



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA SPERIMENTALE

XXI CICLO

**Ruolo della proteina SGK-1 nell'invecchiamento delle cellule
endoteliali**

Katia Basello

A.A. 2008/2009

Docente Guida: Prof. Davide Lauro

Coordinatore: Prof. Renato Lauro

INDICE

INDICE	2
INDICE DELLE FIGURE.....	4
ABSTRACT.....	5
ELENCO PAROLE CHIAVE	7
INTRODUZIONE.....	8
LA SENESCENZA.....	8
TELOMERI E TELOMERASI.....	13
Espressione del gene della telomerasi.....	18
Ruolo della fosforilazione e defosforilazione della telomerasi.....	19
I telomeri e le malattie cardiovascolari.....	21
I telomeri e l'aterosclerosi	21
LO STRESS OSSIDATIVO	23
Lo stress ossidativo condiziona la localizzazione cellulare di hTERT nelle cellule HEK 293.....	24
L'azione degli antiossidanti sull'invecchiamento delle cellule endoteliali	25
Effetti della localizzazione mitocondriale di hTERT sull'apoptosi e sul danno al DNA mitocondriale indotti da stress ossidativo nei fibroblasti umani.....	27
Effetto dell'iperglicemia sull'apoptosi delle cellule endoteliali umane	28
SGK-(serum and glucocorticoid-inducible kinase)-1	30
Regolazione della SGK-1	31
Controllo trascrizionale.....	31
Controllo dell'attività enzimatica	32
Controllo della localizzazione cellulare.....	33
Degradazione della SGK-1	35
Ruolo della SGK-1 nella regolazione delle funzioni molecolare e cellulare.....	35
Canali del sodio.....	35
Proliferazione cellulare e apoptosi.....	38
L' ENDOTELIO	40
L' ATEROSCLEROSI.....	44
Patologia	44
Ruolo della senescenza cellulare nella patofisiologia vascolare.....	48
MATERIALI E METODI.....	50
MODELLO SPERIMENTALE	50
INFEZIONE CELLULARE (HUVEC).....	51
ANALISI CITOFLUORIMETRICA.....	52
STIMOLI UTILIZZATI	53
COLORAZIONE PER LA SA- β -GAL	53
ESTRAZIONE PROTEINE NUCLEARI E CITOPLASMATICHE.....	54

IMMUNOPRECIPITAZIONE	55
WESTERN BLOT	56
OXYBLOT	57
IMMUNOFLUORESCENZA	58
TRAP ASSAY ELISA	59
Preparazione degli estratti cellulari.....	60
Reazione TRAP	60
Reazione di ibridazione ed ELISA	60
Metodo di rivelazione non radioattivo del ladder di DNA prodotto dall'attività della telomerasi	61
SCOPO DEL LAVORO	63
RISULTATI.....	65
MORFOLOGIA E CURVA DI CRESCITA	65
ANALISI WESTERN BLOT SU ESTRATTI PROTEICI NUCLEARI E CITOPLASMATICI	70
IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA SGK1	72
PRODUZIONE ENDOGENA DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO.....	76
Analisi della produzione endogena dei ROS in funzione dell'invecchiamento cellulare in condizioni basali	76
Produzione endogena dei ROS in presenza di glucosamina.....	79
ANALISI DELLE PROTEINE CARBONILATE	81
STUDIO DELL'ATTIVITA' RELATIVA DELLA TELOMERASI.....	84
DISCUSSIONE.....	87
BIBLIOGRAFIA	97

INDICE DELLE FIGURE

<i>Figura 1: Telomeri, telomerasi e proliferazione cellulare.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 2: SA-β-gal in cellule umane in coltura e in sezioni di epidermide umane.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3: Telomeri e telomerasi.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4: Schema della replicazione del DNA.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5: Struttura proteica tridimensionale della telomerasi umana.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 6: Rappresentazione schematica della telomerasi e della sua componente ad RNA.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 7: Schema della struttura della telomerasi.</i>	<i>17</i>
<i>Figura 8: Schema rappresentativo della regolazione mediante fosforilazione/defosforilazione della telomerasi.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 9: Catena di trasporto degli elettroni mitocondriale.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 10: Struttura tridimensionale di SGK.</i>	<i>30</i>
<i>Figura 11: Rappresentazione schematica della struttura di SGK e comparazione delle sequenze aminoacidiche di alcune chinasi omologhe.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 12: Modello per la regolazione del riassorbimento del sodio e della secrezione del potassio dipendente da SGK1 nel nefrone distale sensibile all'aldosterone.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 13: Ruolo della SGK-1 nel controllo della regolazione genica dipendente dal fattore NFκB... </i>	<i>39</i>
<i>Figura 14 : Formazione dell'ateroma.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 15: Colorazione per la SA β-gal su cellule vascolari senescenti nell'ateroma umano.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 16: Morfologia delle cellule HUVEC.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 17: Curve di crescita delle linee cellulari di HUVEC infettate.</i>	<i>66</i>
<i>Figura 18 : Analisi western blot.</i>	<i>68</i>
<i>Figura 19: Grafici relativi ai livelli di espressione di ciclina A, ciclina D1 e p21.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 20: Analisi western blot.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 21: Esperimento di immunoprecipitazione.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 22: Microscopia confocale.</i>	<i>74</i>
<i>Figura 23: Analisi western blot.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 24: Analisi citofluorimetrica della produzione endogena dei ROS.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 25: Esempi di analisi citofluorimetrica per i ROS.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 26: Istogrammi relativi alla produzione dei ROS in condizioni di insulino resistenza.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 27: Analisi delle proteine ossidate nelle HUVEC infettate.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 28: Analisi dell'attività della SA-β-galattosidasi.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 29: Analisi quantitativa dell'attività delle telomerasi.....</i>	<i>86</i>

ABSTRACT

Le linee cellulari vascolari coltivate in vitro possiedono una durata di vita limitata nel tempo. In seguito alle ripetute divisioni cellulari, le cellule vanno incontro ad uno stato di arresto irreversibile della crescita, chiamato “senescenza cellulare”. Questo processo è caratterizzato da una serie specifica di cambiamenti fenotipici nella morfologia cellulare, nell’espressione e nell’attività di geni e proteine. La presenza di cellule vascolari senescenti è stata riscontrata nelle lesioni aterosclerotiche umane, ed è stato stabilito che la lunghezza dei telomeri e l’attività della telomerasi abbiano un ruolo importante in questo processo. La teoria dei radicali liberi sull’invecchiamento sostiene che le specie reattive dell’ossigeno (ROS) contribuiscono significativamente al fenotipo senescente, inducendo danni a lipidi, proteine ed acidi nucleici. È stato dimostrato, nelle cellule endoteliali delle vene del cordone ombelicale, che la produzione dei ROS aumenta con l’invecchiamento cellulare, ossia con l’aumento del numero di raddoppi di popolazione. SGK1 è una serin-treonin protein chinasi che induce sopravvivenza cellulare in seguito a diversi stimoli; la sua trascrizione viene indotta dalla stimolazione da parte di siero e glucocorticoidi. Il presente studio è stato affrontato con l’obiettivo di studiare il ruolo potenziale di SGK1 nel ritardare l’inizio della senescenza, contrastando l’effetto avverso dell’aumento dello stress ossidativo e/o altri meccanismi coinvolti nel processo dell’invecchiamento delle cellule endoteliali. I nostri esperimenti hanno rivelato che, nelle cellule HUVEC infettate con il vettore che sovraesprime la proteina SGK1 WT, la proteina SGK1 è localizzata nel nucleo, mentre nella linea SGK1 $\Delta 60$, la sua

localizzazione risulta essere citoplasmatica. Quest'ultima linea cellulare sovraesprime la proteina SGK1 avente una delezione di 60 aminoacidi all'N-terminale. La produzione dei ROS nella linea SGK WT, durante l'invecchiamento, presenta un andamento decrescente rispetto alla linea di controllo pLPCX. Tale risultato è stato confermato dalla riduzione del danno indotto dai ROS sulle proteine, nella linea SGK WT, rispetto alla linea di controllo pLPCX. Inoltre, è stato osservato un livello ridotto di cellule positive alla attività delle beta galattosidasi associata alla senescenza nella linea SGK WT, rispetto alle altre due linee. Infine, è noto che l'attività della telomerasi, la trascrittasi inversa che allunga la parte terminale dei cromosomi, diminuisce con l'invecchiamento cellulare. Nelle linee cellulari infettate risulta che nella linea di controllo pLPCX e nella linea SGK $\Delta 60$ l'attività delle telomerasi diminuisce in funzione del tempo, mentre nella linea SGK WT si è ottenuto un picco di attività a PDL 8. Quindi, in conclusione, nelle cellule endoteliali senescenti, l'aumentata espressione della proteina SGK1 riduce la produzione dei ROS, aumenta l'attività della telomerasi esercitando probabilmente nelle cellule endoteliali un ruolo protettivo dalla senescenza cellulare.

ELENCO PAROLE CHIAVE

SGK-1; HUVEC; telomerasi; ROS; β -galattosidasi; senescenza.

INTRODUZIONE

LA SENESCENZA

Tutti gli organismi viventi, dal batterio unicellulare al mammifero pluricellulare, sono prodotti da cicli ripetuti di crescita e divisione cellulare che si estendono all'indietro nel tempo fino agli inizi della vita sulla Terra. Una cellula si riproduce svolgendo una sequenza ordinata di eventi in cui duplica i suoi contenuti e poi si divide in due cellule figlie. Questo ciclo di duplicazione e di divisione, noto come ciclo cellulare, è il meccanismo essenziale per cui tutti gli esseri viventi si riproducono. La divisione cellulare è quindi essenziale per la sopravvivenza degli organismi. Per produrre due cellule figlie geneticamente identiche, il DNA di ciascuna cellula deve prima essere fedelmente replicato producendo due copie complete, che devono poi essere equamente distribuite nelle due cellule figlie, così che ciascuna riceva una copia dell'intero genoma. Ma il genoma è continuamente danneggiato dal metabolismo ossidativo, da errori nella replicazione del DNA e nella mitosi cellulare. In base al livello ed al tipo di danno, le cellule quindi promuovono meccanismi di riparazione, muoiono per apoptosi o, altresì, possono diventare potenzialmente oncogeniche.

Gli organismi complessi hanno evoluto almeno due meccanismi cellulari in grado di reprimere la proliferazione di cellule a rischio di trasformazione oncogenica: l'apoptosi (morte cellulare programmata) e la senescenza cellulare.

La senescenza cellulare blocca irreversibilmente la proliferazione cellulare, a differenza dell'apoptosi che, invece, promuove la morte ed elimina le cellule potenzialmente cancerogene (Campisi, 2001).

Il processo di senescenza cellulare è stato scoperto quaranta anni fa come fenomeno che preveniva la crescita in coltura di fibroblasti umani normali in maniera indefinita (Smith, 1996; Campisi, 2000). Negli ultimi quindici anni, si è visto che questo processo, ora denominato senescenza replicativa, è guidato dall'accorciamento dei telomeri (Campisi, 2001).

I telomeri, costituiti da una sequenza ripetitiva di DNA (TTAGGG nei Vertebrati) e da proteine specializzate, sono essenziali per l'integrità del cromosoma. Si stima che circa 50-200 paia di basi di DNA telomerico non vengano replicate durante ciascuna fase S del ciclo cellulare. Poiché la telomerasi, l'enzima che sintetizza DNA telomerico "de novo", non viene espresso da molti tipi di cellule umane, i telomeri si accorciano ad ogni ciclo cellulare. Perciò, quando i telomeri, dalla loro lunghezza massima iniziale di 10-15 kb (nelle linee germinali), raggiungono una lunghezza di 4-6 kb, le cellule umane arrestano irreversibilmente la loro crescita, mostrando un caratteristico fenotipo senescente (Chiu, 1997; Campisi, 2000).

L'arresto della crescita è una manifestazione tipica della senescenza, insieme ai cambiamenti morfologici e metabolici (Campisi, 1996) e la resistenza all'apoptosi nel caso dei fibroblasti umani e dei linfociti T, ma non le cellule endoteliali. I cambiamenti morfologici e metabolici tipici delle cellule senescenti si ritrovano l'aumento del volume cellulare, l'incremento della biogenesi dei lisosomi, e l'espressione della β -galattosidasi a pH 6 ottimale (SA- β -gal) (Dimri, G.P., 1995). Questi cambiamenti fenotipici sono accompagnati anche da un alterato profilo di trascrizione, che le distingue dalle cellule quiescenti

(Dimri, 1994; Semov, 2002; Zhang, 2003). Le cellule senescenti, infatti, possiedono un contenuto di DNA più elevato in G1 dovuto alla repressione dei geni richiesti per la progressione del ciclo cellulare e alla sovraespressione di quelli che lo inibiscono (esempio p21 e p16).

È stato dimostrato che l'espressione ectopica della subunità catalitica della telomerasi (hTERT) possa prevenire l'accorciamento dei telomeri e la senescenza in diversi tipi cellulari, come i fibroblasti umani, le cellule epiteliali della retina, le cellule endoteliali e conduce ad una estensione della durata della vita e alla immortalizzazione delle cellule (Bodnar, 1998; Yang, 1999; Vaziri, 1998).

È probabile che nei Mammiferi la senescenza si sia evoluta come meccanismo di soppressione di tumoregenesi, agendo come meccanismo salva vita per la prevenzione della proliferazione di cellule a rischio per la trasformazione neoplastica. Infatti, le cellule normali entrano potenzialmente in senescenza nel caso in cui abbiano subito danni o stimoli oncogenici come, ad esempio, danni ai telomeri che diventano non funzionali, danno al DNA, perturbazioni della cromatina ed espressione di oncogeni (Campisi 1999, 2000) (figura 1).

Il numero delle divisioni cellulari al quale una popolazione entra in senescenza varia considerevolmente in base al tipo di cellula, specie, età e genotipo. In condizioni di coltura standard, fibroblasti fetali umani generalmente entrano in senescenza dopo 50-80 eventi replicativi, mentre fibroblasti fetali murini dopo 5-10 divisioni cellulari (Wright, 2000).

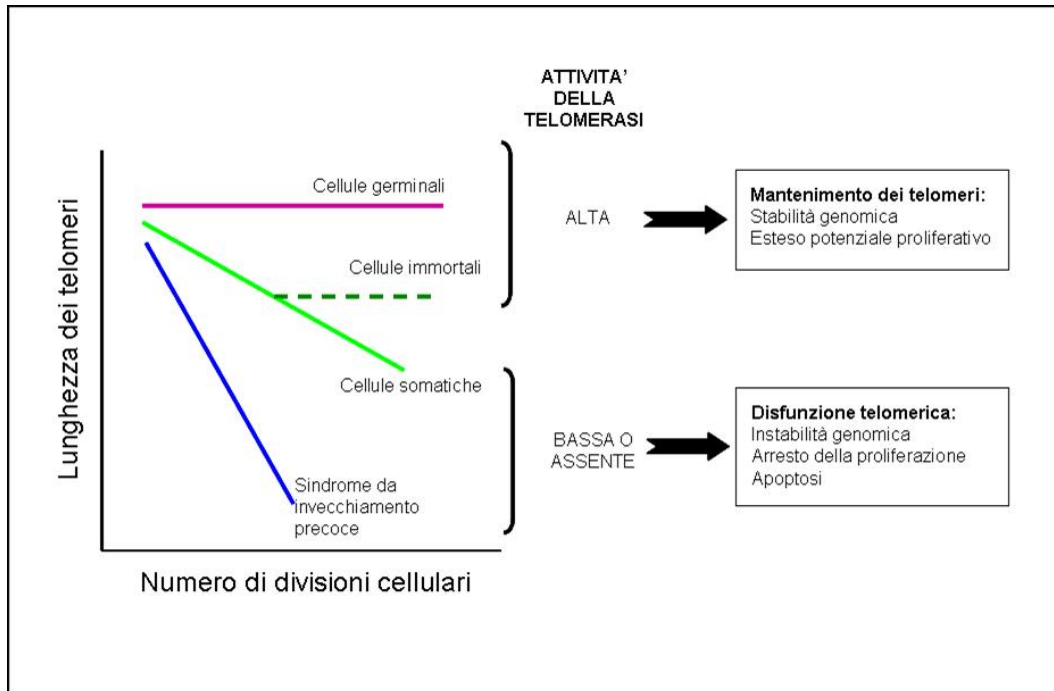


Figura 1: Telomeri, telomerasi e proliferazione cellulare. L'attività della telomerasi è bassa o assente nelle cellule somatiche: quindi, la progressiva erosione dei telomeri avviene in seguito a ciascuna divisione cellulare. Cellule della linea germinale e cellule tumorali, invece, presentano una alta attività telomerasica, assicurando così il mantenimento della lunghezza dei telomeri ed un esteso potenziale proliferativo. L'accorciamento accelerato dei telomeri è associato nell'uomo a sindromi di invecchiamento precoce (Campisi, 2000).

L'attività dell'enzima β -galattosidasi si riscontra specificatamente in colture di fibroblasti umani senescenti, ma non in cellule quiescenti o terminalmente differenziate (Dimri 1995). Per tale motivo il saggio della β -galattosidasi viene utilizzato su vari tipi di cellule e tessuti in vitro (Reznikoff, 1996; Serrano, 1997; Bodnar, 1998; Van der Loo, 1998; Tsukamoto, 1998) e in vivo (Sigal, 1999; Mishima, 1999) (figura 2).

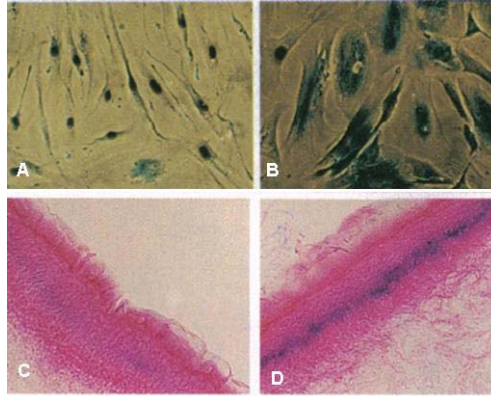


Figura 2: SA- β -gal in cellule umane in coltura e in sezioni di epidermide umane. A) cellule HC2A giovani (ingrandimento 100X); B) cellule HC2A senescenti (ingrandimento 100X); C) e D) epidermide di una donna (C) e di un uomo (D) entrambi di 73 anni di età (ingrandimento 120X) (Dimri, G.P., 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9363–9367).

Uno studio del 2000 dimostra che la senescenza associata alla β -galattosidasi nelle cellule endoteliali umane è una manifestazione dell'attività lisosomiale residua che si ritrova solo nelle cellule senescenti (David J. Kurz, Journal of Cell Science, 2000).

TELOMERI E TELOMERASI

I telomeri sono complessi di DNA e proteine presenti nei punti terminali dei cromosomi; essi hanno la funzione di proteggere il DNA cromosomico dalla fusione e dalla degradazione da parte di esonucleasi e ligasi, di regolare il riconoscimento e la separazione del cromosoma durante la mitosi, di posizionare ed ancorare i cromosomi al macchinario nucleare per facilitare la replicazione del DNA ai vari stadi del ciclo cellulare mitotico e meiotico (Blackburn, E. H., 1990, de Lange, T. 1998). I telomeri sono costituiti da ripetizioni in tandem di sequenze nucleotidiche ricche in G e C che formano filamenti complementari esanucleotidici e da proteine che legano tali sequenze.

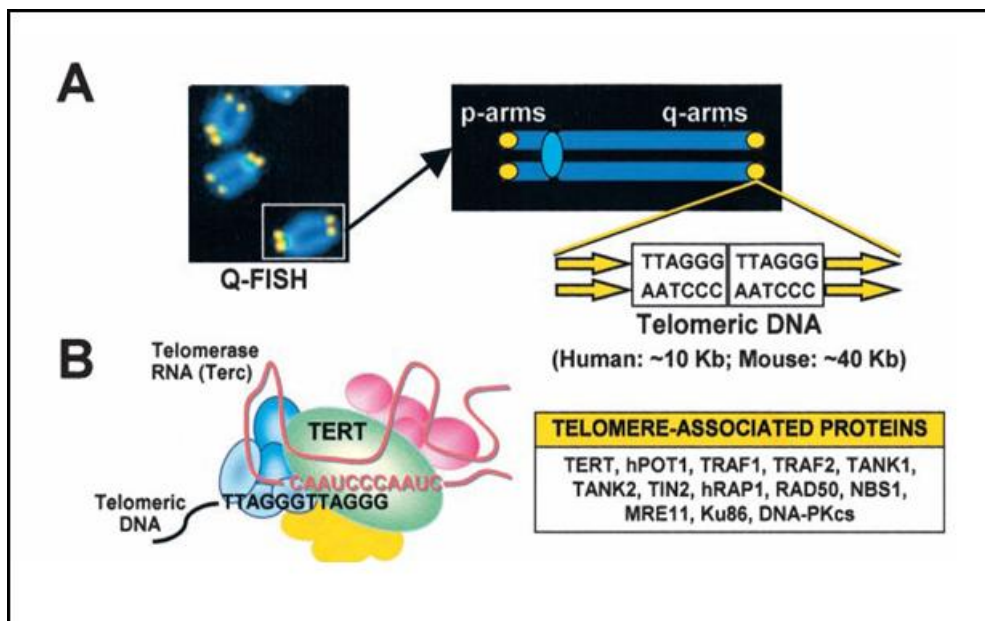


Figura 3: Telomeri e telomerasi. A) la marcatura a fluorescenza Q-FISH rivela i telomeri (giallo) nella parte terminale dei cromosomi (blu). Lo schema a destra mostra la sequenza telomerica ripetuta in tandem presente nel DNA telomerico umano. B) Composizione proteica del complesso ribonucleoproteico della telomerasi umana, caratterizzata solo in parte; lo schema mostra le componenti telomeriche a DNA ed RNA (Terc), la subunità catalitica della telomerasi trascritta inversa (TERT) e le proteine associate alla telomerasi. (Serrano A. L., Circ Res. 2004).

Il DNA telomerico possiede una struttura generica $(T \text{ o } A)_m(G)_n$, che nei Vertebrati è $(TTAGGG)_n$. Le proteine che legano le sequenze telomeriche identificate nell'uomo sono numerose, tra le quali TRF1 e TRF2 (TTAGGG repeat binding factors), TERT (telomerase reverse transcriptase) e TEP-1 (telomerase-associated protein) (figura 3).

Molte di queste proteine potrebbero esser coinvolte nella regolazione della struttura e della funzione telomerica. Studi di microscopia elettronica hanno rivelato che, ad esempio, TRF2 rimodella in vitro il DNA telomerico lineare in un esteso cappio a T a doppio filamento (Griffith, J. D., 1999). La replicazione del DNA è di tipo semiconservativo e provoca l'accorciamento dei telomeri ad ogni divisione cellulare poichè gli estremi terminali dei cromosomi non vengono duplicati completamente (figura 4), perdendo circa 150 paia di basi della sequenza nucleotidica dell'estremo 5' del DNA (Olovnikov, A.M. 1971; Watson, J.D. 1972).

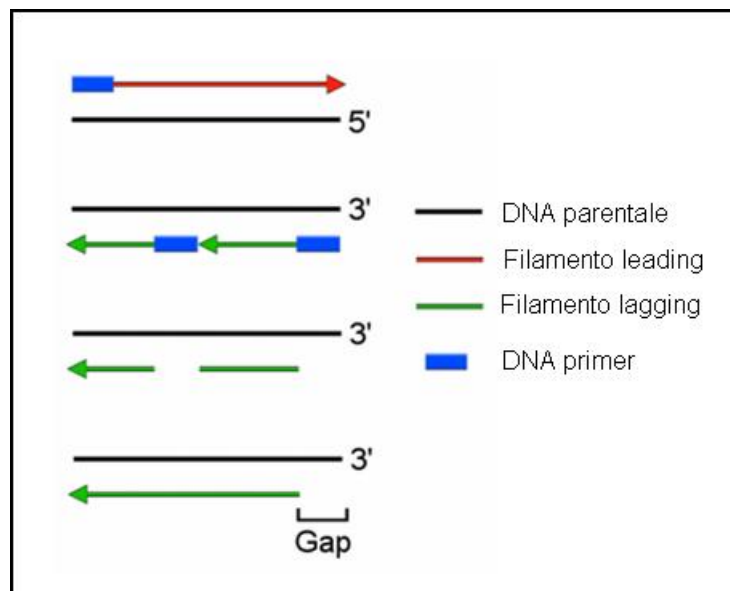


Figura 4: Schema della replicazione del DNA. Poichè la replicazione del DNA è bidirezionale ed inizia da un primer ad opera di una DNA polimerasi unidirezionale, ciascun ciclo di replicazione del DNA lascia 50-200 pb di DNA non replicate all'estremità del cromosoma. (Campisi J., S. Kim, C. Lim, M, Rubio. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. Experimental Gerontology 36 (2001) 1619-1637).

L'aumento del numero di divisioni cellulari, di solito accompagnato dalla diminuzione della lunghezza dei telomeri, potrebbe avere un ipotetico ruolo funzionale di orologio mitotico che memorizza o ricorda il numero delle divisioni cellulari. Quando il numero delle divisioni cellulari è alto, i telomeri diventano così corti che le cellule escono dal ciclo di divisione cellulare per entrare nella senescenza replicativa (Allsopp, R. C., 1992; Hastie, N. D., 1990; Harley, C. B., 1990). Quindi, la degradazione dei telomeri sembra costituire un segnale di arresto della divisione cellulare.

La telomerasi è un complesso ribonucleoproteico che contiene una subunità ad RNA e diverse componenti proteiche (figura 5) (Greider, C. W., and Blackburn, E. H. , 1985; Morin, G. B., 1989).

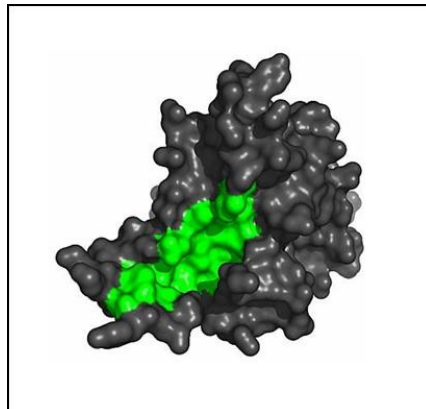


Figura 5: Struttura proteica tridimensionale della telomerasi umana. Il sito attivo dell'enzima appare di colore verde (Howard Hughes Medical Institute).

La componente ad RNA (hTR, human telomerase RNA), lunga 445 nucleotidi, è essenziale per la funzione enzimatica della telomerasi (Shippen-Lentz, D., and Blackburn, E. H. 1990; Feng, J., 1995; Blasco, M. A., 1996; Avilion, A. A., 1996; Tsao, D. A., 1998). Dal momento che serve da template per la trascrizione inversa nella sintesi del DNA

telomerico, la subunità ad RNA è presente nel sito attivo dell'enzima, dove, grazie all'interazione di specifici nucleotidi con le componenti strutturali del DNA substrato, funziona da primer (Roy, J., 1998).

Non sono completamente note le modalità con cui la telomerasi sintetizza e allunga i telomeri. È stato ipotizzato che l'oloenzima telomerasi interagisce con il primer a filamento singolo al 3' ricco in GT e polimerizza deossinucleosidi trifosfati in direzione 5'-3' (figure 6 e 7).

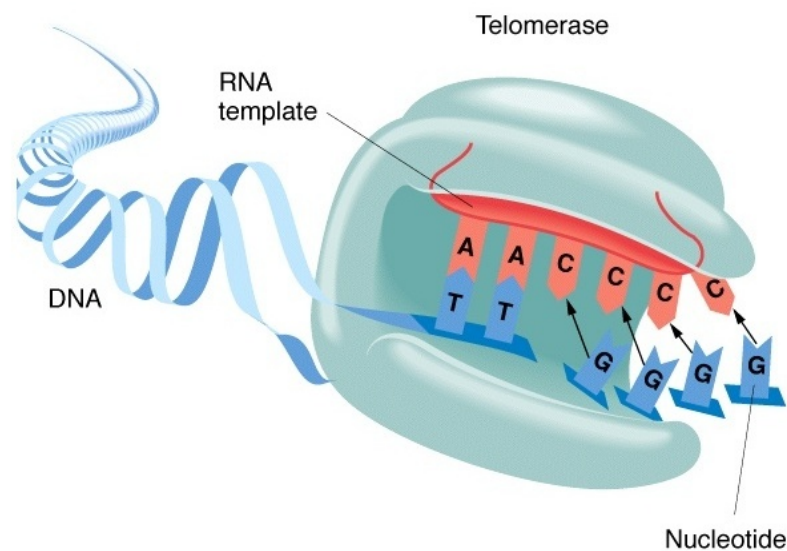


Figura 6: Rappresentazione schematica della telomerasi e della sua componente ad RNA.

Questa reazione nel lievito sembra non richiedere ATP, ma utilizza l'RNA telomerico come stampo guida complementare alle ripetizioni telomeriche di DNA. In una prima fase la telomerasi si lega ad un primer telomerico e si posiziona in modo che la sequenza di RNA template si allinei con il primer di DNA telomerico; poi l'enzima trascrive un nucleotide del DNA del telomero complementare alla sequenza dello stampo di RNA.

Quando le ripetizioni telomeriche TTAGGG complete sono finite, la telomerasi potrebbe traslocare al sito successivo con un processo ciclico che le permette di aggiungere ripetizioni di DNA telomerico.

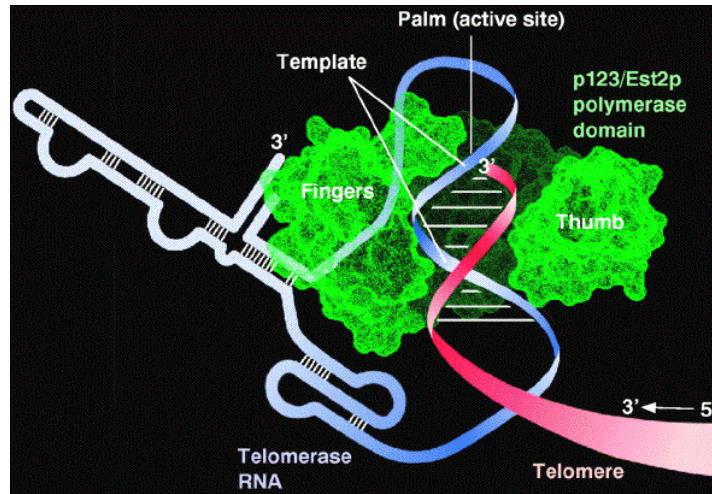


Figura 7: Schema della struttura della telomerasi. Si possono osservare il sito attivo dell'enzima, che forma una tasca entro la quale avviene la reazione di trascrizione inversa, l'RNA telomerico che funziona da stampo per la sintesi del DNA telomerico, e la parte strutturale in verde.

Non sono note né le strutture terziaria e quaternaria di una telomerasi attiva, né la cinetica delle interazioni tra la telomerasi e i telomeri, sebbene sembra probabile che il processo coinvolga cambiamenti dinamici nella configurazione della telomerasi e nelle sue interazioni con il substrato telomerico di DNA e con altri fattori (Niida, H., 1998; Lee, H. W., 1998; Kondo, S., 1998).

L'assenza o la minore regolazione della subunità ad RNA provoca diverse disfunzioni, tra le quali l'inibizione della telomerasi, l'erosione dei telomeri, compromette la capacità di crescita delle cellule staminali embrionali, delle cellule testicolari e delle cellule ematopoietiche murine (Niida, H., 1998; Lee, H. W., 1998; Kondo, S., 1998).

Regolazione molecolare dell'attività della telomerasi

Evidenze sperimentali indicano che la telomerasi viene regolata in maniera reversibile. Per esempio, l'attività della telomerasi non è rilevabile in molte cellule somatiche umane, ma in circa l'85% di linee cellulari umane immortalizzate e tumorali, la telomerasi diventa altamente attiva (Kim, N. W., 1994, Science; Shay, J. W., and Bacchetti, S., 1997, Eur. J. Cancer).

I linfociti presentano una bassa attività telomerasica, ma la stimolazione di specifici recettori antigenici di membrana aumenta notevolmente l'attività di questa proteina (Hathcock, K. S., 1998, J. Immunol). L'esposizione della pelle per lunghi periodi al sole provoca un aumento nell'attivazione dell'enzima telomerasi (Ueda, M., Cancer Res., 1997). In cellule cancerose la telomerasi attiva viene repressa quando le cellule escono dal ciclo cellulare e diventano quiescenti (Sharma, H. W., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA).

Espressione del gene della telomerasi

Mentre la componente ad RNA della telomerasi (hTR) e le proteine associate ai telomeri (hTEP1) vengono normalmente espresse nei tessuti umani, l'espressione della subunità catalitica della telomerasi (hTERT) è repressa in molti tessuti somatici umani dopo la nascita, ma si riattiva in molti tumori primari e in linee di cellule immortali. Comunque, l'espressione ectopica di hTERT in cellule telomerasi negative è sufficiente per ripristinare l'attività della telomerasi, ad allungare i telomeri e ad estendere la durata della vita.

Studi recenti hanno evidenziato che il promotore di hTERT è inattivo nelle normali cellule somatiche, ma diventa attiva durante l'immortalizzazione. Analisi di sequenza rivelano che il promotore di

hTERT contiene siti di legame per diversi fattori di trascrizione, suggerendo che l'espressione della telomerasi potrebbe essere soggetta a livelli multipli di controllo e regolata da diversi fattori in differenti contesti cellulari (Wick, M., 1999, Gene).

L'attività della telomerasi è controllata anche da meccanismi post-trascrizionali. Dopo la traduzione, si presume che l'assemblaggio e il disassemblaggio dell'oloenzima richiedano delle interazioni con altre proteine (Kang, S., 1999, J. Biol. Chem). Poiché l'emivita della telomerasi è più di 24 ore (Holt, S. E., Mol. Cell. Biol. 1996), la sua attività potrebbe essere soggetta anche a modulazione di cambiamenti conformazionali dell'oloenzima mediante interazioni dirette proteina-proteina (Liu, J.P. 1999, The FASEB Journal).

Ruolo della fosforilazione e defosforilazione della telomerasi

La fosforilazione delle proteine rappresenta un importante meccanismo post-traduzionale comunemente utilizzato per controllare la struttura e la funzione di molte proteine.

Il modello proposto per la telomerasi è che questo enzima esiste in due differenti conformazioni che possono essere cambiate nella forma attiva ed inattiva tramite la fosforilazione, da parte della protein chinasi C alfa (PKC α) e la defosforilazione proteica, mediante la protein fosfatasi 2A (PP2A), in maniera reversibile (Li, H., 1997, J. Biol. Chem.).

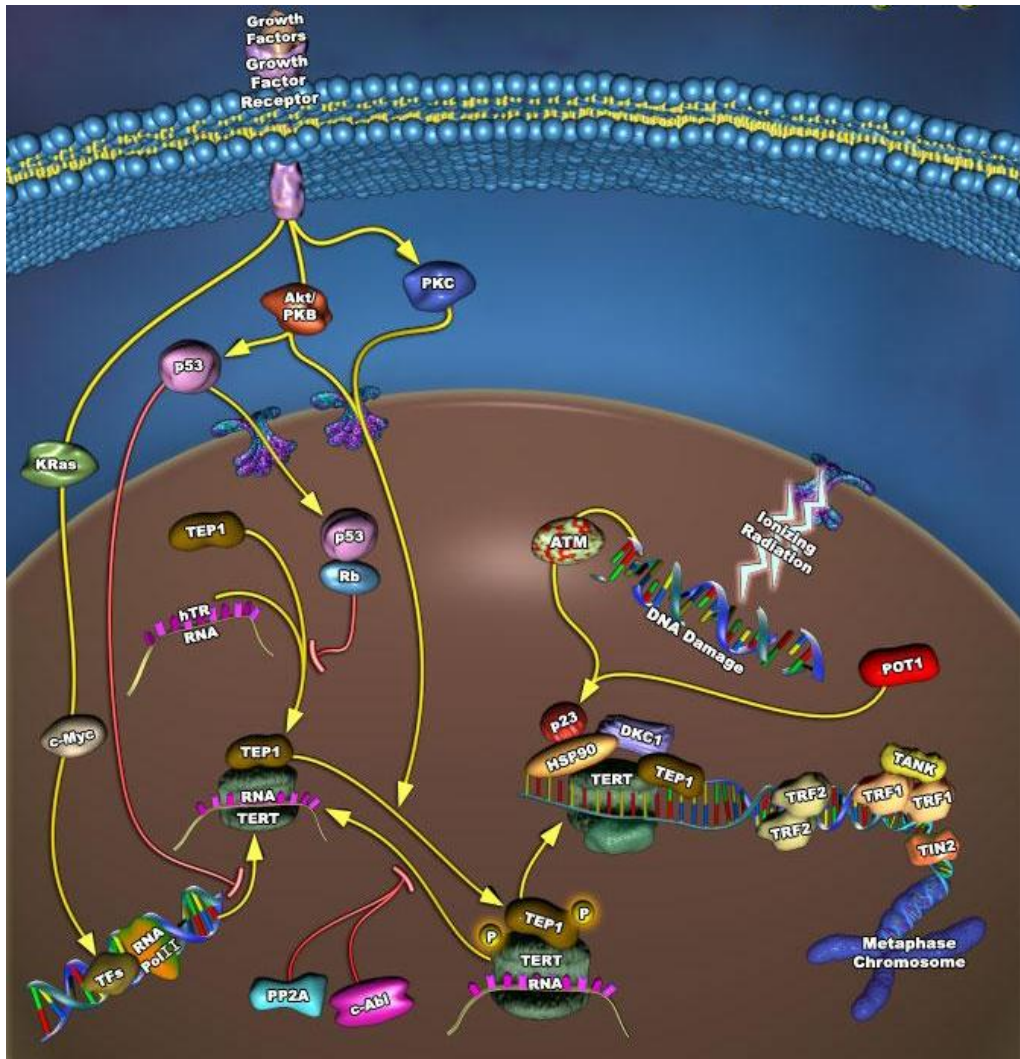


Figura 8: Schema rappresentativo della regolazione mediante fosforilazione/defosforilazione della telomerasi. (Applied Biosystems).

Studi recenti dimostrano che la protein chinasi B (PKB o Akt) è coinvolta nella sovraregolazione della telomerasi (figura 8). In particolare, la PKB in vitro, fosforila il peptide AVRIRGKSYV di hTERT stimolandone l'attività. Il trattamento delle cellule di melanoma umano con il Wortmannin (inibitore della PI3K che attiva la PKB) blocca l'attività della telomerasi (Kang, S., 1999, J. Biol. Chem).

I telomeri e le malattie cardiovascolari

Gli effetti cardioprotettivi degli estrogeni, esercitati attraverso gli effetti diretti su cellule endoteliali e muscolari lisce, probabilmente contribuiscono alla minor incidenza di malattie cardiovascolari osservate nelle donne in premenopausa rispetto agli uomini (Farhat MY, 1996; Nathan L. 1997; Mendelsohn ME, 1999 Dubey RK, 2001). Dati recenti indicano che le donne presentano una velocità di accorciamento dei telomeri, dipendente dall'età, minore rispetto a quella che si verifica negli uomini (Cherif H, 2003; Coviello-McLaughlin GM , 1997; Benetos A, 2001).

Infatti, gli estrogeni inducono la trascrizione di TERT poichè nel promotore di questo gene è presente un elemento di risposta agli estrogeni. Inoltre, gli estrogeni attivano nelle cellule endoteliali la via della PI3K/Akt, la quale induce l'attività della telomerasi mediante la fosforilazione di TERT (Simoncini T.,2000; Kang SS, 1999). Di contro, l'inibizione della PI3K, così come l'impiego del dominante negativo di Akt, diminuiscono l'attività della telomerasi nelle cellule endoteliali mediante la fosforilazione di TERT (Breitschopf K, 2001).

Nell'insieme, i dati di letteratura suggeriscono che gli estrogeni attivano la telomerasi endoteliale via PI3K/Akt e che l'inattivazione di Akt diminuisce l'attività della telomerasi nelle cellule endoteliali. Inoltre, gli estrogeni stimolano anche la produzione di ossido nitrico, il quale, a sua volta, induce l'attività della telomerasi (Vasa M, 2000).

I telomeri e l'aterosclerosi

L'invecchiamento è il maggior fattore di rischio per le malattie cardiovascolari (Ross R. 1999; Lusis AJ. 2000). Le cellule endoteliali umane dell'aorta addominale presentano un accorciamento dei telomeri e una aumentata frequenza di aneuploidia correlate all'età (Aviv H, 2001).

È stata stimata una maggiore percentuale di accorciamento dei telomeri nelle cellule endoteliali umane di arterie iliache, rispetto a quelle di vene iliache (102 pb contro 47 pb per anno, rispettivamente). Inoltre, la perdita dei telomeri nell'intima è dipendente dall'età ed è maggiore nelle arterie iliache rispetto alle arterie toraciche interne (147 pb rispetto a 87 pb per anno, rispettivamente), che subiscono un minor stress emodinamico (Chang E., 1995). Quindi, l'accorciamento dei telomeri contribuirebbe alla disfunzione endoteliale.

In lesioni aterosclerotiche sono state ritrovate cellule endoteliali con fenotipi associati alla senescenza (Minamino T, 2002). È stato verificato che tale fenotipo può essere indotto in cellule endoteliali umane dell'aorta, coltivate in vitro, mediante la sovraespressione del mutante dominante negativo del TRF2 (telomere repeat binding factor 2), ma prevenuto dalla sovraespressione di TERT (Minamino T., 2002 Circulation).

In ultimo, è stato osservato che, nelle cellule endoteliali umane delle vene di cordone ombelicale, la vitamina C riduce del 53% il livello degli intermedi delle specie reattive dell'ossigeno proaterogeniche, provocando un rallentamento nell'accorciamento dei telomeri dipendente dall'invecchiamento (Furumoto K, 1998).

LO STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo può spiegare una larga parte della patogenesi della disfunzione endoteliale. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), che comprendono l'anione superossido, il perossido di idrogeno, i radicali idrossile, e le specie reattive del nitrogeno (ossido nitrico e perossinitrile) hanno un'importanza rilevante nella biologia vascolare in base al loro potenziale di ossido-riduzione (redox). I ROS influenzano la funzione vascolare in diversi modi: modulando la contrazione e dilatazione, la crescita cellulare, l'apoptosi, la migrazione, l'infiammazione (Chandra, J., 2000, *Free Radic. Biol. Med.*; Finkel T., *Nature*, 2000; Griendling, K. K., 1999, *Circ. Res.*; White, C. R., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*).

Il meccanismo mediante il quale i ROS esercitano il loro effetto cellulare nell'endotelio dipende dalla loro capacità nel modulare l'espressione e la funzione di geni vascolari, come il vascular endothelial growth factor (VEGF), il fibroblast growth factor (FGF) ed il platelet-derived growth factor (PDGF), i quali giocano un ruolo aterogenico chiave nella regolazione della crescita cellulare e nel differenziamento. (Eyries M et al. *Endothelium*. 2004).

Un disequilibrio nello stato redox nel quale gli ossidanti superano gli antiossidanti provoca stress ossidativo (Finkel T., 2000, *Nature*). Nel caso delle cellule vascolari sono state studiate molte potenziali risorse enzimatiche di ROS, le quali potrebbero essere responsabili della riduzione della biodisponibilità di NO, come la xantina ossidasi, NADH/NADPH ossidasi, la lipoossigenasi e la cicloossigenasi (Praticò D. *Atherosclerosis* 2005).

L'uomo, come gli altri organismi aerobi, ha sviluppato una varietà di meccanismi per proteggersi dall'effetto potenzialmente deleterio dei

ROS. Tra questi ci sono enzimi, come la catalasi e la superossido dismutasi (SOD), enzimi di riparazione come la DNA glicosilasi, e antiossidanti idro e liposolubili come l'acido ascorbico (Vitamina C), l' α -tocoferolo (Vitamina E) ed il β -carotene (Cai H, *Circul. Res.*, 2000). Le modificazioni a livello vascolare determinate da un'alterazione dei livelli di monossido di azoto predispone i vasi a lesioni aterosclerotiche (Praticò D, *Atherosclerosis* 2005).

Lo stress ossidativo condiziona la localizzazione cellulare di hTERT nelle cellule HEK 293

La regolazione di hTERT gioca un importante ruolo nella capacità proliferativa e nella sopravvivenza delle cellule (Oh, H., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali l'anione superossido, il perossido di idrogeno, i radicali idrossile e le specie reattive del nitrogeno, come l'ossido nitrico e il perossinitrile, sono coinvolte in numerose malattie, nell'apoptosi e nei processi che portano all'invecchiamento (Chandra et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; Finkel et al., *Nature*, 2000; Griendling et al., *Circ. Res.*, 1999; White *Proc Natl Acad Sci.*, 1994). La produzione di alti livelli di ROS esogeni o endogeni provoca un disequilibrio nello stato redox delle cellule, le quali subiscono stress ossidativo. Tale stato provoca modificazioni delle proteine e dei lipidi intracellulari e danno al DNA (Parman et al. *Nat. Med.*, 1999).

È stato osservato che nelle cellule HEK 293 lo stress ossidativo indotto, sia in maniera endogena (TNF α e cicloossigenasi) che esogena (H₂O₂), induce la traslocazione della telomerasi dal nucleo al citoplasma (Haendeler, *Mol Cell Biology*, 2003).

Inoltre, è stato verificato che hTERT viene trasportata attraverso i pori nucleari mediante un processo che dipende dalla proteina Ran-

GTPasi (Haendeler, Mol Cell Biology, 2003). L'esportazione nucleare di hTERT indotta da stress ossidativo esogeno è preceduta dalla fosforilazione del residuo 707 di tirosina, meccanismo necessario sia per l'associazione di TERT con Ran che per l'esportazione di TERT dal nucleo al citoplasma (Haendeler, Mol Cell Biology, 2003). È stato anche osservato, mediante la sovraespressione di un mutante dominante negativo, che l'inibizione della fosforilazione dei residui di tirosina 707 aumenta l'effetto antiapoptotico di TERT, dimostrando che la sua localizzazione nucleare contribuisce fortemente alla sua funzione antiapoptotica. In conclusione, la fosforilazione e la traslocazione di hTERT rappresenterebbero degli ulteriori meccanismi di regolazione dell'attività della telomerasi (Haendeler, Mol Cell Biology, 2003). È stato osservato che in cellule di linfociti del sangue periferico (PBL) il TNF α attiva la telomerasi citoplasmatica e induce la traslocazione di TERT dal citoplasma al nucleo, dove la telomerasi rimane attiva ancora per due ore. L'utilizzo di due diversi inibitori, SN-50 e Wortmannin, ha permesso di individuare che nei linfociti umani la via di segnale coinvolta nella regolazione dell'attività e della traslocazione di hTERT è associata alla via PI3K/ Akt/ NF-kB (M. Akiyama et al., 2004, BBRC).

L'azione degli antiossidanti sull'invecchiamento delle cellule endoteliali

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono coinvolte nei processi di invecchiamento cellulare e in numerose malattie (Finkel et al., Nature, 2000). Nell'invecchiamento cellulare, l'aumentata produzione di ROS potrebbe derivare in maniera primaria dall'attività della NADPH ossidasi e dalla produzione mitocondriale (Hamilton, Hypertension, 2001; Xu, BBRC 2002). Ciò è rafforzato dal fatto che vi è una proporzionalità

diretta tra la durata della vita di molti organismi e il tasso di produzione mitocondriale dei ROS (Finkel et al., Nature, 2000) (figura 9).

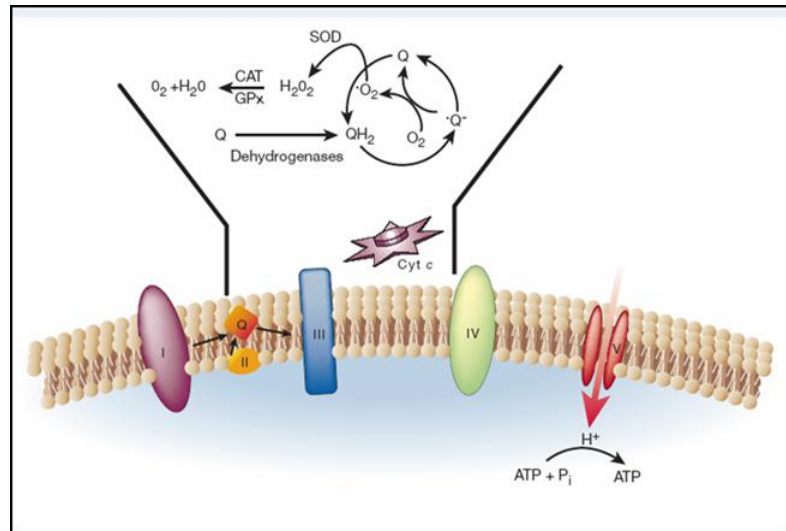


Figura 9: Catena di trasporto degli elettroni mitocondriale. Il complesso III è la maggiore sorgente che produce ROS. Gli elettroni dal complesso I o II deidrogenasi sono trasferiti al coenzima Q (Q), chiamato anche ubiquinone. La forma ridotta dell'ubichinone (QH₂) del coenzima Q successivamente subisce due reazioni di ossidoriduzione utilizzando le forme ridotte e ossidate dei citocromi b e c. L'intermedio instabile dell'ubichinone può portare alla formazione del superossido mediante il trasferimento di elettroni direttamente alla molecola di ossigeno. Una volta generato, il superossido può essere enzimaticamente dismutato mediante la SOD per formare perossido di idrogeno che viene a sua volta metabolizzato da enzimi come la catalasi e la glutazione riduttasi che generano acqua e ossigeno. Poiché la generazione del superossido non è enzimatica, più è alto il metabolismo, maggiore è la produzione dei ROS (Finkel, Nature, 2000).

In linea con queste osservazioni, molecole che mimano l'azione di enzimi antiossidanti, come la superossido dismutasi e la catalasi, possono aumentare la durata della vita (Melov et al., Science, 2000).

Nel 2004, Haendeler et al. hanno dimostrato, su cellule endoteliali umane, che la produzione endogena dei ROS aumenta all'aumentare del numero di raddoppiamenti di popolazione (population doubling PDL). Tale aumento è accompagnato da un forte danno al DNA mitocondriale, dalla diminuita capacità proliferativa, da un leggero aumento della percentuale di cellule SA-β-gal positive e dall'accorciamento dei

telomeri. Ad un incremento della produzione dei ROS corrisponde anche una diminuzione dell'attività di hTERT nucleare e un aumento di quella di hTERT citoplasmatica, ma nessun cambiamento nell'attività e nei livelli di espressione di hTERT totale. Solo a PDL maggiori si verifica una diminuzione dell'attività totale di hTERT. Mediante l'utilizzo a basse dosi dell' N-acetilcisteina (un antiossidante) e la atorvastatina (una statina) si è osservato che in corrispondenza di un numero elevato di PDL la formazione dei ROS diminuisce, così come il danno al DNA mitocondriale, si ritrovano il blocco dell'esportazione nucleare di TERT e l'inibizione della riduzione dell'attività totale di TERT e della senescenza cellulare (Haendeler et al., Circulation Research, 2004).

Effetti della localizzazione mitocondriale di hTERT sull'apoptosi e sul danno al DNA mitocondriale indotti da stress ossidativo nei fibroblasti umani

È stato dimostrato che la hTERT possiede una sequenza leader mitocondriale in corrispondenza dell'estremità N-terminale e che l'espressione ectopica di hTERT in cellule umane è in correlazione con l'aumento del danno al DNA mitocondriale (mt) in seguito a trattamento con perossido d'idrogeno (Santos, Aging Cell, 2004).

Inoltre, recentemente, è stato osservato che questo incremento del danno al mtDNA, dopo trattamento con perossido di idrogeno, dipende dalla presenza di hTERT stessa. Utilizzando un mutante dominante negativo inattivo di hTERT è stato dimostrato che la telomerasi, per mediare il danno al mtDNA, deve essere cataliticamente attiva. Fibroblasti trasfettati con hTERT, oltre a mostrare un incremento del danno al DNAmT in seguito a stress ossidativo, presentano un forte aumento dell'apoptosi, attivazione della caspasi-3 e clivaggio di PARP. Mutazioni nella sequenza leader mitocondriale N-terminale di hTERT

provocano la mancata localizzazione mitocondriale della proteina, che conserva la sua attività catalitica. Fibroblasti che possiedono questa mutazione presentano non solo un minor danno al mtDNA in seguito a stress ossidativo, ma anche un'inalterata capacità proliferativa. Così la localizzazione di hTERT nel mitocondrio rende le cellule più suscettibili al danno del mtDNA indotto da stress ossidativo e alla conseguente morte apoptotica, mentre le cellule che possiedono hTERT esclusivamente nucleare, in mancanza della localizzazione mitocondriale dell'enzima, presentano minor danno al mtDNA, aumento della sopravvivenza cellulare e protezione dalla senescenza cellulare (Santos, Human Molecular Genetics, 2006).

Effetto dell'iperglicemia sull'apoptosi delle cellule endoteliali umane

È ormai noto il coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella patogenesi delle complicazioni vascolari associate al diabete (Giugliano, Diabetes Care, 1996). È stato dimostrato che l'iperglicemia aumenta la produzione dei radicali liberi, inducendo stress ossidativo, il quale attiva pathways di morte coinvolti nella necrosi e nell'apoptosi cellulari (von Harsdorf, Circulation, 1999; Tanaka, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999; Frustaci, Circ Res, 2000). Nelle cellule endoteliali delle vene del cordone ombelicale umano (HUVEC) è stato osservato che la presenza intermittente di elevate concentrazioni di glucosio è più dannosa rispetto a quella continuativa, poiché nella prima condizione si verifica un marcato incremento dell'apoptosi (Risso, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001). È stato dimostrato, inoltre, che il danno iperglicemico è causato dall'aumentata produzione di superossido da parte della catena di trasporto mitocondriale (Nishikawa, Nature, 2000), il cui coinvolgimento è stato ulteriormente dimostrato in maniera specifica, nelle cellule

HUVEC, mediante l'utilizzo dell'inibitore specifico del complesso II, il thenoyltrifluoroacetone (TTFA) (Piconi, Diabetes, 2006).

SGK-(serum and glucocorticoid-inducible kinase)-1

La proteina SGK (serum and glucocorticoid-inducible kinase) è stata originariamente isolata da cellule di tumore mammario di ratto. Essa è membro della famiglia delle serin/treonin protein chinasi ed è sotto il controllo trascrizionale da parte dei componenti del siero e glucocorticoidi (Webster et al., 1993a, 1993b).

E' stato visto che SGK ha un ruolo biologico nella via di trasduzione del segnale coinvolto nella sopravvivenza e nella proliferazione cellulare (Webster et al., 1993b; Buse et al., 1999; Brunet et al., 2001; Mikosz et al., 2001; Xu et al., 2001), nel controllo dell'attività dei canali epiteliali del sodio, nell'omeostasi del sodio (Alvarez de la Rosa et al., 1999; et al., 1999; Naray-Fejes-Toth et al., 1999; Shigaev et al., 2000; Kamynina and Staub, 2002) e nella nefropatia associata al diabete (Kumar et al., 1999).

Il gene Sgk codifica per una proteina di 50 kDa (figura 10)

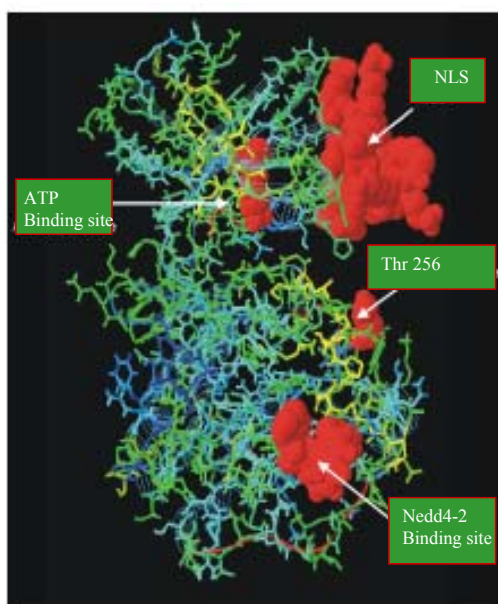


Figura 10: Struttura tridimensionale di SGK. In evidenza vi sono la sequenza di localizzazione nucleare (NLS), il sito di fosforilazione (treonina 256) nel dominio catalitico, il sito di legame con l'ATP e il sito di ubiquitinazione.

e contiene un dominio catalitico omologo per il 45-55% ai domini catalitici di diverse serin-treonin protein chinasi costitutivamente espresse, come Akt/PKB, protein chinasi A, protein chinasi C-zeta, e la p70S6K/p85S6K chinasi (figura 11)(Webster et al., 1993b).

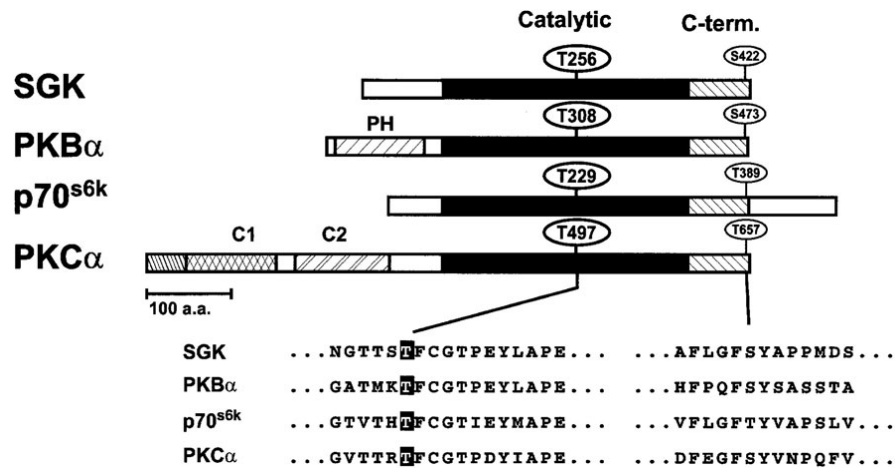


Figura 11: Rappresentazione schematica della struttura di SGK e comparazione delle sequenze aminoacidiche di alcune chinasi omologhe. I siti putativi di fosforilazione di SGK nel dominio catalitico, Thr256, e nel C-terminale, Ser422, vengono comparati a siti analoghi presenti in altre chinasi. I residui di treonina fosforilati da parte di PDK1 sono evidenziati sotto. PH, pleckstrin homology domain; C1, diacylglycerol/phorbol ester binding domain; C2, Ca21/TPA binding domain.

Regolazione della SGK-1

Controllo trascrizionale

Il gene di SGK è altamente conservato dal lievito all'uomo; infatti, la proteina SGK ha un ruolo biologico nell'adattamento e nella sopravvivenza della cellula agli agenti stressogeni, come il cambiamento dei livelli di nutrienti, di temperatura e di osmolarità. Nell'uomo l'espressione di SGK è finemente regolata durante l'embriogenesi. Durante i primi stadi dello sviluppo è espressa ad alti livelli nel cuore e nei vasi sanguigni, suggerendo un ruolo di questa chinasi nello sviluppo di tali organi. Nelle fasi successive dello sviluppo embrionale, SGK si trova ad alti livelli in tessuti coinvolti nella osmoregolazione e nella

risposta a condizioni di stress (Lee, 2001).

La trascrizione del gene Sgk può essere regolata da segnali di stress cellulari e ormonali in maniera tipo cellulare- e stimolo-dipendente (Webster et al., 1993a, 1993b; Imaizumi et al., 1994; Maiyar et al., 1996, 1997; Alliston et al., 1997; Delmolino and Castellot, 1997; Waldegger et al., 1997, 1999; Chen et al., 1999; Iyer et al., 1999; Naray-Fejes-Toth et al., 1999; Bell et al., 2000; Brennan and Fuller, 2000; Cowling and Birnboim, 2000; Shigaev et al., 2000; Mizuno and Nishida, 2001). La trascrizione di questo gene è indotta da gonadotropine, 1,25-diidrossivitamina D₃, TGF- β , interleuchina-6, FGF, PDGF, trombina, endotelina ed altre citochine. Inoltre, l'attivazione del PPAR γ stimola la trascrizione del gene. L'isoforma umana è stata identificata come gene regolato dal volume cellulare che viene trascrizionalmente sovraregolato mediante raggrinzimento cellulare. In cellule epiteliali renali A6, l'espressione di SGK viene stimolata dal rigonfiamento cellulare piuttosto che dalla diminuzione del volume cellulare. La trascrizione del gene viene stimolata anche da eccessive concentrazioni di glucosio, shock termico, radiazioni ultraviolette e stress ossidativo ed inibita dall'eparina (Leong ML, 2003, J Biol Chem.; Delmolino LM, J Cell Physiol, 1997).

Le molecole segnale coinvolte nella regolazione trascrizionale di SGK1 comprendono la protein chinasi C, la protein chinasi Raf, MAP-chinasi, PI3K e p53 (Mizuno H., Genes Cells 2001; Gonzalez-Robayna IJ., Mol Endocrinol 2000).

Controllo dell'attività enzimatica

In risposta a fattori di crescita del siero (Buse et al., 1999; Park et al., 1999), insulina (Kobayashi and Cohen, 1999; Park et al., 1999;

Perrotti et al., 2001), stress ossidativo (Kobayashi and Cohen, 1999; Park et al., 1999) e condizioni iperosmotiche (Bell et al., 2000), la fosforilazione e l'attività enzimatica della SGK-1 viene regolata come una componente a valle della cascata della fosfo-inositide 3-chinasi (PI3K), la quale attiva la protein chinasi-1 dipendente da fosfatidilinositolo (PDK1) (Kobayashi and Cohen, 1999; Park et al., 1999). La stimolazione dell'attività enzimatica di SGK è indotta da due eventi chiave di fosforilazione: uno sul residuo di treonina 256, nel loop di attivazione di SGK, l'altro sul residuo di serina 422, i quali subiscono una fosforilazione diretta rispettivamente sia da parte della PDK-1 che, presumibilmente, da parte della PDK-2 (Kobayashi and Cohen, 1999; Park et al., 1999).

I siti consenso dei substrati della SGK, identificati mediante l'analisi di una libreria peptidica, sono simili a quelli di Akt-1/PKB- α (Kobayashi and Cohen, 1999; Park et al., 1999). Recentemente è stato dimostrato che la SGK-1 fosforila in vitro la glicogeno sintasi chinasi-3 (GSK-3), Raf chinasi e il membro della famiglia forkhead FOXO 3a (FKHRL-1) (Kobayashi and Cohen, 1999; Brunet et al., 2001; Zhang et al., 2001), molecole bersaglio della proteina Akt-1/PKB- α .

Controllo della localizzazione cellulare

La distribuzione subcellulare della SGK-1 è regolata tra nucleo e citoplasma, in cellule epiteliali mammarie e in cellule dell'ovaio in modo stimolo dipendente (Buse et al., 1999; Gonzalez-Robayna et al., 1999; Alliston et al., 2000; Bell et al., 2000).

Nelle cellule di tumore epiteliale mammario stimulate da siero, la SGK-1 viene trasportata nel nucleo o nel citoplasma in sincronia con la fase del ciclo cellulare: la proteina è prevalentemente citoplasmatica in

fase G1 e nucleare durante le fasi S e G2/M del ciclo cellulare (Buse et al., 1999). Il trattamento con i glucocorticoidi, che provoca un arresto del ciclo cellulare in G1 (Buse et al., 1999), o l'esposizione a stress iperosmotico (Bell et al., 2000) determinano una localizzazione strettamente citoplasmatica di SGK.

Nell'ovaio, in seguito a trattamento con ormone follicolo stimolante (FSH), SGK risiede nel nucleo delle cellule proliferanti della granulosa, mentre nelle cellule luteali terminalmente differenziate, essa localizza nel compartimento citoplasmatico (Gonzalez-Robayna et al., 1999; Alliston et al., 2000).

Inoltre, studi di localizzazione subcellulare di SGK1 hanno dato risultati controversi. In cellule del dotto collettore di rene di coniglio che esprimevano transientemente un costrutto codificante per SGK1-AFP (proteina autofluorescente) e che erano marcate per i vari compartimenti subcellulari, la proteina SGK1-AFP colocalizzava con il marcatore del mitocondrio, la DHR 123. Inoltre, per determinare quale regione della sequenza aminoacidica fosse responsabile della localizzazione subcellulare, sono state generate linee mutanti stabili: dallo studio è emerso che la regione dei primi 60 aminoacidi all'N terminale di SGK1 è necessaria e sufficiente per la sua localizzazione subcellulare. La localizzazione di SGK1 nel mitocondrio rafforza l'idea che la SGK-1 possa giocare un ruolo nella regolazione del metabolismo energetico.

Questi dati indicano che la regolazione spazio-temporale della SGK-1 è vitale per la crescita e il differenziamento; ciò evidenzia l'esistenza di meccanismi regolatori specifici per la localizzazione di SGK nei distinti compartimenti cellulari (Cordas E, 2007).

Degradazione della SGK-1

SGK1 possiede una emivita di circa 30 minuti. Questa proteina viene degradata da parte del proteasoma 26S in seguito ad ubiquitinazione (Brickley DR, 2002). La degradazione potrebbe essere mediata dall'ubiquitina ligasi Nedd4.2 (Zhou R and Snyder PM, 2005). Quest'ultima contiene una serie di sequenze ricche in triptofano che interagiscono con il motivo di prolina-tirosina presentato dalle proteine target. La sovraespressione di Nedd4-2 incrementa l'ubiquitinazione della SGK-1 in maniera dose dipendente, incrementando probabilmente la sua ubiquitinazione (presumibilmente entro i primi 60 aminoacidi all'N terminale), e la sua degradazione da parte del proteasoma. Al contrario, il silenziamento di Nedd4-2 mediante RNA interference o la mancanza dell'N terminale di SGK, non permette l'ubiquitinazione della proteina provocando un aumento dell'emivita della stessa.

Ruolo della SGK-1 nella regolazione delle funzioni molecolare e cellulare

La sequenza consenso della SGK-1 è del tipo R-X-R-XX-(S/T)-Φ, in cui X rappresenta un aminoacido qualsiasi, R arginina e Φ indica un aminoacido idrofobico. Essa rappresenta la sequenza consenso comune ad Akt-1 e alle altre chinasi della classe delle SGK, la SGK-2 e SGK-3. La SGK-1 modifica una varietà di funzioni cellulari virtualmente in ogni organo mediante la fosforilazione diretta di molecole effettrici o regolatrici.

Canali del sodio

La SGK-1 è stata identificata come un gene regolato dai mineralocorticoidi, ed è in grado di stimolare il trasporto di sodio attraverso i canali del sodio (ENaC). L'aldosterone stimola il

riassorbimento di Na^+ attraverso l'epitelio localizzato nella regione distale di organi escretori come i reni, il colon e le ghiandole salivari ed è stato trovato che la coespressione della SGK-1 e delle proteine dei canali del sodio incrementa il numero di canali attivi sulla superficie della cellula degli ovociti di *X. Laevis* (Loffing J. et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001). L'mRNA della SGK-1 è rapidamente incrementato in risposta ai mineralocorticoidi in cellule A6 (cellule renali di rana) e nei dotti collettori di rene di ratto, così come in colture primarie di dotti collettori di coniglio ed una varietà di altre cellule. L'attività della PI3K potrebbe essere richiesta per l'attivazione dei canali del sodio SGK-dipendente così come per il trasporto di sodio stimolato dai mineralocorticoidi.

specifici (Ser221, Thr246 e Ser327). La Nedd4-2 fosforilata non è più in grado di legarsi ad ENaC e quindi di ubiquitarlo (figura 12)(Naray-Fejes-Toth et al, Mol Cell Endo 2004; Snyder PM et al. JBC 2002). La SGK-1 può, quindi, regolare la volemia ed una sua modificazione può essere responsabile di fenomeni di ipovolemia. Tuttavia topi knockout per SGK-1, che assumono una dieta a concentrazioni standard di sale non manifestano alcun sintomo; invece, in condizioni di dieta a basso contenuto di sale, questi topi sono ipotesi, dal momento che non sono in grado di riassorbire il sodio in modo adeguato. (Zhou and Snyder, JC 2005)

Proliferaazione cellulare e apoptosi

È stato dimostrato che SGK1 promuove la sopravvivenza cellulare. L'effetto antiapoptotico le è stato attribuito dalla sua capacità di fosforilare i fattori di trascrizione della famiglia forkhead, come FKRHL1.

L'attivazione di SGK1 in cellule cerebrali cancerose inibisce l'apoptosi, poiché essa esercita i suoi effetti modulando NFkB. Infatti, il dominante negativo di IKK β annulla l'effetto antiapoptotico della SGK-1. SGK1 impedisce a Akt-1/PKB- α di fosforilare Bax, prevenendo l'entrata nel mitocondrio di questo importante fattore proapoptotico nel mitocondrio (figura 13)(Tsuruta F, J Biol Chem 2002).

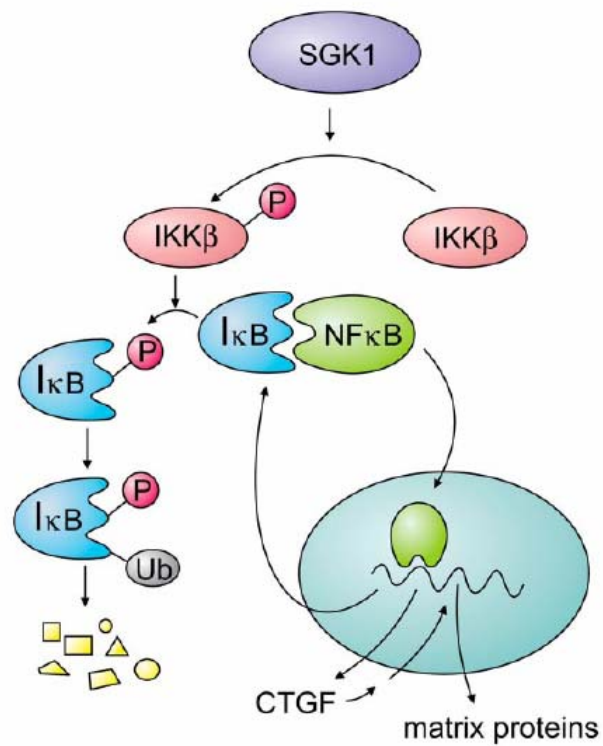


Figura 13: Ruolo della SGK-1 nel controllo della regolazione genica dipendente dal fattore NFκB. La SGK-1 fosforila ed attiva IKKβ, la quale successivamente fosforila IκB, l'inibitore di NFκB. La fosforilazione di IκB provoca la dissociazione di IκB dal complesso IκB-NFκB inattivo. IκB fosforilato viene successivamente ubiquitinato e degradato, mentre NFκB entra nel nucleo per regolare i geni target. I geni che si trovano sotto il controllo di NFκB comprendono il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), un importante stimolatore della sintesi delle proteine di matrice (F. Lang, *Physiol Rev* 86: 1151–1178, 2006).

L' ENDOTELIO

L'endotelio è un tessuto di rivestimento, di tipo pavimentoso semplice, derivante dal mesoderma embrionale, che riveste la superficie interna dei vasi sanguigni e del cuore (endocardio). Le cellule endoteliali, che lo compongono, sono piatte, poligonali e allungate secondo la direzione del flusso. Le cellule endoteliali contengono relativamente pochi organelli intracellulari (Golgi, mitocondri, reticolo endoplasmatico e ribosomi liberi), numerose vescicole pinocitotiche, per il trasporto di sostanze attraverso l'endotelio. L'endotelio forma il rivestimento interno di tutte le arterie e vene, nonché costituisce la parete dei capillari. Considerato in passato come un semplice rivestimento dei vasi, attualmente l'endotelio viene visto come un vero e proprio organo, capace di elaborare una vastissima quantità di sostanze attive, in grado di modulare l'attività sia delle varie strutture della parete vasale da esso rivestite, sia delle cellule ematiche e delle proteine del sistema coagulativo, che vengono in contatto con la sua superficie luminale. Parte di queste sostanze sono secrete dalle cellule endoteliali nelle immediate vicinanze (secrezione paracrina), per esercitare i loro effetti sulla parete vasale, o sono immesse nella circolazione (secrezione endocrina) per svolgere la loro azione a distanza, come nel caso delle sostanze che concorrono al controllo della pressione arteriosa (es. ossido di azoto e endotelina) (Praticò D. Atherosclerosis 2005). Altre molecole prodotte dall'endotelio esplicano la loro azione rimanendo legate alla superficie delle cellule endoteliali, come accade per le molecole di adesione per i leucociti o per quelle che influenzano la coagulazione.

L'endotelio modula il tono vasale e la stessa struttura vasale,

rivestendo un ruolo di primissimo piano nel rimodellamento, che si osserva nell'ipertensione e nella aterosclerosi.

Quando viene compromessa la capacità delle cellule endoteliali di elaborare le sostanze che vengono prodotte in condizioni fisiologiche si parla di disfunzione endoteliale. Essa è caratterizzata dalla compromissione dell'attività endocrino-paracrina dell'endotelio, con secrezione di sostanze biologicamente attive (citochine, fattori di crescita, radicali liberi, ecc.), che sono responsabili dell'attivazione dei leucociti e del controllo del tono vasale. Sebbene la disfunzione riguardi tutte le funzioni endoteliali, clinicamente la disfunzione endoteliale viene valutata principalmente come compromissione della vasodilatazione endotelio-dipendente a livello del circolo coronarico o di quello brachiale. L'endotelio, essendo da un lato bersaglio dei segnali meccanici, generati dal flusso ematico, e dei segnali neuro-ormonali e dall'altro fonte di mediatori vasoattivi, svolge un ruolo fondamentale nel controllo della funzionalità delle arterie e del microcircolo. Infatti, le forze meccaniche principali esercitate dal flusso ematico sulla parete vasale sono due: stress da attrito o shear stress e stress tensivo. Lo shear stress è prodotto dall'attrito del flusso laminare sull'endotelio e interessa esclusivamente le cellule endoteliali, mentre lo stress tensivo è prodotto dalla pressione idrostatica all'interno del vaso e interessa l'intera parete vasale (endotelio, fibroblasti, cellule muscolari lisce). Lo shear stress attiva le cellule endoteliali e promuove la liberazione di mediatori vasodilatatori, mentre lo stress tensivo stimola direttamente le cellule muscolari lisce, inducendone la contrazione, e produce lo stiramento delle cellule endoteliali. L'effetto netto sul tono vasale è il risultato della interazione tra la contrazione miogena indotta dalla pressione e la dilatazione endotelio-dipendente indotta dal flusso.

In condizioni patologiche l'endotelio cambia le sue caratteristiche diventando suscettibile al danno (infiammazione e trombosi), perdendo il controllo della permeabilità vascolare, modificando l'adesività alla parete dei leucociti circolanti (primo segno della formazione della placca aterosclerotica) e, in ultimo, favorendo la vasocostrizione. Dei mediatori vasoattivi secreti dall'endotelio, l'ossido di azoto (NO) è prodotto costitutivamente, anche se la sua sintesi è modulata da numerosi stimoli, mentre la prostaciclina (PGI₂), l'endotelina (ET) e il fattore attivante le piastrine (PAF) sono sintetizzati de novo in risposta a vari agonisti.

Numerose condizioni patologiche (aterosclerosi, ipercolesterolemia, diabete, fumo, ecc.) possono danneggiare l'endotelio e alterare la sua funzione nel controllo del tono vasale. La disfunzione endoteliale comporta la riduzione della vasodilatazione flusso-mediata e la ridotta vasodilatazione agli agonisti, che normalmente determinano vasodilatazione endotelio-dipendente, quali bradichinina, istamina, sostanza P e soprattutto acetilcolina. Questi mediatori inducono vasodilatazione attraverso la produzione endoteliale di NO. Esso è prodotto dal catabolismo della L-arginina per mezzo dell'enzima ossido nitrico sintasi (NOS), costitutivamente espresso dalle cellule endoteliali, ed è il più importante vasodilatatore.

L'acquisizione di un fenotipo endoteliale patologico nell'uomo si verifica prima della manifestazione clinica della malattia e si associa alla presenza dei fattori di rischio cardiovascolari tradizionali come l'ipercolesterolemia, l'ipertensione, il diabete mellito e ad altri fattori di rischio come l'obesità e le malattie sistemiche infiammatorie (artrite reumatoide etc.). La centralità dell'endotelio nella fisiopatologia di alcune fra le più importanti e diffuse patologie umane, quali la sindrome aterosclerosi vascolare, l'ipertensione arteriosa, il diabete e la disfunzione

erettile. In presenza di fattori di rischio il cambiamento delle caratteristiche del tessuto é definito "attivazione endoteliale" cui corrisponde una risposta funzionale diversa, se non assolutamente opposta, a quella dell'endotelio sano. E', quindi, molto importante considerare come la risposta endoteliale non solo cambi in relazione alla condizione in cui si trova l'endotelio, ma abbia anche componenti diverse nei differenti tessuti. Lo sviluppo della disfunzione endoteliale è caratterizzato da un'alterazione del tono vasale e dall'incremento della capacità "adesiva" della cellula endoteliale. Queste alterazioni sono comuni alle diverse patologie vascolari già citate (aterosclerosi, ipertensione e diabete) (Praticò D., 2005).

L'ATEROSCLEROSI

Patologia

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica delle arterie di grande e medio calibro caratterizzata dall'accumulo di lipidi ed elementi fibrosi. E' la causa principale della malattia ischemica cardiaca, causata da aterosclerosi coronarica e successivo evento trombo-embolico, e dell'ictus, le due maggiori cause di mortalità e morbilità che si riscontrano nei paesi sviluppati ed in via di sviluppo.

Le lesioni precoci dell'aterosclerosi consistono in accumuli subendoteliali di macrofagi ripieni di colesterolo chiamati "cellule schiumose". Così lesioni "fatty streak" sono precursori di lesioni aterosclerotiche avanzate caratterizzate dall'accumulo di detriti necrotici ricchi di lipidi e cellule muscolari lisce. Le placche ateromatose possono diventare complesse arrivando alla calcificazione, all'ulcerazione della superficie luminale, e ad emorragie dai piccoli vasi che crescono nelle lesioni della media del vaso sanguigno. Sebbene la crescita delle lesioni può diventare sufficientemente grande da bloccare il flusso sanguigno, la complicanza clinica più importante è l'occlusione acuta di un vaso sanguigno dovuta alla formazione di un trombo o di un coagulo di sangue, come avviene nell'infarto miocardico o nell'ictus. Di solito, la trombosi è associata alla rottura o all'erosione di una placca vulnerabile che presenta un sottile cappello fibroso (Aldons J. L., 2004).

Studi sperimentali su modelli animali e studi di patologia umana hanno elucidato gli eventi dell'aterosclerosi. Topi con delezione (knockout) del gene della apolipoproteina E o del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL) sviluppano lesioni aterosclerotiche

avanzate e rappresentano i modelli di studio più utilizzati. Il primo evento che si osserva è l'accumulo di particelle lipoproteiche e dei loro aggregati nell'intima, nei siti prediletti per la lesione. Successivamente, monociti e linfociti aderiscono alla superficie dell'endotelio e trasmigrano attraverso il monostrato di cellule endoteliali dell'intima. I monociti proliferano, si differenziano in macrofagi e una volta imbibiti di lipoproteine, formano le cellule schiumose, ripiene di colesterolo.

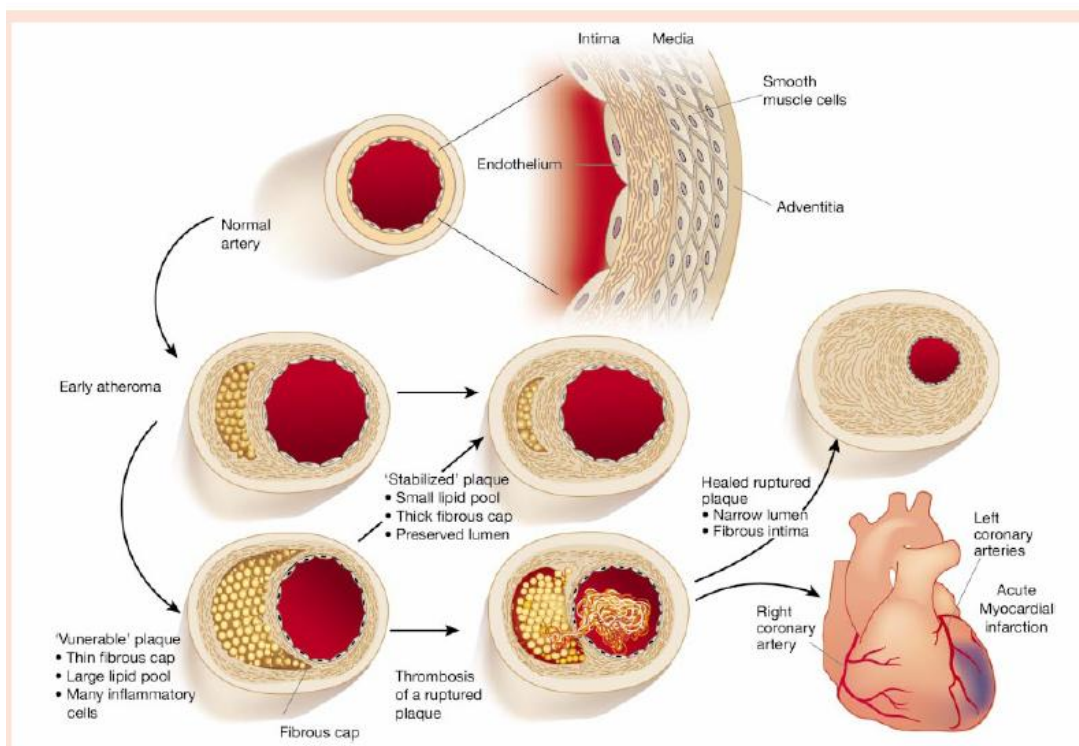


Figura 14 : Formazione dell'ateroma. (Peter Libby, Nature, 2002).

Con il tempo, queste cellule muoiono liberando il loro contenuto lipidico in un crescente core necrotico. Incrementando il volume delle lesioni, le cellule muscolari lisce migrano nell'intima dallo strato mediale e secernono collagene per formare un cappello fibroso. Inizialmente, tali lesioni ateromatose crescono fuori dell'avventizia, ma successivamente esse cominciano a crescere nel lume del vaso. Le lesioni continuano ad incrementare di volume mediante la migrazione di nuove cellule

mononucleate dal sangue, le quali entrano negli strati del vaso, accompagnati dall'accumulo di lipidi extracellulari ed elementi fibrosi. I fattori che provocano lo sviluppo di lesioni complesse ed avanzate, con la presenza di calcificazione e neovascolarizzazione, sono poco conosciuti. Fattori di particolare rilevanza clinica sono quelli che contribuiscono allo sviluppo di placche "vulnerabili", che si possono rompere e scatenare l'evento trombo-embolico (figura 14).

Nella reazione infiammatoria cronica dell'intima, un ruolo fondamentale è svolto dalla ossidazione e glicazione delle LDL, che restano intrappolate nella matrice extracellulare dello spazio subendoteliale. L'ossidazione delle LDL (ox-LDL) è dovuta sia alla presenza di enzimi e metaboliti ossidanti prodotti dalle cellule della parete arteriosa, soprattutto dai monociti-macrofagi reclutati nell'intima, che dal ridotto volume ed aumentata densità delle LDL che, nel processo fisiopatologico dell'aterosclerosi, sono piccole e dense. Le ox-LDL si accumulano nelle cellule che fagocitano macromolecole attive, causando l'accumulo intracellulare di esteri del colesterolo. Quest'ultimo è responsabile della trasformazione in cellule schiumose.

Dalla letteratura è nota la presenza di cellule vascolari senescenti in lesioni aterosclerotiche, le quali esprimono aumentati livelli di molecole pro-infiammatorie e diminuiti livelli dell'enzima ossido nitrico sintasi endoteliale, suggerendo che la senescenza cellulare in vivo contribuisce alla patogenesi dell'aterosclerosi nell'uomo. In particolare, vi è una ampia discussione sull'ipotesi della senescenza telomerica (Minamino, 2003). Infatti, vi sono numerose evidenze che indicano un ruolo critico dei telomeri nella senescenza vascolare e della senescenza cellulare negli organismi invecchiati o nelle malattie legate all'età, inclusa l'aterosclerosi.

È stato dimostrato che cellule EPC, derivate dal midollo osseo di giovani adulti, sono in grado di rimpiazzare la funzione angiogenica danneggiata dall'età (Edelberg JM, 2002). Il trattamento cronico con cellule EPC di topi giovani Apo-E deficienti non aterosclerotici, previene la progressione dell'aterosclerosi in topi Apo-E deficienti che ricevono queste cellule, nonostante una dieta ipercolesterolemica. Comunque, l'introduzione della telomerasi nelle EPC aumenta la durata della vita e l'efficacia della neovascolarizzazione in vivo (Murasawa S, 2002).

L'istologia delle lesioni aterosclerotiche umane ha rivelato che vi sono cellule EPC e VSMC con le caratteristiche morfologiche delle cellule senescenti (Burrig KF. 1991; Ross R, 1984). Ciò suggerisce l'esistenza della senescenza anche in vivo. Infatti, sono state ritrovate cellule vascolari SA- β -gal positive sia in placche aterosclerotiche di arterie coronarie ottenute da pazienti ischemici e sia sulla superficie luminale di placche aterosclerotiche, identificate come cellule endoteliali (Minamino T, 2002)..

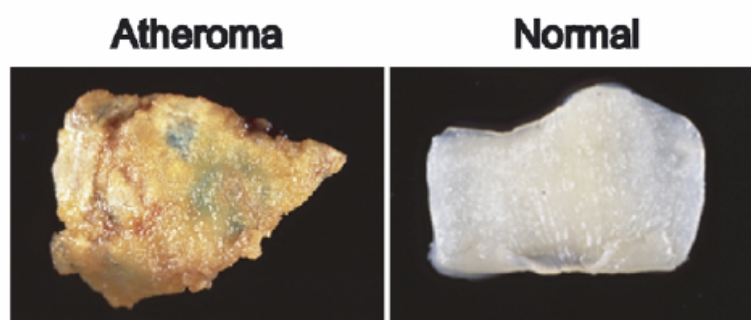


Figura 15: Colorazione per la SA β -gal su cellule vascolari senescenti nell'ateroma umano. Fotografie della superficie luminale dell'ateroma umano (a sinistra) e di un'arteria normale non aterosclerotica (a destra) colorate con la colorazione per la SA β -gal. L'attività per la SA β -gal è stata osservata nell'ateroma umano ma non in arterie normali (colorazione azzurra) (Minamino T., 2003).

Comunque, placche ad uno stadio avanzato presentano cellule VSMC SA- β -gal positive nell'intima ma non nella media: ciò potrebbe

rappresentare un aumento della divisione cellulare nelle lesioni aterosclerotiche, come osservato nelle arterie soggette a doppia denudazione (figura 15).

Dalla letteratura, è noto che cellule SA β -gal positive nell'ateroma umano presentano un aumento dell'espressione di p53 e p16, marcatori alternativi della senescenza, una diminuita espressione e una mancata funzione di eNOS ed una aumentata espressione di molecole pro-infiammatorie, suggerendo un'ulteriore evidenza della senescenza in vivo (Minamino T., 2003). Così, la senescenza cellulare in vivo potrebbe contribuire alla patogenesi dell'invecchiamento vascolare.

Ruolo della senescenza cellulare nella patofisiologia vascolare

I cambiamenti associati all'invecchiamento nei vasi sanguigni comprendono il restringimento del lume del vaso ed un aumento della risposta infiammatoria che promuove aterogenesi (Marin J., 1995). È stato trovato che con l'invecchiamento diminuiscono l'angiogenesi (Rivard A, 1999 ; Rivard A, 2000) e le proprietà antitrombogeniche dell'endotelio (Schneiderman J, 1992). Nelle cellule endoteliali umane senescenti, la produzione di ossido nitrico e l'attività dell'enzima ossido nitrico sintasi sono ridotte (Sato I, 1993). L'induzione della produzione dell'ossido nitrico mediante stress da attrito diminuisce anche nelle cellule endoteliali senescenti (Matsushita H, 2001). Un declino nell'attività di eNOS nelle EC senescenti è attribuibile a una minore espressione della proteina eNOS, così come una minor fosforilazione mediata da Akt (Hoffmann J, 2001). Nelle cellule endoteliali senescenti aumenta anche l'interazione tra monociti e cellule endoteliali, promuovendo aterogenesi (Maier JA, 1993). Ciò sembra essere mediato dalla sovraregolazione di molecole di adesione e citochine

proinfiammatorie, così come una diminuita produzione di NO in cellule endoteliali senescenti.

Infine, nello stato senescente delle cellule endoteliali è stata osservata anche la diminuzione della capacità delle cellule di formare strutture capillari in vitro (Yang J, 1999). Cellule progenitrici endoteliali circolanti derivate dal midollo osseo partecipano alla neovascolarizzazione postnatale e alla riparazione vascolare. La proprietà di crescere in vitro delle EPC, derivate dal midollo osseo, e la loro funzionalità vengono danneggiate in pazienti con malattia arterio-coronarica e correlano negativamente con fattori di rischio inclusi l'età (Hill JM, 2003; Vasa M, 2001). Così, l'invecchiamento potrebbe promuovere la senescenza delle EPC e delle EC, rallentando l'angiogenesi.

MATERIALI E METODI

MODELLO SPERIMENTALE

Per gli esperimenti in vitro sono state utilizzate cellule endoteliali umane di cordone ombelicale (HUVEC) commerciali (LONZA), cresciute in terreno EGM2-MV (LONZA) (EBM-2 + hEGF, h-FGF-B, VEGF, Acido Ascorbico, idrocortisone, R3-IGF-1, Eparina, FBS 5%, Gentamicina). Le cellule sono state contate ad ogni passaggio e il calcolo del numero dei PD (raddoppi di popolazione) è stato fatto mediante la seguente formula:

$$PDL = (\log_{10}F - \log_{10}I) / \log_{10}(2)$$

nella quale F rappresenta il numero finale e I il numero iniziale di cellule (Haendeler, Circ Res, 2003). Il PDL (livello dei raddoppiamenti di popolazione) risulta dalla somma dei singoli PD.

Per l'infezione sono state utilizzate cellule Amphopack (BD) fatte crescere in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, INVITROGEN glucosio 4,5g/l). Le cellule vengono tenute in coltura a 37°C in atmosfera contenente 98% di H₂O e il 5% di CO₂. Ogni 48-72h le cellule vengono lavate con PBS 1X a pH 7,4 (KH₂PO₄ 1.7mM, Na₂HPO₄ 5mM, NaCl 150mM, KCl 2.7mM) tripsinizzate, centrifugate a 980 rpm e piastrate.

INFEZIONE CELLULARE (HUVEC)

L'infezione inizia con la trasfezione delle cellule impacchettatrici, cioè le cellule Amphopack (BD). Questa trasfezione viene fatta con il metodo FUGENE (Roche). Il primo giorno vengono piastrate le cellule impacchettatrici Amphopack in piastre P100. Il giorno seguente vengono trasfettate al 50% di confluenza con il FUGENE con i seguenti costrutti: HA-pLPCX (Clontech); HA-SGK WT; HA-SGK Δ 60, gentilmente concessi dalla Dr.ssa Suzanne Conzen del Dipartimento di Medicina, sezione di Ematologia/Oncologia dell'Università di Chicago. Il costrutto HA-SGK Δ 60 rispetto ad HA-SGK WT ha 60 aminoacidi della regione amino-terminale in meno. Questa è la regione deputata all'ancoraggio di SGK sulla membrana plasmatica.

40 μ l di FUGENE (4 μ l di FUGENE ogni μ g di DNA) vengono risospesi in 700 μ l di terreno senza siero e lasciati a temperatura ambiente per 5 minuti. Trascorso questo tempo al terreno con il FUGENE vengono aggiunti 10 μ g di DNA e viene lasciato per 15 minuti a temperatura ambiente. Infine la soluzione con il DNA viene aggiunta alle piastre di Amphopack. Dopo 24 ore viene cambiato il terreno alle cellule trasfettate. Il giorno seguente viene preparato il polibrene (8 mg/ml) in terreno completo e filtrato con filtri da 0,22 μ m. Il terreno delle Amphopack trasfettate viene filtrato con filtri da 0,45 μ m per togliere eventuali cellule morte e viene messo nelle piastre delle cellule HUVEC, al 50% di confluenza, piastrate il giorno precedente. Il terreno di una piastra di Amphopack (10ml) viene utilizzato per una piastra di HUVEC (P100). Viene poi aggiunto il polibrene (8 mg/ml) alle piastre di HUVEC infettate per evitare la repulsione elettrostatica tra il capsido del virus e la membrana plasmatica delle cellule, mentre alle piastre di Amphopack viene aggiunto terreno fresco. Dopo 5 ore di infezione viene cambiato il

terreno infettato delle HUVEC con terreno fresco (EGM-2MV). Il giorno seguente viene effettuato lo stesso procedimento di infezione, senza tuttavia recuperare le Amphopack le quali dopo 48h non sono più in grado di produrre il virus. Le HUVEC dopo 72h dall'ultima infezione vengono amplificate e fatte crescere in EGM-2MV con l'aggiunta di puromicina (0,5 µg/ml), per selezionare le cellule infettate.

ANALISI CITOFLUORIMETRICA

L'analisi citofluorimetria al FACS Calibur (Becton Dickinson) è stata utilizzata per la misurazione dei livelli di ROS prodotti da cellule vive. Le cellule HUVEC coltivate nelle condizioni suddette, sono state lavate due volte con PBS 1X, staccate con tripsina, in seguito risospese in terreno EBM-2 senza siero e senza fattori di crescita, nel quale è stata diluita la sonda fluorescente diidrorodamina (DHR 123, Molecular Probes) alla concentrazione di 50 µM. In seguito, le cellule sono state incubate al buio 10 minuti a 37°C, lavate due volte in PBS 1X e risospese in PBS con ioduro di propidio (50 µg/ml, SIGMA) per la lettura al FACS. Ciascuna lettura è stata eseguita in doppio, e per ciascun campione analizzato sono state prese in considerazione $1 \cdot 10^5$ eventi. L'analisi è stata eseguita solo su cellule vive eliminando le cellule morte che hanno inglobato lo ioduro di propidio. Gli spettri vengono analizzati mediante il programma CellQuest (Becton Dickinson).

STIMOLI UTILIZZATI

Per l'analisi della produzione dei ROS nelle diverse linee cellulari infettate le cellule sono state piastrate in multiwell da sei in terreno completo EGM2-MV (LONZA) e, il giorno seguente sono state stavate per 4 ore in terreno EBM-2+BSA 0,1%. Poi è stata aggiunta la glucosammina 10mM per 72 ore al termine delle quali è stata seguita la procedura precedentemente descritta per la lettura al FACS dei ROS.

COLORAZIONE PER LA SA- β -GAL

Le cellule cresciute su piastra vengono lavate tre volte in PBS 1X e fissate in paraformaldeide al 4% per 3 minuti. Vengono lavate altre tre volte in PBS 1X e viene aggiunta la soluzione per la colorazione contenente il substrato per la β -galattosidasi alla concentrazione finale di 1 mg/ml. 1 mg di 5-bromo-4-cloro-3-indolil P3-D-galattoside (X-Gal) per ml (stock = 20 mg of dimetilformamide per ml); 40 mM acido citrico/sodio fosfato, pH 6.0; 5 mM ferrocianide di potassio; 5 mM ferricianide di potassio; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂. Dopo 24 ore a 37°C si osservano le cellule al microscopio ottico; vengono considerate positive le cellule che presentano una colorazione azzurra. Sono state contate le cellule positive su un totale di 1000 cellule per piastra P100.

ESTRAZIONE PROTEINE NUCLEARI E CITOPLASMATICHE

Le cellule cresciute su piastra sono lavate due volte in PBS 1X, e viene aggiunta la soluzione L (Tris HCl 10 mM pH 7,5- NaCl 10 mM- MgCl₂ 3 mM- PMSF 10 mM- cocktail di inibitori di proteasi 1X, Roche- NP40 0,5%). In seguito si centrifuga il campione a 1000 rpm per 5 minuti a 4°C e si conserva il supernatante che contiene le proteine citoplasmatiche. Il pellet viene risospeso in saccarosio 0,3 M sciolto in RSB (Tris HCl 10 mM pH 7,5- NaCl 10 mM- MgCl₂ 3 mM). Il pellet così risospeso viene caricato su una soluzione di saccarosio 0,6 M sciolto in RSB, e centrifugato a 4000 rpm per 10 minuti a 4°C. Tale procedimento viene ripetuto due volte, e il pellet finale viene risospeso in soluzione B (Tris HCl 20 mM pH 7,5- NaCl 420 mM- MgCl₂ 1,5 mM- EDTA 1 mM- EGTA 1 mM- glicerolo 20%). Si congela il tutto a -20°C e per 45 minuti si rompono i nuclei con un ago, congelando e scongelando in ghiaccio. Infine, si centrifuga a velocità massima per 10 minuti a 4°C e si conserva il supernatante che contiene le proteine nucleari.

IMMUNOPRECIPITAZIONE

Le cellule vengono lavate in PBS 1X e lisate a 4°C in lysis buffer ipotonico a pH 7.2 (EDTA 5mM, Tris-HCl pH 7.6 50mM, Triton 1%, Na₃VO₄ 2mM, NaF 100mM, NaPP 5mM, PMSF 1mM, inibitori di proteasi 1X-Roche). Il prodotto di lisi cellulare è lasciato in ghiaccio per 30 minuti e centrifugate a 14000g per 20 minuti a 4°C. Viene quindi preso il sovrinatante e quantificato allo spettrofotometro a 495 nm con il saggio Bradford. 1 mg di proteine viene portato a volume finale di 500 µl con il buffer di immunoprecipitazione (150 mM NaCl- Tris HCl pH 7,5 10 mM- NP40 1%- Na₃VO₄ 1 mM- PMSF 1 mM) aggiunto dell'anticorpo anti-SGK1 1:100 (Upstate). Si lascia a girare su una ruota a 4°C per una notte; poi si aggiungono 100 µl di proteina A (Amersham), e si lascia girare su una ruota a 4°C per 2 ore. In seguito, si centrifuga per un minuto a 10000 G a 4°C, si fanno tre lavaggi del precipitato con 1 ml di PBS contenente Na₃VO₄ 1 mM e PMSF 1 mM. Si aggiunge il tampone di caricamento 2X, si bolle per 5 minuti, si centrifuga a 10000 G per 10 minuti e si carica il supernatante su un SDS-PAGE al 10%.

WESTERN BLOT

Le cellule vengono lavate in PBS 1X e lisate a 4°C in lysis buffer ipotonico a pH 7.2 (EDTA 5mM, Tris-HCl pH 7.6 50mM, Triton 1%, sodio ortovanadato 2 mM, sodio fluoruro 100mM, sodio pirofosfato 5mM, PMSF 1mM, tablet complete Roche). Vengono poi lasciate in ghiaccio per 30 minuti e centrifugate a 14000g per 20 minuti a 4°C. Viene quindi preso il sovranatante e quantificato allo spettrofotometro a 495 nm con il saggio Bradford. I lisati proteici (100µg) vengono poi caricati su gel SDS-PAGE al 10% e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. La membrana viene bloccata in TBS-T 0.1% (Tris 0.2 M, NaCl 1.5 M, Tween 20 0.1%) e latte al 5% per due ore a temperatura ambiente e successivamente viene incubata a 4°C o.n. con l'anticorpo primario. Il giorno seguente la membrana viene incubata con l'anticorpo secondario (un'ora a temperatura ambiente) ed il segnale viene rilevato con il sistema ECL (Amersham).

Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti:

anti-SGK1 tot (50kDa), UPSTATE 1:1000 in latte 5%

anti- α tubulina (55kDa), SIGMA 1:5000 in latte 5%

anti-hTERT (127 kDa), Abcam 1:1000 in TBST+BSA 1%

anti-P53 (53 kDa), Abcam 1:1000 in latte 5%

anti-NFkB (65 kDa), Abcam 1:1000 in latte 5%

anti-topoisomerasi I (100kDa), Santa Cruz 1:500 in latte 5%

anti ciclina A (60 kDa), Santa Cruz 1:1000 in latte 5%

anti ciclina D1 (35 kDa), Santa Cruz 1:1000 in latte 5%

anti p21 (21 kDa), Santa Cruz 1:1000 in latte 5%.

OXYBLOT

L'ossidazione delle proteine causata dai radicali liberi dell'ossigeno e da altre specie reattive provoca l'introduzione di gruppi carbonili nelle catene laterali delle proteine mediante un meccanismo sito-specifico. L'OxyBlot™ Kit (Protein Oxidation Detection Kit, Chemicon) permette di individuare questi gruppi carbonili che rappresentano un buon indice dello stato di ossidazione delle proteine. I gruppi carbonili delle catene laterali vengono derivatizzati mediante la reazione con il 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH). I campioni proteici derivatizzati sono poi separati su un SDS-PAGE al 10% seguito da un Western blot. In seguito, il filtro viene incubato con un anticorpo primario anti-DNP, poi con un secondario che riconosce il primario e che è coniugato con la perossidasi. Il filtro viene quindi trattato con un reagente chemiluminescente, il luminolo, il quale emette luce ad una lunghezza d'onda di 428 nm (GE HealthCare).

IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule HUVEC sono messe in coltura su dei vetrini coprioggetto. Raggiunta la confluenza desiderata si fanno due lavaggi con PBS e si aggiunge la paraformaldeide al 4% per 20 minuti al buio. In seguito si fanno altri due lavaggi con PBS e uno con acqua e si aggiunge il PBS-triton 0,1% per 5 minuti a temperatura ambiente. Si fanno altri tre lavaggi con PBS da 5 minuti e si blocca il vetrino mettendolo con PBS-T 0,1% + BSA 2% per un'ora a temperatura ambiente. Si fanno rapidi lavaggi con PBS-T e si incuba per una notte a 4°C con l'anticorpo primario d'interesse. Si fanno tre lavaggi con PBS-T e si incuba per 45 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario ed HOECST 33342 al buio. Poi si fanno un lavaggio rapido e tre da 8 minuti con PBS-T e si montano i vetrini su un vetrino portaoggetto con glicerolo/PBS 3:1. Una volta asciutta la preparazione, si osserva al microscopio confocale mediante l'uso di laser adatti alle lunghezze d'onda di emissione degli anticorpi secondari utilizzati. Sono stati adoperati i seguenti anticorpi: anti h-TERT 1:1500 (Abcam); anti SGK-1 1,5:100 (Cell Signaling). Per marcare il DNA è stato utilizzato HOECST 33342 1:500 (Invitrogen).

TRAP ASSAY ELISA

Il saggio TRAP ELISA permette di quantificare l'attività relativa dell'enzima telomerasi. Il saggio TRAP può essere diviso in due passaggi: 1) allungamento/ amplificazione; 2) rivelazione tramite ELISA.

Nel primo passaggio la telomerasi del campione aggiunge le ripetizioni (TTAGGG) al 3' finale di un primer sintetico P1-TS marcato con la biotina. I prodotti di allungamento ottenuti, così come lo standard interno (IS) incluso nello stesso tubo di reazione, sono amplificati tramite PCR utilizzando il primer P1-TS ed il primer ancora P2. I prodotti di PCR, derivati nel primo passaggio dai prodotti dell'allungamento dato dalla telomerasi, contengono incrementi di 6 nucleotidi telomerasi-specifici, mentre lo standard interno IS genera un prodotto di PCR di 216 pb (figura 1 A).

Nel secondo passaggio i prodotti di PCR sono separati in due aliquote, denaturati ed ibridizzati separatamente a sonde marcate con la digossigenina, specifiche per le ripetizioni telomeriche P3-T e per lo standard interno (IS)(P3-Std), rispettivamente. I prodotti sono immobilizzati mediante la biotina ad una piastra coniugata con la streptavidina. Gli ampliconi immobilizzati sono quindi rivelati con un anticorpo anti-digossigenina coniugato ad una perossidasi (Anti-DIG-HRP) e con il relativo substrato della perossidasi TMB (Figura 1B).

Preparazione degli estratti cellulari

Si centrifugano $1 \cdot 10^5$ cellule a 3000 G per 5 minuti a 4°C. Si rimuove il supernatante e si fa un lavaggio in PBS 1X. Si risospende il pellet con 50 µl di tampone di lisi (soluzione 1) e si incuba in ghiaccio per 30 minuti. Si centrifuga il lisato a 16000 G per 20 minuti a 4 °C e si conserva il supernatante contenente proteine totali.

Reazione TRAP

Si prepara una master mix per i campioni e i templati di controllo. Per ciascun campione si mettono 25 µl di mix di reazione (soluzione 2) pronta del kit e 5 µl di interno standard (soluzione 3). Quindi in ciascun tubo di reazione si mettono 30 µl di master mix e si aggiungono: 1) 10 µg di proteine totali che devono corrispondere ad un volume di 1-3 µl per tubo; 2) per il controllo negativo del campione 10 µg di proteine totali trattate con il calore (85°C per 10 minuti); 3) per il controllo template mettere 1 µl di sol 4 o 5 e 1 µl di buffer di lisi in due tubi di reazione separati. Il volume finale di ciascuna reazione è di 50 µl.

Si esegue la PCR con le seguenti condizioni:

allungamento primer: 10-30 minuti a 25°C	
denaturazione: 30 sec a 94°C	} 30 cicli
annealing: 30 sec a 50°C	
polimerizzazione: 90 sec a 72°C	
10 minuti a 72°C.	

Reazione di ibridazione ed ELISA

Per ciascun campione si mettono 10 µl di soluzione denaturante in due tubi separati, si aggiungono 2,5 µl di prodotto di PCR di ciascun campione e si incuba a 20°C per 10 minuti. Si aggiungono 100 µl di

tampone di ibridazione T in una vial e 100 µl di tampone di ibridazione S in un'altra. Per i controlli negativi si mette solo il tampone di ibridazione T. Si mettono i campioni ad ibridare per 2 ore su uno shaker a 37°C a 300 rpm, poi si trasferiscono 100 µl della mix di ibridazione in ciascun pozzetto della piastra dell'ELISA, si coprono i pozzetti con l'adesivo e si incuba per 1 ora a 37°C. In seguito si rimuove completamente la soluzione di ibridazione, si lava per 3 volte con 250 µl di tampone di lavaggio e si aggiungono 100 µl di anticorpo anti digossigenina coniugato alla perossidasi ad ogni pozzetto. Si incuba la piastra a 20°C per 30 minuti su una piastra rotante a 300 rpm. Poi si fanno 5 lavaggi con 250 µl di tampone di lavaggio e si aggiungono 100 µl di soluzione substrato TMB ad ogni pozzetto. Si incuba per 20 minuti a 20°C su una piastra rotante a 300 rpm e al termine si aggiungono 100 µl di reagente di stop in ciascun pozzetto. Infine si misura l'assorbanza dei campioni su un microplate reader a 450 nm entro 30 minuti dall'aggiunta dello stop reagent.

Metodo di rivelazione non radioattivo del ladder di DNA prodotto dall'attività della telomerasi

I prodotti dell'attività della telomerasi amplificati tramite PCR possono esser visualizzati mediante la seguente procedura. Si caricano 20 µl di prodotti di PCR con il tampone di caricamento (blu di bromofenolo 0,25%- xilene cianolo 0,25%- glicerolo 30%) su un PAGE al 12% non denaturante in TBE 1X (TBE 5X: 54 g Tris base; 27,5 g acido bórico; 20 ml EDTA 0,5 M pH 8,0) a 1-8 V/cm. Dopo l'elettroforesi si trasferiscono i prodotti di PCR dal gel ad una membrana di nylon carica positivamente (Roche), attivata in acqua bidistillata, mediante l'uso del vacuum blotting. Si utilizza NaOH 0,4 N come tampone di trasferimento e si lascia trasferire per 30 minuti. Poi si fa asciugare la membrana per 30

minuti a temperatura ambiente e si fissa il DNA sulla membrana esponendone il lato con il DNA agli UV per 3 minuti. In seguito, la membrana viene bloccata per 30 minuti con la soluzione bloccante (Roche) e si lascia per 30 minuti con la streptavidina coniugata all'alcalin fosfatasi (1mg/ml) (Roche) sciolta nella soluzione bloccante. Infine, si fanno due lavaggi da 15 minuti a temperatura ambiente nel buffer di lavaggio (Roche) e si rivela mediante il metodo della chemiluminescenza (Amersham).

SCOPO DEL LAVORO

È nota la centralità dell'endotelio nella fisiopatologia, di una fra le più importanti e diffuse patologie, quale la sindrome aterosclerotica caratterizzata da infarto del miocardio, ictus, e insufficienza vascolare degli arti inferiori. La senescenza precoce presente in differenti condizioni, fra cui il Diabete Mellito, ha un ruolo determinante nell'insorgenza precoce della sindrome stessa nel soggetto diabetico. Ciò è confermato e documentato da risultati sperimentali sia in vitro, che in vivo e nell'uomo.

In questo lavoro abbiamo studiato quale sia il ruolo svolto dalla proteina chinasi SGK-1 nell'invecchiamento delle cellule endoteliali. Questa proteina svolge un ruolo nella via di trasduzione del segnale per la sopravvivenza cellulare e la proliferazione (Webster et al., 1993b; Buse et al., 1999; Brunet et al., 2001; Mikosz et al., 2001; Xu et al., 2001). Per poter verificare un suo eventuale ruolo nell'invecchiamento delle cellule endoteliali, siamo partiti dalla produzione endogena dei ROS in condizioni basali in funzione del tempo. Infatti, dalla letteratura è noto che con l'invecchiamento, la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) aumenta, e con essa anche il danno ossidativo a proteine, lipidi ed acidi nucleici.

Inoltre, l'attività della telomerasi, la trascrittasi inversa che svolge un ruolo importante nella cellula, poiché la sua azione determina una sorta di funzione di "orologio biologico", diminuisce con l'aumentare del numero dei raddoppiamenti di popolazione. Quindi, per poter delineare un quadro completo sulla senescenza delle cellule endoteliali, abbiamo studiato l'attività della telomerasi in funzione del tempo e l'attività della β -galattosidasi associata alla senescenza. Quest'ultimo saggio, rappresenta un metodo considerato ormai fedele per valutare

qualitativamente e quantitativamente il processo di senescenza in svariati tipi cellulari.

RISULTATI

MORFOLOGIA E CURVA DI CRESCITA

In questo lavoro è stato analizzato il potenziale ruolo della SGK-1 nella protezione delle cellule endoteliali dall'invecchiamento. Come modello cellulare è stata utilizzata la linea di cellule endoteliali umane di cordone ombelicale (HUVEC). Dati di letteratura mostrano che la senescenza delle cellule vascolari umane è considerata uno dei fattori principali che contribuisce alla disfunzione vascolare associata all'età; infatti, sono state trovate *in vivo* cellule senescenti sulle lesioni aterosclerotiche (Minamino et al. 2002; Vasile et al. 2001). Inoltre, sono stati studiati modelli di senescenza *in vitro* utilizzando cellule endoteliali derivate da vene del cordone ombelicale umano (HUVEC) (Grillari, J., 2000).

In prima istanza abbiamo studiato la morfologia delle HUVEC, la quale risulta diversa tra il fenotipo giovane e quello senescente. Come si osserva dalla figura 16, il fenotipo senescente mostra maggiori dimensioni, aumento della granulosità e della vacuolizzazione e non è in grado di raggiungere la confluenza.

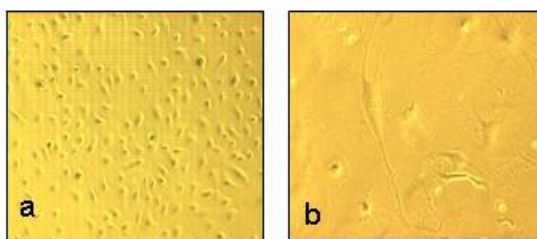


Figura 16: Morfologia delle cellule HUVEC. In (a) tipica morfologia di cellule HUVEC giovani a confluenza e in (b) HUVEC senescenti che presentano una diversa morfologia caratterizzata dall'incapacità di raggiungere la confluenza, maggiori dimensioni e aumento della granulosità.

Come si può osservare di seguito nel diagramma (figura 17), nel nostro sistema sperimentale le cellule infettate entrano nello stato d'arresto della crescita intorno al PDL 14, lasciando la fase di crescita esponenziale ed entrando in quella di plateau.

Le cellule sono state contate ad ogni passaggio e il numero dei PD (raddoppi di popolazione) è stato calcolato mediante la seguente formula:

$$PD = (\log_{10}F - \log_{10}I) / \log_{10}(2)$$

nella quale F rappresenta il numero finale e I il numero iniziale di cellule (Haendeler, Circ Res, 2003). Il livello dei raddoppiamenti di popolazione (PDL) è stato poi calcolato mediante la somma dei singoli PD.

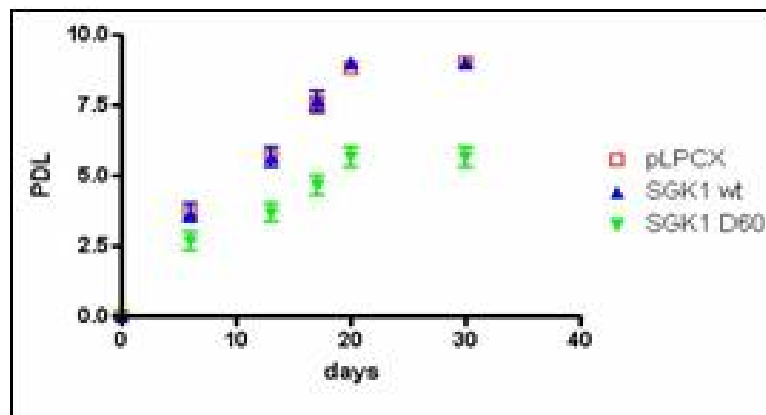


Figura 17: Curve di crescita delle linee cellulari di HUVEC infettate. Le cellule sono state coltivate in terreno EGM2-MV a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. La vitalità delle cellule è stata valutata mediante la colorazione con trypan blu.

In particolare, la curva di crescita mostra come il tasso di crescita per le cellule HUVEC infettate con SGK WT sia simile a quello che si ritrova per la linea cellulare di controllo pLPCX; lo stesso non si può dire per la linea infettata con SGK Δ60, la quale presenta un tasso di crescita inferiore alle altre due linee cellulari (figura).

ANALISI DELL' ESPRESSIONE DI PROTEINE CHE REGOLANO IL CICLO CELLULARE

La progressione del ciclo cellulare è controllata da un gruppo di chinasi dipendenti di cicline (cdk), enzimi eterodimerici che consistono di una subunità catalitica e una regolatrice, una specifica ciclina (Nigg, 1995). L'attività delle chinasi dipendenti da cicline viene controllata da proteine inibitrici, chiamate cki (inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti), che bloccano l'attività catalitica di specifiche cdk mediante interazione diretta (Peter, 1997). È stato dimostrato che l'espressione degli inibitori delle cicline, p21 e p16, viene aumentata nei fibroblasti senescenti, provocando l'inibizione delle chinasi dipendenti da cicline (Stein, 1995).

Per studiare lo stato del ciclo cellulare delle cellule HUVEC infettate del nostro sistema sperimentale, sono stati analizzati i livelli di espressione di diversi geni che controllano la progressione del ciclo cellulare e che vengono espressi in maniera dipendente dalla fase del ciclo cellulare (figura18). È noto che in cellule umane nella fase G1 del ciclo cellulare aumentano i livelli delle cicline D1 e E; cellule in fase S e G2/M presentano, invece, alti livelli di ciclina A (Lavia,1999), la quale è essenziale sia per entrare nella fase S sia nella transizione in G2/M (Pagano, 1992). I livelli delle proteine ciclina A, ciclina D1 e p21 sono stati analizzati mediante western blot (figg.19 e 20) e normalizzati con i livelli di α -tubulina di ciascun pozzetto di caricamento.

I nostri dati indicano che la ciclina A, necessaria ad entrare nella fase S del ciclo cellulare e nella fase di transizione G2/M, viene espressa ad uguali livelli nelle cellule infettate giovani, ma si osserva una

diminuzione nel livello di espressione nella linea SGK Δ 60 a PDL 9 e un aumento in SGK WT a PDL 14.

Invece la ciclina D1, che normalmente aumenta in fase G1, viene espressa a minor livelli in SGK Δ 60 ai vari PDL considerati: a PDL 6 essa viene espressa lievemente, per poi aumentare la sua espressione all'aumentare dei PDL. Nella linea SGK WT si nota un aumento dell'espressione della ciclina D1 a PDL 14, rispetto ai livelli riscontrati ai PDL piú bassi.

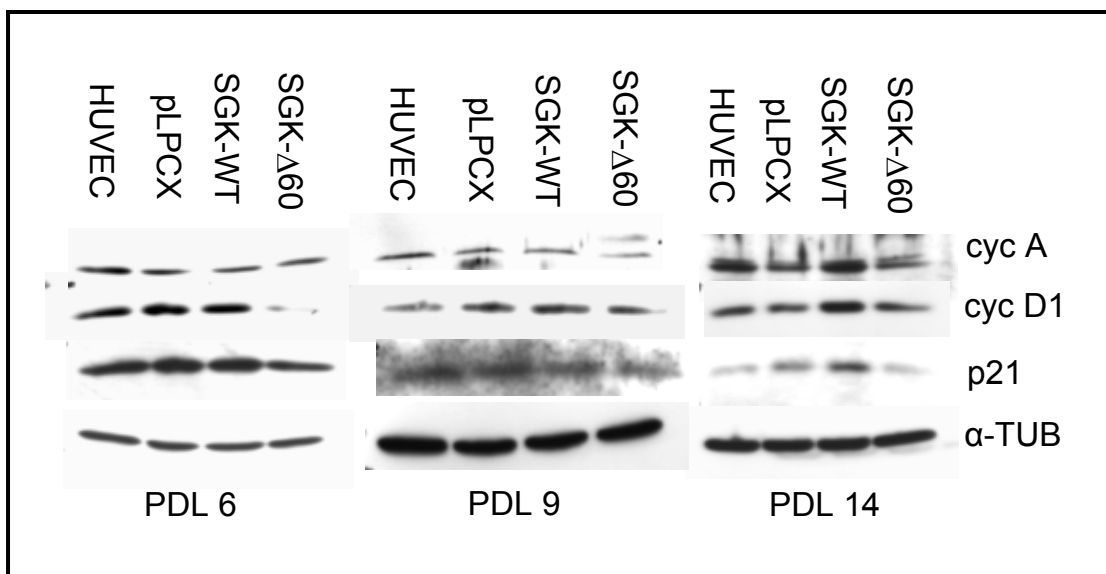


Figura 18 : Analisi western blot. Livelli di espressione di ciclina A, ciclina D1, p21 e α -tubulina nelle HUVEC non infettate e nelle linee cellulari di HUVEC infettate pLPCX, SGK WT e SGK Δ 60 a PDL 6, 9 e 14.

Infine, per l'inibitore delle cicline p21, che aumenta nei fibroblasti senescenti, i nostri dati indicano una diminuzione dei suoi livelli di espressione in SGK Δ 60 a tutti i PDL considerati, ed una maggiore espressione della proteina nella linea SGK WT a PDL 14 rispetto al controllo pLPCX.

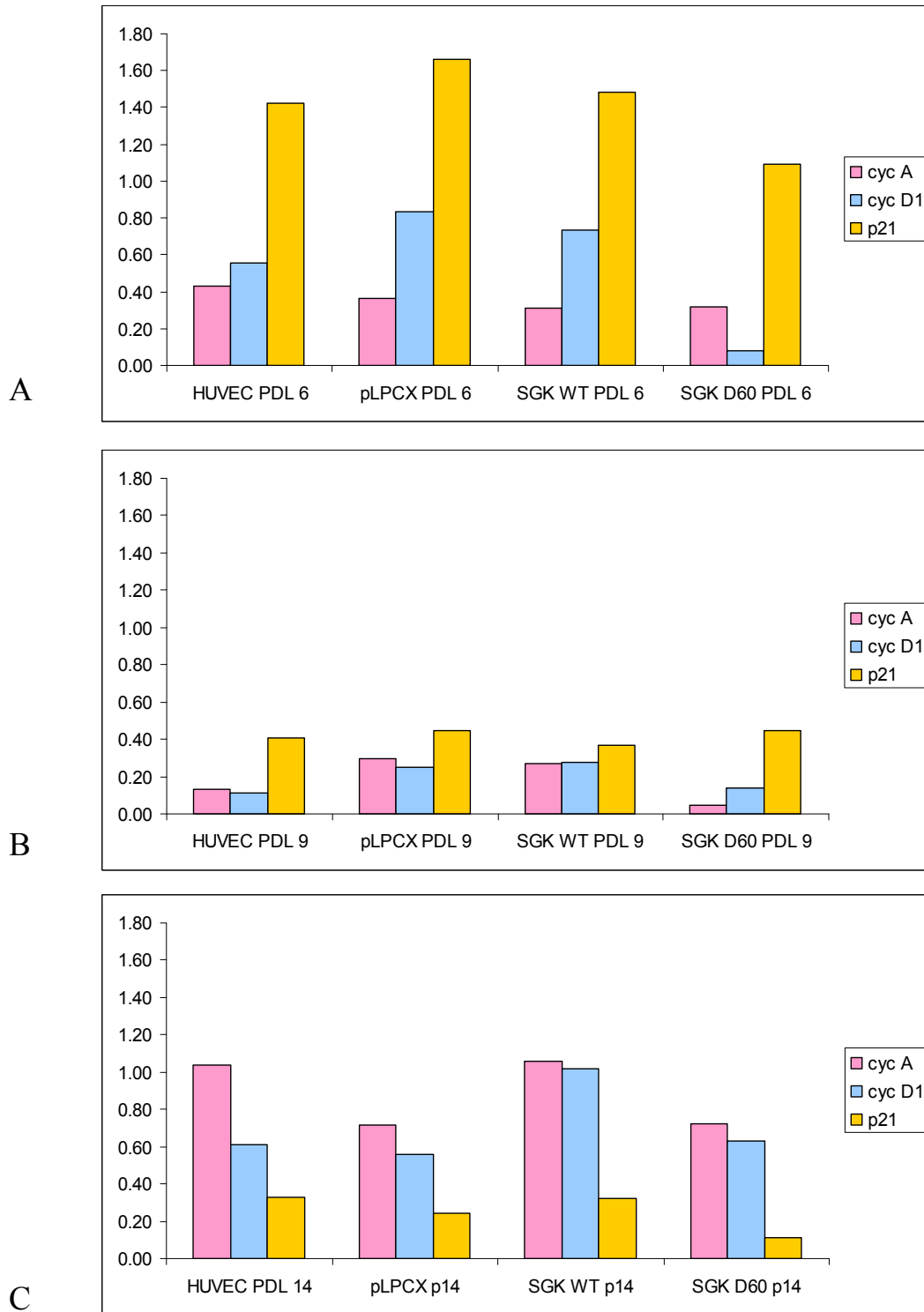


Figura 19: Grafici relativi ai livelli di espressione di ciclina A, ciclina D1 e p21. I valori ottenuti sono stati normalizzati con i livelli di espressione dell' α -tubulina a diversi PDL: 6 (A), 8 (B) e 14 (C).

ANALISI WESTERN BLOT SU ESTRATTI PROTEICI NUCLEARI E CITOPLASMATICI

NFkB è una proteina che nella sua forma inattiva è legata ad un inibitore specifico, Ikb α (Karin M, 2000). In risposta a danno al DNA, a citochine, o a fattori di crescita, Ikb α viene fosforilato, ubiquitinato e degradato mediante proteasoma, lasciando la proteina NFkB libera di entrare nel nucleo e di legare le regioni dei promotori di geni target specifici. Di recente è stato scoperto che anche la proteina SGK1 è in grado di attivare NFkB aumentando la capacità di IKK β di fosforilare Ikb α , causando la degradazione di Ikb α (Zhang L, 2005; F. Lang, 2006).

Inoltre è stata rivelata anche l'interazione tra NFkB e hTERT in cellule umane MM.1S (in seguito ad uno stimolo esogeno, il TNF α); tale interazione permette la traslocazione nucleare della telomerasi.

Nelle linee cellulari di HUVEC infettate del nostro sistema sperimentale, l'esperimento di western blot ha rivelato la localizzazione nucleare sia di hTERT sia di NFkB (figura 20).

La proteina p53 regola la crescita cellulare e protegge le cellule dalla trasformazione. In cellule normali questa proteina viene espressa a bassi livelli perché viene rapidamente degradata. Diverse situazioni di stress, come danno al DNA, ipossia, mancanza di fattori di crescita possono attivarla. È stato dimostrato che p53 è localizzata nel citoplasma in diversi tipi di cellule normali, mentre in cellule trasformate si localizza nel nucleo (Rotter, V., 1983). Come si può osservare dalla figura 21, la sua localizzazione nelle tre linee cellulari di HUVEC infettate risulta essere citoplasmatica.

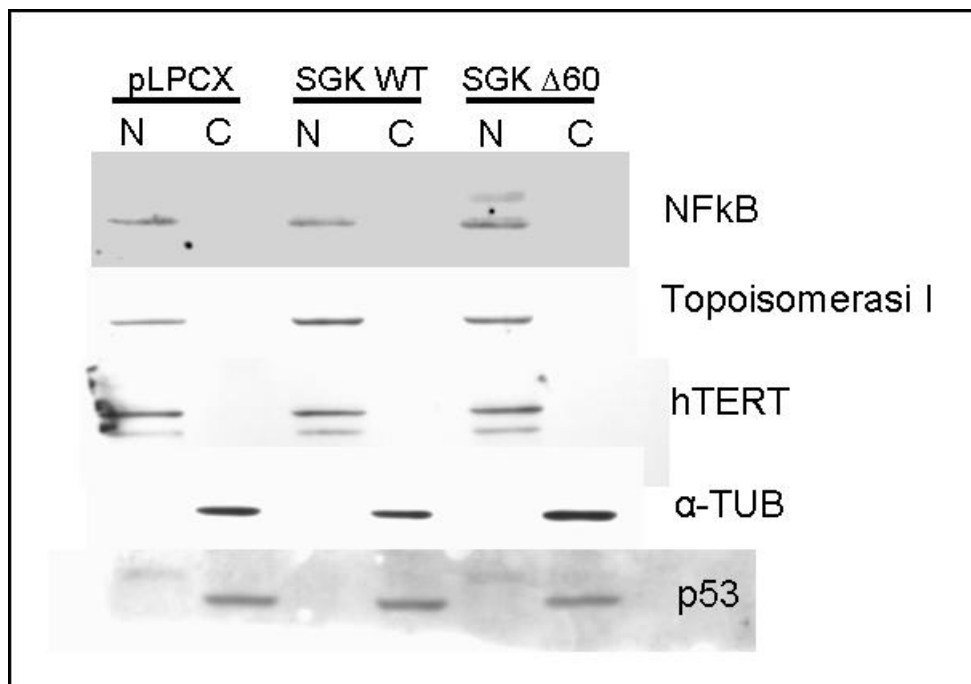


Figura 20: Analisi western blot. Localizzazione subcellulare delle proteine NFkB, hTERT, p53 nelle linee cellulari di HUVEC infettate a PDL 13.

IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA SGK1

La proteina SGK1 presenta un 45-55% di omologia della sequenza aminoacidica dei domini catalitici di altre serin-treonin protein chinasi, come la Akt-1/PKB- α (Webster et al., 1993b). Studi recenti dimostrano che la Akt-1/PKB- α può indurre l'attivazione della telomerasi. In vitro, la PKB fosforila il peptide AVRIRGKSYV di hTERT stimolandone l'attività. È quindi possibile che la maggiore attività relativa della telomerasi osservata nella linea SGK WT a PDL 8, possa essere dovuta ad un probabile effetto della proteina SGK-1 localizzata nel nucleo di questa linea cellulare.

Per poter verificare l'ipotesi di una interazione diretta tra la telomerasi e la proteina SGK-1 nella linea SGK WT è stata immunoprecipitata la SGK-1 ed eseguito un SDS-PAGE al 10%. In seguito la membrana è stata incubata con l'anticorpo anti-hTERT. Come si può osservare in figura 21, non si è osservata nessuna interazione diretta tra le due proteine nelle HUVEC SGK WT a PDL 8.

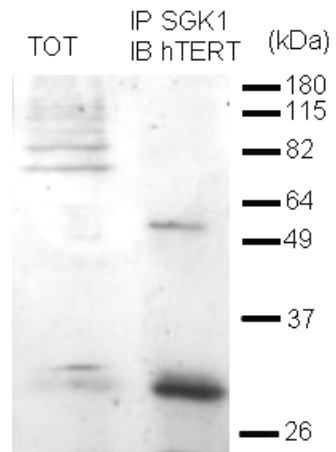


Figura 21: Esperimento di immunoprecipitazione. Il lisato totale della linea SGK WT a PDL 8 è stata incubata con l'anticorpo anti-SGK1 per una notte e , quindi, immunoprecipitata con la proteina A-sefarosio per 4 ore. Il complesso antigene-anticorpo è stato lavato, separato in SDS-PAGE al 10% ed analizzato mediante immunoblotting con l'anticorpo anti hTERT.

LOCALIZZAZIONE DELLA SGK-1 E DI hTERT

Mediante la tecnica di immunofluorescenza abbiamo studiato la localizzazione subcellulare delle proteine SGK1 e telomerasi (subunità catalitica hTERT) nel nostro sistema sperimentale. Utilizzando la microscopia confocale (figura 22) è stato riscontrato che la proteina SGK-1 è localizzata prevalentemente nel nucleo nella linea SGK WT (pannello B) e, diversamente, nel citoplasma nella linea SGK Δ 60 (pannello C), in accordo con recenti studi di N. S. Raikwar (J Physiol Renal Physiol, August 27, 2008).

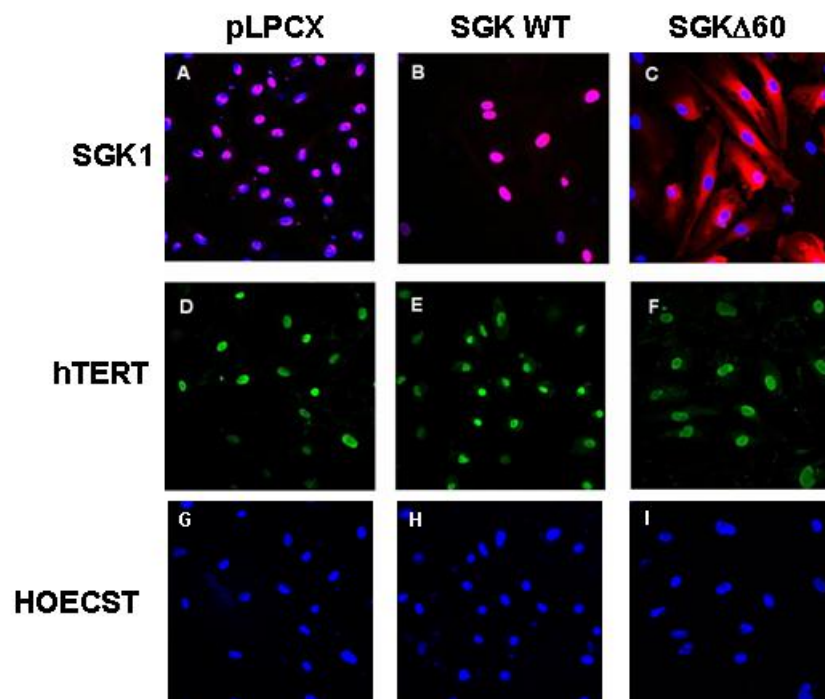


Figura 22: Microscopia confocale. Immunofluorescenza nelle cellule HUVEC infettate (pLPCX pannelli A, D e G, SGK1-WT pannelli B, E e H and SGK-1 Δ 60 pannelli C, F e I) per le proteine SGK1 (rosso; pannelli A, B, C) e hTERT (verde; pannelli D,E,F). I nuclei sono stati marcati con HOECST 33342 (blu).

Come si può osservare dalle immagini (figura 22), il livello di espressione della proteina SGK1 risulta essere maggiore nella linea SGK Δ 60 rispetto al livello presente in SGK WT e pLPCX; quest'ultima linea

mostra un livello di espressione inferiore anche rispetto alla linea SGK WT.

Inoltre, tale esperimento ha confermato il risultato ottenuto mediante western blot sulla localizzazione nucleare di hTERT (pannelli D, E, F).

Tali risultati rappresentano un buon metodo per esser certi che il sistema cellulare utilizzato negli esperimenti nel corso della presente tesi, fosse funzionale e corretto. Infatti, il vettore di espressione utilizzato per infettare le HUVEC permette la sovraespressione della proteina SGK1 nella linea SGK WT e della proteina SGK1 deleta di 60 aminoacidi nell' N-terminale nella linea SGK Δ 60 (figura 23).

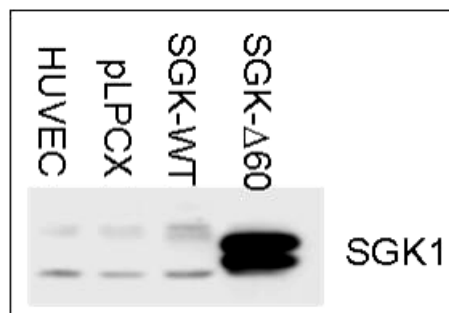


Figura 23: Analisi western blot. Livelli di espressione della proteina SGK1 nella linea cellulare HUVEC non infettata e nelle linee HUVEC infettate con i vettori pLPCX, SGK WT e SGK Δ 60.

La proteina mutante SGK-1 Δ 60 presenta un'emivita maggiore rispetto a quella wild type poiché essa non viene ubiquitinata (Brickley et al. JBC Nov 2002), e conseguentemente non può esser degradata dal proteasoma; inoltre, SGK-1 Δ 60 non può entrare nel nucleo poiché la regione amino terminale mancante comprende anche la sequenza di localizzazione nucleare (A. Engelsberg, 2006).

PRODUZIONE ENDOGENA DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO

La teoria dei radicali liberi sull'invecchiamento suggerisce che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) contribuiscono significativamente al fenotipo senescente, essendo la causa di danni a lipidi, proteine e acidi nucleici (Harman, D., 1956).

Nell'invecchiamento cellulare, l'aumentata produzione di ROS potrebbe derivare in maniera primaria dall'attività della NADPH ossidasi e dal mitocondrio (Hamilton, Hypertension, 2001; Xu, BBRC 2002). Ciò è rafforzato dal fatto che vi è una proporzionalità diretta tra la durata della vita di molti organismi e il tasso di produzione mitocondriale dei ROS (Finkel et al., Nature, 2000). In linea con queste osservazioni, molecole che mimano l'azione di enzimi antiossidanti, come la superossido dismutasi e la catalasi, possono aumentare la durata della vita (Melov et al., Science , 2000).

I ROS, oltre ad esser coinvolti nel processo di invecchiamento cellulare, partecipano all'insorgenza di numerose malattie (Finkel et al., Nature, 2000).

Analisi della produzione endogena dei ROS in funzione dell'invecchiamento cellulare in condizioni basali

Mediante l'utilizzo del citofluorimetro FACSCalibur e del software CellQuest (Becton Dickinson) sono stati analizzati i livelli di produzione endogena dei ROS nelle linee infettate pLPCX, SGK WT e SGK $\Delta 60$. L'esperimento è stato effettuato a diversi PDL per poter studiare la produzione dei ROS in funzione del tempo, durante l'invecchiamento delle cellule. L'analisi è stata effettuata su cellule vive che producevano

ROS, mediante la doppia marcatura con ioduro di propidio (PdI) e diidrorodamina 123 (DHR123). Infatti, lo ioduro di propidio, penetrando nelle cellule con la membrana plastica compromessa e intercalando tra il doppio filamento di DNA, permette di discriminare le cellule vive da quelle morte. Le cellule sono state incubate con DHR 123, un colorante sensibile agli stati redox, che si accumula nei mitocondri ed esibisce un colore rosso quando viene ossidato a rodamina (Laun et al., 2001).

I risultati, (figura 24), mostrano che all'aumentare del numero di PDL, i livelli di ROS prodotti dalla linea SGK WT, rispetto a quelli relativi alla linea di controllo pLPCX, presentano un andamento lineare decrescente statisticamente significativo (ANOVA, Post test for linear trend, N=3 $P < 0,05$ SGK WT vs pLPCX) (figura 24). In altre parole, il rapporto tra la linea SGK WT e quella di controllo pLPCX dei ROS prodotti diminuisce in funzione del tempo in maniera lineare: ciò significa che la sovraespressione della proteina SGK-1 nella cellula endoteliale induce un effetto inibitorio sulla produzione dei ROS rispetto a quanto avviene in pLPCX, perciò il rapporto diminuisce. La linea SGK- $\Delta 60$ non presenta questo tipo di andamento, bensì esso si presenta irregolare nei livelli di produzione endogena dei ROS confrontati a quelli della linea di controllo.

Produzione endogena dei ROS in presenza di glucosamina

Sono stati condotti esperimenti per verificare la produzione dei ROS in condizioni di insulino-resistenza, mimata da un'alta concentrazione di glucosamina su cellule non infettate (WT), infettate con i tre diversi vettori. Le tre linee, a PDL bassi, in seguito ad una starvation di 4 ore in terreno senza fattori, aggiunto di BSA 0,1%, sono state sottoposte ad uno stress ossidativo indotto dalla presenza di glucosamina 10 mM per 72 ore. In seguito alla lettura citofluorimetrica (figura 25), e all'analisi statistica effettuata con il metodo "one-way ANOVA", si ritrova una diminuzione della produzione dei ROS da parte della linea SGK-WT trattata con glucosamina, statisticamente significativa ($P < 0,05$) rispetto alle altre due linee trattate (figura 26).

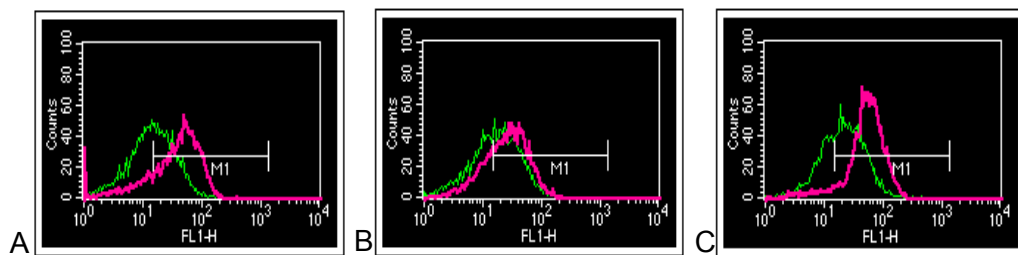


Figura 25: Esempi di analisi citofluorimetrica per i ROS. L'analisi è stata eseguita sulle HUVEC infettate trattate (linea fucsia) e non trattate (linea verde) con glucosamina 10 mM per 72ore. (A) pLPCX, (B) SGK WT, (C) SGK $\Delta 60$.

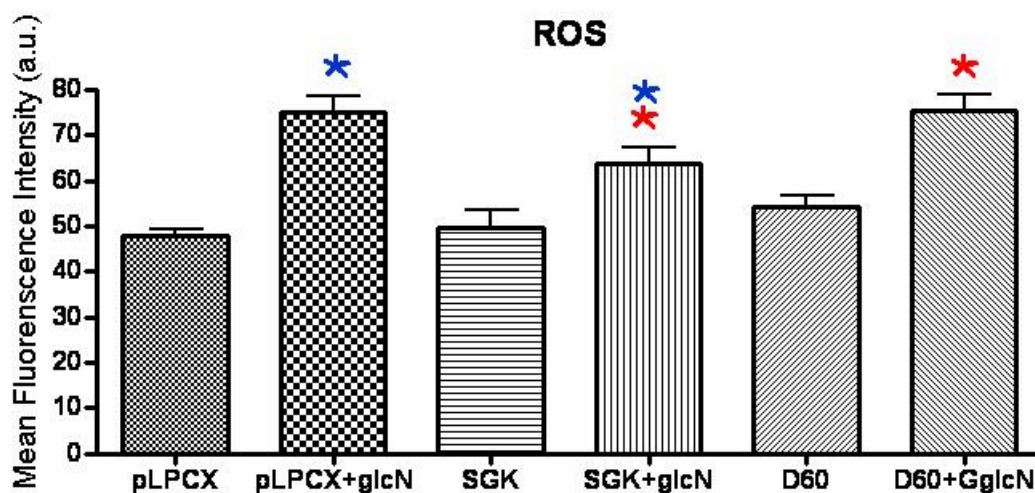


Figura 26: Istogrammi relativi alla produzione dei ROS in condizioni di insulino resistenza. Tali istogrammi rappresentano i valori ottenuti dalle letture al citofluorimetro relative alla produzione dei ROS in presenza e assenza di glucosamina 10 mM per 72 ore. Il numero degli esperimenti effettuati in maniera indipendente è 4, e le letture sono state fatte in doppio.

Legenda: * $P < 0.05$ = SGK+ GlcN vs D60+ GglcN; * $P < 0,05$ = SGK+ GlcN vs pLPCX+ GlcN (one-way ANOVA).

ANALISI DELLE PROTEINE CARBONILATE

Per verificare i dati ottenuti mediante citofluorimetria è stato valutato il grado di ossidazione delle proteine, mediante la tecnica dell'Oxyblot. Infatti, l'ossidazione delle proteine causata dai radicali liberi dell'ossigeno e da altre specie reattive provoca l'introduzione di gruppi carbonili nelle catene laterali delle proteine mediante un meccanismo sito-specifico. Tali gruppi vengono rivelati mediante una reazione di derivatizzazione.

L'esperimento è stato condotto sulle linee cellulari infettate pLPCX, SGK WT e SGK Δ 60 a PDL 6 e 9. Al 70 % di confluenza le cellule endoteliali sono state lisate e le proteine sono state derivatizzate con la 2,4-dinitrofenilidrazina. 5 μ g di proteine derivatizzate sono state analizzate in 10% SDS-PAGE. Le proteine sono state rivelate mediante chemiluminescenza (GE HealthCare).

Tale esperimento ha rivelato un minore livello di ossidazione delle proteine della linea SGK WT, rispetto a quelli ritrovati nelle linee di controllo infettata con il vettore vuoto e mutante SGK Δ 60 (figura 27).

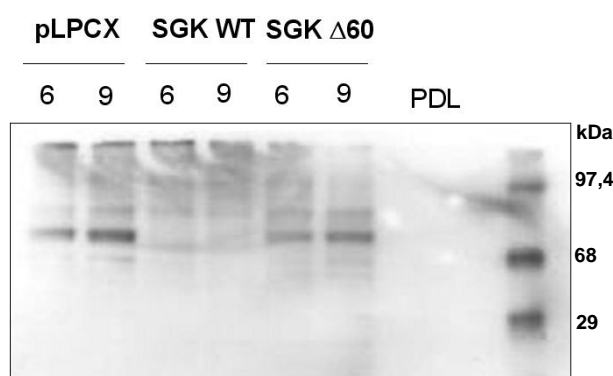


Figura 27: Analisi delle proteine ossidate nelle HUVEC infettate. I gruppi carbonili delle catene laterali delle proteine sono stati derivatizzati a 2,4-dinitrofenilidrazone. Questo pannello è rappresentativo dell'analisi dell'Oxyblot di 5 μ g di proteine totali ottenute da pLPCX, SGK WT e SGK Δ 60 ai PDL 6 e 9.

ANALISI DELL'ATTIVITA' DELLA β -GALATTOSIDASI ASSOCIATA ALLA SENESCENZA

Caratteristica della senescenza replicativa è l'espressione di uno specifico isoenzima, la β -galattosidasi (Dimri, G.P., 1995). È stata descritta l'attività della β -galattosidasi a pH 6, trovata specificatamente in colture di fibroblasti umani senescenti, ma non in cellule quiescenti o terminalmente differenziate. Diversi gruppi di ricerca hanno utilizzato questo saggio su vari tipi di cellule e tessuti per testare la senescenza replicativa in vitro (Reznikoff, 1996; Serrano,1997; Bodnar, 1998; Van der Loo, 1998; Tsukamoto, 1998) e in vivo (Sigal, 1999; Mishima,1999).

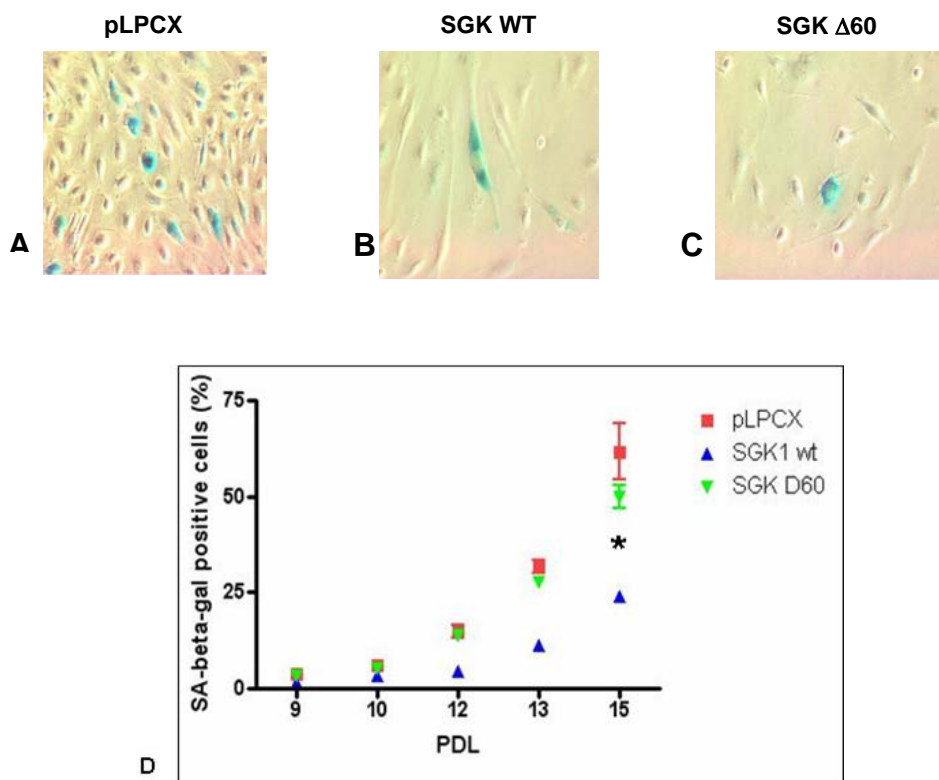


Figura 28: Analisi dell'attività della SA- β -galattosidasi. Il numero delle cellule β -galattosidasi positive è stato determinato contando il numero di cellule blu al microscopio ottico su 1000 cellule totali. A) pLPCX; B) SGK WT; C) SGK Δ 60 (20X). La percentuale di cellule positive che rappresentano le cellule senescenti (pannello D) è stata calcolata in cellule infettate da PDL 9 a PDL 15. (* $P < 0,05$ SGK WT vs pLPCX and vs SGK Δ 60; 1 way ANOVA, N=3).

I dati ottenuti, contando le cellule positive alla β -galattosidasi, ci mostrano solo come una piccola percentuale di cellule siano senescenti intorno al PDL 9, ed il loro numero incrementi fino al PDL 15. Invece le percentuali sono diverse tra le varie linee infettate: nel caso della linea SGK $\Delta 60$ è del 50%, per la linea di controllo raggiunge circa il 60%, mentre per la linea SGK WT il massimo della percentuale è del 25% (figura 28).

STUDIO DELL'ATTIVITA' RELATIVA DELLA TELOMERASI

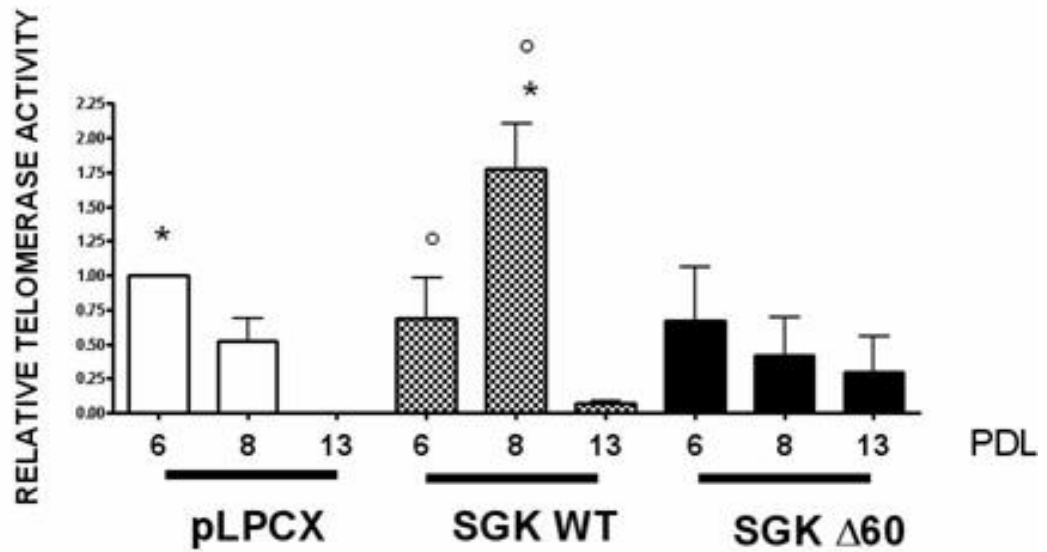
Crescenti evidenze suggeriscono che i telomeri e la telomerasi giochino un ruolo importante nella senescenza in vitro e in vivo. La telomerasi, trascrittasi inversa che estende i telomeri nei cromosomi eucariotici, è repressa nelle normali cellule somatiche, ma viene attivata durante lo sviluppo e le neoplasie. Mentre l'attivazione è coinvolta nell'immortalizzazione di cellule neoplastiche, la repressione della telomerasi provoca l'accorciamento dei telomeri in maniera dipendente dalla replicazione. Questo catabolismo unidirezionale ciclo-dipendente dei telomeri costituisce un meccanismo cellulare per "ricordare" il quantitativo di DNA perso e il numero delle divisioni cellulari; infatti, quando i telomeri diventano corti in maniera critica, le cellule terminano la replicazione dei cromosomi ed entrano in senescenza.

Sebbene non siano ancora noti i meccanismi di regolazione della telomerasi, la quale viene attivata o repressa in condizioni diverse, è stata dimostrato che l'inibizione della telomerasi compromette la crescita di cellule cancerose in coltura; al contrario, l'espressione forzata dell'enzima in cellule senescenti umane estende la durata della loro vita, riportandole ad uno stato simile a quello di tipiche cellule giovani (Bodnar et al., 1998).

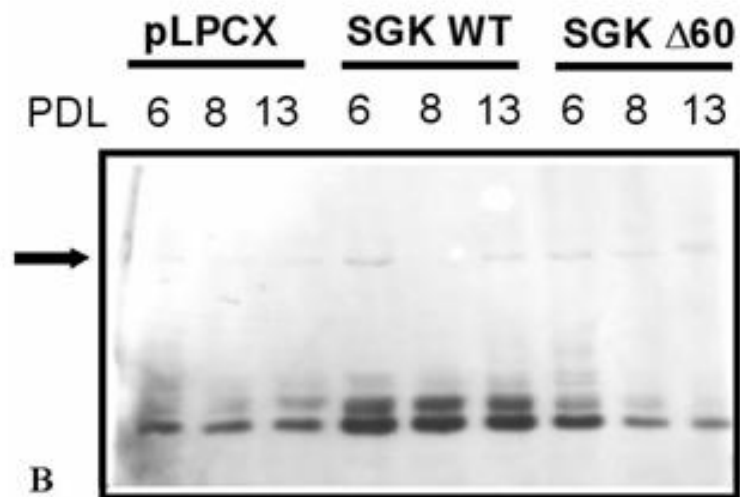
Evidenze recenti suggeriscono che la telomerasi potrebbe essere transientemente espressa durante la fase S in normali cellule umane (Masutomi et al., 2003). È stato anche dimostrato che l'espressione di hTERT non porta alla trasformazione neoplastica di cellule coltivate in vitro (Morales et al., 1999).

Abbiamo quindi studiato l'attività della telomerasi nelle linee infettate mediante la tecnica di PCR ELISA TRAP assay (Roche

Diagnostic) a diversi PDL. L'attività dell'enzima è stata rivelata partendo da 10 µg di proteine native di estratto cellulare totale contenente la telomerasi biologicamente attiva. I dati ottenuti indicano che, mentre l'attività dell'enzima diminuisce all'aumentare del numero dei raddoppi di popolazioni, sia nella linea di controllo infettata con il vettore vuoto pLPCX, che nella linea che sovraesprime la proteina SGK mutante $\Delta 60$, la linea infettata SGK WT presenta un picco di attività della telomerasi a PDL 8. A parità di PDL, tale attività è pari a più del doppio dei valori delle attività relative ritrovate nelle altre due linee (figura 29).



A



B

Figura 29: Analisi quantitativa dell'attività delle telomerasi. A) L'attività relativa dell'enzima telomerasi presente nelle linee infettate pLPCX, SGK WT e SGK Δ60 ai PDL 6, 8, 13. (* $P < 0,05$ pLPCX P6 vs SGK WT P8; ° $P < 0,05$ SGK WT P6 vs SGK WT P8) (1 way ANOVA $N=3$). B) Southern blot rappresentativo che mostra i prodotti dell'attività della telomerasi ai diversi PDL (6, 8, 13). 20 μ l di prodotti di PCR delle linee infettate sono stati rivelati mediante streptavidina coniugata alla alcalin fosfatasi. La freccia indica lo Standard Interno.

DISCUSSIONE

L'endotelio, ritenuto in passato un semplice rivestimento dei vasi, è considerato come un vero e proprio organo poiché produce numerose molecole in grado di modulare fenomeni come l'homing e l'infiammazione. Nel momento in cui viene compromessa la capacità delle cellule endoteliali di elaborare tali sostanze si parla di disfunzione endoteliali, con una ridotta capacità di produzione di differenti molecole fra cui l'ossido nitrico (NO). In condizioni patologiche l'endotelio cambia le sue caratteristiche diventando suscettibile al danno (infiammazione e trombosi), perdendo il controllo della permeabilità vascolare, modificando l'adesività alla parete dei leucociti circolanti (primo segno della formazione della placca aterosclerotica) e, in ultimo, favorendo la vasocostrizione (Stary HC, 1994, Circulation). Nell'uomo, l'acquisizione di un fenotipo endoteliale patologico si verifica prima della manifestazione clinica della malattia e si associa alla presenza dei fattori di rischio cardiovascolari tradizionali come l'ipercolesterolemia, l'ipertensione, il diabete mellito, l'obesità e le malattie sistemiche infiammatorie. Da queste osservazioni deriva la centralità dell'endotelio nella fisiopatologia di alcune fra le più importanti e diffuse patologie umane, quali l'aterosclerosi vascolare, l'ipertensione arteriosa, il diabete e la disfunzione erettile.

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica delle arterie di grande e medio calibro (macroangiopatia) caratterizzata dall'accumulo di lipidi ed elementi fibrosi (Ross R. N Engl J Med. 1999).

È nota dalla letteratura la presenza nelle lesioni aterosclerotiche di cellule vascolari senescenti, le quali esprimono maggiori livelli di molecole pro-infiammatorie e minori livelli dell'enzima ossido nitrico

sintasi endoteliali (e-NOS). Questo suggerisce che la senescenza cellulare, nell'uomo contribuisce alla patogenesi dell'aterosclerosi e, in particolare, vi è un'ampia discussione sull'ipotesi della senescenza telomerica associata a patologia vascolare (Minamino, 2003). Infatti numerose evidenze che indicano un ruolo critico dei telomeri nella senescenza vascolare e nella senescenza cellulare degli organismi invecchiati o nelle malattie legate all'età, inclusa l'aterosclerosi. L'istologia delle lesioni aterosclerotiche umane ha rivelato la presenza di cellule EPC (cellule endoteliali progenitrici) e VSMC (cellule vascolari muscolari lisce) con le caratteristiche morfologiche di cellule senescenti (Ross R, 1984; Burring KF. 1991). Inoltre, sono state ritrovate cellule vascolari, identificate come cellule endoteliali, SA- β -gal positive sia in placche aterosclerotiche di arterie coronarie ottenute da pazienti ischemici, sia sulla superficie luminale di placche ateroscleriche, (Minamino T, 2002). È stato verificato che tale fenotipo può essere indotto in vitro nelle cellule endoteliali umane dell'aorta, mediante la sovraespressione del mutante dominante negativo del TRF2 (telomere repeat binding factor 2), ma prevenuto dalla sovraespressione di TERT.

Con il presente lavoro abbiamo voluto studiare eventuali effetti di protezione dalla senescenza delle cellule endoteliali, da parte della proteina SGK-1.

La proteina SGK-1 è membro della famiglia delle serin/treonin protein chinasi ed è sotto il controllo trascrizionale da parte di siero e glucocorticoidi (Webster et al., 1993a, 1993b). E' stato dimostrato un ruolo per SGK nella via di trasduzione del segnale per la sopravvivenza cellulare e la proliferazione (Webster et al., 1993b; Buse et al., 1999; Brunet et al., 2001; Mikosz et al., 2001; Xu et al., 2001). La SGK-1 è una proteina di 50 kDa che contiene un dominio catalitico omologo per il 45-55% ai domini catalitici di diverse serin-treonin protein chinasi

costitutivamente espresse, come Akt-1/PKB- α , protein chinasi A, protein chinasi C-zeta, e la p70S6K/p85S6K chinasi (Webster et al., 1993b). I siti consenso dei substrati di SGK, identificati mediante lo screening di una libreria peptidica, sono simili a quelli di Akt-1/PKB- α (Kobayashi and Cohen, 1999; Park et al., 1999). Recentemente è stato dimostrato che SGK fosforila in vitro target comuni ad Akt/PKB.

Per poter studiare gli eventuali effetti di questa proteina sull'invecchiamento delle cellule endoteliali, sono state infettate le cellule HUVEC mediante un retrovirus per poter ottenere tre linee: pLPCX, infettata con il vettore vuoto; SGK WT, infettata con il vettore che sovraesprime la proteina SGK1; SGK Δ 60, infettata con il vettore che sovraesprime il mutante di SGK con la delezione dei 60 aminoacidi all'N-terminale e che ne aumenta il tempo di emivita.

Innanzitutto, abbiamo verificato l'esistenza di eventuali differenze nel tasso di crescita delle tre linee, costruendo le relative curve di crescita. La linea SGK WT presenta un tasso di crescita simile al controllo, a differenza della linea SGK Δ 60, che mostra una crescita più lenta. Tale risultato è in accordo con i livelli di espressione di alcune proteine che regolano il ciclo cellulare: infatti, la ciclina A, essenziale sia per entrare nella fase S, sia nella transizione in G2/M (Pagano, 1992), presenta livelli maggiori in SGK WT rispetto a SGK Δ 60 a PDL 14; la ciclina D1, che normalmente aumenta in fase G1, presenta livelli maggiori in SGK Δ 60 all'aumentare dei PDL, rispetto al controllo, mentre nella linea SGK WT si nota un suo aumento solo a PDL 14. Al contrario, l'inibitore del ciclo cellulare p21, la cui espressione aumenta nei fibroblasti senescenti, presenta un minor livello di espressione in SGK Δ 60 a tutti i PDL considerati, ed una sua maggiore espressione nella linea SGK WT a PDL 14, entrambi rispetto al controllo pLPCX. Da tali

risultati si evince che il sistema sperimentale utilizzato è caratterizzato da una linea cellulare, SGK WT, che presenta un andamento nella crescita simile a quella di controllo, ed una, SGK $\Delta 60$, che invece presenta una ridotta replicazione.

I livelli di espressione della proteina SGK-1 sono stati confermati mediante l'analisi di western blot, e la sua localizzazione mediante tecniche di immunofluorescenza. Il mutante $\Delta 60$ ha mostrato una diversa localizzazione rispetto alla proteina wild type: SGK-1 wild type è localizzata nel nucleo, mentre il mutante SGK-1 $\Delta 60$ è prevalentemente citoplasmatica. Questo è in accordo con il fatto che l'estremità N-terminale rappresenta la sequenza necessaria alla localizzazione nucleare e mitocondriale. Tale risultato è stato confermato recentemente in un lavoro di N. S. Raikwar (*J Physiol Renal Physiol*, August 27, 2008).

La senescenza cellulare blocca irreversibilmente la proliferazione cellulare (Campisi, 2001). Negli ultimi quindici anni, si è visto che questo processo, ora denominato senescenza replicativa, è guidato dall'accorciamento dei telomeri. I telomeri sono complessi specializzati di DNA-proteine localizzati nella parte terminale del cromosoma lineare degli eucarioti. Essi preservano l'integrità e la stabilità del genoma proteggendo le estremità cromosomiche. Il complesso telomerico è composto da ripetizioni a doppio filamento non codificante di sequenze di DNA ripetute in tandem ricche in G (TTAGGG nell'uomo) che si estendono per diverse migliaia di basi. Ad essi sono associate diverse proteine con funzioni strutturali e di regolazione. La telomerasi è costituita da due componenti, una subunità catalitica (telomerase reverse transcriptase TERT) e una componente ad RNA (Terc) che serve da stampo per la sintesi di nuove ripetizioni telomeriche di DNA. La replicazione del DNA, di tipo semiconservativo, provoca l'accorciamento dei telomeri ad ogni divisione cellulare poichè gli estremi terminali dei

cromosomi non vengono duplicati completamente. Ad ogni replicazione cromosomica, i telomeri tipicamente perdono circa 150 paia di basi della sequenza nucleotidica al 5' del DNA, come risultato dell'incapacità della DNA polimerasi di replicare le estremità finali dei telomeri (Olovnikov, A.M. 1971; Watson, J.D. 1972). L'accorciamento telomerico potrebbe quindi essere una sorta di orologio mitotico che memorizza il numero delle divisioni cellulari. Quando il numero delle divisioni cellulari è alto, i telomeri diventano così corti che le cellule escono dal ciclo di divisione cellulare, per entrare nella senescenza replicativa (Allsopp, R. C., 1992; Hastie, N. D., 1990; Harley, C. B., 1990). Quindi, l'accorciamento dei telomeri sembra costituire un segnale di arresto della divisione cellulare.

È noto dalla letteratura che l'espressione ectopica di hTERT in cellule telomerasi negative è sufficiente per ripristinare l'attività della telomerasi, per l'allungamento dei telomeri e per l'estensione della durata di vita. Evidenze recenti suggeriscono che la telomerasi potrebbe essere transientemente espressa durante la fase S in normali cellule umane (Masutomi et al., 2003). In passato è stato anche dimostrato che l'espressione di hTERT non porta alla trasformazione neoplastica di cellule coltivate in vitro (Morales et al., 1999). Abbiamo quindi studiato l'attività della telomerasi nelle linee infettate a diversi PDL. I dati ottenuti indicano che, mentre l'attività dell'enzima diminuisce all'aumentare del numero dei raddoppiamenti di popolazione, sia nella linea di controllo infettata con il vettore vuoto pLPCX, che nella linea che sovraesprime la proteina SGK mutante $\Delta 60$, la linea infettata SGK WT presenta un picco di attività della telomerasi a PDL 8. A parità di PDL, tale attività è pari a più del doppio dei valori delle attività relative ritrovate nelle altre due linee.

È noto che alla base della regolazione della telomerasi vi è la protein chinasi B (PKB o Akt). In vitro, la PKB fosforila il peptide

AVRIRGKSYV di hTERT stimolandone l'attività. Gli estrogeni attivano nelle cellule endoteliali la via della PI3K/Akt, la quale induce l'attività della telomerasi mediante la fosforilazione di TERT (Simoncini T, 2000; Kang SS, 1999). Di contro, l'inibizione della PI3K, così come il dominante negativo di Akt, diminuiscono l'attività della telomerasi nelle cellule endoteliali mediante la fosforilazione di TERT (Breitschopf K, 2001). Nell'insieme, i dati di letteratura suggeriscono che gli estrogeni attivano la telomerasi endoteliale via PI3K/Akt e che l'inattivazione di Akt, diminuisce l'attività della telomerasi nelle cellule endoteliali. Gli effetti cardioprotettivi degli estrogeni, esercitati attraverso gli effetti diretti su cellule endoteliali e muscolari lisce, probabilmente contribuiscono alla minor incidenza di malattie cardiovascolari osservate nelle donne in premenopausa rispetto agli uomini (Farhat MY, 1996; Nathan L. 1997; Mendelsohn ME, 1999; Dubey RK, 2001). Dati recenti, inoltre, indicano che le donne presentano una velocità di accorciamento dei telomeri, dipendente dall'età, minore rispetto a quella che si verifica negli uomini (Cherif H, 2003; Coviello-McLaughlin GM, 1997; Benetos A, 2001).

Lo stress ossidativo può spiegare una larga parte della patogenesi della disfunzione endoteliale. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), che comprendono l'anione superossido, il perossido di idrogeno, i radicali idrossile, e le specie reattive del nitrogeno (ossido nitrico e perossinitrile) hanno un'importanza rilevante nella biologia vascolare in base al loro potenziale di ossido-riduzione (redox). I ROS influenzano la funzione vascolare in diversi modi: modulando la contrazione e dilatazione, la crescita cellulare, l'apoptosi, la migrazione, l'infiammazione.

Un disequilibrio nello stato redox nel quale gli ossidanti superano gli antiossidanti provoca stress ossidativo. Nel caso delle cellule vascolari sono state studiate molte potenziali fonti enzimatiche di ROS, le quali

potrebbero essere responsabili della riduzione della biodisponibilità di NO, come la xantina ossidasi, NADH/NADPH ossidasi, la lipoossigenasi e la cicloossigenasi (Praticò D. *Atherosclerosis* 2005). Tale stato provoca modificazioni delle proteine e dei lipidi intracellulari e danno al DNA (Parman et al. *Nat. Med.*, 1999). Nel 2004, Haendeler et al. hanno dimostrato che, nelle cellule endoteliali umane, la produzione endogena dei ROS aumenta all'aumentare del numero di raddoppi di popolazione (population doubling level, PDL), quindi con l'invecchiamento cellulare. Tale aumento è accompagnato da un forte danno al DNA mitocondriale, dalla diminuita capacità proliferativa, da un leggero aumento della percentuale di cellule SA- β -gal positive e dall'accorciamento dei telomeri.

I risultati ottenuti mostrano un andamento lineare decrescente statisticamente significativo nella linea SGK WT: ciò significa che all'aumentare del numero di PDL, il rapporto dei ROS prodotti dalla linea SGK WT e da quella di controllo pLPCX diminuisce in funzione del tempo in maniera lineare. Quindi, la sovraespressione della proteina SGK-1 nella cellula endoteliale induce un effetto inibitorio sulla produzione dei ROS rispetto a quanto avviene in pLPCX.

L'effetto della proteina SGK-1 sulla produzione dei ROS in funzione del tempo è stato confermato anche dal risultato ottenuto dall'esperimento di verifica del danno ossidativo sulle proteine delle tre linee. Infatti, è noto che durante il processo di invecchiamento le cellule aumentano la produzione delle specie reattive dell'ossigeno. Tale aumento potrebbe derivare in maniera primaria dall'attività della NADPH ossidasi e dal mitocondrio (Hamilton, *Hypertension*, 2001; Xu, *BBRC* 2002). Quanto detto è rafforzato dal fatto che vi è una proporzionalità diretta tra la durata della vita di molti organismi e il tasso di produzione mitocondriale dei ROS (Finkel et al., *Nature*, 2000).

Inoltre, alla luce dei risultati ottenuti sull'attività della telomerasi, ci sono lavori in letteratura che indicano un possibile collegamento tra l'aumento dello stress ossidativo e la riduzione dell'attività della telomerasi (T. Finkel, 2000; D.J. Kurz, J. Cell Sci., 2004). Tali dati rafforzano quindi l'idea di un ruolo protettivo da parte della proteina SGK-1 nei confronti della senescenza, in quanto diminuisce la produzione dei ROS e riattiva, anche se transientemente, la telomerasi, inducendo così un rallentamento nel processo di invecchiamento cellulare. I suoi effetti sulla minore produzione dei ROS sono comprovati dai risultati ottenuti negli esperimenti di Oxyblot, che hanno evidenziato un grado di ossidazione delle proteine minore in SGK WT rispetto alle altre due linee. Tale risultato non permette di ipotizzare facilmente una possibile spiegazione. Studi di localizzazione subcellulare di SGK-1 hanno dato risultati controversi: in cellule che esprimevano transientemente un costrutto codificante per SGK1-AFP (proteina autofluorescente), è stata riscontrata la localizzazione mitocondriale di SGK-1. Inoltre, è emerso che la regione dei primi 60 aminoacidi all'N terminale di SGK-1 è necessaria e sufficiente per la sua localizzazione mitocondriale. La localizzazione di SGK-1 nel mitocondrio rafforza l'idea che questa proteina possa giocare un ruolo nella regolazione del metabolismo energetico (Cordas E, 2007) ed è in accordo con i dati relativi alla produzione dei ROS nel nostro modello sperimentale, non avendo però verificato nessuna localizzazione mitocondriale di SGK1 nella linea SGK WT.

La diversa localizzazione subcellulare di SGK-1 e il picco di attività della telomerasi ottenuto in SGK WT a PDL 8, hanno suggerito l'ipotesi di un collegamento tra la proteina SGK-1 e la telomerasi, facendo supporre che vi poteva essere una interazione diretta di attivazione tra le due proteine. Inoltre, l'ipotesi era fortificata dall'omologia di sequenza degli aminoacidi tra la PKB- α ed SGK-1.

Infatti, la PKB- α è tra le chinasi che attivano, fosforilandolo, l'enzima telomerasi. Gli esperimenti di immunoprecipitazione hanno rivelato che non vi è nessuna interazione, quindi l'aumento temporaneo dell'attività della telomerasi nella linea SGK WT potrebbe esser spiegato mediante un eventuale altro interattore di attivazione.

È da notare anche che, in accordo ai risultati ottenuti dell'attività della telomerasi, la proteina p53, coinvolta nell'inibizione dell'attività della telomerasi, si ritrova nel compartimento citoplasmatico anche nella linea SGK WT. Infatti, per poter inibire l'attività enzimatica della telomerasi, la p53 deve localizzarsi nel nucleo.

In ultimo, i dati ottenuti mediante lo studio sulla senescenza associata alla β -galattosidasi confermano globalmente i risultati ottenuti in questo lavoro, poiché si è osservata una minore percentuale di cellule positive per la linea SGK WT, rispetto sia al controllo sia alla linea mutante SGK-1 Δ 60.

In conclusione, possiamo affermare che la serin-treonina protein chinasi SGK-1 sia coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, come già riportato in letteratura e, dato nuovo, nella senescenza almeno a livello endoteliale. La riduzione della produzione dei ROS, la modulazione dell'attività di hTERT e delle differenti cicline permette a cellule che sovraesprimono la SGK-1 a livello nucleare di rallentare l'invecchiamento e di essere protette dall'induzione dello stress ossidativo. Questo nuovo ruolo della SGK-1 apre la strada all'ipotesi che vede questa molecola bersaglio dell'azione di nuovi farmaci che rallentino l'invecchiamento cellulare. Inoltre, andrebbe analizzato in vivo ed in vitro lo stimolo fisiologico che, aumentando la trascrizione e/o l'attività della SGK-1, ne moduli questa azione. Inoltre, la riduzione del danno ossidativo, la modulazione dell'espressione delle differenti cicline

e della percentuale di cellule positive all'attività della β -galattosidasi (cellule senescenti) permette di affermare che la SGK-1 è una molecola che aumenta la vitalità cellulare regolando sia il processo replicativo, che la senescenza.

BIBLIOGRAFIA

- Aldons J. Lusic, Rebecca Mar, and Paivi Pajukanta, *Annu. Rev. Genetics of atherosclerosis. Genomics Hum. Genet.* 2004. 5:189–218.
- Alliston TN, Gonzalez-Robayna IJ, Buse P, Firestone GL, and Richards JS. Expression and localization of serum/glucocorticoid-induced kinase in the rat ovary: relation to follicular growth and differentiation. *Endocrinology* 141: 385–395, 2000.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., and Harley, C. B. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10114–10118.
- Alvarez de la Rosa D, Zhang P, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, and Canessa CM. The serum and glucocorticoid kinase SGK increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 274: 37834–37839, 1999.
- Avilion, A. A., Piatyszek, M. A., Gupta, J., Shay, J. W., Bacchetti, S., and Greider, C. W. (1996) Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* 56, 645–650.
- Aviv H, Khan MY, Skurnick J, Okuda K, Kimura M, Gardner J, Priolo L, Aviv A. Age dependent aneuploidy and telomere length of the human vascular endothelium. *Atherosclerosis.* 2001;159:281–287.
- Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, Labat C, Bean K, Aviv A. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension.* 2001;37:381–385.
- Blackburn, E. H. (1990) Telomeres and their synthesis [Review]. *Science* 249, 489-490.

- Blasco, M. A., Rizen, M., Greider, C. W., and Hanahan, D. (1996) Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nature Genet.* 12, 200–204.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998; 279:349–352.
- Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism. *FEBS Lett.* 2001;493:21–25.
- Brickley DR, Mikosz CA, Hagan CR, and Conzen SD. Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1). *J Biol Chem* 277: 43064–43070, 2002.
- Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, and Greenberg ME. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 21: 952–965, 2001.
- Burrig KF. The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1678–89.
- Campisi J., S. Kim, C. Lim, M, Rubio. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Experimental Gerontology* 36 (2001) 1619-1637.
- Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN. Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:1576–1583.
- Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:11190–11194.
- Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, and Pearce D. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2514–2519, 1999.
- de Lange, T. (1998) Telomeres. *Nature (London)* 392, 753–754.

- Coviello-McLaughlin GM, Prowse KR. Telomere length regulation during postnatal development and ageing in *Mus spretus*. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3051–3058.
- Delmolino LM and Castellot JJ Jr. Heparin suppresses sgk, an early response gene in proliferating vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 173: 371–379, 1997.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Smith, J., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9363–9367.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O.M., Peacocke, M. & Campisi, J. (1995) A novel biomarker identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 9363±9367.
- Dippold, W.G., Jay, G., DeLeo, A.B., Khoury, G. & Old, L.J. (1981) p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 78, 1695±1699.
- Dubey RK, Jackson EK. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280:F365–F388.
- Edelberg JM, Tang L, Hattori K, Lyden D, Rafii S. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res* 2002;90:E89–93.
- Emily Cordas, Anikó Náráy-Fejes-Tóth and Géza Fejes-Tóth. Subcellular Location of Serum- and Glucocorticoid-Induced Kinase-1 (SGK1) in Renal and Mammary Epithelial Cells. *Am J Physiol Cell Physiol* (January 3, 2007).
- Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.* 1996;10:615–624.35. Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:477–515.

- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., Le, S., West, M. D., Harley, C. B., Andrews, W. H., Greider, C. W., and Villeponteau, B. (1995) The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236–1241.
- Finkel Toren, Holbrook Nikki J.. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000; 408: 239-247.
- Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E, Miwa N. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci.* 1998;63:935–948.
- Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1989) A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature (London)* 337, 331–337.
- Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405–413.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop [see comments]. *Cell* 97, 503–514.
- Grillari, J., Hohenwarter, O., Grabherr, R.M., Katinger, H., 2000. Subtractive hybridization of mRNA from early passage and senescent endothelial cells. *Exp. Gerontol.* 35, 187–197.
- Hainaut, P. & Hollstein, M. (2000) p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res.* 77, 81±137.
- Hamilton, Hypertension, 2001.
- Haendeler J., J. Hoffmann, J.F. Diehl, M. Vasa, I. Spyridopoulos, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells, *Circ. Res.* 94 (2004) 768–775.

- Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature (London)* 345, 458–460.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K., and Allshire, R. C. (1990) Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing [see comments]. *Nature (London)* 346, 866–868.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New Engl J Med* 2003;348:593–600.
- Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rossig L, Vasa M, Zeiher AM, et al. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res* 2001;89:709–15.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49±53.
- Hupp, T.R. (1999) Regulation of p53 protein function through alterations in protein-folding pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 88±95.
- Imaizumi K, Tsuda M, Wanaka A, Tohyama M, and Takagi T. Differential expression of sgk mRNA, a member of the Ser/Thr protein kinase gene family, in rat brain after CNS injury. *Brain Res* 26: 189–196, 1994.
- Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J Jr, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D and Brown PO. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283: 83–87, 1999.
- Jun-Ping L., 1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13, 2091–2104.

- Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem.* 1999;274:13085–13090.
- Kamynina E and Staub O. Concerted action of ENaC, Nedd4–2, and Sgk1 in transepithelial Na() transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F377–F387, 2002.
- Karin M, Delhase M. The IkappaB kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signaling. *Semin Immunol* 2000;12:85–98.
- Kondo, S., Tanaka, Y., Kondo, Y., Hitomi, M., Barnett, G. H., Ishizaka, Y., Liu, J., Haqqi, T., Nishiyama, A., Villeponteau, B., Cowell, J. K., and Barna, B. P. (1998) Antisense telomerasi treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation. *FASEB J.* 12, 801–811.
- Kumar JM, Brooks DP, Olson BA, and Laping NJ. Sgk, a putative serine/threonine kinase, is differentially expressed in the kidney of diabetic mice and humans. *J Am Soc Nephrol* 10: 2488–2494, 1999.
- Kurz D.J., S. Decary, Y. Hong, and Jorge D. Erusalimsky. Senescence-associated b-galactosidase reflects an increase in lisosoma mass during replicative ageing of human endothelial cells, *Journal of Cell Science* (2000) 113, 3613-3622.
- Kurz D.J., S. Decary, Y. Hong, E. Trivier, A. Akhmedov, J.D. Erusalimsky, Chronic oxidative stress compromises telomere Integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 2417–2426.
- Lane, D. (1998) Awakening angels. *Nature* 394, 616±617.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K.U., Breitenbach, M., 2001. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.* 39, 1166–1173.

- Lee, H. W., Blasco, M. A., Gottlieb, G. J., Horner, J. W., 2nd, Greider, C. W., and DePinho, R. A. (1998) Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature (London)* 392, 569–574.
- Lee et al., *Mech. Dev.* 2001
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002.Vol. 420: 868-874.
- Liu JP. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 1999;13:2091–2104.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233–241.
- Maiyar AC, Huang AJ, Phu PT, Cha HH, and Firestone GL. p53 stimulates promoter activity of the *sgk*. Serum/glucocorticoid-inducible serine/threonine protein kinase gene in rodent mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 271: 12414–12422, 1996.
- Maier JA, Statuto M, Ragnotti G. Senescence stimulates U937-endothelial cell interactions. *Exp Cell Res* 1993;208:270–4.
- Marin J. Age-related changes in vascular responses: a review. *Mech Ageing Dev* 1995;79:71–114.
- Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: preservation by hTERT immortalization. *Circ Res* 2001;89:793–8.
- Melov et al., *Science* ,2000
- Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999;340:1801–1811.
- Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, Moran TW, and Conzen SD. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *J Biol Chem* 276: 16649–16654, 2001.

- Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 2002;105:1541–4.
- Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;105:1541–1544.
- Minamino T, Yoshida T, Tateno K, Miyauchi H, Zou Y, Toko H, et al. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation*, 2003
Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H., Komuro, I., 2002. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 105, 1541–1544.
- Morin, G. B. (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521–529.
- Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Isner JM, Losordo DW, Asahara T. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;106:1133–9.
- Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, and Fejes-Toth G. Sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na₊ channels. *J Biol Chem* 274: 16973–16978, 1999.
- Niida, H., Matsumoto, T., Satoh, H., Shiwa, M., Tokutake, Y., Furuichi, Y., and Shinkai, Y. (1998) Severe growth defect in mouse cells lacking the telomerase RNA component. *Nat. Genet.* 19, 203–206
- Olovnikov, A. M. (1971) Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 201, 1496–1499.
- Prives, C. & Hall, P.A. (1999) The p53 pathway. *J. Pathol.* 187, 112±126.

- Rivard A, Berthou-Soulie L, Principe N, Kearney M, Curry C, Branellec D, et al. Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem* 2000;275:29643–7.
- Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 1999;99: 111–20.
- Ross R, Wight TN, Strandness E, Thiele B. Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am J Pathol* 1984;114:79–93.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115–126.
- Rotter, V., Abutbul, H. & Ben-Ze'ev, A. (1983) p53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts. *EMBO J.* 2, 1041±1047.
- Roy, J., Fulton, T. B., and Blackburn, E. H. (1998) Specific telomerase RNA residues distant from the template are essential for telomerase function. *Genes Dev.* 12, 3286–3300
- Sato I, Morita I, Kaji K, Ikeda M, Nagao M, Murota S. Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:1070–6.
- Serrano A. L., Andrés V.. Telomeres and Cardiovascular Disease. Does Size Matter? *Circ Res.* 2004;94:575-584.
- Shigaev A, Asher C, Latter H, Garty H, and Reuveny E. Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na₊ channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F613–F619, 2000.
- Shippen-Lentz, D., and Blackburn, E. H. (1990) Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247, 546–552.

- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of estrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000;407:538–541.
- Tsao, D. A., Wu, C. W., and Lin, Y. S. (1998) Molecular cloning of bovine telomerase RNA. *Gene* 221, 51–58.
- Tsuruta F, Masuyama N, and Gotoh Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem* 277: 14040–14047, 2002.
- Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res*. 2000;87: 540–542.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:E1–7.
- Vasile, E., Tomita, Y., Brown, L.F., Kocher, O., Dvorak, H.F., 2001. Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J*. 15, 458–466.
- Waldegger S, Barth P, Raber G, and Lang F. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4440–4445, 1997.
- Watson, J. D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol*. 239, 197–201.
- Webster et al., 1993b Buse P, Tran SH, Luther E, Phu PT, Aponte GW, and Firestone GL. Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, in mammary tumor cells. A novel

- Xu, BBRC 2002.
- Xu J, Liu D, Gill G, and Songyang Z. Regulation of cytokineindependent survival kinase (CISK) by the Phox homology domain and phosphoinositides. *J Cell Biol* 154: 699–705, 2001.
- Yang J, Chang E, Cherry AM, Bangs CD, Oei Y, Bodnar A, et al. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem* 1999;274:26141–8.
- Zhang L, Cui R, Cheng X, and Du J. Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I κ B kinase. *Cancer Res* 65: 457–464, 2005.
- Zhou R and Snyder PM. Nedd4–2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 280: 4518–4523, 2005.