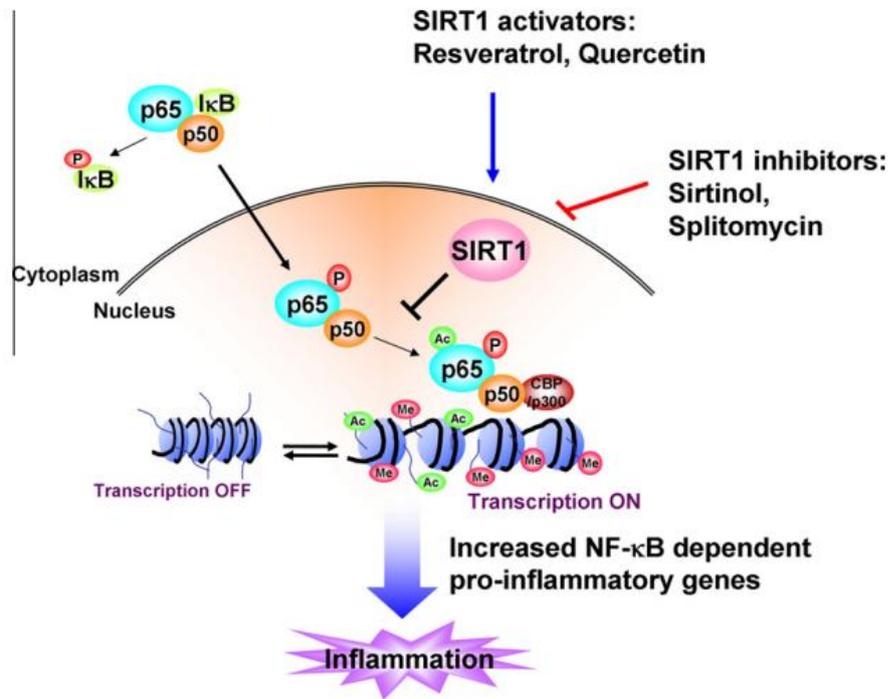
La quercetina, o quercitina, è un flavonoide ubiquitario presente in una grande varietà di frutti (mele, uva, olive, agrumi, frutti di bosco), verdure (pomodori, cipolle, broccoli, capperi), bevande (tè e vino rosso) ed estratti erboristici. In natura, la quercetina non è presente nella forma isolata bensì come aglicone (parte non zuccherina) di vari glicosidi, tra cui rutina e quercitrina; sotto tale forma abbonda, in particolare, negli estratti di ippocastano, ginko biloba, calendula, biancospino camomilla, levistico e iperico (**Figura 21**).



**Figura 21.** Struttura della quercetina

Nota per il suo elevato potere antiossidante ed antinfiammatorio, la quercetina viene proposta come supplemento dietetico all'interno di formulazioni ad attività antiaging ed antinfiammatorie. Alcuni studi riportano che la quercetina, similmente al RSV, è in grado di attivare la SIRT1 umana o la Sir2 del lievito sebbene in misura minore rispetto a quanto riesca a fare il RSV [127-129]. Evidenze sperimentali riportano inoltre che il knockout/knockdown di SIRT1 porta a un aumento della attivazione del fattore nucleare NF-kB e a un aumento del rilascio di citochine infiammatorie mentre l'attivazione di SIRT1 mediata da suoi attivatori (come il RSV e la quercetina) inibiscono il rilascio di mediatori dell'infiammazione regolati da NF-kB in vivo e in vivo suggerendo il ruolo di SIRT1 nella regolazione della infiammazione. A tal proposito l'attivazione di SIRT1

mediata da suoi attivatori o da polifenoli potrebbe risultare un utile approccio per il trattamento di varie patologie croniche infiammatorie (**Figura 22**) [130-135].

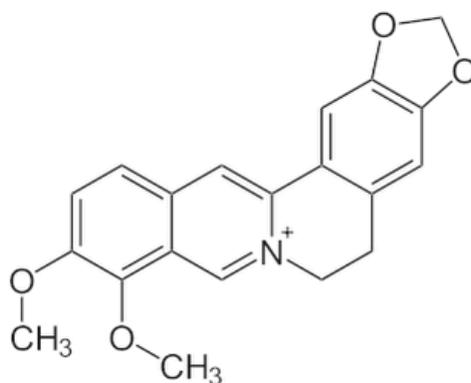


**Figura 22.** Polifenoli, come il RSV e la quercetina, possono aumentare l'attività di SIRT1 reprimendo così l'infiammazione.

Ulteriori studi in vitro indicano anche un possibile uso della quercetina come terapia anti tumorale, grazie alla sua capacità di interagire con molteplici pathways cancro-correlati. Tra questi, dati recenti rivelano che la quercetina può inibire l'attività di mTOR in cellule tumorali. L'inibizione del pathway di mTOR mediato dalla quercetina può essere dedotto dalla sua interferenza con la stimolazione di Akt PI3K-dipendente, l'attivazione della PKA, e la up-regolazione della amartina. La capacità della quercetina di interferire con l'attività di mTOR e con la attivazione del pathway PI3K/Akt conferisce a questa sostanza il vantaggio di poter funzionare come duplice inibitore di mTOR/PI3K. Il complesso mTOR, spesso iperattivato nei tumori, è un importante proteina chinasi che regola molteplici funzioni cellulari, tra cui la crescita cellulare, la biosintesi delle proteine e l'autofagia. La capacità della quercetina di inibire l'attività di mTOR mediante molteplici pathways potrebbe quindi risultare un utile approccio per il trattamento dei tumori e altre malattie associate alla deregolazione di mTOR.

## 7.4 Berberina

La Berberina è un alcaloide isochinolinico quaternario presente in diverse piante della famiglia delle *Berberidaceae*, come *Berberis vulgaris*, *Berberis aquifolium* e *Berberis aristata*, e in altre specie vegetali, quali *Coptis chinensis*, *Hydrastis canadensis* e *Phellodendron amurense*. A seconda della specie e/o varietà, la berberina risulta essere prevalentemente localizzata nelle radici, nei rizomi, nella corteccia o nei piccioli (**Figura 23**).



**Figura 23.** Struttura della berberina

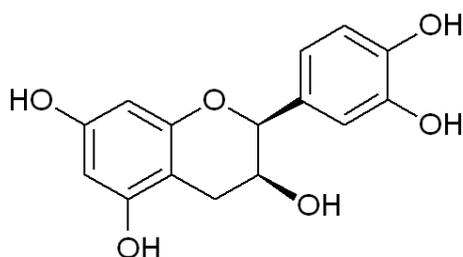
L'impiego curativo della berberina, soprattutto come rimedio contro le infezioni e i disturbi gastrointestinali, vanta una lunga tradizione nella medicina ayurvedica e cinese. Numerosi studi scientifici ne hanno evidenziato le proprietà antimicrobiche nei confronti di diverse specie di batteri, funghi e protozoi ( ad es. *Vibrio colera*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*). La berberina risulta particolarmente efficace nel trattamento di forme aggressive di diarrea batterica e di infezioni parassitarie intestinali. Oltre ad esplicare un'azione antibatterica diretta, si è visto che la berberina è in grado di neutralizzare gli effetti delle enterotossine prodotte da *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* e di inibire l'adesione dei microrganismi agli eritrociti e alle cellule epiteliali.

Sebbene la berberina possieda un ampio spettro di effetti terapeutici il suo effetto sul *lifespan* non è mai stato studiato. Solo recentemente i risultati di uno studio pubblicato nel

2012 da Navrotskaya e collaboratori [136] riportano che la berberina prolunga la vita e migliora la salute nel moscerino *Drosophila melanogaster*.

## 7.5 Catechina

Le catechine (catechina, epicatechina, gallo catechina, epigallo catechina, epicatechina gallato, epigallo catechina gallato) sono un gruppo di sostanze antiossidanti appartenenti alla categoria dei flavonoidi. Contenute soprattutto nel tè (ed in modo particolare in quello verde, dove rappresentano circa il 20-30% del peso a secco), le catechine contribuiscono a sostenere le funzioni cardiache e concorrono al mantenimento di un buono stato di salute. Ulteriori fonti di catechine sono rappresentate dal cacao, dal cioccolato e dal vino (**Figura 24**).

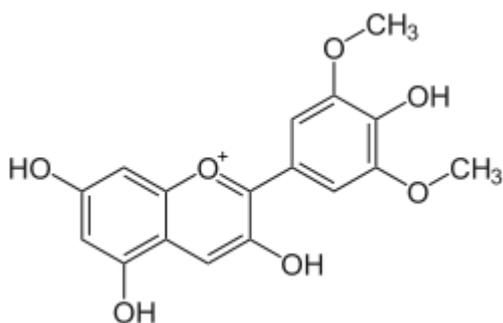


**Figura 24.** Struttura della catechina

Oltre a possedere un'azione antiossidante diretta, le catechine potenziano altri sistemi antiossidanti, come quelli in cui è coinvolta la vitamina E. Le ricerche mostrano che le catechine possiedono ulteriori vantaggi per la salute, grazie alle loro proprietà epatoprotettive, immunostimolanti e alla loro capacità di rallentare il processo di invecchiamento.

## 7.6 Malvidina

La malvidina è un polifenolo appartenente alla classe delle antocianidine. Le antocianine sono tra i più importanti gruppi di pigmenti presenti nei vegetali, e si ritrovano nei fiori e frutti così come negli arbusti e nelle foglie autunnali (**Figura 25**).



**Figura 25.** Struttura della malvidina

In assoluto l'alimento che contiene più antociani rispetto a tutti gli altri frutti è l'aronia. Altri alimenti ricchi in queste sostanze sono il ribes, la ciliegia, il cavolo rosso, l'uva, la fragola, il sambuco e le bacche in generale.

Gli antociani, pur non essendo indispensabili per la nutrizione umana, esercitano un'azione positiva sull'intero organismo, in quanto possiedono spiccate proprietà antiossidanti e proteggono l'organismo, preservandolo dalla degenerazione e dall'invecchiamento.

## **8. Scopo della tesi**

L'importante ruolo che SIRT 1 assume nell'invecchiamento è legato, oltre a quanto appena visto, soprattutto alla sua azione inibitoria su mTOR. Ciò è di notevole importanza, soprattutto se si considera che la disregolazione del segnale mTORC1 altera il metabolismo corporeo ed è causa di affezioni età correlate, invecchiamento per inibizione dell'autofagia (processo necessario al prolungamento della vita che tende a ridursi con il procedere dell'età) e affezioni tumorali in cui la proteina è iperegolata.

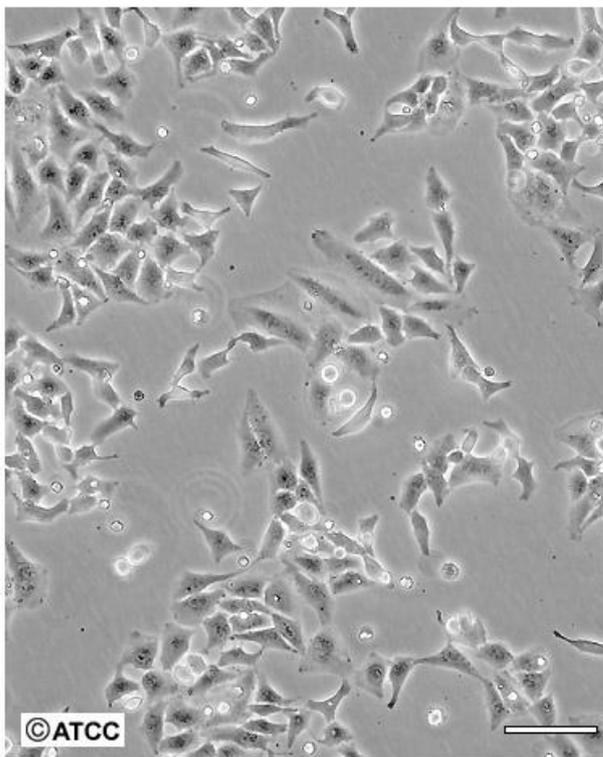
Lo scopo della presente tesi sperimentale è quello di andare a verificare se le sostanze testate (quercetina, berberina, catechina e malvidina) determinano una stimolazione dell'espressione di SIRT1 e verificare la loro attività rispetto al resveratrolo, e, successivamente, analizzare se queste sostanze sono anche in grado di portare a una inibizione dell'espressione di mTOR.

## 9. Materiali e metodi

### 9.1 Colture cellulari

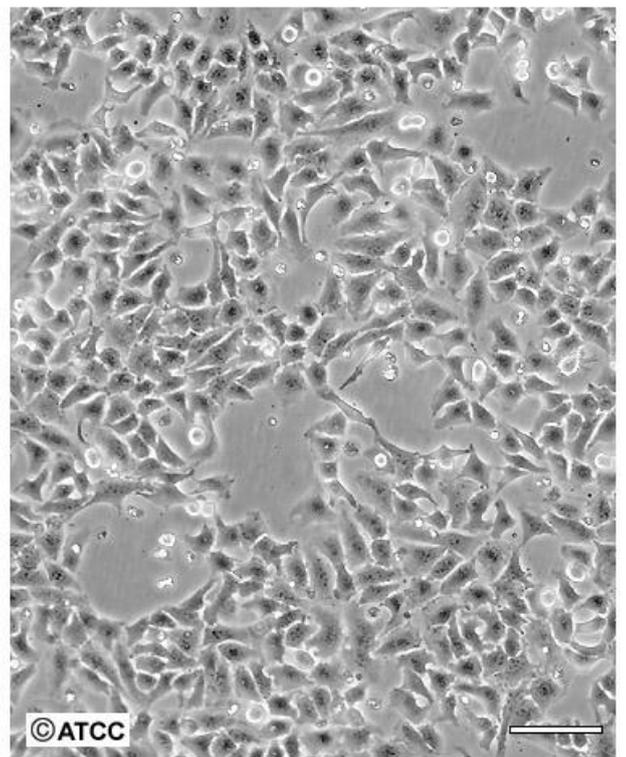
Le linee cellulari utilizzate sono state le HeLa (**Figura 26**). Le HeLa sono una linea cellulare tumorale umana isolata da un cancro della cervice uterina; si tratta di cellule immortalizzate, altamente stabilizzate e molto più resistenti delle altre cellule tumorali. Queste sono state coltivate in un terreno di coltura composto da DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-Sigma) al quale è stato aggiunto siero fetale bovino al 10% (Sigma), penicillina-streptomina (Sigma) e L-glutammina (Sigma). Le colture cellulari crescono in monostrato in supporti quali fiasche di plastica o piastre Petri sterili monouso, e una volta trattate vengono mantenute in incubatore a 37° C in presenza di anidride carbonica (5%) per mantenere il pH a 7.4.

ATCC Number: **CCL-2**  
Designation: **HeLa**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

**Figura 26.** Cellule Hela a bassa e ad alta densità. ATCC – American type culture collection

Le cellule sono state fatte crescere fino a una confluenza dell' 80% per poi essere tripsinizzate e splittate a una confluenza minore.

Il giorno della piastrazione, le cellule sono state sottoposte ad alcuni lavaggi con PBS, successivamente tripsinizzate ed infine centrifugate. Il pellet cellulare, derivante dalla centrifuga, è stato risospeso con medium fresco e ne è stata prelevata una piccola aliquota su cui è stata effettuata la conta cellulare con la Camera di Burker. Successivamente, una aliquota di queste cellule è stata rimessa in fiasche con medium, mentre un'altra aliquota è stata conservata in congelatore a  $-80^{\circ}\text{C}$  con DMSO al 7%. Al momento della messa a punto dell'esperimento, le cellule, dopo aver raggiunto una adeguata confluenza, sono state tripsinizzate, contate con la camera di Burker e piastrate 200.000 per pozzetto. Circa 24 ore prima dell'inizio dell'esperimento, il medium completo nei pozzetti è stato cambiato con medium privo di siero, ed è stata così effettuata una starvation overnight.

Sono state preparate le 5 sostanze per il trattamento delle cellule (resveratrolo, quercetina, berberina, catechina e malvidina) mediante opportuna solubilizzazione con DMSO, preparando così soluzioni stock per ciascuna sostanza. La preparazione di soluzioni stock è fondamentale per ottenere la giusta concentrazione delle sostanze di interesse una volta diluite nel medium all'interno del pozzetto.

Il giorno dell'esperimento le cellule sono state trattate con: 1) Resveratrolo (5;10  $\mu\text{M}$ ), 2) Quercetina (10; 25  $\mu\text{M}$ ), 3) Berberina (5;10  $\mu\text{M}$ ), 4) Catechina (5;10  $\mu\text{M}$ ), 5) Malvidina (10;20  $\mu\text{M}$ ). I tempi di incubazione sono stati di 3 e 6 ore. Al termine della fase di incubazione, dopo aver aspirato il medium dai pozzetti, sono stati aggiunti, in ciascuno di essi, 120  $\mu\text{l}$  di lisi buffer, composto da una soluzione di RIPA buffer (Tris.HCl a pH 8.0, NaCl, EDTA e SDS) a cui sono stati aggiunti un cocktail di inibitori di proteasi (Pepstatina, Leuceptina, Aprotinina, PMSF) e di fosfatasi (Sodio ortovanadato 1  $\mu\text{M}$ , Sodio pirofosfato 10  $\mu\text{M}$ , Sodio fluoruro 20  $\mu\text{M}$ ). Dopo aver proceduto con lo screpaggio, i campioni sono stati raccolti in ghiaccio, centrifugati, ed infine è stato prelevato il sovrantante, che conteneva le proteine di interesse. Una parte del lisato è stata trasferita in una eppendorf il cui contenuto è stato quantificato allo spettrofotometro, utilizzando un kit commerciale basato sulla metodica di Bradford. Per valutare la concentrazione proteica incognita nei campioni è stata costruita una curva di taratura, utilizzando concentrazioni crescenti di Siero Albumina di Bue (BSA), sciolta in acqua distillata. Tutte le prove, compresa la curva di taratura, sono state allestite in duplicato. Il metodo di Bradford è basato sul legame del colorante Coomassie blue alle proteine. Il colorante Coomassie blue cambia colore (da marrone a blu), in seguito al legame con arginine e altri amminoacidi. L'espressione di SIRT1 e di mTOR è stata valutata mediante Western Blot.

## 9.2 Western Blot

Il Western Blot (o immunofissazione) è una tecnica biochimica che permette di identificare una specifica proteina (per riconoscimento da parte di anticorpi specifici), dopo aver ottenuto la separazione delle proteine presenti nel campione in base alla loro carica e al loro peso molecolare (PM). Le molecole di grandi dimensioni migrano in genere più lentamente di quelle piccole: ciò permette la separazione delle diverse proteine all'interno del gel, appunto, in base al loro PM.

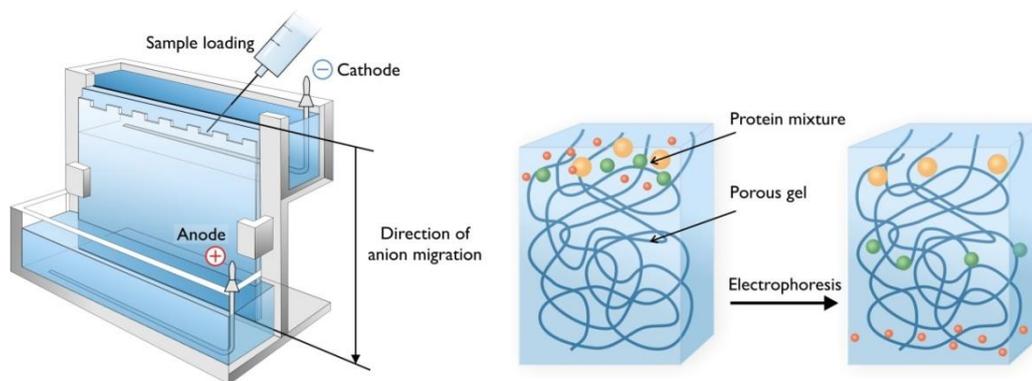
Al campione, prima del caricamento su gel, è stato aggiunto il Laemmli Buffer (Tris.HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 20 %, glicerolo, 2-mercaptoetanol, blu di bromofenolo 0,2 %). Questo tampone ha il compito di conferire un elevato peso molecolare al campione (grazie alla presenza di glicerolo), e una colorazione blu intensa (per la presenza del colorante blu di bromofenolo), in modo da agevolare le operazioni di caricamento del campione sul gel di elettroforesi; la presenza di SDS (sodio dodecil-solfato), sostanza che denatura le proteine, conferisce loro una carica negativa, cosicché, durante la corsa elettroforetica, le proteine si separeranno solo in base al loro peso molecolare e non alla propria carica.

Il tutto è stato fatto bollire per 5 minuti per completare la denaturazione già avviata dall'SDS.

Per la separazione elettroforetica delle proteine è stato utilizzato un gel di poliacrilammide che è composto da due parti, una inferiore denominata gel di corsa (Running gel), contenente acrilamide (ammide dell'acido acrilico) al 12 % (acrilamide/bis-acrilamide 30 %), in cui avviene la separazione delle proteine, ed una superiore, chiamata gel di caricamento (Stacking gel), contenente acrilamide al 10%, dove sono stati costruiti i pozzetti per il caricamento del campione (**Figura 27**).

A questo proposito, per la preparazione del gel di corsa, è stata preparata una soluzione composta da acqua distillata, Acrilamide 30 % (Sigma Aldrich), Tris-base HCl pH 8,8 (Sigma), SDS 10% (Sigma), TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), APS (ammonio persolfato) 10%. Dopo circa 30 minuti, si procede con la preparazione della soluzione per il gel di caricamento composta da acqua distillata, Acrilamide 30 % (Sigma), Tris-base HCl pH 6,8 (Sigma), SDS 10 %, TEMED (N,N,N',N' Tetramethylethylenediamine), APS (ammonio persolfato) 10% (Sigma). Anche per questa reazione di polimerizzazione occorrono circa 30 minuti. I vetrini contenenti il gel polimerizzato sono stati trasferiti nella vaschetta per l'elettroforesi contenente un tampone

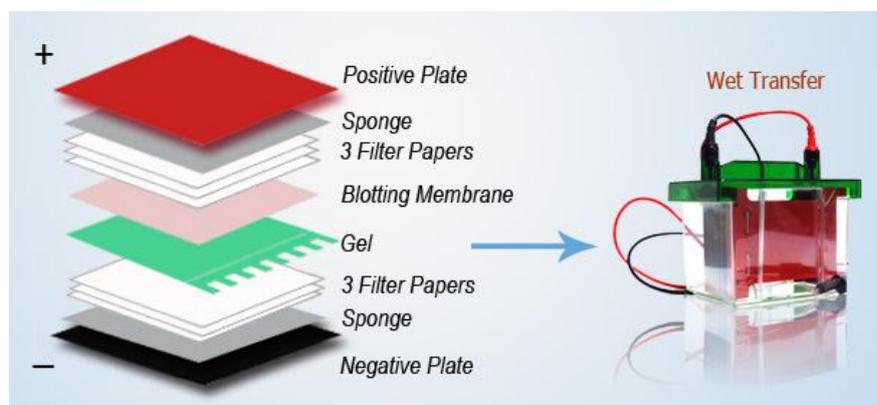
di corsa elettroforetica, il Running Buffer, la cui preparazione è composta da Tris-base (Sigma), Glicina (Sigma), SDS 1% (Sigma) e acqua distillata.



**Figura 27.** Caricamento dei pozzetti e separazione elettroforetica delle proteine

I pozzetti, presenti nel gel di caricamento, sono stati successivamente caricati con i vari campioni, ad eccezione del primo pozzetto dove è stato caricato il marcatore di peso molecolare noto, il cosiddetto marker (Prestained Protein Sharpmass-Euroclone). La corsa elettroforetica è stata eseguita facendo passare una corrente a 200V per circa 1 ora, o comunque fino a quando il fronte non ha raggiunto il fondo del gel.

Una volta terminata la corsa, è stato eseguito il trasferimento delle proteine dal gel a una membrana di Polivinildenfluoruro (PVDF). Il tutto è stato riposto in una seconda vaschetta per elettroforesi che è stata riempita di Transfer Buffer (composto da tris base e da Glicina) fino a completa sommersione del “sandwich” (**Figura 28**).



**Figura 28.** Fase di trasferimento

L'alimentatore è stato programmato in modo da fornire un voltaggio pari a 100V per 1 ora. Dopo il trasferimento la membrana è stata posta in una soluzione di bloccaggio (per prevenire le interazioni non specifiche tra anticorpo e membrana) composta da latte magro in polvere al 5% diluito in TBS-Tween 1 x (TBS 1x, Tween20 0,1%) per 1 ora in agitatore e a temperatura ambiente. Dopo la fase di bloccaggio la membrana è stata sottoposta ad alcuni lavaggi rapidi con TBS-tween 1x.

Per la determinazione di SIRT1 si è proceduto all'incubazione con l'anticorpo primario (AbI° anti-SIRT1, rabbit, alla diluizione di 1:1000 in TBS-Tween + BSA 5%) per tutta la notte a 4°C. Il giorno seguente sono stati eseguiti 5 lavaggi con TBS-Tween, e in seguito la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario (AbII° goat anti-rabbit diluito 1:10000 in TBS-Tween + BSA 5%) per un ora in agitazione.

Per la determinazione di mTOR è stato necessario utilizzare due tipi di anticorpi primari, di cui uno per la forma fosforilata di mTOR (rabbit, diluito 1:1000 in TBS-Tween + BSA 5%) e uno per mTOR totale (rabbit, diluito 1:1000 in TBS-Tween + BSA 5%). Infatti la determinazione della forma fosforilata di mTOR richiede il suo confronto con mTOR totale. L'incubazione con l'anticorpo primario è avvenuta anche qui per tutta la notte a 4°C e il giorno seguente si è proceduto con l'incubazione dell'anticorpo secondario (AbII° goat anti-rabbit diluito 1:10000 in TBS-Tween + BSA 5%) per un ora in agitazione.

Durante questa fase l'anticorpo secondario, coniugato ad un enzima perossidasi, si lega in maniera specie-specifica all'anticorpo primario. Nel passaggio successivo l'enzima perossidasi legherà un substrato specifico (il luminolo) per la reazione di chemiluminescenza. In seguito sono stati effettuati una serie di lavaggi con TBS-Tween in agitazione allo scopo di rimuovere tutto l'anticorpo secondario non legato.

Lo sviluppo conclusivo è stato eseguito ponendo la membrana nella soluzione di sviluppo LifeAblot plus Enhanced Chemiluminescent HRP Substrate (Euroclone) per circa 3 minuti in agitazione e l'impressione della lastra fotografica è stata realizzata mediante lo strumento Kodak Image Station 440 CF (**Figura 29**).



**Figura 29.** Kodak Image Station 440 CF

### **9.3 ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica è stata condotta tramite il pacchetto statistico Statview, versione 5.0.1 (SAS Institute, Concetto Abacus, Inc., Berkeley, California) ed il programma di calcolo Microsoft Excel 2010.

In particolare, per tutti i dati la significatività è stata valutata applicando il test t di Student per dati non appaiati.

Sono stati considerati statisticamente significativi valori di  $p < 0.01$  rispetto al controllo.

I dati sono espressi come Media  $\pm$  ES (errore standard).

## 10. Risultati

### 10.1 Stimolazione di SIRT1

Qui di seguito sono riportati i risultati dell'analisi dell'espressione di SIRT1, mediante la tecnica del Western Blot. Si può osservare come l'espressione di questa proteina sia significativamente aumentata in tutti i gruppi sperimentali rispetto al gruppo di controllo.

#### RESVERATROLO

Il RSV è stato testato alle concentrazioni di 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ . A 5  $\mu\text{M}$  si osserva un incremento statisticamente significativo di SIRT1, rispetto al controllo, di  $46.03 \pm 3.07\%$  a 3h e del  $47.3 \pm 6.29\%$  a 6h ( $p < 0,0001$ ), mentre alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  si osserva un aumento del  $46.8 \pm 2.82\%$  a 3h e del  $47.6 \pm 2.28\%$  a 6h ( $p < 0,0001$ ) (Figura 30).

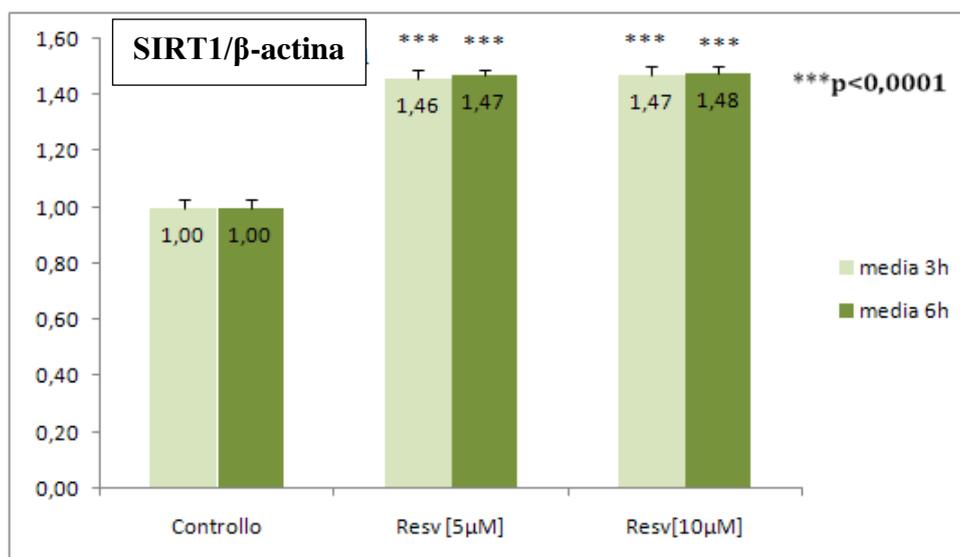
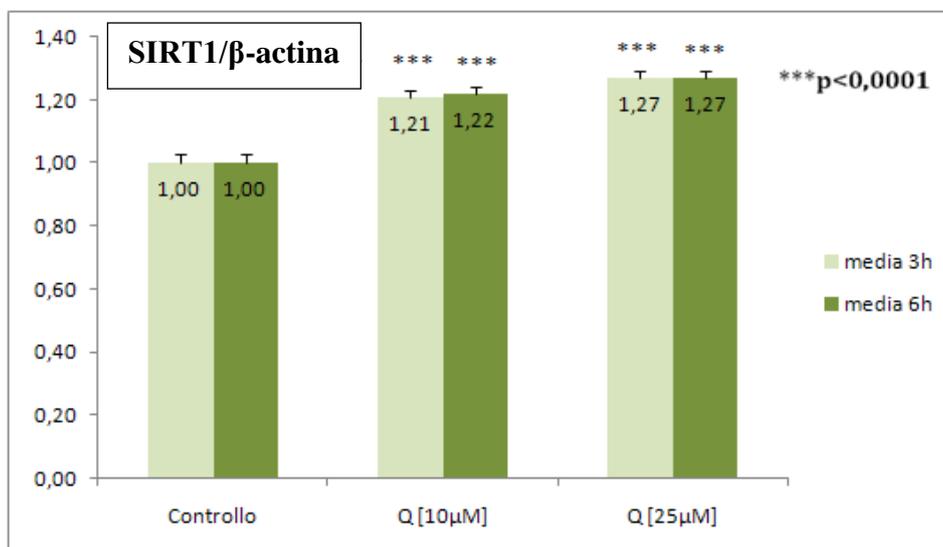


Figura 30. Espressione di SIRT1. \*\*\* $p < 0,0001$  vs controllo

#### QUERCETINA

La quercetina è stata testata alle concentrazioni di 10  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ . A 10  $\mu\text{M}$  si osserva un incremento statisticamente significativo di SIRT1, rispetto al controllo, di  $21.50 \pm 2.91\%$  a 3h e del  $22 \pm 2.58\%$  a 6h ( $p < 0,0001$ ), mentre alla concentrazione di 25  $\mu\text{M}$  si osserva un

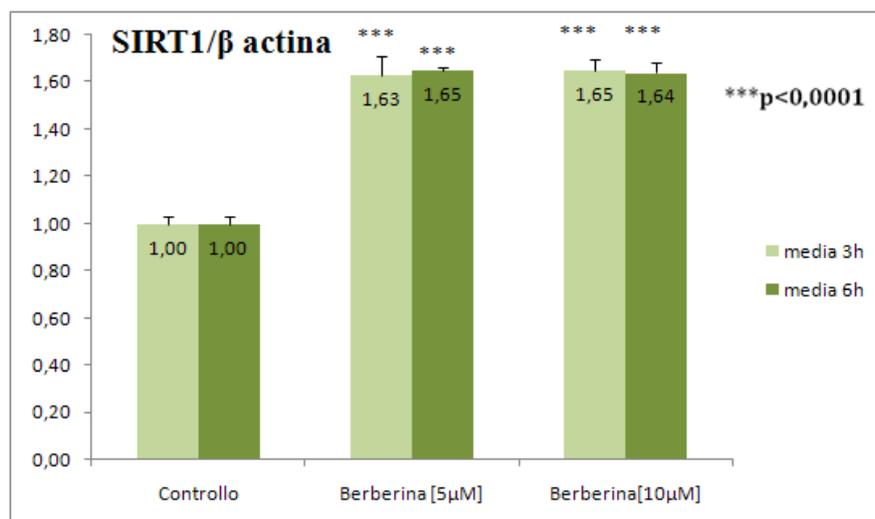
aumento dell'attività di SIRT1 del  $27\pm 3.08\%$  a 3h e del  $27.50\pm 1.96\%$  alle 6h ( $p<0,0001$ ) (Figura 31).



**Figura 31.** Espressione di SIRT1. \*\*\* $p<0,0001$  vs controllo

## BERBERINA

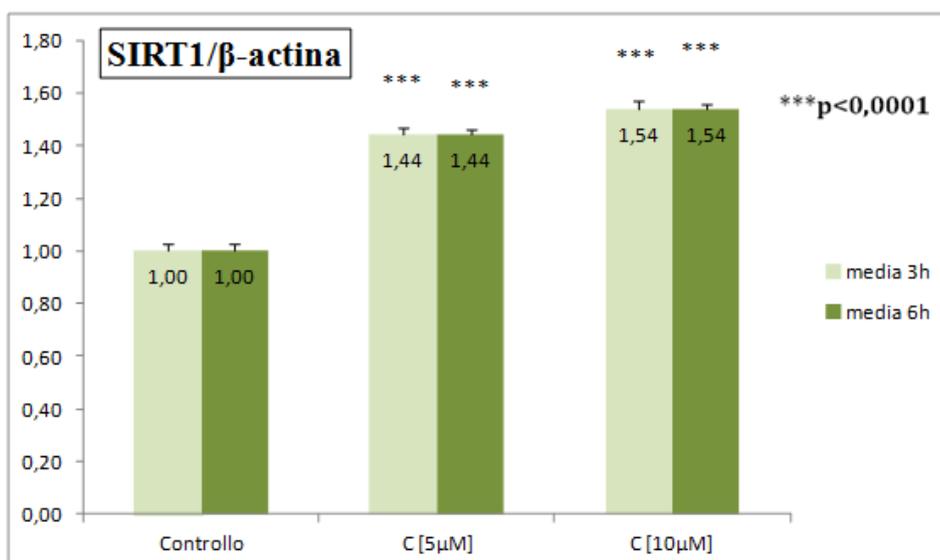
La berberina è stata testata alle concentrazioni di 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ . In entrambi i casi si osserva un incremento statisticamente significativo di SIRT1 rispetto al controllo. Alla concentrazione di 5  $\mu\text{M}$  si osserva infatti un incremento rispetto al controllo di  $63.09\pm 8.19\%$  a 3h e di  $65.5\pm 10.98\%$  alle 6h ( $p<0,0001$ ). A 10  $\mu\text{M}$  si osserva un incremento statisticamente significativo, rispetto al controllo, di  $65.09\pm 5.17\%$  a 3h e di  $64.2\pm 3.65$  a 6h ( $p<0,0001$ ) (Figura 32).



**Figura 32.** Espressione di SIRT1. \*\*\*p<0,0001 vs controllo

### CATECHINA

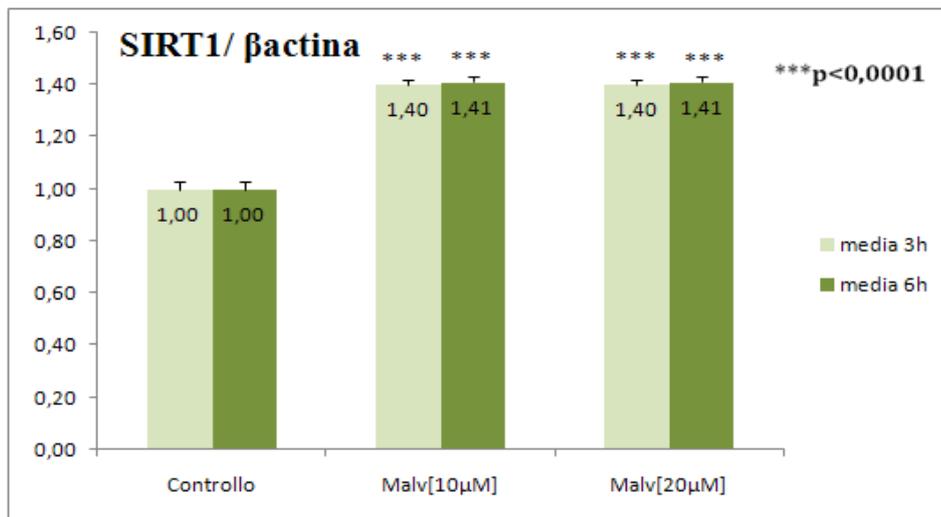
La catechina è stata testata alle concentrazioni di 5 μM e 10 μM. A 5 μM si osserva un incremento statisticamente significativo di SIRT1, rispetto al controllo, di **43.66±3.65%** a 3h e di **44.16±2.83%** alle 6h (p<0,0001). A 10 μM si osserva un incremento statisticamente significativo, rispetto al controllo, di **54.16±2.86%** a 3h e di **54±2.49%** a 6h (p<0,0001) (**Figura 33**).



**Figura 33.** Espressione di SIRT1. \*\*\*p<0,0001 vs controllo

## MALVIDINA

La malvidina è stata testata alle concentrazioni di 10  $\mu\text{M}$  e di 20  $\mu\text{M}$ . Alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  si osserva un incremento statisticamente significativo di SIRT1, rispetto al controllo, del  $40\pm 3.39\%$  a 3h e del  $41.01\pm 2.12\%$  a 6h ( $p < 0,0001$ ). A 20  $\mu\text{M}$  si osserva un incremento statisticamente significativo di SIRT1, rispetto al controllo, di  $40.3\pm 2.20\%$  a 3h e di  $40.8\pm 3.01\%$  a 6h ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 34**).



**Figura 34.** Espressione di SIRT1. \*\*\* $p < 0,0001$  vs controllo

## 10.2 Inibizione di mTOR

Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi dell'espressione di mTOR, mediante la tecnica del Western Blot. Si può osservare come l'espressione di questa proteina sia significativamente diminuita in tutti i gruppi sperimentali rispetto al gruppo di controllo. Le sostanze che sono state testate sono quercetina, berberina, catechina e malvidina.

### QUERCETINA

La quercetina è stata testata alle concentrazioni di 10  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ . A 10  $\mu\text{M}$  si osserva una diminuzione statisticamente significativa di mTOR, rispetto al controllo, di  $-8\pm 2\%$  a 3h e di  $-36\pm 4\%$  a 6h ( $p < 0,0001$ ). Alla concentrazione di 25  $\mu\text{M}$  si osserva una diminuzione statisticamente significativa, rispetto al controllo, di  $-24\pm 6\%$  ( $p < 0,0001$ ) a 3h di trattamento e di  $-42\pm 4\%$  alle 6h ( $p < 0,0001$ ) (Figura 35).

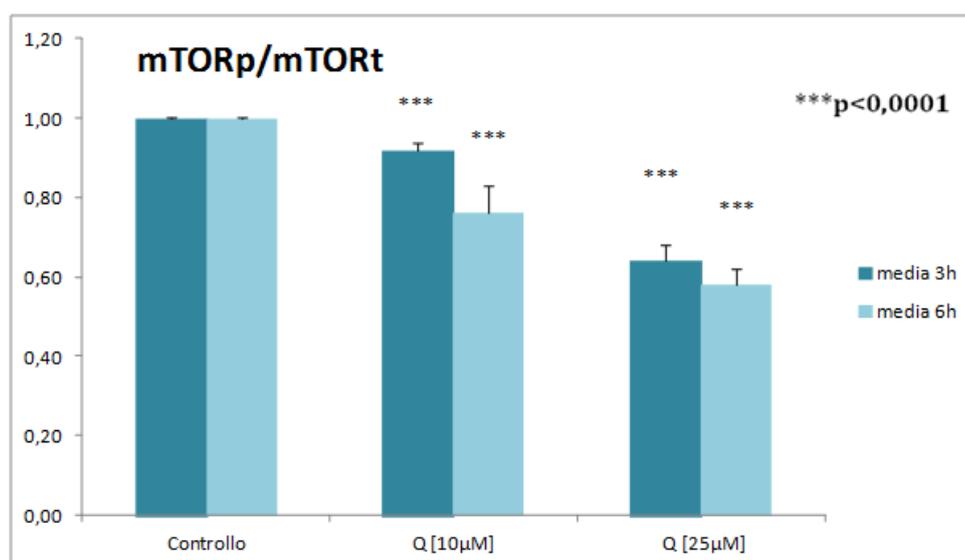
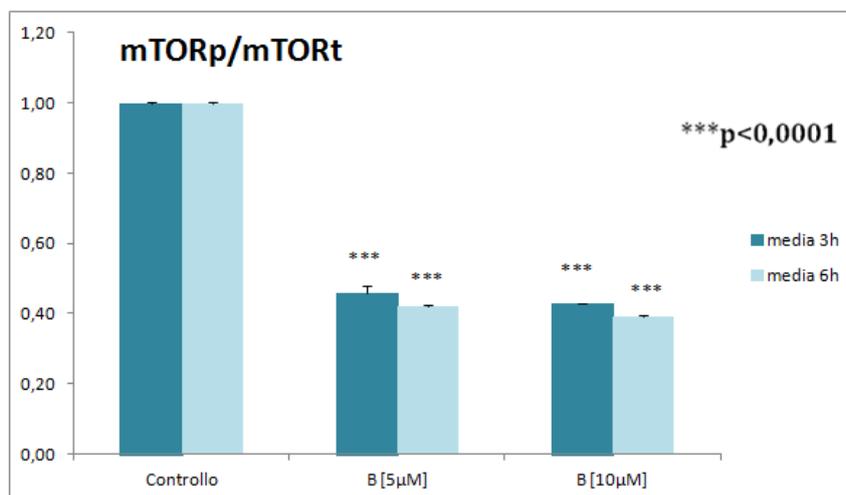


Figura 35. Espressione di mTOR. \*\*\* $p < 0,0001$  vs controllo

### BERBERINA

La berberina è stata testata alle concentrazioni di 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ . A 5  $\mu\text{M}$  si osserva una diminuzione statisticamente significativa di mTOR, rispetto al controllo, di  $-54\pm 1,7\%$  a 3h e di  $-58\pm 0,7\%$  a 6h ( $p < 0,0001$ ). Alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  si osserva un decremento

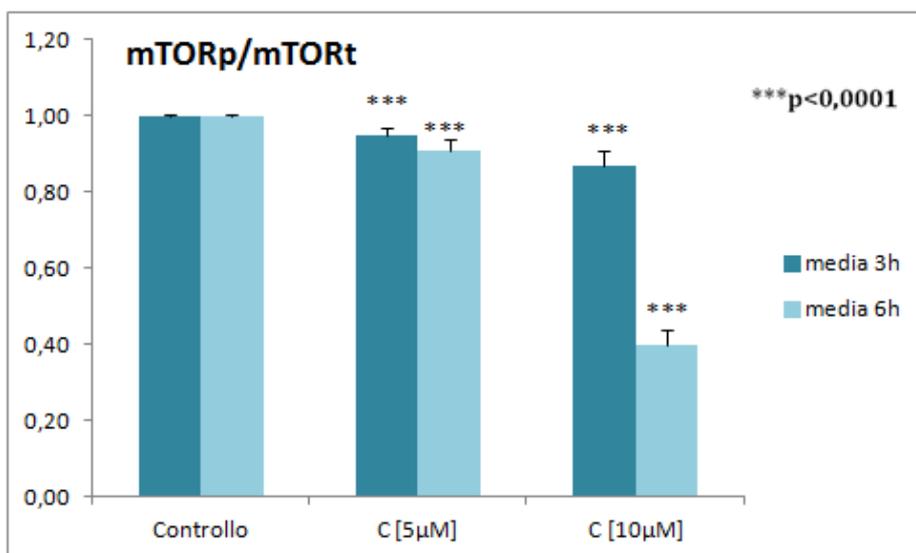
statisticamente significativo, rispetto al controllo, di  $-57\pm 0.8\%$  a 3 h e di  $-61\pm 0.4\%$  a 6h ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 36**).



**Figura 36.** Espressione di mTOR. \*\*\* $p < 0,0001$  vs controllo

## CATECHINA

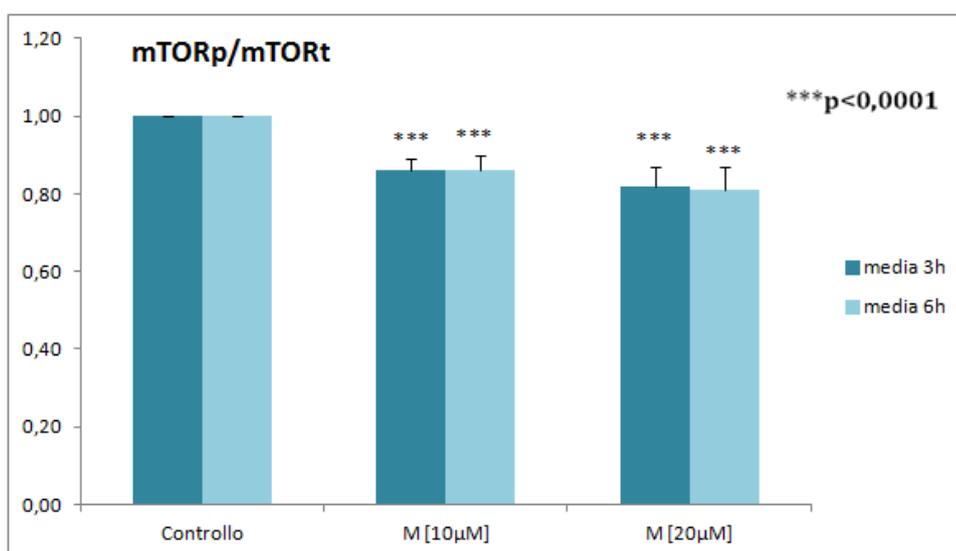
La catechina è stata testata alle concentrazioni di 5 µM e 10 µM. A 5 µM si osserva una diminuzione statisticamente significativa di mTOR, rispetto al controllo, di  $-5\pm 1\%$  a 3h e di  $-9\pm 2\%$  a 6h ( $p < 0,0001$ ). Alla concentrazione di 10 µM si osserva un decremento statisticamente significativo, rispetto al controllo, di  $-13\pm 5\%$  a 3 h e di  $-60\pm 36\%$  a 6h ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 37**).



**Figura 37.** Espressione di mTOR. \*\*\*p<0,0001 vs controllo

## MALVIDINA

La malvidina è stata testata alle concentrazioni di 10 µM e di 20 µM. A 10 µM si osserva una diminuzione statisticamente significativa di mTOR, rispetto al controllo, di  $-14\pm 4\%$  a 3h e di  $-14\pm 3\%$  alle 6h ( $p<0,0001$ ). Alla concentrazione di 20 µM, si osserva una diminuzione statisticamente significativa, rispetto al controllo, di  $-18\pm 5\%$  a 3 h e  $-19\pm 5\%$  a 6h ( $p<0,0001$ ) (**Figura 38**).



**Figura 37.** Espressione di mTOR. \*\*\*p<0,0001 vs controllo

## 11. Discussione

I risultati ottenuti sulla stimolazione dell'espressione di SIRT1 da parte dei composti fenolici testati hanno confermato le nostre aspettative iniziali. Come già ampiamente riportato in letteratura, il resveratrolo è stato in grado di stimolare l'espressione di SIRT1 in maniera significativa, rispetto al gruppo di controllo, sia alla concentrazione di 5  $\mu$ M che alla concentrazione di 10  $\mu$ M.

Similmente al resveratrolo, anche la quercetina è risultata essere in grado di stimolare l'espressione di SIRT1, e le due concentrazioni a cui si è ottenuta la stimolazione più significativa sono state di 10  $\mu$ M e di 25  $\mu$ M, confermando così alcuni studi che mettevano in luce l'importante regolazione positiva mediata dalla quercetina su SIRT1.

Meno informazioni avevamo a disposizione riguardo a un possibile ruolo svolto in questo contesto dalle sostanze berberina, catechina e malvidina, ma i risultati ottenuti hanno confermato che anche queste sostanze, testate rispettivamente alle concentrazioni di 5 -10  $\mu$ M, 5-10  $\mu$ M e 10 -20  $\mu$ M, hanno determinato un aumento statisticamente significativo, rispetto al gruppo di controllo, dell'espressione di SIRT1.

L'importante ruolo che SIRT1 assume nell'invecchiamento è legato, oltre a quanto appena visto, soprattutto alla sua azione inibitoria su mTOR, una proteina chinasi implicata nella regolazione di numerosi pathway metabolici.

La valutazione di queste sostanze sul loro possibile ruolo inibitorio sul pathway di mTOR ha evidenziato che la berberina, ad esempio, testata alle concentrazioni di 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M, è stata in grado di determinare una diminuzione statisticamente significativa dell'espressione mTOR, rispetto al controllo. La quercetina è risultata essere in grado di interferire con il pathway di mTOR, determinando una diminuzione statisticamente significativa della sua espressione. Come ampiamente dimostrato dalla letteratura, la capacità della quercetina di interferire con l'attività di mTOR e con la attivazione del pathway PI3K/Akt conferisce a questa sostanza il vantaggio di poter funzionare come duplice inibitore di mTOR/PI3K. La capacità della quercetina di inibire l'espressione di mTOR mediante molteplici pathways potrebbe quindi risultare un utile approccio per il trattamento dei tumori e altre malattie associate alla deregolazione di mTOR.

Infine si è proceduto nel testare le ultime due sostanze rimanenti, ossia la catechina e la malvidina. La catechina, testata alle concentrazioni di 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , ha determinato, a entrambe le concentrazioni, una diminuzione statisticamente significativa dell'espressione di mTOR, rispetto al controllo. Similmente alla catechina, anche la malvidina è risultata essere in grado di inibire l'espressione di mTOR, e le due concentrazioni a cui si è ottenuta la stimolazione più significativa sono state di 10  $\mu\text{M}$  e di 20  $\mu\text{M}$ .

Questi risultati suggeriscono quindi che queste due sostanze potrebbero essere oltre ad un utile approccio come terapia antitumorale, dato che in numerosi tipi di cancro il pathway di mTOR risulta essere disregolato, anche utilizzabili in diverse patologie età correlate.

## 12. Conclusioni

A causa della scoperta di geni anti-invecchiamento negli organismi inferiori, i diversi approcci di ricerca scientifica atti a allungare la durata della vita umana hanno, abbastanza comprensibilmente, conosciuto una considerevole diffusione. Mentre la comprensione dei meccanismi che consentono di estendere la durata della vita umana potrebbe richiedere diversi decenni, ammesso che sia possibile arrivare a tanto, i ricercatori stanno già impiegando le conoscenze ricavate dagli studi sull'invecchiamento e gli effetti della restrizione calorica per scoprire nuovi farmaci per curare le numerose malattie età correlate. A tal proposito, l'impiego delle sostanze polifenoliche, in grado di stimolare l'espressione di SIRT1 ed inibire quella di mTOR, potrebbero contribuire alla cura e alla prevenzione delle principali malattie degenerative.

Numerose osservazioni sperimentali si schierano a supporto dell'ipotesi che la lunghezza telomerica sia un biomarker per l'invecchiamento delle cellule somatiche umane. Oggi molti laboratori di ricerca stanno cercando il modo di resettare l'orologio biologico, al fine di ottenere l'allungamento delle estremità cromosomiche nelle cellule eucariotiche e rallentare quindi i processi di invecchiamento.

Numerosi studi condotti in diversi modelli animali evidenziano, in questo contesto, l'importante ruolo svolto da SIRT1 nel preservare l'integrità del genoma e la sua stabilità. Infatti da questi studi è risultato che la over-espressione di SIRT1 nei topi porta ad una diminuzione della percentuale di erosione dei telomeri associata alla divisione cellulare e all'invecchiamento tissutale, mentre la delezione di SIRT1 porta ad un effetto opposto. Con l'invecchiamento, quindi, i telomeri si accorciano, fino a raggiungere una lunghezza critica e inizia una fase di instabilità genomica che, probabilmente, corrisponde allo stadio di iperplasia della progressione tumorale. L'importante ruolo svolto dalle sostanze polifenoliche nella stimolazione dell'espressione di SIRT1 potrebbe risultare, in questo contesto, un utile approccio per contrastare e rallentare il processo di invecchiamento tramite la preservazione dell'integrità del genoma e della sua stabilità.

Numerosi studi sperimentali e clinici confermano i benefici effetti della restrizione calorica nell'uomo che concorrono alla riduzione delle malattie età correlate ed hanno un impatto favorevole sulle affezioni tumorali. Tali effetti favorevoli si realizzano, almeno in parte, per inibizione delle vie di segnale insulina/IGF-1 e mTOR. Da un punto di vista

molecolare emerge l'importanza del segnale mTOR e degli enzimi Sirtuine nel mantenimento della sopravvivenza cellulare e nella patologia tumorale.

L'inibizione del primo e l'incremento delle Sirtuine concorrono all'azione protettiva che si manifesta in condizioni di restrizione calorica. In modelli animali la restrizione calorica svolge una azione protettiva contro il cancro che per il suo metabolismo ha bisogno di molta energia per promuovere la sintesi di lipidi, proteine, DNA. Anche nell'uomo la riduzione delle calorie nella dieta ha un'azione protettiva e permette il prolungamento della sopravvivenza. A tal proposito l'impiego di sostanze che in qualche modo mimano gli effetti mediati dalla restrizione calorica potrebbe giocare un ruolo di primaria importanza nel trattamento di numerose forme di cancro e patologie correlate all'età, al fine di ottenere un miglioramento delle aspettative di vita.

## 13.Bibliografia

- [1] **Klar AJ, Seymour F, Macleod K.** *MAR1-A* regulator of the *HMa* and *HMa* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1979; 93: 37–50.
- [2] **Blander G, Guarente L.** The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73: 417–35.
- [3] **Gottlieb S, Esposito RE.** A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell*. 1989; 56: 771–776.
- [4] **Aparicio OM, Billington BL, Gottschling DE.** Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell*. 1991; 66: 1279–1287.
- [5] **Braunstein M, Rose AB, Holmes SG, et al.** Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev*. 1993; 7: 592–604.
- [6] **Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, et al.** The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev*. 1995; 9: 2888–2902.
- [7] **Derbyshire MK, Weinstock KG, Strathern JN.** HST1, a new member of the SIR2 family of genes. *Yeast*. 1996; 12: 631–640.
- [8] **Frye, R. A.** Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 273: 793–798.
- [9] **Greg Kelly.** A review of the Sirtuin System, its Clinical Implications, and the potential Role of Dietary Activators like Resveratrol: Part 1. *Alternative Medicine Review*. 2010; Volume 15, Number 3.

- [10] **Denu, J.M.** The Sir2 family protein deacetylases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005; 9: 431-440.
- [11] **Houtkooper, R.H. et al.** Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012; 13: 225-238.
- [12] **Tanno M, Sakamoto J, Miura T et al.** Nucleo cytoplasmic shuttling of the NAD-dependent histone deacetylase SIRT1. *J BiolChem.* 2007; 282: 6823–6832.
- [13] **Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, et al.** Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* 2000; 403: 795-800.
- [14] **Cant C., Gerhart-Hines Z., Feige J.N.** AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature.* 2009; 458: 1056–1060.
- [15] **A Mair, W. and Dillin, A.** Aging and survival: the genetics of lifespan extension by dietary restriction. *Annu. Rev. Biochem.* 2008; 77: 727-754.
- [16] **Guarente, L. and Picard, F.** Calorie restriction – the Sir2 connection. *Cell.* 2005; 120: 473-482.
- [17] **Yang Y., Fu W., Chen J. et al.** SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat. Cell Biol.* 2007; 9: 1253–1262.
- [18] **Gao Z., Zhang J., Kheterpal I. et al.** Sirtuin 1 (SIRT1) protein degradation in response to persistent c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation contributes to hepatic steatosis in obesity. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 22227–22234.
- [19] **Gerhart-Hines Z, Dominy JE Jr, Blättler SM et al.** The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD<sup>+</sup>. *Mol. Cell.* 2011; 44: 851–863.

- [20] **Guo X., Williams JG, Schug T. T. et al.** DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 13223–13232.
- [21] **Nasrin N., Kaushik V. K., Fortier E. et al.** JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One.* 2009; 4: e8414.
- [22] **Sasaki T., Maier B., Koclega K. D. et al.** Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoSOne.* 2008; 3: e4020.
- [23] **Zschoernig B., Mahlkecht U.** Carboxy-terminal phosphorylation of SIRT1 by proteinkinase CK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 381: 372–377.
- [24] **Sasaki, T. et al.** Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoSOne.* 2008; 3: e4020.
- [25] **Kang H., Jung J. W., Kim M. K. et al.** CK2 is the regulator of SIRT1 substrate-binding affinity, deacetylase activity and cellular response to DNA damage. *PLoSOne.* 2009; 4: e6611.
- [26] **Nasrin N. et al.** JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoSOne.* 2009; 4: e8414.
- [27] **Nemoto S., Fergusson MM, and Finkel T.** Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science.* 2004; 306: 2105-2108.
- [28] **Brown E.J., Albers M.W., Shin T.B. et al.** A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature.* 1994; 369: 756–758.
- [29] **Chiu M.I., Katz H., and Berlin V.** RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 12574–12578.

- [30] **Sabatini DM., Erdjument-Bromage H., Lui M. et al.** RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994; 78: 35–43.
- [31] **Kunz J., Henriquez R., Schneider U. et al.** Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*. 1993; 73: 585–596.
- [32] **Helliwell S.B., Wagner P., Kunz J. et al.** TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell*. 1994; 5: 105–118.
- [33] **Chen J., Zheng X.F., Brown E.J. et al.** Identification of an 11-kDa FKBP12–rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12–rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 4947–4951.
- [34] **Choi J., Chen J., Schreiber S.L. et al.** Structure of the FKBP12–rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*. 1996; 273: 239–242.
- [35] **Sarbassov D.D., Ali S.M. and Sabatini D.M.** Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*. 2005; 17: 596-603.
- [36] **Andrade M.A. and Bork P.** HEAT repeats in the Huntington’s disease protein. *Nat. Genet.* 1995; 11: 115–116.
- [37] **Bosotti R., Isacchi A. and Sonnhammer E.L.** FAT: A novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25: 225–227.
- [38] **Peterson R.T., Beal P.A., Comb M.J. et al.** FKBP12–rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 7416–7423.

- [39] **Takahashi T., Hara K., Inoue H. et al.** Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes Cells.* 2000; 5: 765–775.
- [40] **Laplante M., Sabatini D.M.** mTOR signaling in growth control and disease *Cell.* 2012; 149: 274-93.
- [41] **Hay N., Sonenberg N.** Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004; 18: 1926-45.
- [42] **Li Y., Corradetti MN., Inoki K. et al.** TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29: 32-8.
- [43] **Sancak Y., Thoreen CC., Peterson TR. et al.** PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell.* 2007; 25: 903–915.
- [44] **Thedieck K., Polak P., Kim ML et al.** PRAS40 and PRR5-Like Protein Are New mTOR Interactors that Regulate Apoptosis. *PLoS ONE.* 2007; 2: e1217.
- [45] **Vander Haar E., Lee SI, Bandhakavi S. et al.** Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 316–323.
- [46] **Wang L., Harris TE, Roth RA et al.** PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 20036–20044.
- [47] **Inoki K., Li Y., Zhu T. et al.** TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002; 4: 648–657.

- [48] **Ma L., Chen Z., Erdjument-Bromage H. et al.** Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*. 2005; 121: 179–193.
- [49] **Manning BD, Tee AR, Logsdon MN et al.** Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol. Cell*. 2002; 10: 151–162.
- [50] **Potter CJ, Pedraza LG, Xu T.** Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol*. 2002; 4: 658–665.
- [51] **Roux PP, Ballif BA, Anjum R. et al.** Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13489–13494.
- [52] **Inoki K., Zhu T., Guan KL.** TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003; 115: 577–590.
- [53] **Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF et al.** AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30: 214–226.
- [54] **Brugarolas JB, Vazquez F., Reddy A. et al.** TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer Cell*. 2003; 4: 147–158.
- [55] **De Young MP, Horak P., Sofer A.** Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*. 2008; 22: 239–251.

- [56] **Reiling JH, Hafen E.** The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charyb disinhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TS Drosophila. *Genes Dev.* 2004; 18: 2879–2892.
- [57] **Feng Z., Zhang H., Levine AJ et al.** The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 8204–8209.
- [58] **Budanov AV, Karin M.** p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell.* 2008; 134: 451–460.
- [59] **Blommaert EF, Luiken JJ, Blommaert PJ et al.** Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rathepatocytes. *J BiolChem.* 1995; 270: 2320–2326.
- [60] **Hara K., Yonezawa K., Weng QP et al.** Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J BiolChem.* 1998; 273: 14484–14494.
- [61] **Jacinto E., Loewith R., Schmidt A. et al.** Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004; 6: 1122–1128.
- [62] **Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH et al.** Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *CurrBiol.* 2004; 14: 1296–1302.
- [63] **Phung TL, Ziv K., Dabydeen D. et al.** Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer cell.* 2006; 10: 159–170.
- [64] **Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S. et al.** Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 2006; 22: 159–168.

- [65] **Zinzalla V., Stracka D., Oppliger W. et al.** Activation of mTORC2 by association with the Ribosome. *Cell*. 2011; 144: 757–768.
- [66] **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM et al.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTORcomplex. *Science*. 2005; 307: 1098–1101.
- [67] **Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC et al.** Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *DevCell*. 2006; 11: 859–871.
- [68] **Jacinto E., Facchinetti V., Liu D. et al.** SIN1/MIP1 maintains rictor-mTORcomplex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*. 2006; 127: 125–137.
- [69] **Garcia-Martinez JM, Alessi DR.** mTORcomplex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J*. 2008; 416: 375–385.
- [70] **Jacinto E., Loewith R., Schmidt A. et al.** Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004; 6: 1122–1128.
- [71] **Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH et al.** Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004; 14: 1296–1302.
- [72] **Blagosklonny MV.** Linking calorie restriction to longevity through sirtuins and autophagy: any role for TOR. *Cell Death Dis*. 2010; 1: e12.
- [73] **McCay CM, Crowel MF, Maynard LA.** The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size. *J. Nutr*, 1935; 10: 63–79.

- [74] **Barrows CH, Kokkonen GC.** Dietary restriction and life extension, biological mechanisms. In: Moment GB, ed. Nutritional approaches to aging research. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 1982: 219–43.
- [75] **Weindruch R., Walford RL.** The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield, IL: Charles C Thomas Publisher, 1988.
- [76] **Richardson, A.** The effect of age and nutrition on protein synthesis by cells and tissues from mammals. In Handbook of nutrition in the aged (ed. W.R. Watson), CRC Press, Boca Raton, FL. 1985; pp. 31–48.
- [77] **Weindruch, R., Walford, R.L., Fligiel, S. et al.** The retardation of aging in mice by dietary restriction: Longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J. Nutr.* 1986; 116: 641–654.
- [78] **Sohal, R.S. and Weindruch, R.** Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 273: 59–63.
- [79] **Lane M.A., Black A., Handy A. et al** Caloric restriction in primates. *Ann. NY Acad. Sci.* 2001; 928: 287–295.
- [80] **Hansen BC, Bodkin NL.** Primary prevention of diabetes mellitus by prevention of obesity in monkeys. *Diabetes.* 1993; 42: 1809-14.
- [81] **Houthoofd K., Braeckman BP., Johnson TE et al.** Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 2003; 38: 947–954.
- [82] **Bishop NA, Guarente L.** Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 2007; 447: 545–549.
- [83] **Panowski SH, Wolff S., Aguilaniu H. et al.** PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature.* 2007; 447: 550–555.

- [84] **Clancy DJ., Gems D., Hafen E. et al.** Dietary restriction in long-lived dwarf flies. *Science*. 2002; 296: 319.
- [85] **Weindruch R., Walford RL, Fligiel S. et al.** The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J. Nutr.* 1986; 116: 641-654.
- [86] **Klass MR.** Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech. Ageing Dev.* 1977; 6: 413 – 29.
- [87] **Fontana L., Partridge L., Longo VD.** Review Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans. *Science*. 2010; 328: 321-6.
- [88] **Kaeberlein M., McVey M., Guarente L.** The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 1999; 13: 2570-80.
- [89] **Lin SJ, Defossez PA, Guarente L.** Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 2000; 289: 2126-8.
- [90] **Cohen HY, Miller C., Bitterman KJ et al.** Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004; 305: 390-2.
- [91] **Herranz D., Munoz-Martin M., Canamero M. et al.** Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat. Commun.* 2010; 1:3.
- [92] **Dhahbi JM, Kim HJ, Mote PL. et al.** Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101: 5524–5529.
- [93] **Fulgencio JP, Kohl C., Girard J. et al.** Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. *Biochem. Pharma-col.* 2001; 62: 439–446.

- [94] **Ingram DK, Anson RM, De Cabo R. et al.** Development of calorie restriction mimetics as a longevity strategy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1019: 412–423.
- [95] **Spindler SR, Dhahbi JM, Mote PL et al.** Rapid identification of candidate CR mimetics using microarrays. *Biogerontology.* 2003; 4: 89.
- [96] **Wan R., Camandola S., Mattson MP.** Intermittent fasting and dietary supplementation with 2-deoxy- D-glucose improve functional and metabolic cardiovascular risk factors in rats. *FASEB J.* 2003; 17: 1133–1134.
- [97] **Wan R., Camandola S., Mattso MP.** Dietary supplementation with 2-deoxy-D-glucose improves cardiovascular and neuroendocrine stress adaptation in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 287: H1186–H1193.
- [98] **Weindruch R., Kayo T., Lee CK et al.** Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J. Nutr.* 2001; 131: 918S–923S
- [99] **Anisimov VN, Semchenko AV, Yashin AI.** Insulin and longevity: antidiabetic biguanides as geroprotectors. *Biogerontology.* 2003; 4: 297– 307.
- [100] **Dilman VM, Anisimov VN.** Effect of treatment with phenformin, diphenylhydantoin or L-dopa on life span and tumour incidence in C3H/ Sn mice. *Gerontology.* 1980; 26: 241–246.
- [101] **Carling D.** The AMP-activated protein kinase cascade; a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29: 18–24.
- [102] **Shishodia S. and Aggarwal BB.** (2006) Resveratrol: a polyphenol for all seasons. *Resveratrol in Health and Disease* 1, 1-15
- [103] **Vastano BC, Chen Y, Zhu N et al.** Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*, *J Agric Food Chem.* 2000; 48: 253–256.

- [104] **Borra MT, Smith BC. and Denu JM.** Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *Journal of Biological Chemistry.* 2005; 280: 17187-17195.
- [105] **Kaeberlein M. et al.** Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *Journal of Biological Chemistry.* 2005; 280: 17038-17045.
- [106] **Behr D. et al.** Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chemical Biology & Drug Design.* 2009; 74: 619-624.
- [107] **Pacholec M. et al.** SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *Journal of Biological Chemistry.* 2010; 285: 8340-8351.
- [108] **Zini R. et al.** Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under Experimental and Clinical Research.* 1999; 25: 87-97.
- [109] **Gledhill JR. et al.** Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007; 104: 13632-13637.
- [110] **Hawley SA et al.** Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metabolism.* 2010; 11: 554-565.
- [111] **Park SJ et al.** Resveratrol ameliorates aging related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell.* 2012; 148: 421-433.
- [112] **Hou X. et al.** SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMPactivated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry.* 2008; 283: 20015-20026.
- [113] **Ivanov VN et al.** Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. *Experimental Cell Research.* 2008; 314: 1163-1176.

- [114] **Lan F. et al.** SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 2008; 283: 27628–27635.
- [115] **Hardie DG.** AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2007; 8: 774-785.
- [116] **Carling D., Sanders MJ. And Woods A.** (2008) The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes.* 2008; Sep;32 Suppl 4:S55-9.
- [117] **Dasgupta B. and Milbrandt J.** Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007; 104: 7217-7222.
- [118] **Vingtdeux V. et al.** AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *Journal of Biological Chemistry.* 2010; 285: 9100-9113.
- [119] **Puissant A. et al.** Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Research.* 2010; 70: 1042-105.
- [120] **Park SJ et al.** Resveratrol ameliorates aging related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell.* 2012; 148: 421-433.
- [121] **Kubota S. et al.** Roles of AMP-activated protein kinase in diabetes-induced retinal inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2011; 52: 9142-9148.
- [122] **Reinhard C., Thomas G. and Kozma SC.** A single gene encodes two isoforms of the p70 S6 kinase: activation upon mitogenic stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1992; 89: 4052-4056.

- [123] **Hubbard BP et al.** Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science*. 2013; 339: 1216-1219.
- [124] **Shima H. et al.** Disruption of the p70(s6k)/ p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO Journal*. 1998; 17: 6649-6659.
- [125] **Sabatini DM.** mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 729-734.
- [126] **Peterson TR et al.** DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009; 137: 873-886.
- [127] **K.T. Howitz , K.J. Bitterman, H.Y. Cohen** Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003; 425: 191–196.
- [128] **J.M. Davis, E.A. Murphy, M.D. Carmichael.** Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009; 296: R1071–R1077.
- [129] **De Boer VC, de Goffau MC, Arts IC et al.** SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism. *Mech Ageing Dev.* 2006; 127: 618-627.
- [130] **J.C. Milne, P.D. Lambert, S. Schenk.** Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 2007; 450: 712–716.
- [131] **F. Yeung, J.E. Hoberg, C.S. Ramsey.** Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase, *EMBO J.* 2004; 23: 2369-80.
- [132] **Milne JC, Denu JM.** The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. *Curr Opin Chem Biol.* 2008;12:11–17.

- [133] **T. Yoshizaki, S. Schenk, T. Imamura.** SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010; 298: E419–E428.
- [134] **U.P. Singh, N. Singh, B. Singh.** Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappaB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010; 332: 829–839.
- [135] **M.A. Birrell, K. McCluskie, S. Wong.** Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kappaB-independent mechanism. *FASEB J.* 2005; 19: 840–841.
- [136] **V. V. Navrotskaya<sup>1</sup> , G. Oxenkrug<sup>2</sup> , L. I. Vorobyova.** Berberine Prolongs Life Span and Stimulates Locomotor Activity of *Drosophila melanogaster* *American Journal of Plant Sciences.* 2012; 3:1037-1040.

