

The Hallmarks of Aging

Carlos López-Otín,¹ Maria A. Blasco,² Linda Partridge,^{3,4} Manuel Serrano,⁵ and Guido Kroemer^{6,7,8,9,10}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Oncología (IUOPA), Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

²Telomeres and Telomerase Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

³Max Planck Institute for Biology of Ageing, Cologne, Germany

⁴Institute of Healthy Ageing, Department of Genetics, Evolution and Environment, University College London, London, UK

⁵Tumor Suppression Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

⁶INSERM, U848, Villejuif, France

⁷Metabolomics and Cell Biology Platforms, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

⁸Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

⁹Pole de Biologie, Hopital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France

¹⁰Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

PREMESSA: la figura 1 illustra i modelli per lo studio dell'invecchiamento umano.

LE CARATTERISTICHE BIOLOGICHE E MOLECOLARI DELL'INVECCHIAMENTO

L'invecchiamento (Aging in inglese americano o Ageing in inglese britannico) è definito come la totalità dei cambiamenti che occorre in un individuo nel corso del tempo (1). Questo è un aspetto fondamentale della società moderna in quanto i cambiamenti delle caratteristiche biologiche della popolazione vivente si riflettono su cambiamenti di tipo culturale, sociale ed economico. Approssimativamente 100.000 persone su 150.000 muoiono ogni giorno per cause età-correlate in tutto il mondo e se si fa riferimento solo ai paesi industrializzati si arriva al 90% delle cause di decesso (1). L'invecchiamento della popolazione è definito come l'aumento del numero e della percentuale dei soggetti più anziani nella società. Ci sono almeno due cause che concorrono all'aumento dell'età media: un diminuito tasso di nascite ed un aumento della durata di vita. La porzione più anziana della popolazione sta crescendo rapidamente. Quando le persone raggiungono un'età avanzata a causa delle patologie croniche vanno incontro a fragilità e disabilità con la conseguente perdita di indipendenza. Tale condizione ha implicazioni sociali ed economiche molto importanti. La sfida della ricerca biomedica moderna è di comprimere, se non eliminare, questo periodo di fragilità e disabilità, aumentando la porzione di vita priva da malattie. L'invecchiamento è il principale fattore di rischio per molte condizioni croniche che limitano l'indipendenza, la sopravvivenza e il benessere (1). Alcune condizioni croniche come l'aterosclerosi, alcuni tipi di cancro, la demenza, il diabete, così come molte altre, diventano progressivamente più incidenti con l'aumentare della popolazione più anziana (Figura 2).

Una possibile causa che contribuisce all'insorgenza di queste condizioni è l'infiammazione cronica di tipo non infettivo che si instaura in diversi tessuti. Marcatori di infiammazione come IL 6, TNF α e chemochine sono associate con demenza (2), depressione (3), aterosclerosi (4-5), cancro (6-7), diabete (8-9), e mortalità (2,10,11). L'infiammazione è

probabilmente il fattore più fortemente associato con la fragilità età-correlata (12-13), che include aumentata vulnerabilità allo stress (ad esempio infezioni, traumi ed operazioni), perdita di massa muscolare (sarcopenia) e cachessia/perdita di massa grassa, tutte condizioni che diventano comuni in età avanzata (12, 14). La fragilità predispone all'insorgenza di patologie croniche, mancanza di indipendenza e mortalità, incrementando sensibilmente i costi per la spesa sanitaria (15-16). Fino a poco fa, la forte associazione tra età e morbilità cronica è stata vista con poche opportunità di intervento. Di fatto un trattamento per prevenire/curare la fragilità e le patologie croniche viste nel loro insieme ancora non esiste. Le cure ad oggi disponibili (supporto sociale, aiuti alla mobilità, trattamenti curativi della sintomatologia associata alla fine di vita) non sono dirette contro la vera radice delle disfunzioni età correlate. Trattare le malattie croniche una ad una non è sufficiente (17). Calcoli basati sul tasso di mortalità negli Stati Uniti indicano che se il cancro fosse eliminato come causa di decesso, la durata media della vita aumenterebbe del solo 3-4% (18). Lo stesso discorso è valido anche per le patologie ischemiche (17). La restrizione calorica, che ritarda il processo di invecchiamento nella sua interezza, con un meccanismo ancora parzialmente da definire, estende la durata della vita in modelli animali di una percentuale sensibilmente superiore (19). Chiaramente, la pratica clinica potrebbe risultare trasformata se potessero essere sviluppati trattamenti basati sul meccanismo dell'invecchiamento, rompendo il legame tra i processi fondamentali dell'aging e le patologie croniche, rendendo l'invecchiamento stesso un fattore di rischio modificabile. La recente consapevolezza che i disordini età correlati possono essere guidati da alcuni meccanismi di base dell'invecchiamento ha ispirato sforzi per identificare questi processi e sviluppare strategie, preferibilmente di natura farmacologica, di intervento.

L'attuale situazione della ricerca sull'invecchiamento presenta diversi paralleli con quella sul cancro nel decennio passato. La ricerca sul cancro ha raggiunto il suo massimo nel 2000 con la pubblicazione di un paper di riferimento in cui venivano elencate le sei caratteristiche fondamentali del cancro, che sono state recentemente espanso a dieci. Questa categorizzazione ha aiutato la concettualizzazione dell'essenza del cancro e i meccanismi importanti in questo contesto. A prima vista, cancro e invecchiamento possono sembrare processi opposti: il cancro è la conseguenza di un aberrante guadagno di "salute" da parte della cellula, mentre l'aging è caratterizzato da una perdita di "salute" della cellula. Ad un livello più profondo, tuttavia, cancro e invecchiamento possono avere origini comuni. L'accumulo di danni cellulari tempo dipendente è ampiamente accettato come causa generale di invecchiamento. Allo stesso tempo, il danno cellulare può occasionalmente provocare vantaggi aberranti ad alcune cellule, che eventualmente possono dare origine al cancro. Quindi, cancro ed invecchiamento possono essere viste come due diverse manifestazioni dello stesso processo di base, cioè l'accumulo di danni cellulari. Inoltre, diverse patologie associate con l'invecchiamento, come l'aterosclerosi e l'infiammazione, coinvolgono una crescita cellulare incontrollata o iperattività. Basandosi su questa struttura concettuale, una serie di questioni critiche sono sorte nel campo dell'aging riguardo le fonti fisiologiche del danno età associato, le risposte compensatorie che cercano di ristabilire l'omeostasi, le interconnessioni tra i diversi tipi di danno e le risposte compensatorie, e le possibilità di intervenire dall'esterno per ritardare l'invecchiamento.

Una recente review di Kromer e colleghi ha provato ad identificare le caratteristiche molecolari cardine dell'invecchiamento. Ci sono nove caratteristiche che sono generalmente considerate come causa/contributo nel determinare il fenotipo tipico dell'invecchiamento (Figura 3). Ogni meccanismo di quelli elencati dovrebbe idealmente soddisfare i seguenti criteri: 1 dovrebbe manifestarsi durante il normale invecchiamento; 2 la sua induzione o esacerbazione prodotta sperimentalmente dovrebbe accelerare l'invecchiamento; 3 la sua attenuazione dovrebbe ritardare il normale processo di invecchiamento e quindi incrementare la porzione della vita senza malattie. L'ultimo criterio è il più difficile da soddisfare, anche se ristretto ad un solo aspetto dell'invecchiamento. Per

questo motivo, non tutti gli interventi adottati basandosi su questi meccanismi si sono rivelati efficaci nell'attenuare l'invecchiamento. Questo fenomeno è fortificato dall'estesa interconnessione che c'è tra i vari meccanismi dell'aging, il che implica che l'attenuazione sperimentale di un particolare meccanismo potrebbe contrastare o modificare il decorso di un altro.

1. Instabilità genomica

Un comune denominatore dell'invecchiamento è l'accumulo di danni genetici che occorrono durante la vita (Figura 4). D'altronde, numerose malattie di invecchiamento precoce, quali la sindrome di Werner e la sindrome di Bloom (figura 5), sono la conseguenza di un incrementato accumulo di DNA danneggiato, sebbene il contributo di queste ed altre sindromi progeroidi al normale processo di invecchiamento rimane irrisolto dovuto, in parte, al fatto che esse riassumono solo alcuni aspetti dell'invecchiamento.

L'integrità e la stabilità del DNA sono continuamente minacciate da agenti esogeni fisici, chimici e biologici, tanto quanto eventi endogeni quali errori di replicazione del DNA, reazioni idrolitiche spontanee e specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le lesioni genetiche che derivano dai danni estrinseci o intrinseci sono molto diverse e includono mutazioni puntiformi, traslocazioni, aggiunta o perdita di cromosomi, accorciamento di telomeri e interruzione genica causata dall'integrazione di virus o di trasposoni (alcuni elementi genetici presenti nei genomi di procarioti ed eucarioti, capaci di spostarsi da una posizione all'altra del genoma). Le conseguenze possono spaziare da una mutazione silente che codifica per lo stesso aminoacido all'attivazione di oncogeni o al silenziamento di geni oncosoppressori. L'accumulo di danni al DNA è imolcato direttamente nella carcinogenesi e in altri disordini correlati con l'invecchiamento quali le malattie neurodegenerative

Per minimizzare queste lesioni, gli organismi hanno evoluto una complessa rete di meccanismi di DNA repair che sono collettivamente capaci di affrontare la maggior parte dei danni inflitti al DNA nucleare. I sistemi di stabilità genomica includono specifici meccanismi di mantenimento dell'appropriata lunghezza e funzionalità dei telomeri e di assicurare anche l'integrità del DNA mitocondriale (mtDNA). Il DNA umano è quindi costantemente esposto all'azione di mutageni esogeni ed endogeni per cui è inevitabile che qualcuno sfugga ai meccanismi di riparo e, di conseguenza, con il tempo accumuli mutazioni e danni. Pertanto la cellula più è vecchia e più alta è la probabilità che accumuli instabilità genetica. Il cancro del colon-retto ereditario non poliposico (HNPCC o sindrome di Lynch) è causato da un difettoso meccanismo di mismatch riparo che porta a instabilità microsatellitare (MSI) e ad un alto rischio di cancro colonrettale e di altri tipi di cancro soprattutto in persone più giovani se comparato con il cancro colonrettale sporadico. Nei cancri sporadici un difetto simile a quello di HNPCC avviene tramite il silenziamento epigenetico degli enzimi coinvolti nel riparo mismatch che porta a MSI. I cambiamenti epigenetici e l'instabilità microsatellitare divengono più frequenti con l'invecchiamento. Varie forme di instabilità genomica sono presenti in vari tipi di cancro e le stesse si associano all'invecchiamento.

In aggiunta a queste lesioni dirette al DNA, difetti nell'architettura nucleare, conosciute come laminopatie, possono causare instabilità genomica ed esitare in sindromi di invecchiamento prematuro.

DNA nucleare

Accumulo di mutazioni somatiche sono state osservate sia in cellule provenienti da persone anziane che da modelli animali. Con l'invecchiamento si riscontrano anche altre forme di danno al DNA, come aneuploidia e variazioni del numero di copie. E' stato descritto anche un maggiore mosaicismismo clonale per estese anomalie cromosomiche. Tutte queste alterazioni del DNA possono influenzare geni e pathway trascrizionali essenziali, portando a disfunzione cellulare e, se non eliminate per apoptosi o senescenza, ad alterazioni gravi dell'omeostasi tissutale. Ciò diventa particolarmente importante quando il danno genomico va ad impattare la funzionalità delle cellule staminali, compromettendo il

loro ruolo nel rinnovamento tissutale. Evidenza causale per il link proposto tra accumulo di danno genetico durante la vita e invecchiamento è dato da studi su topi e umani, che mostrano come deficienze in meccanismi di riparo del DNA sono associate ad un accelerato invecchiamento quali le sindromi di Werner, di Bloom, lo xeroderma pigmentosum, tricotiodistrofia, sindrome di Cockayne o di Seckel. Questi risultati supportano la tesi che il rafforzamento artificiale dei meccanismi di riparo del danno al DNA possono ritardare l'invecchiamento.

DNA mitocondriale (mtDNA)

Mutazioni e delezioni nel mtDNA invecchiato possono contribuire all'invecchiamento. Il mtDNA è stato considerato come uno dei principali bersagli delle mutazioni somatiche età associate in virtù del microambiente ossidativo presente nel mitocondrio, per la mancanza di istoni protettivi in questo DNA e per la limitata efficacia dei meccanismi di riparo di questo DNA rispetto quelli di riparo del genoma nucleare. Analisi su singole cellule hanno dimostrato che, nonostante il basso livello totale di mutazioni, il carico mutazionale di singole cellule che invecchiano diventa significativo e potrebbe raggiungere uno stato di omoplasia in cui un genoma mutante domina quello normale. Al contrario delle attese è interessante notare che la maggior parte delle mutazioni del mtDNA nelle cellule adulte o vecchie sembrano essere causate da errori di replicazione nella fase precoce della vita, piuttosto che da danno ossidativo. Queste mutazioni possono andare incontro ad espansione policlonale e causare disfunzione della catena respiratoria in diversi tessuti. Studi di accelerato invecchiamento in pazienti affetti da HIV trattati con antiretrovirali, che interferiscono con la replicazione del DNA mitocondriale, hanno supportato il concetto dell'espansione clonale delle mutazioni nel mtDNA che originano precocemente durante la vita. La prima evidenza a supporto di questa tesi deriva dall'identificazione di disordini multi organo simili per fenotipo a quelli dell'invecchiamento causati da mutazioni mitocondriali. Ulteriori studi sono necessari per determinare se manipolazioni genetiche che diminuiscono il carico delle mutazioni mitocondriali sono in grado di portare ad un'estensione della vita.

Architettura nucleare

Oltre al danno genomico che influenza il DNA nucleare o mitocondriale anche difetti nella lamina possono causare instabilità genomica. Le lamine nucleari A, B e C costituiscono il principale componente della lamina nucleare e partecipano al mantenimento del genoma fornendo un supporto per l'ancoraggio della cromatina e dei complessi proteici che regolano la stabilità genomica. La lamina nucleare ha attirato l'attenzione dei gerontologi dopo la scoperta che mutazioni nei geni che codificano per queste proteine, o fattori che influenzano la maturazione o le dinamiche di questa struttura, causano sindromi di invecchiamento accelerato, come la progeria di Hutchinson-Gilford e la sindrome di Nèstor-Guillermo (HGPS e NGPS rispettivamente) (Figura 6). Alterazioni della lamina nucleare e la produzione di un'isoforma aberrante della prelamina A chiamata progerina sono anche state ritrovate nel normale aging umano. La disfunzione dei telomeri promuove anche la produzione di progerina nei normali fibroblasti umani dopo una prolungata coltura in vitro, suggerendo un legame intimo tra il mantenimento dei telomeri e l'espressione della progerina durante l'invecchiamento fisiologico.

In generale, ormai c'è un'evidenza accertata che il danno genomico accompagna l'aging e che la sua induzione artificiale provochi l'accelerazione dell'invecchiamento. Nel caso del macchinario che assicura la segregazione fedele dei cromosomi, esiste l'evidenza genetica che il suo potenziamento possa estendere la longevità nei mammiferi. Trovare interventi che rinforzino gli aspetti della stabilità genomica nucleare, mitocondriale e dell'architettura, come la riparazione del DNA, potrebbero avere un impatto positivo sul normale invecchiamento. In conclusione, trovare i modi di aumentare la stabilità del DNA potrebbe potenzialmente ridurre l'incidenza di cancro, malattie cardiovascolari e malattia di Alzheimer. Per ottenere ciò una via suggerita sempre più emergente è la restrizione

calorica. Mangiare frutta e vegetali è stata associata ad un aumentato riparo del DNA e minore danno dello stesso.

2. Accorciamento dei telomeri

Il telomero è la regione terminale di un cromosoma composta di DNA non codificante altamente ripetuto che protegge l'estremità del cromosoma stesso dal deterioramento o dalla fusione con cromosomi confinanti. Il suo nome deriva dal nome greco telos (τέλος) 'fine' e da meros (μέρος, radice: μερ-) 'parte.' Nei vertebrati la sequenza di nucleotidi nei telomeri è TTAGG. Questa sequenza TTAGGG si ripete circa 2,500 volte negli umani. L'accumulo di DNA danneggiato con l'età colpisce il genoma casualmente, ma ci sono regioni cromosomiche, quali i telomeri, che sono particolarmente suscettibili al deterioramento correlato con l'età (Figura 7). La DNA polimerasi manca della capacità di replicare completamente le parti terminali delle molecole di DNA lineare, una funzione che è peculiare di una DNA polimerasi specializzata conosciuta come telomerasi. La maggior parte delle cellule somatiche dei mammiferi non esprimono la telomerasi e ciò porta ad una progressiva perdita dei telomeri che sono sequenze protettive poste alle estremità dei cromosomi. L'esaurimento dei telomeri spiega la limitata capacità replicativa di alcuni tipi di colture cellulari in vitro, la cosiddetta senescenza replicativa o limite di Hayflick (Figura 8). E' importante notare che l'accorciamento dei telomeri è osservato durante il normale invecchiamento anche nell'uomo. I telomeri sono legati ad un caratteristico complesso multiproteico conosciuto come shelterin (Figura 9). I telomeri possono essere considerati come rotture del DNA che sono invisibili ai meccanismi di riparo grazie alla formazione di questi complessi nucleo proteici noti come shelterin. I telomeri, altrimenti, dovrebbero essere "riparati" come rotture di DNA portando a fusione di cromosomi. Pertanto, ogni divisione cellulare porta ad un progressivo accorciamento delle parti terminali del DNA e, in teoria, il processo potrebbe continuare coinvolgendo parte del DNA codificante. Inoltre, per la mancata riparazione l'eventuale danno al DNA dei telomeri persiste. Per ovviare a tutto questo la cellula entra nella senescenza replicativa e/o apoptosi. Il deficit di telomerasi negli umani è associato con il prematuro sviluppo di malattie quali fibrosi polmonare, discheratosi congenita e anemia aplastica, che implicano la perdita di capacità rigenerativa di vari tessuti. Anche deficit nei componenti shelterin esitano nello scappucciamento dei telomeri e fusioni cromosomiche. Mutazioni del complesso Shelterin sono state trovate in alcuni casi di anemia aplastica e discheratosi congenita. Vari modelli di perdita di funzione per i componenti di shelterin sono caratterizzati da un rapido declino della capacità rigenerativa dei tessuti e invecchiamento accelerato, un fenomeno che si verifica anche in presenza di telomeri di lunghezza normale. Modelli animali geneticamente modificati hanno stabilito legami causali tra la perdita dei telomeri e la senescenza cellulare e l'invecchiamento dell'organismo. Topi con telomeri accorciati o allungati esibiscono, infatti, rispettivamente durata di vita accorciata o aumentata. Recenti evidenze indicano che l'invecchiamento può anche essere invertito con l'attivazione della telomerasi. Negli umani, recenti metanalisi hanno supportato l'esistenza di una forte relazione tra accorciamento di telomeri e rischio di morte, soprattutto nelle giovani età. Nelle persone ultrasessantenni la lunghezza telomerica accorciata si associa con morte più precoce a causa di malattie correlate all'età. Secondo alcuni studi la sovraespressione della telomerasi può ritardare l'invecchiamento ma a scapito di un'aumentata tumorigenesi. Uno studio su famiglie longeve ha mostrato che la lunghezza dei telomeri era minore con l'età negli uomini; è importante notare che apparve che la lunghezza dei telomeri sia altamente ereditabile. Infine, l'accorciamento dei telomeri si associa a varie malattie correlate con l'età quali l'artrosi, aterosclerosi, cardiopatia ischemica e fibrillazione atriale.

Riassumendo, l'accorciamento dei telomeri assieme all'instabilità genomica appare essere di importanza critica per l'invecchiamento a livello cellulare. Il normale invecchiamento è accompagnato dall'accorciamento dei telomeri nei mammiferi. Una disfunzione patologica dei telomeri accelera l'invecchiamento anche negli uomini, mentre la

stimolazione sperimentale della telomerasi può ritardare l'invecchiamento nei topi e, pertanto, soddisfa in pieno il criterio per essere una caratteristica fondamentale dell'invecchiamento.

3. Alterazioni epigenetiche

Le alterazioni epigenetiche si riferiscono ai cambiamenti dell'espressione genica senza interessare la sequenza del DNA a livello delle basi accoppiate. Una varietà di alterazioni epigenetiche colpiscono tutte le cellule e tessuti durante la vita (Figura 10 e 11). Cambiamenti epigenetici coinvolgono alterazione nei pattern di metilazione del DNA, modificazione posttraslazione di istoni, rimodellamento della cromatina e RNA non codificante. In comune questi meccanismi hanno la capacità di regolare l'espressione genica senza alterare la sequenza originale di basi dei geni interessati. L'aumentata acetilazione o metilazione di alcuni istoni o la diminuita metilazione di altri costituiscono marchi epigenetici correlati con l'età. I sistemi multienzimatici che assicurano la formazione e il mantenimento di patterns epigenetici includono DNA metiltransferasi, istone acetilasi, deacetilasi, metilasi e demetilasi, tanto quanto complessi proteici implicati nel rimodellamento della cromatina.

In breve, ci sono molte evidenze che suggeriscono che l'invecchiamento è accompagnato da cambiamenti epigenetici e che perturbazioni epigenetiche possono provocare sindromi progeroidi in modelli organismici. SIRT 6 esemplifica un enzima epigeneticamente rilevante la cui perdita di funzione riduce la longevità e il cui guadagno di funzione aumenta la longevità nei topi. Insieme, questi lavori suggeriscono che capire e manipolare l'epigenoma è promettente per migliorare le patologie correlate con l'età ed estendere la durata di vita in salute.

4. Perdita di proteostasi

L'invecchiamento ed alcune malattie ad esso associate sono legati anche al deterioramento dell'omeostasi proteica o proteostasi (Figure 12). Tutte le cellule usufruiscono di un pannello di meccanismi di controllo della qualità per preservare la stabilità e funzionalità dei loro proteomi (insieme di proteine di un tipo di cellula). La proteostasi coinvolge meccanismi per la stabilizzazione delle proteine correttamente ripiegate, soprattutto la famiglia delle proteine heat shock (proteine dello stress: così chiamate perché inizialmente soperte con lo shock termico) e meccanismi di degradazione delle proteine da parte del protosoma o dei lisosomi. Inoltre, ci sono regolatori di proteotossicità legati all'età, come MOAG-4, che agisce attraverso una distinta via alternativa dalle molecole chaperon e proteasi. Tutti questi sistemi funzionano in modo coordinato per ripristinare la struttura di polipeptidi mal ripiegati o per rimuoverli e degradarli completamente, così da impedire l'accumulo di componenti danneggiati e assicurando il continuo rinnovamento di proteine intracellulari. Molti studi hanno dimostrato che la proteostasi è alterata con l'invecchiamento. In aggiunta, l'espressione cronica di proteine dispiegate, malripiegate o aggregate contribuisce allo sviluppo di alcune patologie correlate con l'età, come la malattia di Alzheimer, la malattia di Parkinson e la cataratta. La caratteristica di queste malattie è appunto la consistente presenza di inclusioni e aggregati proteici insolubili.

a) Conformazione e stabilità proteica mediata dalle Chaperon

Gli chaperones molecolari sono piccole proteine che assistono le catene polipeptiche native nel corretto ripiegamento in strutture proteiche funzionali. Le più importanti di questi chaperones sono le proteine appartenenti alla famiglia Heat Shock (HSF). La loro trascrizione è sovraregolata con lo stress cellulare (incluso lo stress termico, da cui il nome). Nelle cellule dei mammiferi il fattore di trascrizione HSF1 è il principale regolatore della risposta allo stress dovuta all'accumulo di proteine male ripiegate. La sintesi indotta da stress di chaperon citosolici e organello-specifici è significativamente alterata durante l'invecchiamento. Vermi e mosche transgenici che iperesprimono proteine chaperon hanno

lunga durata della vita. Vari approcci per mantenere o aumentare la proteostasi mirano ad attivare il ripiegamento e la stabilità proteica tramite le chaperonine. Piccole molecole possono essere impiegate come chaperon farmacologici per assicurare il ripiegamento delle proteine danneggiate e migliorare fenotipi legati all'età in diversi modelli.

b) Sistemi proteolitici

Le attività dei due principali sistemi proteolitici implicati nel controllo della qualità proteica, cioè il sistema autofagia-lisosomiale e il sistema ubiquitina-proteasoma, declinano con l'invecchiamento, supportando l'idea che il collasso proteostatico costituisce un comune rilievo dell'età anziana. L'attività proteasomica è stata trovata elevata nei centenari ed è stato postulato essere uno dei meccanismi del loro invecchiamento in buona salute. Tra i composti capaci di attivare il proteasoma ci sono gli acidi grassi della dieta, pollini, estratti di alghe, spezie e vari composti sintetici. La macroautofagia è la degradazione dei componenti del citosolici mediata dai lisosomi: un modo per le cellule di eliminare le proteine mal ripiegate, organelli danneggiati e patogeni intracellulari. La restrizione calorica è da tempo conosciuta allungare la durata di vita e molti meccanismi con cui agisce sembrano convergere sull'autofagia. La restrizione calorica sottoregola il target della via di segnalazione rapamicina/SK6 e sovraregola le vie della sirtuina 1 (SIRT1) deacetilasi e della chinasi proteica AMP-dipendente, tutte vie che sovraregolano l'autofagia. La stimolazione dell'autofagia è sufficiente ad allungare la vita a nematodi, moscerini e topi. Il polimorfismo genico dell'autofagia è stato correlato con il cancro del colon-retto, mammario e a malattie legate all'età quali artrosi, osteoporosi senile e a malattie neurodegenerative.

Interventi che usano induttori chimici di macroautofagia (un tipo di autofagia diversa da quella chaperone-mediata) hanno stimolato straordinario interesse dopo la scoperta che la somministrazione costante o intermittente di rapamicina (inibitore di mTOR) può aumentare la durata di vita di topi di mezza età. Similmente, la supplementazione di nutrienti con preparati poliaminici contenenti spermidina o la fornitura di un poliaminico che produce flora intestinale aumenta la longevità nei topi. Nei nematodi anche la supplementazione dietetica con acidi grassi polinsaturi ω -6 aumenta la durata di vita tramite l'attivazione dell'autofagia. Per quanto riguarda il proteasoma, l'attivazione della segnalazione EGF (Epidermal Grow Factor) aumenta la longevità nei nematodi tramite l'aumento dell'espressione di vari componenti del sistema ubiquitina-proteasoma. Similmente, l'aumentata attività proteasomica da parte di inibitori della deubiquitina o da parte di attivatori proteasomiali accelera la clearance di proteine tossiche in colture di cellule umane.

In definitiva, c'è evidenza che l'invecchiamento è associato con un'alterata proteostasi e perturbazioni sperimentali della stessa possono precipitare patologie correlate con l'invecchiamento. Ci sono anche esempi di manipolazioni genetiche che migliorano la proteostasi e ritardano l'invecchiamento nei mammiferi.

5. Deregolazione di vie metaboliche sensibili ai nutrienti

Il genere umano dipende dall'abilità di usare nutrienti e fluidi per crescere e mantenere le funzioni corporee durante la vita. Il glucosio è il substrato essenziale e il corpo umano è programmato per mantenerlo sempre entro uno stretto intervallo. Nei mammiferi i meccanismi omeostatici rispondono a diversi ormoni e nutrienti per mantenere la glicemia a livelli fisiologici. Negli anziani molti di questi sensori e target molecolari sono persi o deregolati e questo è il motivo per cui è sotto intensa investigazione l'identificazione delle vie metaboliche che ritardano l'esordio del declino metabolico. L'insulino resistenza è parte del declino metabolico, mentre i tessuti sensibili all'insulina mostrano una ridotta capacità di un'efficace assunzione e utilizzo. Caratteristiche comuni dell'invecchiamento umano includono un'aumentata massa grassa viscerale, perdita di massa magra, ridotta sensibilità all'insulina che esita nell'intolleranza glicidica e incremento di fibre rosse muscolari sfilacciate. Tutte queste alterazioni sono legate a malattie correlate con l'invecchiamento come quelle cardiovascolari e metaboliche, atrofia muscolare, malattie

neurodegenerative e suscettibilità al cancro. La capacità di usare i nutrienti nei processi metabolici è vitale a livello cellulare e le perturbazioni nei meccanismi di assunzione dei nutrienti alterano l'omeostasi cellulare. I mitocondri hanno un ruolo chiave per l'utilizzo dei substrati e la produzione di energia. Di conseguenza qualsiasi deterioramento nel DNA mitocondriale, biogenesi, dinamiche o integrità strutturale colpisce il corpo intero esitando in un metabolismo deregolato che accompagna l'invecchiamento umano.

La crescita e la regolazione insulinica si associano aGH e IGF1 che entrambi declinano con l'invecchiamento.

Nei mammiferi l'asse somatotropico comprende l'ormone della crescita (GH), che è prodotto dall'ipofisi anteriore, e il suo secondo mediatore insulin-like growth factor 1 (IGF-1), prodotto in risposta al GH in molti tipi di cellule, ma principalmente epatociti. La via di segnalazione intracellulare dell'IGF-1 è la stessa di quella dell'insulina, che informa le cellule della presenza di glucosio. Per questa ragione i segnali di IGF-1 e insulina sono conosciuti come la via di "insulin ed IGF-1 signaling" (IIS). È rimarchevole il fatto che la IIS è la via che controlla l'invecchiamento maggiormente conservata nell'evoluzione e tra i suoi multipli bersagli ci sono i fattori di trascrizione della famiglia FOXO e i complessi mTOR, che sono pure coinvolti nell'invecchiamento e conservati nell'evoluzione. Polimorfismi genetici o mutazioni che riducono le funzioni di GH, il recettore di IGF-1, il recettore dell'insulina o gli effettori intracellulari a valle quali AKT, mTOR e FOXO sono legati alla longevità, sia negli umani che in modelli organismici, illustrando ulteriormente il maggiore impatto sulla longevità delle vie trofiche e bioenergetiche (Figura 13).

Per questa rilevanza il sensore deregolato dei nutrienti è un marchio dell'invecchiamento, la restrizione dietetica (DR) aumenta la durata di vita o di vivere in salute in tutte le specie eucariotiche investigate, inclusi i primati non umani.

a) La via di segnalazione Insulina e IGF-1

Multiple manipolazioni genetiche che attenuano l'intensità di segnale a differenti livelli della via IIS aumentano in maniera consistente la durata di vita dei nematodi, mosche e topi. Analisi genetiche indicano che questa via media parte dei benefici effetti della DR sulla longevità nei lombrichi e mosche. Tra gli effettori a valle della via IIS il più rilevante per la longevità nei nematodi e mosche è il fattore di trascrizione FOXO.

b) Altri sistemi sensibili ai nutrienti: mTOR, AMPK e sirtuine.

Oltre al pathway IIS che partecipa al rilevamento del glucosio, altri tre sistemi sensibili ai nutrienti tra loro interconnessi sono al centro di intense ricerche: mTOR per il rilevamento di alte concentrazioni di aminoacidi, AMPK che avverte gli stati di bassa energia rilevando alti livelli di AMP, e le sirtuine che sentono gli stati di bassa energia rilevando alti livelli di NAD⁺ (Figura 13). La chinasi mTOR è parte di due complessi multiproteici, mTORC1 e mTORC2, che regolano sostanzialmente tutti gli aspetti del metabolismo anabolico. La down-regolazione genetica dell'attività mTORC1 in lieviti, vermi e mosche estende la longevità e attenua gli ulteriori benefici di longevità della DR, suggerendo che l'inibizione di mTOR mima fenotipicamente DR. Nei topi, il trattamento con rapamicina aumenta la longevità ed è quello che è considerato l'intervento chimico più robusto per aumentare la durata della vita nei mammiferi. Topi geneticamente modificati con bassi livelli di attività di mTORC1, ma normali livelli di mTORC2, hanno una maggiore durata di vita, così come topi carenti in S6K1 (un substrato di mTORC1), indicando così la down-regulation di mTORC1/S6K1 come mediatore critico della longevità in relazione ad mTOR. Queste osservazioni, insieme con quelle che coinvolgono il pathway di IIS, indicano che attività anabolica e trofica intensa, segnalata tramite IIS o le vie mTORC1, sono i principali acceleratori di invecchiamento. Sebbene l'inibizione dell'attività TOR ha evidentemente effetti benefici durante l'invecchiamento, ha anche effetti collaterali indesiderabili, come un'alterata guarigione delle ferite, insulino-resistenza, cataratta e degenerazione testicolare nei topi. Sarà quindi importante capire i meccanismi coinvolti, al fine di determinare se effetti dannosi e vantaggiosi dell'inibizione di TOR possano essere separati l'uno dall'altro.

Gli altri due sensori di nutrienti, AMPK e sirtuine, agiscono nella direzione opposta a IIS e mTOR, nel senso che segnalano la scarsità di nutrienti e il catabolismo invece dell'abbondanza e l'anabolismo. Di conseguenza, la loro up-regolazione favorisce un invecchiamento in salute. L'attivazione di AMPK ha molteplici effetti sul metabolismo e, straordinariamente, spegne mTORC1. Ci sono prove che indicano che l'attivazione di AMPK possa mediare l'estensione della vita osservata a seguito della somministrazione di metformina a vermi e topi. Oltre alle funzioni già menzionate, SIRT1 può deacetilare ed accendere l'attivatore PPAR co-1 α (PGC-1 α). PGC-1 α orchestra una risposta metabolica complessa che comprende mitocondriogenesi, potenziamento delle difese antiossidanti, e miglioramento dell'ossidazione degli acidi grassi. Inoltre, SIRT1 e AMPK possano agire con un feedback positivo, collegando così entrambi i sensori di stati a basso consumo energetico in una risposta unitaria.

Nell'insieme gli studi fatti in questo campo, con l'evidenza disponibile correntemente, supportano fortemente l'idea che i segnali anabolici accelerino l'invecchiamento e che, al contrario una diminuita segnalazione dei nutrienti aumenti la longevità. Inoltre, una manipolazione farmacologica che mimi un limitato stato di disponibilità di nutrienti, come la rapamicina, può aumentare la longevità nei topi.

6. Disfunzione mitocondriale

Come le cellule e gli organismi invecchiano tende a diminuire la catena respiratoria, incrementando quindi il rilascio di elettroni e riducendo la generazione di ATP (Figura 14).

Specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species = ROS)

La teoria dei radicali liberi mitocondriali nell'invecchiamento propone che la progressiva disfunzione mitocondriale che avviene con l'invecchiamento esita in un'aumentata produzione di ROS, che a sua volta causa ulteriore danno mitocondriale e un danno globale cellulare. Negli ultimi anni è stata rivalutata questa teoria. In particolare hanno avuto particolare impatto le inaspettate osservazioni che aumentate concentrazioni di ROS possono prolungare la durata di vita nel lievito e *C. elegans*, che manipolazioni genetiche nei topi che incrementano i ROS mitocondriali e il danno ossidativo non accelerano l'invecchiamento, che nei topi con aumentate difese antiossidanti non aumenta la durata di vita e che l'invecchiamento accelera peggiorando con manipolazioni genetiche la funzione mitocondriale ma senza aumentare i ROS. Questi e altri dati hanno aperto la strada a riconsiderare il ruolo dei ROS nell'invecchiamento. Invero, parallelamente e separatamente al lavoro sugli effetti dannosi dei ROS, il campo della segnalazione intracellulare ha accumulato una solida evidenza del ruolo dei ROS nell'innescare proliferazione e sopravvivenza in risposta a segnali fisiologici e a condizioni di stress. Le due linee di evidenza possono essere armonizzate se si guarda il ROS come un segnale di sopravvivenza indotto dallo stress, concettualmente simile a AMP o NAD⁺ (vedere "Sensori deregolati dei nutrienti"). In questo senso l'effetto primario dei ROS potrebbe essere l'attivazione di risposte omeostatiche compensatorie. Come l'età cronologica avanza aumenta lo stress e il danno cellulare e i livelli di ROS aumentano parallelamente nel tentativo di mantenere la sopravvivenza. Oltre una certa soglia i livelli di ROS mancano il loro iniziale proposito omeostatico ed aggravano, piuttosto che alleviare, il danno associato all'età. Questo nuovo concetto accomoda l'evidenza apparentemente conflittuale riguardo gli effetti positivi, negativi o neutrali dei ROS sull'invecchiamento.

Integrità mitocondriale e biogenesi

La disfunzione mitocondriale può contribuire all'invecchiamento indipendentemente dai ROS. Ciò può succedere attraverso una serie di meccanismi; per esempio carenze mitocondriali possono influenzare segnali apoptotici aumentando la propensione dei mitocondri a permeabilizzare in risposta allo stress e innescando reazioni infiammatorie favorendo l'attivazione di infiammatori (complesso enzimatico coinvolto nell'attivazione dell'infiammazione) ROS-mediato e/o facilitati dalla permeabilizzazione. La ridotta efficienza bioenergetica mitocondriale con l'invecchiamento può risultare da multipli

meccanismi convergenti. SIRT1 modula biogenesi mitocondriale tramite un processo coinvolgente il coattivatore trascrizionale PGC-1 α e la rimozione di mitocondri danneggiati con l'autofagia. SIRT3, che è la principale deacetilasi mitocondriale, ha come bersagli molti enzimi coinvolti nel metabolismo energetico, inclusi componenti della catena respiratoria, il ciclo dell'acido tricarbossilico, chetogenesi e la β -ossidazione degli acidi grassi. SIRT3 può anche controllare direttamente la velocità di produzione dei ROS deacetilando la manganese superossido dismutasi (SOD), uno dei maggiori enzimi antiossidanti mitocondriali. Nell'insieme questi risultati supportano l'idea che le sirtuine (oltre che i telomeri) possono controllare la funzione mitocondriale e giocare quindi un ruolo protettivo contro le malattie associate all'età.

Altri meccanismi che causano insufficienze bioenergetiche sono l'accumulo di mutazioni e delezioni nel mtDNA, ossidazione di proteine mitocondriali, destabilizzazione dell'organizzazione macromolecolare di (super)complessi della catena respiratoria, cambiamenti della composizione lipidica delle membrane mitocondriali, alterazioni delle dinamiche mitocondriali risultanti dallo sbilanciamento di eventi di scissione e di fusione e il difettoso controllo di qualità della mitofagia, una forma organello specifica di macroautofagia che ha come bersagli mitocondri inefficienti portandoli alla degradazione proteolitica. La combinazione di maggior danno e ridotto turnover, a causa della minore biogenesi mitocondriale e loro ridotta clearance, può contribuire al processo di invecchiamento (Figura 14).

E' interessante notare che l'allenamento di resistenza e il digiuno a giorni alterni possono migliorare la durata del periodo di salute tramite la loro capacità di evitare la degenerazione mitocondriale. E' possibile speculare che questi benefici effetti siano mediati, almeno in parte, tramite l'induzione di autofagia per la quale sia l'allenamento intenso e il digiuno costituiscono potenti attivatori. L'induzione di autofagia, in ogni caso, probabilmente non è il solo meccanismo con il quale uno stile di vita sano ritarda l'invecchiamento, in quanto in dipendenza dal regime DR anche altre vie della longevità possono essere attivate.

Mitomesi

Disfunzioni mitocondriali che si verificano durante l' invecchiamento sono anche collegate con l'ormesi, un concetto su cui un certo numero di linee di ricerca sono confluite. Secondo questo concetto, trattamenti tossici lievi innescano risposte compensatorie benefiche che superano la riparazione del danno generato e in realtà producono un miglioramento della salute cellulare rispetto alle condizioni di partenza pre danno. Così, sebbene la grave disfunzione mitocondriale è patogena, carenze respiratorie lievi possono aumentare la durata della vita, forse a causa di una risposta ormetica. Tali reazioni ormetiche potrebbero consistere nell'induzione di una risposta allo stress mitocondriale, o nello stesso tessuto in cui i mitocondri sono difettosi, o anche in tessuti distanti, come mostrato in *C. elegans*. Ci sono prove convincenti che composti come metformina e resveratrolo sono veleni mitocondriali lievi che inducono uno stato di basso consumo energetico caratterizzato da aumento dei livelli di AMP e l'attivazione di AMPK. È importante sottolineare che, la metformina estende la durata della vita in *C. elegans* tramite l'induzione di una risposta compensatoria allo stress mediata dalla AMPK e dall'importante regolatore antiossidante Nrf2. Recenti studi hanno inoltre dimostrato che la metformina ritarda l'invecchiamento nei vermi compromettendo il metabolismo di folati e metionina del loro microbioma intestinale. Per quanto riguarda i mammiferi, la metformina può aumentare la durata della vita del topo quando somministrata sin dai primi anni di vita. Nei casi di resveratrolo e dell'attivatore di sirtuine SRT1720, ci sono prove che proteggono dai danni metabolici e migliorano la respirazione mitocondriale in maniera PGC - 1 α - dipendente, anche se il resveratrolo non estende la durata della vita nel topo in condizioni alimentari normali. Ulteriore supporto per il ruolo di PGC - 1 α nella longevità deriva dalla constatazione che la sovra espressione di PGC - 1 α è sufficiente per estendere la durata della vita in *Drosophila*, fenomeno associato ad una migliore attività mitocondriale.

In definitiva, la funzione mitocondriale ha un profondo impatto sul processo di invecchiamento. La disfunzione mitocondriale può accelerare l'invecchiamento nei mammiferi, ma è meno chiaro se il miglioramento della funzione mitocondriale, per esempio attraverso la mitomimesi, può estendere la durata della vita nei mammiferi, anche se suggestive prove in questo senso esistono già.

7. Senescenza cellulare

Un meccanismo fondamentale che contribuisce alle disfunzioni età correlate e all'infiammazione sterile cronica è la senescenza cellulare. Il termine senescenza cellulare si riferisce essenzialmente all'arresto irreversibile della replicazione cellulare, accompagnato da cambiamenti morfologici stereotipati (Figura 15). Questo fenomeno è stato originariamente descritto da Hayflick nel 1961 dopo passaggi seriali in colture di fibroblasti umani. Oggi sappiamo che la senescenza osservata da Hayflick è causata dall'accorciamento dei telomeri, ma ci sono altri stimoli età correlati in grado di innescare la senescenza indipendentemente dall'accorciamento dei telomeri. In particolare, DNA danneggiato e la derepressione del locus INK4/ARF, ognuno dei quali occorre progressivamente con l'invecchiamento cronologico, sono capaci di indurre senescenza. Alcuni studi hanno usato direttamente la β galattosidasi associata alla senescenza (Senescence-associated beta-galactosidase = SA- β -gal o SABG: è un'ipotetica idrolasi che catalizza l'idrolisi di β -galattosidi in monosaccaridi solamente in cellule senescenti SABG) per identificare la senescenza dei tessuti. C'è una dettagliata e parallela quantificazione di SABG e danno del DNA nei prodotti epatici comparabile a circa l'8% di cellule senescenti nei topi giovani e circa 17% in quelli molto anziani. Simili risultati sono stati ottenuti con la cute, polmone e milza, ma nessun cambiamento è stato osservato con il cuore, muscolo scheletrico e rene.

Basandosi su questi dati è chiaro che la senescenza cellulare non è una proprietà generalizzata di tutti i tessuti negli organismi invecchiati. Nel caso di cellule tumorali senescenti c'è una buona evidenza che esse sono soggette ad una stretta sorveglianza immunitaria e che sono efficacemente rimosse tramite fagocitosi. E' plausibile che l'accumulo di cellule senescenti con l'invecchiamento possa riflettere un'aumentata generazione e/o una diminuita eliminazione, per esempio per un'attenuata risposta immunitaria. Poiché il numero delle cellule senescenti aumenta con l'invecchiamento è stato ormai ampiamente assunto che la senescenza contribuisce all'invecchiamento stesso. Comunque questo punto di vista sottovaluta quale è lo scopo primario della senescenza che è di prevenire la propagazione di cellule danneggiate e di innescare la loro morte tramite il sistema immunitario. E' possibile quindi che la senescenza sia una benefica risposta compensatoria che contribuisce a liberare i tessuti da cellule danneggiate e potenzialmente oncogeniche. Questo checkpoint cellulare, comunque, richiede un efficiente sistema di ricambio che coinvolge l'eliminazione di cellule senescenti e la mobilitazione dei progenitori per ristabilire il numero cellulare. Negli organismi anziani questo turnover può divenire inefficiente o può esaurirsi la capacità rigenerativa delle cellule progenitrici, risultando alla fine nell'accumulo di cellule senescenti che possono aggravare il danno e contribuire all'invecchiamento (Figura 15). Negli ultimi anni è stato riconosciuto che le cellule senescenti manifestano drammatiche alterazioni nel loro secretoma, che si arricchisce particolarmente di citochine proinfiammatorie e di metalloproteasi della matrice: è ciò che viene chiamato "fenotipo secretorio associato alla senescenza". Questo secretoma proinfiammatorio può contribuire all'invecchiamento (vedi Comunicazione Intercellulare).

Ci sono ormai forti evidenze che indicano la senescenza cellulare come un potente meccanismo anticancro. Al contrario, nonostante il suo nome, la sua scoperta oltre 50 anni fa, e l'aumento dei dati che associano le cellule senescenti col fenotipo dell'invecchiamento e le patologie età-correlate, evidenze emerse solo recentemente dimostrano come eliminando le cellule senescenti si possano effettivamente ritardare la comparsa delle

disfunzioni età associate, almeno su un modello murino progeroide. Questi risultati devono essere verificati anche in modelli di invecchiamento cronologico, ma si tratta della prima chiara evidenza in vivo che le cellule senescenti sono importanti attori di multiple patologie età associate. Come la senescenza cellulare contribuisca a queste ed in generale alla fragilità rimane una delle questioni aperte più importanti nella biologia dell'aging e della geriatria clinica.

Il numero delle cellule senescenti aumenta in diversi tessuti col progredire dell'età cronologica o nelle sindromi progeroidi. Diversi meccanismi sono stati identificati come causa della o associati alla senescenza cellulare, e tutti questi aumentano con l'età (Figura 3).

Cause che inducono senescenza includono divisioni cellulari ripetute e forti segnali mitogenici, accorciamento dei telomeri, danni al DNA e mutazioni, aggregazione proteica e aumento dei livelli di ROS. Questi insulti attivano pathway oncosoppressori quali quelli di p53 e p16INK4a e potenzialmente anche altri per iniziare una risposta che porti alla senescenza. Una volta innescata, la senescenza richiede giorni o addirittura settimane per diventare pienamente stabile e irreversibile. Il processo è rinforzato da un signaling intracellulare a loop che include DDR (risposta al danno al DNA da ROS), NF-κB, TGF, così come IL-1, IL-6 e C/EBP (CCAAT Enhancer Binding Protein). Le cellule senescenti riorganizzano la cromatina, con la formazione di etero cromatina, cambiamenti estensivi dell'espressione genica, aumento delle dimensioni cellulari e del contenuto proteico e cambiamenti della forma della cellula e degli organelli. Le cellule senescenti sono metabolicamente attive, relativamente resistenti all'apoptosi, e sembrano essere rimosse dal sistema immunitario. La senescenza appare effettivamente come un possibile destino della cellula, al pari della replicazione, della differenziazione o dell'apoptosi e può accadere ad ogni punto della vita. Un tratto comune dei tessuti dell'anziano è l'infiammazione cronica di basso grado, denominata infiammazione sterile (ad indicare l'assenza di patogeni) o inflammaging. L'infiammazione cronica può causare patologie tramite almeno due meccanismi. Primo, le cellule immunitarie infiltrate nei tessuti ne possono causare la degradazione tramite rilascio di molecole tossiche o reattive. Secondo, citochine pro-infiammatorie possono provocare cambiamenti fenotipici che sono indipendenti dal sistema immunitario. Per esempio, IL-6 e IL-8 possono stimolare l'angiogenesi, distruggere la comunicazione cellula-cellula, impedire la funzione macrofagica, indurre risposta da parte dell'immunità innata e promuovere l'invasione e la migrazione di cellule epiteliali ed endoteliali. Poco si conosce riguardo la fonte di questa infiammazione sterile che aggrava molte patologie età associate, come quelle degenerative, oppure la perdita di funzionalità cerebrale, così come patologie iperproliferative come il cancro. Quest'infiammazione cronica potrebbe derivare in parte da un declino età associato della normale omeostasi del sistema immunitario o dalla resistenza a microbi endogeni. Oppure potrebbe derivare in parte da cellule senescenti: queste infatti secernono citochine pro-infiammatorie, chemochine e proteasi e questo fenomeno è denominato SASP (senescence-associated secretory phenotype ovvero fenotipo secretorio associato alla senescenza).

SASP

La SASP (Figura 16 e 17) è fondamentalmente una DDR (risposta al danno al DNA). La SASP, attraverso i fattori infiammatori, promuovendo la crescita, e il rimodellamento che produce, può spiegare come le cellule senescenti alterano il microambiente tissutale, attraggono le cellule del sistema immunitario, e inducono un fenotipo maligno nelle cellule vicine. Proteine associate a SASP, come il TNF (Tumor Necrosis Factor), IL-6 (Interleukina 6), MMPs (Metalloproteasi), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), e IGF binding proteins (IGFBPs), aumentano in diversi tessuti durante l'invecchiamento cronologico e ciò accade parallelamente all'infiammazione sterile. Questi risultati suggeriscono che la SASP è il principale attore dell'infiammazione età correlata, quantomeno nel tessuto adiposo in certe condizioni. Quindi, l'eliminazione selettiva delle cellule senescenti o dei loro effetti potrebbe essere un buon modo per ridurre l'infiammazione sterile età associata, aumentare

la porzione di vita priva da malattia e interrompere il legame tra invecchiamento e patologie croniche.

La senescenza cellulare è un arma a doppio taglio. Ci sono due concetti fondamentali per comprendere l'impatto positivo e negativo della senescenza sulla salute dell'organismo. Il primo è l'antagonismo pleiotropico. Quest'elemento della teoria evolutiva dell'aging sostiene l'esistenza di processi che sono stati selezionati nel corso dell'evoluzione per assicurare la salute nella prima parte della vita (ad esempio controllo immunitario delle cellule cancerose), ma che risultano poi avere effetti deleteri nella porzione ultima della vita causando il fenotipo dell'invecchiamento e le patologie ad esso associate. Volendo semplificare il concetto solo nell'ultimo secolo è aumentata sensibilmente la durata della vita, grazie al miglioramento delle condizioni igieniche e alla scoperta di centinaia di farmaci (antibiotici ad esempio) e terapie, e nessuno ha avuto un vantaggio riproduttivo nel raggiungere un'età più avanzata in salute, rendendo quindi inesistente una selezione dovuta a questo aspetto (i meccanismi evolutivi operano in un periodo di tempo considerevolmente più lungo). Un secondo concetto importante è che la SASP può avere effetti positivi o negativi a seconda del contesto. Può causare infiammazione locale e sistemica, distruggere la normale architettura dei tessuti e stimolare la crescita di cellule maligne vicinali quando si tratta di una SASP pronunciata e persistente, come ad esempio nell'età avanzata, l'obesità massiccia e la progeria. Contrariamente, una SASP localizzata e limitata nel tempo può essere utile nel risolvere il danno tissutale, quantomeno nei soggetti giovani, in accordo con la teoria dell'antagonismo pleiotropico. La SASP può allertare le cellule vicinali contro pericoli potenziali e promuovere la clearance immunitaria delle cellule danneggiate. Inoltre le MMP rilasciate dalla SASP limitano la fibrosi in seguito ad un danno al fegato o durante la guarigione delle ferite a livello della cute, portando quindi beneficio. Citochine prodotte da SASP, quali IL6 e IL 8 rinforzano l'arresto replicativo della senescenza, il che è protettivo nei confronti del cancro. D'altro canto, queste citochine possono anche causare la transizione epitelio-mesenchima, che promuove l'invasione tumorale. La composizione di quest'ultima può variare con il tempo dopo l'inizio della senescenza e ciò può dipendere parzialmente dal meccanismo tramite il quale la senescenza è indotta. A supporto di questa ipotesi, la senescenza indotta da RAS oncogenico, overespressione di p16INK4a, o dall'attività di p53 è associata con una variabilità sia della qualità che dell'entità delle proteine secrete da SASP. Quindi, parlando di SASP, è evidente che non ne esiste un unico tipo. La SASP sembra inoltre diffondere da cellula a cellula, amplificando il carico di cellule senescenti, l'infiammazione sterile, e la progressione delle patologie croniche, specialmente quando la capacità del sistema immunitario di rimuovere le cellule senescenti è sopraffatta. La SASP sembra avere una relazione molto ampia col sistema immunitario. Elementi del sistema immunitario, specialmente dell'immunità innata come risposte che coinvolgono l'infiltrazione macrofagica, sono coinvolti nella rimozione delle cellule senescenti. Comunque, le risposte tissutali macrofagiche sembrano diminuire con l'età, contribuendo potenzialmente all'accumulo di cellule senescenti che si osserva con l'età avanzata.

8. Esaurimento del pool di cellule staminali

La diminuzione del potenziale di rigenerazione dei tessuti è una delle caratteristiche più evidenti dell'invecchiamento (Figura 18). Ad esempio, l'ematopoiesi diminuisce con l'età per riduzione della cellula staminale ematopoietica (HSC) con conseguente diminuita produzione di cellule immunitarie, un processo chiamato immunosenescenza, portando anche ad una maggiore incidenza di anemia e leucemie mieloidi maligne. Un simile logoramento funzionale delle cellule staminali è stato trovato sostanzialmente in tutti i compartimenti di cellule staminali adulte. Il declino della cellula staminale mesenchimale (MSC) porta all'osteoporosi e fratture. La deplezione della cellula staminale epiteliale intestinale causa una ridotta funzione intestinale. La disfunzione delle staminali muscolari o della cellula satellite sono implicate nella sarcopenia. Tutte queste sono associate con

l'invecchiamento. Studi su topi anziani hanno rivelato una diminuzione complessiva dell'attività del ciclo cellulare delle cellule staminali ematopoietiche (HSC), HSC vecchie compiono meno divisioni cellulari di cellule staminali emopoietiche giovani. Questo comportamento correla con l'accumulo di danno al DNA, e con la sovraespressione di proteine inibitorie del ciclo cellulare come p16INK4a. L'accorciamento dei telomeri è una causa importante del declino delle cellule staminali osservato con l'invecchiamento in diversi tessuti.

Questi sono solo esempi di un quadro molto più ampio in cui il declino delle cellule staminali adulte emerge come una conseguenza di molteplici tipi di danni. Sebbene la carente proliferazione di cellule staminali e progenitrici è ovviamente dannosa per il mantenimento a lungo termine dell'organismo, un'eccessiva proliferazione di staminali e cellule progenitrici può anche essere deleteria in quanto accelera l'esaurimento delle nicchie staminali. L'importanza della quiescenza delle cellule staminali per la loro funzionalità a lungo termine è stata convincentemente dimostrata nel caso delle cellule staminali intestinali di *Drosophila*, dove un'eccessiva proliferazione porta ad esaurimento e invecchiamento precoce. Una situazione simile si incontra nei topi p21 - null, che presentano esaurimento prematuro delle cellule staminali emopoietiche e neuronali. A questo proposito, l'induzione di INK4a durante l'invecchiamento (vedere "Senescenza cellulare") e la diminuzione di IGF-1 sierica (vedere "Sensori dei nutrienti deregolati"), potrebbero entrambi riflettere un tentativo dell'organismo di preservare la quiescenza delle cellule staminali. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che un aumento del signaling di FGF2 (Fibroblast Grow Factor 2) nella nicchia staminale del muscolo invecchiato provoca perdita di quiescenza, ed eventualmente deplezione delle cellule staminali e diminuita capacità rigenerativa, mentre la soppressione di questa via di segnalazione allevia questi difetti. Questo apre la possibilità di progettare strategie volte a inibire il signaling di FGF2 per ridurre l'esaurimento di cellule staminali durante l'invecchiamento.

Un dibattito importante per quanto riguarda il declino della funzione delle cellule staminali è il ruolo relativo di pathway intrinseci alla cellula rispetto a quelli estrinseci. Lavori recenti hanno fornito un forte sostegno per i secondi. In particolare, la DR aumenta la funzionalità delle staminali intestinali e muscolari attraverso meccanismi cellulari estrinseci. Allo stesso modo, il trapianto di cellule staminali derivate dal muscolo di topi giovani a topi progeroidi estende la durata della vita e migliora i cambiamenti degenerativi di questi animali anche in tessuti in cui cellule donatrici non vengono rilevate, suggerendo che il loro beneficio terapeutico può derivare da effetti sistemici causati dai fattori secreti. Interventi farmacologici sono inoltre in fase di studio per migliorare la funzione delle cellule staminali. In particolare, l'inibizione di mTORC1 con la rapamicina, che ritarda l'invecchiamento, migliorando proteostasi (vedere "Perdita di proteostasi") e migliorando il rilevamento dello stato energia (vedere "Sensori dei nutrienti deregolati"), può migliorare la funzione delle cellule staminali nell'epidermide, nel sistema ematopoietico e nell'intestino. Questo illustra la difficoltà di districare la base meccanicistica per quanto riguarda l'attività anti-invecchiamento della rapamicina, e sottolinea l'interconnessione tra le diverse caratteristiche dell'invecchiamento. L'esaurimento delle cellule staminali si spiega come conseguenza integrativa di diversi tipi di danni età associati e probabilmente costituisce uno dei principali responsabili dell'invecchiamento di tessuti e organismi. Recenti studi promettenti suggeriscono che il ringiovanimento della cellula staminale può invertire il fenotipo di invecchiamento a livello dell'organismo.

9. Comunicazione intercellulare alterata

Al di là di alterazioni cellulari, l'invecchiamento comporta anche modifiche a livello di comunicazione intercellulare, sia esso endocrino, neuroendocrino o neuronale (Figura 19). Ad esempio, segnalazioni neurormonali (come l'asse renina-angiotensina, adrenergici, dell'insulina-IGF1) tendono ad essere deregolati durante l'invecchiamento all'aumentare delle reazioni infiammatorie mentre l'immunosorveglianza contro patogeni e cellule

precancerose declina e la composizione dell'ambiente extra e peri cellulare cambia, influenzando in tal modo le proprietà meccaniche e funzionali di tutti tessuti.

Infiemmazione

Una alterazione associata all'invecchiamento di primo piano nella comunicazione intercellulare è l' 'inflammaging', cioè un fenotipo proinfiammatorio che accompagna l'invecchiamento nei mammiferi. L'inflammaging può derivare da molteplici cause quali l'accumulo di danno tissutale proinfiammatorio, il fallimento di un sempre meno efficiente sistema immunitario verso agenti patogeni e cellule ospiti disfunzionali, la propensione di cellule senescenti a secernere citochine pro-infiammatorie (vedere SaSP), la maggiore attivazione del fattore di trascrizione NF-kB (Nuclear Factor-kB), o il verificarsi di un guasto nella risposta autofagica. L'infiammazione è anche coinvolta nella patogenesi dell'obesità e diabete di tipo 2, due condizioni che contribuiscono e correlano con l'invecchiamento nella popolazione umana. Allo stesso modo, le risposte infiammatorie difettose giocano un ruolo critico nell'aterosclerosi. La recente scoperta che l'infiammazione associata all'età inibisce la funzione delle cellule staminali epidermiche, supporta ulteriormente l'intricata concatenazione delle diverse caratteristiche che rafforza il processo di invecchiamento. Parallelamente all'inflammaging, la funzione del sistema immunitario adattativo declina. Questa immunosenescenza può aggravare il fenotipo di invecchiamento a livello sistemico, a causa del fallimento del sistema immunitario nell'eliminare agenti infettivi, cellule infettate, cellule sull'orlo di una trasformazione maligna, di riconoscere ed eliminare le cellule senescenti (vedere "Esaurimento cellule staminali"), nonché le cellule iperdiploidi che si accumulano nei tessuti invecchiati e nelle lesioni precancerose. Tutto ciò porta al sorgere di infezioni opportunistiche e allo sviluppo di cellule tumorali.

Studi globali sul versante trascrizionale dei tessuti invecchiati hanno inoltre sottolineato la pertinenza delle vie infiammatorie nell'invecchiamento. L'iperattivazione del pathway di NF-kB è una di queste firme trascrizionali dell'invecchiamento. Un collegamento tra infiammazione e invecchiamento deriva dalla recente scoperta che risposte infiammatorie allo stress attivano NF-kB nell'ipotalamo e inducono una via di segnalazione che esita nella riduzione della produzione di ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) da parte dei neuroni. Questo declino di GnRH può contribuire a numerosi cambiamenti legati all'invecchiamento come la fragilità ossea, debolezza muscolare, atrofia cutanea e ridotta neurogenesi. Coerentemente, il trattamento con GnRH impedisce la riduzione nella neurogenesi e rallenta l'invecchiamento nei topi. Questi risultati suggeriscono che l'ipotalamo possa modulare l'invecchiamento sistemico, integrando le risposte infiammatorie NF-kB - guidate con effetti neuroendocrini GnRH - mediati. Anche le sirtuine hanno un impatto sulla risposta infiammatoria associata all'invecchiamento. Diversi studi hanno rivelato che, tramite deacetilazione di istoni e componenti di vie di segnalazione infiammatorie come NF-kB, SIRT1 può down- regolare i geni correlati all'infiammazione. Coerentemente con questi risultati, la riduzione dei livelli di SIRT1 correla con lo sviluppo e la progressione di molte malattie infiammatorie, mentre l'attivazione farmacologica di SIRT1 può prevenire risposte infiammatorie nei topi.

Altri tipi di comunicazione intercellulare

Oltre all'infiammazione anche i cambiamenti dovuti all'invecchiamento in un tessuto possono portare al deterioramento aging-specifico di altri tessuti tramite il coordinamento interorgano del fenotipo di invecchiamento. Oltre alle citochine infiammatorie ci sono altri esempi di "invecchiamento contagioso" o effetti bystander (effetti "spettatore": induzione di un effetto biologico in cellule che non sono state per es. direttamente colpite dalla radiazione ma che si trovano nelle vicinanze di cellule irraggiate o che ne condividono il terreno di coltura) in cui le cellule senescenti inducono senescenza nelle cellule vicine attraverso contatti cellula-cellula mediati da gap junction e processi che coinvolgono ROS. Il microambiente contribuisce ai difetti funzionali età correlati delle cellule T CD4. Allo stesso modo, l'alterata funzione renale può aumentare il rischio di malattie cardiache negli

esseri umani. Al contrario, manipolazioni di un unico tessuto possono ritardare il processo di invecchiamento in altri tessuti.

Ripristino di comunicazione intercellulare difettoso

Ci sono diverse possibilità per ripristinare la comunicazione intercellulare difettosa tipica dei processi di invecchiamento. Questi comprendono interventi genetici, nutrizionali e farmacologici che possono migliorare le proprietà di comunicazione cellula-cellula. Di particolare interesse in questo senso sono gli approcci della DR per estendere la durata della vita in buona salute. Inoltre, la somministrazione a lungo termine di agenti antinfiammatori come l'aspirina può aumentare la longevità nei topi e migliorare l'invecchiamento in salute nell'uomo. Ancora, dato che il microbioma intestinale modella la funzione del sistema immunitario dell'ospite ed esercita effetti metabolici sistemici, sembra possibile estendere la durata della vita mediante manipolazione della composizione e della funzionalità del complesso intestinale e dell'ecosistema di batteri del corpo umano.

Ci sono prove convincenti che l'invecchiamento non è un fenomeno biologico esclusivamente cellulare ma che è accoppiato ad una alterazione generale nella comunicazione intercellulare, il che offre opportunità di modulare l'invecchiamento a questo livello. E' eccitante sapere che esiste una prova di principio per il ringiovanimento attraverso fattori sistemici per via ematica.

Le figure 21 e 22 danno una visione d'insieme delle caratteristiche dell'invecchiamento e le prospettive future per allungare la vita, ma soprattutto di aumentare la durata di vita senza le malattie associate all'invecchiamento.

Bibliografia

1. [No authors listed]. *The Silver Book: Chronic Disease and Medical Innovation in an Aging Nation*. Washington, DC, USA: Alliance for Aging Research; 2012.
2. Bruunsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2003;23(1):15–39.
3. Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*. 2009;71(2):171–186.
4. Tuomisto K, Jousilahti P, Sundvall J, Pajunen P, Salomaa V. C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as predictors of incident coronary and cardiovascular events and total mortality. A population-based, prospective study. *Thromb Haemost*. 2006;95(3):511–518.
5. Pai JK, et al. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med*. 2004;351(25):2599–2610.
6. O'Connor PM, Lapointe TK, Beck PL, Buret AG. Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(8):1411–1420.
7. Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous damage- associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia*. 2009;11(7):615–628.
8. Spranger J, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*. 2003;52(3):812–817.
9. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *J Amer Med Assoc*. 2001;286(3):327–334.
10. Harris TB, et al. Associations of elevated interleukin- 6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med*. 1999;106(5):506–512.
11. Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Hjelmborg JB, Pedersen BK, Jeune B. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am J Med*. 2003;115(4):278–283.

12. Kanapuru B, Ershler WB. Inflammation, coagulation, and the pathway to frailty. *Am J Med*. 2009;122(7):605–613.
13. Ferrucci L, et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J Am Geriatr Soc*. 1999;47(6):639–646.
14. Bandeen-Roche K, Walston JD, Huang Y, Semba RD, Ferrucci L. Measuring systemic inflammatory regulation in older adults: evidence and utility. *Rejuvenation Res*. 2009;12(6):403–410.
15. Fried LP, et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56(3):M146–M156.
16. Rockwood K, Mitnitski A, Song X, Steen B, Skoog I. Long-term risks of death and institutionalization of elderly people in relation to deficit accumulation at age 70. *J Am Geriatr Soc*. 2006;54(6):975–979.
17. Fried LP, et al. Nonlinear multisystem physiological dysregulation associated with frailty in older women: implications for etiology and treatment. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009;64(10):1049–1057.
18. Olshansky SJ, Carnes BA, Cassel C. In search of Methuselah: estimating the upper limits to human longevity. *Science*. 1990;250(4981):634–640.
- 19 Kapahi P, et al. With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab*. 2010;11(6):453–465.
- 20 Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H et al. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev* 2013; **12**: 661–684.
- 21 Pitt JN, Kaeberlein M. Why is aging conserved and what can we do about it? *PLoS Biol* 2015; **13**: e1002131.
- 22 Longo VD, Antebi A, Bartke A, Barzilai N, Brown-Borg HM, Caruso C et al. Interventions to slow aging in humans: are we ready? *Aging Cell* 2015; **14**: 497–510.
- 23 Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell* 2014; **159**: 709–713.
- 24 Ogino S, Chan AT, Fuchs CS, Giovannucci E. Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut* 2011; **60**: 397–411.
- 25 Michan S. Calorie restriction and NAD⁺/sirtuin counteract the hallmarks of aging. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014; **19**: 1300–1319.
- 26 Slysokva J, Lorenzo Y, Karlsen A, Carlsen MH, Novosadova V, Blomhoff R et al. Both genetic and dietary factors underlie individual differences in DNA damage levels and DNA repair capacity. *DNA Repair (Amst)* 2014; **16**: 66–73.
- 27 Xie Z, Jay KA, SmithDL, Zhang Y, Liu Z, Zheng J et al. Early telomerase inactivation accelerates aging independently of telomere length. *Cell* 2015; **160**: 928–939.
- 28 Pereira B, Ferreira MG. Sowing the seeds of cancer: telomeres and age-associated tumorigenesis. *Curr Opin Oncol* 2013; **25**: 93–98.
- 29 Honig LS, Kang MS, Cheng R, Eckfeldt JH, Thyagarajan B, Leiendecker-Foster C et al. Heritability of telomere length in a study of long-lived families. *Neurobiol Aging* 2015; **36**: 2785–2790.
- 30 Kuszel L, Trzeciak T, Richter M, Czarny-Ratajczak M. Osteoarthritis and telomere shortening. *J Appl Genet* 2015; **56**: 169–176.
- 31 Carlquist JF, Knight S, Cawthon RM, Le VT, Bunch TJ, Horne BD et al. Shortened telomere length is associated with paroxysmal atrial fibrillation among cardiovascular patients enrolled in the Intermountain Heart Collaborative Study. *Heart Rhythm* 2015; doi: 10.1016/j.hrthm.2015.07.032/.
- 32 Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Satta S et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell* 2013; **49**: 359–367.

- 33 Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE *et al.* DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol* 2015; **16**: 25.
- 34 Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* 2012; **61**: 1315–1322.
- 35 Marttila S, Kananen L, Hayrynen S, Jylhava J, Nevalainen T, Hervonen A *et al.* Ageing-associated changes in the human DNA methylome: genomic locations and effects on gene expression. *BMC Genomics* 2015; **16**: 179.
- 36 Labbadia J, Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 2015; **84**: 435–464.
- 37 Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones* 2015; **20**: 885–892.
- 38 Chondrogianni N, Sakellari M, Lefaki M, Papaevgeniou N, Gonos ES. Proteasome activation delays aging *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 2014; **71**: 303–320.
- 39 Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest* 2015; **125**: 85–93.
- 40 Carames B, Olmer M, Kiosses WB, Lotz MK. The relationship of autophagy defects to cartilage damage during joint aging in a mouse model. *Arthritis Rheumatol* 2015; **67**: 1568–1576.
- 41 Chen K, Yang YH, Jiang SD, Jiang LS. Decreased activity of osteocyte autophagy with aging may contribute to the bone loss in senile population. *Histochem Cell Biol* 2014; **142**: 285–295.
- 42 J. R. Aunan, M. M. Watson, H. R. Hagland and K. Søreide. Molecular and biological hallmarks of ageing. *BJS* 2016; **103**: 29–46.

Il segreto dei geni della longevità (Elisir di lunga vita? Figura22)

Possiamo valutare con buona approssimazione lo stato di un'auto usata a partire dal suo chilometraggio e dall'anno del modello. Gli effetti di un uso intensivo e il trascorrere del tempo avranno inevitabilmente lasciato il segno. Lo stesso sembra valere per il decadimento fisico degli esseri umani, ma con una differenza cruciale: nei sistemi biologici il declino non è inesorabile, grazie alla loro capacità di reagire all'ambiente sfruttando le proprie forze per difendersi e autoripararsi.

A un certo punto, gli scienziati hanno pensato che l'invecchiamento non fosse soltanto una forma di degenerazione, ma la prosecuzione attiva dello sviluppo geneticamente programmato di un organismo. Al raggiungimento dell'età matura, i «geni dell'invecchiamento» avrebbero cominciato a guidare il cammino dell'individuo verso la tomba. Questa ipotesi è stata smentita, e oggi è convinzione comune che l'organismo invecchi per il progressivo declino dei normali meccanismi di riparazione e mantenimento del corpo. La selezione naturale non avrebbe un motivo logico per mantenere attive queste funzioni in chi abbia superato l'età riproduttiva.

Eppure si è scoperto che un gruppo di geni coinvolti nella capacità di affrontare gli stress ambientali come una calura eccessiva o la scarsità di cibo o di acqua ha il potere di conservare intatte le naturali attività di difesa e di riparazione dell'organismo a dispetto dell'età. Questi geni, ottimizzando il funzionamento del corpo ai fini della sopravvivenza, portano al massimo le possibilità di superare le crisi e, se rimangono attivi abbastanza a lungo, possono migliorare notevolmente le condizioni di salute dell'organismo e allungarne la durata della vita. In pratica, sono l'opposto dei geni dell'invecchiamento: sono geni della longevità. Si è cominciato a esplorare questa idea circa 20 anni fa, immaginando che l'evoluzione avrebbe favorito un sistema di regolazione universale per coordinare questa

ben nota risposta allo stress ambientale. Se si fosse riuscito a identificare il gene, o i geni, preposti al controllo di quel meccanismo si sarebbe potuto trasformarli in armi per sconfiggere le malattie e il declino che sono ormai un sinonimo di terza età.

Si è scoperto che vari geni noti come DAF-2, PIT- 1, AMP- 1, CLK- 1 e P66 influenzano la resistenza allo stress e la durata della vita nelle cavie di laboratorio e questo suggerisce che possano far parte di un meccanismo fondamentale di sopravvivenza alle avversità ambientali.

Uno dei geni implicati è chiamato SIR2, le cui varianti compaiono in tutti gli organismi studiati finora, dal lievito all'uomo. La presenza di copie extra di questo gene aumenta la longevità di creature profondamente diverse fra loro come il lievito, i vermi nematodi e i moscerini della frutta e si sta cercando di stabilire se lo stesso accade in animali più grandi, come i topi.

Il gene SIR2 è stato uno dei primi geni della longevità a essere identificato, per questo motivo è anche quello caratterizzato meglio, e vi sono segnali sempre più chiari che SIR2 è il regolatore chiave del meccanismo di sopravvivenza controllato geneticamente, in grado di estendere l'arco vitale e migliorare lo stato di salute.

Il gene codifica per un enzima con un'attività del tutto nuova. Gran parte del DNA cellulare si trova generalmente avvolto intorno a complessi di proteine «impacchettatrici», chiamate istoni, a cui sono associati alcuni marcatori chimici, i gruppi acetilici, che determinano il grado in cui il DNA è strettamente impacchettato. La rimozione dei gruppi acetilici fa sì che il filamento di DNA si avvolga ancora più strettamente intorno agli istoni (Figura 23). Questa forma deacetilata di DNA è detta silente perché tutti i geni presenti in quelle regioni del genoma sono inattivi. Il ruolo delle proteine Sir nel silenziamento dei geni era già noto, Sir2 è uno dei vari enzimi in grado di rimuovere i gruppi acetilici dagli istoni, ma si è scoperto che è l'unico la cui attività enzimatica necessita assolutamente di una piccola molecola, chiamata NAD, usata come canale in molte reazioni metaboliche cellulari. L'associazione fra Sir2 e NAD era molto interessante perché collegava l'attività di Sir2 al metabolismo e quindi, potenzialmente, al rapporto fra dieta e invecchiamento osservato nei regimi di restrizione calorica.

Il ruolo delle calorie

La riduzione di apporto calorico nell'organismo è l'intervento più noto fra quelli finora sperimentati per allungare la durata della vita. Scoperto oltre settant'anni fa, è tuttora l'unico metodo di cui sia stata dimostrata l'efficacia. Un regime di restrizione prevede di solito una riduzione del consumo di cibo fra il 30 e il 40 per cento rispetto a ciò che è considerato normale per la specie. Gli animali sottoposti a questa dieta oltre a vivere di più godono anche di una salute migliore. La dieta sembra anche ostacolare l'insorgenza di varie malattie fra cui il cancro, il diabete e perfino i disturbi neurovegetativi. È come se l'organismo fosse iperattivato per la sopravvivenza. L'unico svantaggio sembra essere, in alcune specie, una perdita di fertilità.

L'idea di comprendere come agisce la restrizione calorica e sviluppare medicine capaci di riprodurre i benefici ha tentato gli studiosi per decenni (si veda l'articolo *Le basi scientifiche della pillola antiinvecchiamento* di Mark A. Lane, Donald K. Ingram e George S. Roth, in «Le Scienze» n. 410, ottobre 2002). Il fenomeno è stato a lungo attribuito a un semplice rallentamento del metabolismo - cioè della produzione di energia da parte delle cellule a partire da molecole carburanti - e quindi riduzione dei suoi residui tossici in risposta al minore apporto di cibo.

Ma oggi questa visione si rivela inesatta. La restrizione calorica non rallenta il metabolismo nei mammiferi, e addirittura lo accelera nel lievito e nei vermi. Vi è convinzione che la restrizione calorica sia un fattore di stress biologico paragonabile alla naturale scarsità di cibo e che induca una risposta difensiva per aumentare le probabilità di sopravvivenza dell'organismo.

Nei mammiferi, quando l'alimentazione è scarsa si alterano i meccanismi di difesa e riparazione cellulare, la produzione di energia e l'attivazione della morte cellulare programmata nota come apoptosi.

Nel lievito una minore disponibilità di cibo influenza due processi che aumentano l'attività enzimatica di Sir2 nelle cellule. Da un lato, la restrizione calorica attiva un gene chiamato PNC1, che produce un enzima che elimina dalle cellule la nicotinammide, una molecola simile alla vitamina B3 che normalmente inibisce Sir2 (Figura24). Coerentemente con l'idea che la restrizione calorica sia un elemento di stress da cui s'innesci una reazione di sopravvivenza, PNC1 è anche stimolato da altri fattori di stress più deboli che allungano la vita del lievito, come l'aumento di temperatura o una quantità eccessiva di sale.

Il secondo processo stimolato dalla restrizione calorica nel lievito è la respirazione, una produzione di energia che crea NAD (Nicotinamide Adenina Dinucleotide) come sottoprodotto e contemporaneamente abbassa i livelli della sua controparte, NADH. Stando ai risultati, non solo Sir2 è attivato da NAD ma è anche inibito da NADH, quindi l'alterazione del rapporto fra NAD e NADH influenza profondamente l'attività dell'enzima.

Dopo aver osservato che lo stress biologico che allunga la vita incrementa anche l'attività di Sir2, la domanda è: Sir2 è necessario per aumentare la longevità? La risposta è decisamente positiva. Un modo per stabilire se l'enzima è essenziale a questo processo consiste nel rimuovere il gene che lo codifica e vedere se l'effetto permane. In organismi della complessità di un moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*), la restrizione calorica ha bisogno di SIR2 per prolungare la durata della vita. E poiché un moscerino adulto ha numerosi tessuti analoghi ai mammiferi si ritiene che anche in questi ultimi la restrizione calorica necessiti dell'intervento di SIR2.

Ma se mai gli esseri umani dovessero riuscire a godere dei vantaggi della restrizione calorica, una dieta radicale non è la strada più indicata. Sarebbe invece necessario sviluppare farmaci in grado di modulare in modo analogo l'attività di Sir2 e delle proteine imparentate, le sirtuine.

Un composto in grado di attivare le sirtuine, o STAC (Sirtuin-activating compounds), che si è dimostrato particolarmente interessante è il resveratrolo, una piccola molecola presente nel vino rosso e fabbricata da varie piante in risposta agli stress. Altri 18 composti prodotti dalle piante in condizioni stressanti si sono rivelati capaci di modulare le sirtuine, indicando che probabilmente le piante usano queste molecole per controllare i propri enzimi Sir2.

Somministrando il resveratrolo al lievito, ai vermi e ai moscerini, o sottoponendoli a restrizione calorica, la vita di questi organismi si allunga di circa il 30 per cento, ma solo se hanno il gene SIR2. Per di più, un moscerino che produca quantità superiori di Sir2 ha un arco di vita più lungo che non può essere prolungato dal resveratrolo o dalla restrizione calorica. La conclusione più semplice è che sia la restrizione calorica sia il resveratrolo prolungano la vita dei moscerini attivando l'enzima Sir2.

I moscerini cui viene somministrato il resveratrolo non solo vivono più a lungo pur mangiando quanto vogliono, ma non subiscono il calo di fertilità spesso associato alla restrizione calorica. Questa è una buona notizia per chi spera di curare le malattie umane con molecole che condizionano gli enzimi Sir2; ma prima si deve comprendere meglio il ruolo di Sir2 nei mammiferi.

Il direttore d'orchestra

La versione del gene del lievito SIR2 nei mammiferi si chiama SIRT1 e il gene codifica per una proteina, la Sirt1, che oltre a svolgere la stessa attività enzimatica di Sir2 è in grado di deacetilare una più ampia varietà di proteine sia dentro il nucleo della cellula sia nel citoplasma. Molte di queste proteine bersaglio di Sirt1 sono state identificate, e sappiamo che controllano processi cruciali, come l'apoptosi, le difese cellulari e il metabolismo. Il potenziale ruolo di aumento della longevità dei geni della famiglia SIR2 sembra quindi essersi conservato anche nei mammiferi. Non sorprende, tuttavia, che in

organismi più grandi e complessi le sirtuine raggiungano i loro risultati per vie più complicate. Livelli più alti di Sirt1 nei topi e nei ratti, per esempio, fanno sì che alcune cellule sopravvivano agli stress che normalmente ne innescano il suicidio programmato.

Sirt1 ottiene questo effetto regolando l'attività di diverse altre proteine chiave delle cellule, come p53, FoxO e Ku70, coinvolte nel fissare un valore soglia per l'apoptosi l'attivare la riparazione cellulare (Figura 25).

Quindi, Sirt1 migliora i meccanismi di riparazione delle cellule facendo guadagnare loro del tempo. Nell'arco della vita di un organismo, la perdita di cellule dovuta all'apoptosi può essere un fattore importante dell'invecchiamento, soprattutto per i tessuti non rigenerabili come quelli di cuore e cervello; il rallentamento di questo processo può quindi essere un modo in cui le sirtuine promuovono salute e longevità. Uno straordinario esempio della capacità di Sirt1 di favorire la sopravvivenza cellulare nei mammiferi è riscontrabile nella mutazione walleriana del topo. In questi topi è duplicato un singolo gene e la mutazione rende i loro neuroni altamente resistenti allo stress, proteggendoli dall'ictus, dagli effetti tossici della chemioterapia e dalle malattie neurodegenerative.

Nel 2004 Jeffrey D. Milbrandt della Washington University di Saint Louis ha dimostrato con i suoi colleghi che nei topi la mutazione walleriana (la degenerazione *walleriana* lenta - gene *Wld(s)* - è una *mutazione* dominante spontanea nei topi *che* ritarda la degenerazione assonale di circa 2-3 settimane) incrementa l'attività di un enzima che produce il NAD, e che il NAD aggiuntivo protegge i neuroni attivando Sirt1. In più, Milbrandt ha scoperto che alcuni composti STAC, come il resveratrolo, hanno un effetto protettivo simile alla mutazione walleriana sui neuroni dei topi normali.

In uno studio più recente, il francese Christian Nèri dell'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, ha mostrato che in due differenti modelli animali sia il resveratrolo che la fisetina, un altro STAC, prevengono la morte delle cellule nervose causata dal morbo di Huntington. In entrambi i casi la protezione fornita dagli STAC richiedeva l'attività dei geni della famiglia delle sirtuine.

L'effetto protettivo delle sirtuine a livello cellulare è ormai sempre più chiaro. Ma se questi geni mediano i benefici apportati dalla restrizione calorica, rimane da capire in che modo la dieta riesca a regolarne l'attività, e quindi il ritmo dell'invecchiamento nell'intero organismo. Una ricerca condotta da Pere Puigserver della Johns Hopkins University School of Medicine ha mostrato che, in condizioni di digiuno, nelle cellule del fegato aumentano i livelli di NAD, determinando un aumento di attività di Sirt1. Fra le proteine su cui agisce Sirt1 c'è un importante regolatore della trascrizione genetica chiamato PGC-1 α , che induce cambiamenti nel metabolismo del glucosio delle cellule. Insomma, si è scoperto che Sirt1 agisce sia come sensore della disponibilità nutritiva, sia come regolatore della risposta del fegato.

I risultati hanno suggerito che Sirt1 è un regolatore metabolico centrale nelle cellule epatiche, muscolari e adipose perché, attraverso i cambiamenti nel rapporto fra NAD e NADH, la proteina percepisce le variazioni dietetiche ed esercita un'influenza a lungo termine sul modello di trascrizione del gene. Ciò spiegherebbe come Sirt1 possa integrare molti dei geni e dei processi che hanno a che fare con la longevità.

L'attività di Sirt1 nell'organismo, comunque, potrebbe essere mediata da più meccanismi. Un'altra ipotesi affascinante è che i mammiferi registrino la disponibilità di cibo in base alla quantità di energia immagazzinata sotto forma di grasso corporeo. Le cellule adipose secernono degli ormoni che trasmettono segnali agli altri tessuti dell'organismo, ma il loro messaggio dipende dai livelli di grasso immagazzinato.

Riducendo la massa adiposa, la restrizione calorica può stabilire un sistema di segnali ormonali che comunica la «scarsità» nutritiva da cui prendono il via le difese cellulari. A conferma di quest'ipotesi, i topi geneticamente modificati per rimanere magri a prescindere dall'apporto calorico tendono a vivere più a lungo.

Questa possibilità ha posto la domanda se Sirt1 non regoli anche l'accumulo di grasso in risposta alla dieta. E infatti, dopo una limitazione alimentare l'attività della proteina nelle

cellule adipose aumenta, provocando lo spostamento delle riserve di grasso dalle cellule al flusso sanguigno, in vista di una loro conversione in energia all'interno di altri tessuti. Una ipotesi è che Sirt1 rilevi il diminuito apporto di cibo e quindi regoli il livello di accumulo di grasso e di conseguenza il tipo di ormoni prodotti dalle cellule adipose. Questo effetto sulla massa adiposa e sui segnali che invia determinerebbe, a sua volta, il ritmo di invecchiamento dell'intero organismo, facendo di Sirt1 un parametro chiave della longevità favorita dalla restrizione calorica.

Inoltre, stabilirebbe uno stretto legame fra la senescenza e i disturbi metabolici associati all'eccesso di grasso corporeo, fra cui il diabete di tipo 2. Intervenire farmacologicamente sui meccanismi di Sirt1 nelle cellule adipose potrebbe quindi aiutare a prevenire non solo l'invecchiamento, ma anche specifiche malattie.

Un altro importante processo modificato da Sirt1 è quello infiammatorio, coinvolto in disturbi come il cancro, l'artrite, l'asma, le malattie cardiache e neurodegenerative.

Un recente studio di Martin W. Mayo, dell'Università della Virginia, ha mostrato che Sirt1 inibisce una proteina complessa detta NF-kB, che induce la risposta infiammatoria. Lo stesso effetto è provocato dal resveratrolo, il composto che attiva Sirt1. Si tratta di una scoperta particolarmente incoraggiante, sia perché la ricerca delle molecole che inibiscono NF-kB è un'area molto attiva dello sviluppo farmacologico, sia perché un'ulteriore conseguenza nota della restrizione calorica è la sua capacità di inibire le infiammazioni eccessive.

Quindi se il gene SIR2 è il direttore d'orchestra di un sistema regolatore dell'invecchiamento attivato dallo stress, potrebbe dirigere una banda che include le reti ormonali, le proteine di regolazione intracellulare e altri geni associati con la longevità. Una delle scoperte più significative degli ultimi anni è che l'enzima Sirt1 regola la produzione di insulina e l'IGF-1, il «fattore di crescita 1» simile all'insulina, e che queste due molecole, a loro volta, sembrano regolare la produzione di Sirt1 nell'ambito di un complesso circuito di retroazione. La relazione fra Sirt1, IGF-1 e insulina è affascinante perché spiega come l'attività di Sirt1 in un tessuto è comunicata ad altre cellule dell'organismo. Inoltre, è noto che i livelli circolanti di insulina e IGF-1 stabiliscono la durata della vita in svariati organismi: vermi, moscerini, topi, e forse anche esseri umani.

Dalla difesa alla prevenzione

Anche se l'umanità cerca di rallentare l'invecchiamento da migliaia di anni qualcuno può aver difficoltà ad accettare l'idea che la lunghezza della vita possa essere controllata manipolando un gruppo di geni. Eppure è possibile ritardare l'invecchiamento nei mammiferi con una semplice variazione dietetica: la restrizione calorica, ed è stato dimostrato che i geni della famiglia delle sirtuine controllano molti degli stessi processi molecolari regolati dalla restrizione calorica.

Oggi si sa anche che la famiglia dei geni SIR2 si è evoluta moltissimo tempo fa, perché li troviamo in organismi che vanno dal lievito del pane ai parassiti, ai vermi nematodi fino agli uomini. In tutti questi organismi a eccezione dell'ultimo, non ancora messo alla prova, le sirtuine determinano la lunghezza della vita. Questo fatto ci fa pensare che i geni umani della famiglia delle sirtuine detengano la chiave della nostra salute e longevità.

Per conoscere esattamente il modo in cui i geni delle sirtuine condizionano la longevità umana occorrerà invece ancora qualche decennio. Chi oggi spera di ingoiare una pillola e vivere fino a 130 anni è nato un po' troppo presto, ma forse vivrà abbastanza per vedere la comparsa di molecole che modulano l'attività degli enzimi della famiglia delle sirtuine in grado di curare malattie come il morbo di Alzheimer, il cancro, il diabete e le cardiopatie; per molti di questi farmaci sono state avviate sperimentazioni cliniche.

A lungo termine, ci aspettiamo che svelare i segreti dei geni della longevità consentirà di superare la cura delle malattie associate all'invecchiamento, addirittura impedendone l'insorgenza. Qualcuno potrebbe chiedersi se armeggiare con la durata della vita sia una buona idea. Ma all'inizio del XX secolo la speranza di vita alla nascita era di circa 45 anni,

mentre ora è di 75, grazie agli antibiotici e alle misure di salute pubblica che permettono di superare o evitare le malattie infettive. La società si è adattata al drastico cambiamento della durata della vita media e pochi vorrebbero tornare a vivere senza questi progressi. Le generazioni future, abituate a vivere oltre i cent'anni, guarderanno a questi sforzi per migliorare la salute come ai resti primitivi di un'epoca lontana.

La figura 26 mostra le varie benefiche azioni delle sirtuine.

FOXO3 è un Major Gene per la Longevità degli uomini

Per la sua posizione e azioni nelle vie di segnalazione intracellulari FoxO3 è da tempo considerato giocare un ruolo fondamentale nelle basi molecolari della longevità [6]. Per questo motivo è stato condotto presso Kuakini Medical Center a Honolulu uno studio atto a valutare l'associazione genetica di polimorfismi di singoli nucleotidi del gene FOXO3 umano (SNPs = single-nucleotide polymorphisms) in una coorte di uomini americani con antenati di etnia giapponese. I casi "longevi" furono uomini di oltre 95 anni e i "controlli" furono uomini di una coorte con normale durata di vita (età media 78,5 anni) per questa popolazione. Questo studio ha rivelato una associazione di tre FOXO3 SNPs con la longevità più estrema [20]. Ci sono 11 studi indipendenti su popolazioni di etnia diversa in diversi Paesi simili a questo. Una meta-analisi del 2014 di questi studi ha trovato che 5 dei FOXO3 SNPs testati erano statisticamente significativamente associati alla longevità [21]. L'associazione più forte si ebbe con l'allele G.

Non sono ancora delineate le ragioni sottostanti l'effetto protettivo di queste singole SNPs sulla longevità. Cionondimeno lo studio Leiden 85-plus ha trovato un'associazione tra gli aplotipi di FOXO3 con tutte le cause di mortalità, mortalità da stroke e cardiovascolare [26]. Ricerche sono necessarie per comparare i livelli di FOXO3 in vari tessuti nei longevi e in quelli che hanno una normale durata di vita con genotipi GG e TT.

I fattori genetici contribuiscono per circa un terzo sulla variabilità della durata di vita umana [23]. Basandosi sulle ricerche disponibili ad oggi, FOXO3 è uno dei soli due geni (l'altro è APOE – vedere Alzheimer -) che è stato trovato in modo consistente tra varie popolazioni umane associato con la longevità estrema [23, 24]. Anche varianti in altri geni possono contribuire alla longevità ed è probabile un significativo contributo di rare varianti in multipli geni come accade in altre condizioni complesse poligeniche.

Le vie tramite le quali FOXO3 aumenta la durata di vita potrebbero rivelare dei target biologici per terapie future che non estendono solo la durata di vita, ma in buona salute.

Segnalazione Insulinica e omeostasi glucidica

Gli organi coinvolti nel controllo dell'omeostasi del glucosio (fegato, pancreas, tessuto adiposo e muscolo scheletrico) hanno maggiore attività FOXO1 rispetto FOXO3, essendo FOXO1 attivato da condizioni di bassa glicemia con lo scopo di riportare l'omeostasi glucidica [5, 28]. FoxO4 ha livelli più elevati nel muscolo scheletrico, mentre FOXO 3 è più abbondante nel cervello, cuore, rene e milza e FOXO6 è principalmente rilevato nel cervello, sia durante lo sviluppo che durante la vita adulta [3, 28]. Uno studio su 196 gemelli monozigoti danesi ha trovato che la longevità legata all'allele *FOXO3 rs2800292 G* era associata con una maggiore sensibilità insulinica periferica ed epatica [29].

Avendo FoxO3 un ruolo nella soppressione di IIS (via comune per l'insulina e IGF-1) e quindi nell'accrescimento così come estende la durata di vita, la longevità associata alla variante allele *G di FOXO3 rs28002292* è associato con una più bassa statura [30].

Apoptosi

I geni FoxO promuovono l'inibizione della crescita cellulare e/o l'apoptosi attraverso vie di segnalazioni specifiche.

Immunità e Infiammazione

FoxO3 contribuisce alla regolazione del sistema immunitario [31]. Nell'anziano il sistema immunitario si deteriora e di conseguenza aumenta il rischio di infezioni e un'infezione è una causa comune di morte negli anziani. FoxO3 induce la sintesi di peptidi antimicrobici nel rene, polmone e intestino [33]. Questi combattono le infezioni microbiche in diverse specie e servono come molecole effettrici dell'immunità innata. FoxO3 ha inoltre azioni antinfiammatorie [34] che coinvolgono l'inibizione di citochine infiammatorie come l'interleukina-2 [35] e l'interleukina-6 [36]. In risposta all'infezione, l'interleukina-6 è attivata [36] e questa regola il sistema immunitario in vari modi come la produzione di anticorpi, la funzione delle cellule T, ematopoiesi e l'infiammazione [37]. Nell'anziano elevati livelli di l'interleukina-6 sono associati con un'augmentata mortalità per tutte le cause e morte per cardiopatia ischemica e cancro [37].

L'allele di FOXO3 SNP *rs12212067* si associa con un decorso più mite delle condizioni infiammatorie come la malattia di Crohn e artrite reumatoide, dimostrando che questa variante ha un ruolo antinfiammatorio [38]. Questo ruolo per FoxO3 non è posseduto dalle altre proteine FoxO.

I centenari sono relativamente liberi da malattie età correlate con fenotipo infiammatorio e presentano una minore infiammazione sistemica [39]; ciò nonostante hanno elevati livelli di interleukina-6, fibrinogeno e fattori della coagulazione. Questo contrastante aspetto potrebbe essere dovuto al fatto che questi fattori pro infiammatori sono contrastati da aumentati livelli di citochine antinfiammatorie come la TGF- β 1 (Trasforming Grow Factor) [39]. Alternativamente, potrebbe essere semplicemente che le malattie età correlate con infiammazione sono nei centenarie posticipate. Gli alleli di FOXO3 associati con la longevità sono legati con una forte inibizione di citochine [38].

Proteostasi e Autofagia

Le proteine FoxO regolano la rete di omeostasi proteica, che è coinvolta nel controllo di qualità cellulare [3]. Questo sottolinea il ruolo delle proteine FoxO nella longevità. Il sistema ubiquitine-proteasoma e autofagia aiuta ad eliminare dalla cellula le proteine danneggiate o aggregate. L'autofagia diminuisce con l'età e una ridotta autofagia si associa con un prematuro invecchiamento e malattie [3]. In risposta alla riduzione di nutrienti sono attivati vari geni promuoventi l'autofagia, mitofagia (autofagia mitocondriale via lisosomi) nel muscolo scheletrico, fegato, neuroni e in altre cellule e lipofagia nel fegato [40]. L'inibizione del maggior regolatore dell'omeostasi proteica mTORC1 è un'altra via con cui le proteine FoxO controllano l'autofagia. La capacità della proteostasi Foxo indotta di promuovere la sopravvivenza nei neuroni, ma anche la degenerazione nel muscolo scheletrico, potrebbe essere il risultato dell'espressione specifica del tipo di cellula, essendo FoxO3 e FoxO6 abbondanti nel cervello, mentre il muscolo è ricco di FoxO4 [3]. FoxO3 potrebbe contrastare la tossica aggregazione proteica che si ritrova nelle malattie neurodegenerative che riducono la durata di vita.

Malattie Cardiovascolari

FoxO3 protegge il cuore e i vasi sanguigni. Nelle malattie associate all'invecchiamento e nell'invecchiamento dei vasi è coinvolta l'aumentata infiammazione. La perdita di densità e plasticità microvascolare è uno delle maggiori caratteristiche dell'invecchiamento umano. Ciò si accompagna a disfunzioni delle cellule staminali adulte nelle loro nicchie vascolari. Le citochine infiammatorie guidano questo processo e FoxO3 inibisce queste citochine. L'angiogenesi può essere indotta infettando le cellule endoteliali vascolari con citomegalovirus e questo processo lo si ottiene sovraregolando un microRNA che riduce la sirtuina-1 e FoxO3 [43]. L'invecchiamento dei vasi coinvolge quindi i processi di perdita di

densità e plasticità microvascolare, la disfunzione delle cellule staminali adulte e l'infiammazione. Questi effetti contrastano il normale funzionamento di vari sistemi d'organo del corpo.

FoxO3 abbassa il colesterolo LDL reclutando la sirtuina 6 in un gene che ha un ruolo cruciale nella degradazione del recettore per le LDL [45].

FoxO3 agisce nei cardiomiociti per regolare l'autofagia, proliferazione, dimensione e sopravvivenza cellulare [46]. Si pensa che FoxO3 abbia un ruolo sia positivo che negativo nella cardiomiopatia correlata all'autofagia come la cardiopatia ischemica e l'ipertrofia miocardica. L'iperespressione di FoxO3 in vivo riduce le dimensioni del cardiomiocita aumentando la formazione di autofagosoma e altre vie legate all'autofagia [47]. Nei fibroblasti cardiaci FoxO3 riduce lo stress ossidativo [48].

Cancro

FoxO3 sopprime la crescita tumorale [2] e questo avviene in concerto con p53 [28]. La proteina p53 regola positivamente l'espressione delle proteine FoxO e insieme dirigono l'induzione all'apoptosi p53 dipendente [5]. Nella leucemia [49] e nelle cellule del cancro mammario [50] i farmaci anti cancro sovregolano FoxO3 che attraverso altri segnali inibisce la crescita tumorale. FoxO3 diminuisce la proteina Myc, stimolatrice della proliferazione e sopravvivenza tumorale [51]. In un subset di pazienti con leucemia mieloide acuta, i fattori FoxO funzionano come oncogeni [52].

Cellule Staminali

Negli umani FoxO3 è cruciale per la regolazione dell'omeostasi della cellula staminale adulta come quella neurale ed emopoietica [54], mentre FoxO1 mantiene l'auto-rinnovamento e la pluripotenza della cellula staminale embrionale [55]. FoxO3 è l'isoforma predominante nelle cellule staminali/progenitrici neurali. Essa protegge queste cellule con l'aumentata espressione di geni che codificano per la SOD2, catalasi, atassia telangiectasica mutata e l'inibitore CDK 2A tutti enzimi che bersagliano i ROS per eliminarli. Le cellule eritroidi sono particolarmente pronte al danno ossidativo durante la maturazione e sono protette da FoxO3 [56]. Una caratteristica di molti disordini età-correlati è la perdita di cellule staminali adulte. Ciò è visto nella malattia coronarica, insulino resistenza e diabete mellito tipo 2. FoxO3 è il principale driver che mantiene il pool di staminali nei mammiferi. Lo fa assicurando un programma di autofagia protettiva, tanto quanto altri processi come la quiescenza mediata dal recettore notch-1 and notch-2 nelle cellule satellite muscolari [57], staminale mesenchimale, neurale [58], Sca-1-positive cardiac [59], e cellule staminali emopoietiche (HSC).

La capacità della sirtuina 1 a controllare l'omeostasi della HSC è via FoxO3 [61].

Una critica riduzione nella lunghezza dei telomeri nelle estreme età di vecchiaia esita nella scomparsa di molte HSCs dal pool delle HSC [62]. Le cellule staminali sono maggiormente coinvolte nella rigenerazione di cellule danneggiate dopo infarto miocardico [64].

Gli agonisti FoxO3 potrebbero potenzialmente essere usati a proteggere le cellule staminali adulte e prevenire così la loro perdita con l'invecchiamento.

Interventi che aumentano i livelli o l'attività di FoxO3 possono aumentare la durata di vita

Sembra quindi che FoxO3 dovrebbe essere considerato un potenziale target per interventi terapeutici per promuovere un invecchiamento in buona salute e aumentare la durata di vita. Agenti che promuovono FoxO3 potrebbero essere di particolare beneficio in pazienti ad alto rischio come quelli con diabete mellito tipo 2 e obesi.

Composti fitochimici compresi i polifenoli sono promettenti nel sovregolare la funzione delle proteine FoxO. Per esempio, il trattamento di ratti di 5 settimane con 25 mg/Kg/die di epigallocatechina gallato (componente polifenolica del tè verde) in bevanda acquosa aumenta la sirtuina 1, Foxo3 (del 67-100%), SOD, glutatone perossidasi e la durata di

vita (del 14%), riduce NF- κ B, IL-6, TNF- α , ROS, infiammazione, stress ossidativo nel siero, fegato e rene, e protegge dal danno d'organo [65]. In una popolazione umana è stato recentemente mostrato che nelle età più avanzate le associazioni tra bevande di tè e disabilità cognitive erano dipendenti dal genotipo FOXO con alcune varianti dello stesso che mostravano una significativa riduzione del rischio per disabilità cognitiva [66]. Il polifenolo curcumina riduce la fosforilazione di FoxO3 determinandone la traslocazione all'interno del nucleo e raddoppiando l'espressione di FoxO3 [67]. La curcumina, incrementando l'attività di FoxO3, protegge dal danno ossidativo e lipidico indotto dalle cellule infiammatorie del sistema vascolare, riducendo il rischio quindi di malattie cardiovascolari associate all'età [67]. Il resveratrolo e composti attivati dalle sirtuine possono, in certi casi, allontanare la vecchiaia, le malattie ad essa associate ed aumentare la durata di vita [69].

In conclusione, si vede come FoxO3 e altre proteine FoxO sono non solo la guida di un ampio spettro di processi associati all'invecchiamento in salute delle cellule e quindi dell'organismo, ma alcuni alleli di FOXO3 aumentano la durata di vita umana. Composti naturali come il resveratrolo, curcumina ed altri, stimolando l'effetto delle proteine FoxO su numerosi geni importanti per la salute cellulare e miglioramento delle malattie associate all'invecchiamento possono teoricamente migliorare la salute dell'organismo ed estendere la durata di vita. Maggiori dettagli sul delicato bilanciamento delle vie di segnalazione di Foxo3 sono cruciali per lo sviluppo di interventi farmacologici atti a migliorare l'invecchiamento in salute e la longevità [5].

La figura 27 riassume le varie azioni di Foxo3.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Furuyama T, Yamashita H, Kitayama K, Higami Y, Shimokawa I, Mori N: Effects of aging and caloric restriction on the gene expression of Foxo1, 3, and 4 (FKHR, FKHL1, and AFX) in the rat skeletal muscles. *Microsc Res Tech* 2002; 59: 331–334.
- 2 Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, Miao L, Tothova Z, Horner JW, Carrasco DR, Jiang S, Gilliland DG, Chin L, Wong WH, Castrillon DH, DePinho RA: FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 2007; 128: 309–323.
- 3 Webb AE, Brunet A: FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci* 2014; 39: 159–169.
- 4 Morris BJ: Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic Biol Med* 2013; 56: 133–171.
- 5 Eijkelenboom A, Burgering BM: FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 83–97.
- 6 Morris BJ: A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer. *J Hypertens* 2005; 23: 1285–1309.
- 7 Chen CC, Jeon SM, Bhaskar PT, Nogueira V, Sundararajan D, Tonic I, Park Y, Hay N: Fox-Os inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor. *Dev Cell* 2010; 18: 592–604.
- 8 Kenyon CJ: The genetics of ageing. *Nature* 2010; 464: 504–512.
- 9 Eijkelenboom A, Mokry M, de Wit E, Smits LM, Polderman PE, van Triest MH, van Bortel R, Schulze A, de Laat W, Cuppen E, Burgering BM: Genome-wide analysis of FOXO3 mediated transcription regulation through RNA polymerase II profiling. *Mol Syst Biol* 2013; 9(article 638):1–15.
- 10 Kenyon C: A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1204: 156–162.

- 11 Giannakou ME, Goss M, Junger MA, Hafen E, Leever SJ, Partridge L: Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* 2004; 305: 361.
- 12 Blüher M, Kahn BB, Kahn CR: Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 2003; 299: 572–574.
- 13 Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS: A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 2001; 292: 107–110.
- 14 Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R: A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993; 366: 461–464.
- 15 Solon-Biet SM, McMahon AC, Ballard JW, Ruohonen K, Wu LE, Cogger VC, Warren A, Huang X, Pichaud N, Melvin RG, Gokarn R, Khalil M, Turner N, Cooney GJ, Sinclair DA, Raubenheimer D, Le Couteur DG, Simpson SJ: The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. *Cell Metab* 2014; 19: 418–430.
- 16 Bosch TCG, Anton-Erxleben F, Hemmrich G, Khalturin K: The Hydra polyp: nothing but an active stem cell community. *Dev Growth Differ* 2010; 52: 15–25.
- 17 Boehm A-M, Rosenstiel P, Bosch TC: Stem cells and aging from a quasi-immortal point of view. *Bioessays* 2013; 35: 994–1003.
- 18 Boehm AM, Khalturin K, Anton-Erxleben F, Hemmrich G, Klostermeier UC, Lopez-Quintero JA, Oberg HH, Puchert M, Rosenstiel P, Wittlieb J, Bosch TC: FoxO is a critical regulator of stem cell maintenance in immortal Hydra. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 19697–19702.
- 19 Schaible R, Sussman M: FOXO in aging: did evolutionary diversification of FOXO function distract it from prolonging life? *Bioessays* 2013; 35: 1101–1110.
- 20 Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, Masaki KH, Willcox DC, Rodriguez B, Curb JD: FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13987–13992.
- 21 Bao JM, Song XL, Hong YQ, Zhu HL, Li C, Zhang T, Chen W, Zhao SC, Chen Q: Association between FOXO3A gene polymorphisms and human longevity: a meta-analysis. *Asian J Androl* 2014; 16: 446–452.
- 22 Broer L, Buchman AS, Deelen J, Evans DS, et al: GWAS of longevity in CHARGE consortium confirms APOE and FOXO3 candidacy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2015; 70: 110–118.
- 23 Brooks-Wilson AR: Genetics of healthy aging and longevity. *Hum Genet* 2013; 132: 1323–1338.
- 24 Murabito JM, Yuan R, Lunetta KL: The search for longevity and healthy aging genes: insights from epidemiological studies and samples of long-lived individuals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012; 67: 470–479.
- 25 Donlon TA, Curb JD, He Q, Grove JS, Masaki KH, Rodriguez B, Elliott A, Willcox DC, Willcox BJ: FOXO3 gene variants and human aging: coding variants may not be key players. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012; 67: 1132–1139.
- 26 Kuningas M, Mägi R, Westendorp RG, Slagboom PE, Remm M, van Heemst D: Haplotypes in the human Foxo1a and Foxo3a genes; impact on disease and mortality at old age. *Eur J Hum Genet* 2007; 15: 294–301.
- 27 Forte G, Grossi V, Celestini V, Lucisano G, Scardapane M, Varvara D, Patruno M, Bagnulo R, Loconte D, Giunti L, Petracca A, Giglio S, Genuardi M, Pellegrini F, Resta N, Simone C: Characterization of the rs2802292 SNP identifies FOXO3A as a modifier locus predicting cancer risk in patients with PJS and PHTS hamartomatous polyposis syndromes. *BMC Cancer* 2014; 14: 661.
- 28 Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK: Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 1978–1986.
- 29 Banasik K, Ribel-Madsen R, Gjesing AP, Wegner L, Andersson A, Poulsen P, Borglykke A, Witte DR, Pedersen O, Hansen T, Vaag A: The FOXO3A rs 2802292 G-allele associates

- with improved peripheral and hepatic insulin sensitivity and increased skeletal muscle-FOXO3A mRNA expression in twins. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:E119–E124.
- 30 He Q, Morris BJ, Grove JS, Petrovitch H, Ross W, Masaki KH, Rodriguez B, Chen R, Donlon TA, Willcox DC, Willcox BJ: Shorter men live longer: association of height with longevity and FOXO3 genotype in American men of Japanese ancestry. *PLoS One* 2014; 9:e94385.
- 31 Peng SL: Immune regulation by Foxo transcription factors. *Autoimmunity* 2007; 40: 462–469.
- 32 You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, Villunger A, Mak TW: FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med* 2006; 203: 1657–1663.
- 33 Becker T, Loch G, Beyer M, Zinke I, Aschenbrenner AC, Carrera P, Inhester T, Schultze JL, Hoch M: FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature* 2010; 463: 369–373.
- 34 Lin L, Hron JD, Peng SL: Regulation of NF- κ B, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity* 2004; 21: 203–213.
- 35 Oh HM, Yu CR, Golestaneh N, Amadi-Obi A, Lee YS, Eseonu A, Mahdi RM, Egwuagu CE: STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. *J Biol Chem* 2011; 286: 30888–30897.
- 36 Dejean AS, Beisner DR, Ch'en IL, Kerdiles YM, Babour A, Arden KC, Castrillon DH, DePinho RA, Hedrick SM: Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10: 504–513.
- 37 Lee JK, Bettencourt R, Brenner D, Le TA, Barrett-Connor E, Lomba R: Association between serum interleukin-6 concentrations and mortality in older adults: the Rancho Bernardo study. *PLoS One* 2012; 7:e34218.
- 38 Lee JC, Espéli M, Anderson CA, Linterman MA, Pocock JM, Williams NJ, Roberts R, Viatte S, Fu B, Peshu N, Hien TT, Phu NH, Wesley E, Edwards C, Ahmad T, Mansfield JC, Geary R, Dunstan S, Williams TN, Barton A, Vinuesa CG, Parkes M, Lyons PA, Smith KG: Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell* 2013; 155:57–69.
- 39 Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S: Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 2007; 128: 92–105.
- 40 Liesa M, Shrihai OS: Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 2013; 17: 491–506.
- 41 Abid MR, Yano K, Guo S, Patel VI, Shrikhande G, Spokes KC, Ferran C, Aird WC: Forkhead transcription factors inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *J Biol Chem* 2005; 280: 29864–29873.
- 42 Lee HY, Chung JW, Youn SW, Kim JY, Park K, Koo BK, Oh BH, Park YB, Chaqour B, Walsh K, Kim HS: Forkhead transcription factor FOXO3a is a negative regulator of angiogenic immediate early gene CYR61, leading to inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2007; 100: 372–380.
- 43 Zhang S, Liu L, Wang R, Tuo H, Guo Y, Yi L, Wang D, Wang J: MicroRNA-217 promotes angiogenesis of human cytomegalovirus-infected endothelial cells through downregulation of SIRT1 and FOXO3A. *PLoS One* 2013; 8:e83620.
- 44 Tsuchiya K, Tanaka J, Shuiqing Y, Welch CL, DePinho RA, Tabas I, Tall AR, Goldberg IJ, Accili D: FoxOs integrate pleiotropic actions of insulin in vascular endothelium to protect mice from atherosclerosis. *Cell Metab* 2012; 15: 372–381.
- 45 Tao R, Xiong X, DePinho RA, Deng CX, Dong XC: FoxO3 transcription factor and Sirt6 deacetylase regulate low density lipoprotein (LDL)-cholesterol homeostasis via control of

the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (Pcsk9) gene expression. *J Biol Chem* 2013; 288: 29252–29259.

46 Sengupta A, Molkenin JD, Paik JH, DePinho RA, Yutzey KE: FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 2011; 286: 7468–7478.

47 Skurk C, Izumiya Y, Maatz H, Razeghi P, Shiojima I, Sandri M, Sato K, Zeng L, Schiekofer S, Pimentel D, Lecker S, Taegtmeyer H, Goldberg AL, Walsh K: The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 20814–20823.

48 Chiribau CB, Cheng L, Cucoranu IC, Yu YS, Clempus RE, Sorescu D: FOXO3A regulates peroxiredoxin III expression in human cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 2008; 283: 8211–8217.

49 Essafi A, Fernández de Mattos S, Hassen YA, Soeiro I, Mufti GJ, Thomas NS, Medema RH, Lam EW: Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. *Oncogene* 2005; 24: 2317–2329.

50 Sunters A, Fernández de Mattos S, Stahl M, Brosens JJ, Zoumpoulidou G, Saunders CA, Coffey PJ, Medema RH, Coombes RC, Lam EW: FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 2003; 278: 49795–49805.

51 Delpuech O, Griffiths B, East P, Essafi A, Lam EW, Burgering B, Downward J, Schulze A: Induction of Mxi1-SR alpha by FOXO3a contributes to repression of Myc-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 4917–4930.

52 Sykes SM, Lane SW, Bullinger L, Kalaitzidis D, Yusuf R, Saez B, Ferraro F, Mercier F, Singh H, Brumme KM, Acharya SS, Scholl C, Tothova Z, Attar EC, Fröhling S, DePinho RA, Armstrong SA, Gilliland DG, Scadden DT: AKT/FOXO signaling enforces reversible differentiation blockade in myeloid leukemias. *Cell* 2011; 146: 697–708.

53 Hui RC, Gomes AR, Constantinidou D, Costa JR, Karadedou CT, Fernandez de Mattos S, Wymann MP, Brosens JJ, Schulze A, Lam EW: The forkhead transcription factor FOXO3a increases phosphoinositide-3 kinase/Akt activity in drug-resistant leukemic cells through induction of PIK3CA expression. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 5886–5898.

54 Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama KI, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A: Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 101–112.

55 Zhang X, Yalcin S, Lee DF, Yeh TY, Lee SM, Su J, Mungamuri SK, Rimmelé P, Kennedy M, Sellers R, Landthaler M, Tuschl T, Chi NW, Lemischka I, Keller G, Ghaffari S: FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 1092–1099.

56 Marinkovic D, Zhang X, Yalcin S, Luciano JP, Brugnara C, Huber T, Ghaffari S: Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. *J Clin Invest* 2007; 117: 2133–2144.

57 Gopinath SD, Webb AE, Brunet A, Rando TA: FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of selfrenewal. *Stem Cell Reports* 2014; 2: 414–426.

58 Yeo H, Lyssiotis CA, Zhang Y, Ying H, Asara JM, Cantley LC, Paik JH: FoxO3 coordinates metabolic pathways to maintain redox balance in neural stem cells. *EMBO J* 2013; 32: 2589–2602.

59 Uchida S, De Gaspari P, Kostin S, Jenniches K, Kilic A, Izumiya Y, Shiojima I, Grosse Kreymborg K, Renz H, Walsh K, Braun T: Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Reports* 2013; 1: 397–410.

60 Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegué E, DePinho RA, Gilliland DG: FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 2007; 128: 325–339.

- 61 Rimmelé P, Bigarella CL, Liang R, Izac B, Dieguez-Gonzalez R, Barbet G, Donovan M, Brugnara C, Blander JM, Sinclair DA, Ghaffari S: Aging-like phenotype and defective lineage specification in SIRT1-deleted hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cell Reports* 2014; 3: 44–59.
- 62 Holstege H, Pfeiffer W, Sie D, Hulsman M, Nicholas TJ, Lee CC, Ross T, Lin J, Miller MA, Ylstra B, Meijers-Heijboer H, Brugman MH, Staal FJ, Holstege G, Reinders MJ, Harkins TT, Levy S, Sistermans EA: Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-years-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. *Genome Res* 2014; 24: 733–742.
- 63 Webb AE, Pollina EA, Vierbuchen T, Urbán N, Ucar D, Leeman DS, Martynoga B, Sewak M, Rando TA, Guillemot F, Wernig M, Brunet A: FOXO3 shares common targets with ASCL1 genome-wide and inhibits ASCL1-dependent neurogenesis. *Cell Rep* 2013; 4: 477–491.
- 64 Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E: Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012; 379: 895–904.
- 65 Niu Y, Na L, Feng R, Gong L, Zhao Y, Li Q, Li Y, Sun C: The phytochemical, EGCG, extends lifespan by reducing liver and kidney function damage and improving age-associated inflammation and oxidative stress in healthy rats. *Aging Cell* 2013; 12: 1041–1049.
- 66 Zeng Y, Chen H, Ni T, Ruan R, Feng L, Nie C, Cheng L, Li Y, Tao W, Gu J, Land KC, Yashin A, Tan Q, Yang Z, Bolund L, Yang H, Hauser E, Willcox DC, Willcox BJ, Tian XL, Vaupel JW: GxE Interactions between FOXO genotypes and tea drinking are significantly associated with cognitive disability at advanced ages in China. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014, Epub ahead of print.
- 67 Zingg JM, Hasan ST, Cowan D, Ricciarelli R, Azzi A, Meydani M: Regulatory effects of curcumin on lipid accumulation in monocytes/macrophages. *J Cell Biochem* 2012; 113: 833–840.
- 68 Stefani M, Markus MA, Lin RC, Pinese M, Dawes IW, Morris BJ: The effect of resveratrol on a cell model of human aging. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1114: 407–418.
- 69 Hubbard BP, Sinclair DA: Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35: 146–154.

