

a cura di Francesco Purrello

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

Tra longevità e metabolismo: il ruolo di p66Shc determinato in modelli sperimentali

Stefano Ciciliot¹, Gian Paolo Fadini²

¹Dipartimento di Medicina, Università di Padova;

²Istituto Veneto di Medicina Molecolare, Padova

INTRODUZIONE

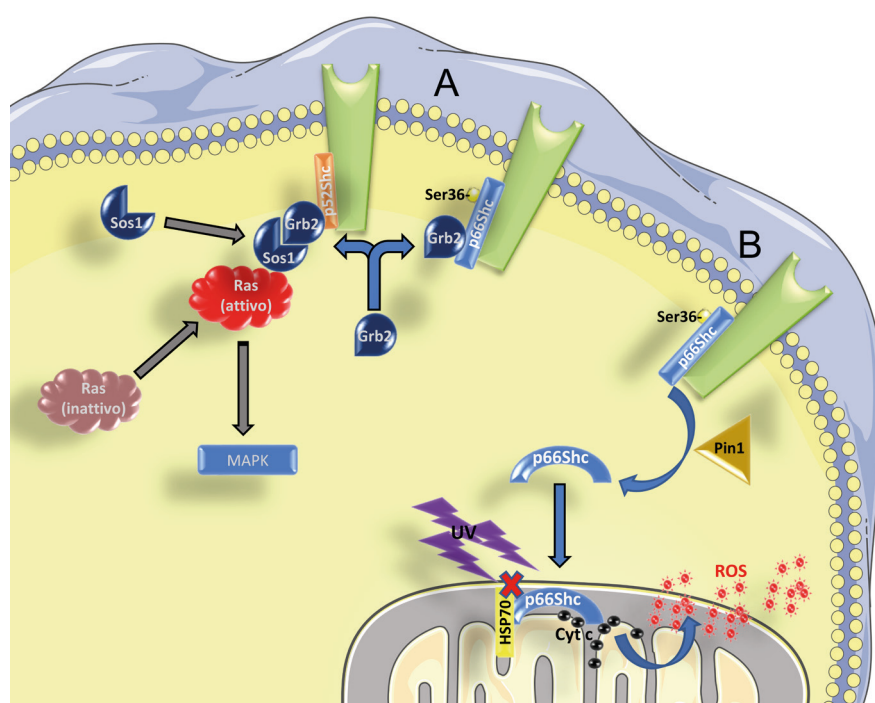
La proteina p66Shc è codificata nel locus genico *Shc1*, insieme a due isoforme più corte, note come p52Shc e p46Shc (1-2). Queste ultime sono generate a partire dallo stesso mRNA, da diversi siti di inizio della traduzione (2), mentre p66Shc è prodotta a partire da un diverso arrangiamento di esoni al 5' dell'mRNA. Queste tre proteine hanno in comune un dominio di legame alle fosfo-tirosine (PTB, o *phosphotyrosine binding domain*), una regione ricca di proline e di omologia al collagene-1 (CH1, o *collagen homology 1*), e un dominio di omologia Src2 (SH2, o *Sarcoma homologous type 2 domain*). Dal punto di vista filogenetico, proteine della famiglia Shc sono presenti nei mammiferi, nei pesci, in drosophila ed anche nel verme *C. elegans* (3). La caratteristica che le contraddistingue è possedere i domini PTB e SH2 sempre in quest'ordine dall'N- al C-terminale. A differenza di p52Shc e p46Shc, p66Shc possiede una regione di omologia al collagene 2 (CH2), e proprio la peculiare presenza di tale regione CH2, identifica p66Shc come variante del locus *Shc1* tipica dei vertebrati (3). Data questa caratteristica, la maggior parte degli studi *in vivo* su p66Shc sono stati condotti su topo, dove due modelli *knockout* specifici sono disponibili (4-5). Un terzo *knockout* dell'intero locus *Shc1* è stato descritto (6), tuttavia la delezione risulta letale a livello embrionale, a causa di difetti nello sviluppo a carico del sistema cardiovascolare. Sono stati inoltre prodotti altri *knockout* condizionali o mutanti che hanno permesso di individuare un coinvolgimento del locus *Shc1* nel cuore e nel muscolo scheletrico (7-8), nel cervello (9), nel sistema immunitario (10-11). Non vi è notizia dell'esistenza di modelli murini transgenici condizionali o inducibili per p66Shc.

RUOLO DI P66SHC NELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

p52Shc e p46Shc sono in grado di trasdurre il segnale da recettori con attività tirosin-chinasi verso Ras e MAPK (12-13). L'attivazione di queste vie avviene attraverso il loro legame a recettori ad attività tirosin-chinasica (RTKs) attivati, ovvero fosforilati a loro volta in residui tirosina specifici (Fig. 1A). Successivamente, la fosforilazione di tre residui tirosina nel dominio CH1 recluta il complesso Grb2/Sos1 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2* e *Son Of Sevenless 1*) tramite dominio SH2 ed infine l'attivazione di Ras (14), essendo Sos1 una GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*). Potenzialmente, p66Shc dovrebbe essere in grado di formare gli stessi complessi ed attivare Ras. Tuttavia diversi studi indicano che la via Ras-MAPK non solo non è attivata, ma può essere anche attivamente inibita da p66Shc, nonostante p66Shc sia in grado di legare Grb2 (2, 12, 15-17). Una possibile spiegazione è che p66Shc competa con p52Shc e p46Shc per il legame con Grb2, causando la rottura del complesso

Grb2/Sos1. Perché ciò avvenga, sembra essere necessario che p66Shc sia fosforilata a livello di Ser36 (vedere più avanti), come per esempio dalla MAPK-chinasi MEK (15). Quindi, un aumento nell'attivazione di p66Shc sarebbe sufficiente a causare un'inibizione della via Ras-MAPK (2, 15, 18-19). Una vasta letteratura ha mostrato che p66Shc non è solamente coinvolta nel contrastare l'attivazione della via Ras-MAPK, ma è soprattutto coinvolta nella risposta agli stimoli di stress ambientale e ossidativo (4, 14, 20-24). Chinasi come JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) o PKC β (*Protein Kinase C β*) (25-26), attivate in risposta a stress, sono in grado di fosforilare p66Shc in un particolare residuo di serina (Ser36), all'interno del dominio CH2, a cui segue un'isomerizzazione *cis-trans* ad opera di Pin1 (*Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase 1*), che porta alla traslocazione di p66Shc nello spazio inter-membrana mitocondriale (Fig. 1B). A questo livello, ed in assenza di stimoli pro-apoptotici (come acqua ossigenata o raggi UV), p66Shc è legata in complessi ad alto peso molecolare (27) e Hsp70 (*Heat Shock Protein 70*) (28)) o ad altre proteine coinvolte nel trasporto tra le membrane mitocondriali (29). A seguito di stimolazione, p66Shc può interagire con il citocromo c, grazie ad un apposito dominio di interazione, generando ROS (*Reactive Oxygen Species*), sequestrando elettroni dalla catena di trasporto degli elettroni (ETC, *Electron Transport Chain*) mitocondriale (14, 22-23, 30). A tal proposito, alcuni autori hanno espresso alcuni dubbi sulla capacità di p66Shc di fungere da accettore di elettroni dalla ETC (31-32), tuttavia è da notare come tali affermazioni, per quanto plausibili, non siano attualmente supportate da dati sperimentali. Qualunque sia l'esatto meccanismo molecolare, è noto che l'eccessiva produzione di ROS interferisce con numerosi processi cellulari e può indurre apoptosi. Il coinvolgimento di p66Shc in questo fenomeno, è confermato dal fatto che l'eliminazione o la sovra espressione di p66Shc hanno effetti opposti, rendendo le cellule più resistenti nel primo caso, e più sensibili nel secondo caso agli stimoli apoptotici (4, 20, 33). L'ipotesi che l'attivazione di p66Shc favorisca la formazione di ROS stimolando l'apoptosi potrebbe essere una visione troppo semplicistica: è noto un comportamento sia anti-ossidante (34) che anti-apoptotico (35) di p66Shc. Tuttavia, è da notare come questo si verifichi solo in determinati tipi cellulari ed in condizioni particolari. p66Shc sembra partecipare ai processi apoptotici anche comportandosi da effettore a valle di p53 (33). L'attivazione di p53 in risposta a perossido di idrogeno induce una stabilizzazione della proteina p66Shc, e probabilmente anche un aumento del trascritto, dato che nel promotore di p66Shc è presente una regione sito di legame per p53 (36). Tuttavia in assenza di p66Shc, p53 si attiva ma le cellule sono resistenti all'apoptosi.

Figura 1 ♦ Ruolo di p66Shc nella trasduzione del segnale



(A) P52Shc e p46Shc vengono attivati in seguito al legame con recettori tirosin-chinasi e alla fosforilazione di residui tirosina nel dominio CH1. Successivamente viene reclutato il complesso Grb2/Sos1, che porta all'attivazione di Ras e della via delle MAP-chinasi (MAPK). P66Shc compete per il legame con Grb2, interferendo con l'attivazione di Ras. (B) In seguito all'attivazione da parte di recettori tirosin-chinasi e della concomitante fosforilazione in serina-36 (Ser36), p66Shc subisce isomerizzazione *cis-trans* ad opera di Pin1, e trasloca nel mitocondrio. In assenza di stimoli, p66Shc è legato ad altre proteine (HSP70), ma in presenza di stimoli come UV o acqua ossigenata può legarsi al citocromo c (cyt c) e portare alla formazione di radicali liberi (ROS). Vedere il testo per maggiori dettagli

P66SHC IN MODELLI SPERIMENTALI ANIMALI: STORIA DI UNA RICERCA LUNGA OLTRE 15 ANNI

Il dato probabilmente più sorprendente sul ruolo di p66Shc è il suo coinvolgimento nella determinazione della longevità (4). I dati inizialmente riportati dall'analisi del primo topo *knockout* per la sola isoforma p66Shc indicavano una sopravvivenza incrementata del 30% rispetto ai controlli, dovuta probabilmente ad una diminuita suscettibilità all'apoptosi in seguito a stress ossidativo. L'unico altro modello murino che mostrasse un aumento della vita media e della lunghezza massima della vita era quello della restrizione calorica (37-38), ma i p66Shc^{-/-} non sembravano più magri e non mangiavano meno dei controlli. Tali risultati supportavano la cosiddetta teoria dell'invecchiamento basata sui radicali liberi, secondo cui l'accumulo di danni molecolari e al DNA dovuti all'eccesso di ROS favorirebbe il processo di invecchiamento. È da notare inoltre che, nonostante l'inibizione dell'apoptosi, i topi p66Shc^{-/-} non risultavano maggiormente suscettibili allo sviluppo di neoplasie. Successivamente, grazie all'utilizzo di fibroblasti isolati da topi p66Shc^{-/-} e p53^{-/-} è stato possibile identificare il ruolo di p66Shc come effettore a valle di p53 nel mediare l'apoptosi, favorendo il rilascio di citocromo c e l'aumento dei ROS (33). Questo lavoro suggeriva inoltre come p66Shc non mediasse né interferisse con altre funzioni di p53, infatti i topi p53^{-/-} hanno un'accresciuta mortalità a causa della formazione di tumori spontanei, che non si osserva nei topi p66Shc^{-/-}.

Grazie alla protezione dallo stress ossidativo, i dati della letteratura sono piuttosto concordi nell'attribuire ai topi p66Shc^{-/-} una resistenza nei confronti di alcune malattie comunemente attribuite allo stress ossidativo, incluse le complicanze croniche del diabete. Infatti, diverse ricerche hanno documentato come la delezione di p66Shc risulti protettiva nei confronti della disfunzione endoteliale associata al diabete (39-40), della nefropatia diabetica (41), della cardiomiopatia diabetica (42), e della guarigione delle ulcere (43).

Uno studio condotto su topi con una ridotta o assente espressione del recettore di IGF1 (IGF-1R^{+/-} e IGF-1R^{-/-}) suggerì un collegamento tra la via IGF1 e p66Shc, dato che nei topi IGF-1R^{+/-} vi era una minore fosforilazione in tirosina di p66Shc (44). Questo collegamento fu confermato successivamente da altri studi, condotti su mioblasti L6 di ratto (45-46). Inoltre, la riduzione dell'espressione di p66Shc in mioblasti L6 di ratto causava un aumento nell'assorbimento basale del glucosio, dovuto in parte ad un incremento di espressione di Glut1 e Glut3, e soprattutto al rimodellamento del citoscheletro di actina, dipendente da Erk.

Parallelamente, altri studi identificarono il modo in cui una parte di p66Shc fosse mantenuto inattivo nello spazio intermembrana del mitocondrio complessato con proteine hsp70 (28), e di come p66Shc potesse agire da ossido-reduttasi interagendo con il citocromo c per produrre H₂O₂ a seguito di stimoli pro-apoptotici (27, 30). Si è inoltre dimostrato come la fosforilazione di Ser36 ad opera di PKCβ e l'isomerizzazione in prolina ad opera di Pin1 siano coinvolte nella traslocazione di p66Shc nel mitocondrio (26), anche se il meccanismo esatto rimane ignoto. Più recentemente, l'ipotesi che la funzione di p66Shc sia interamente dipendente dalla fosforilazione su Ser36 ad opera di PKCβ è stata messa in dubbio. Infatti, secondo un lavoro in vitro, i siti bersaglio di PKCβ su p66Shc sarebbero altri residui di Serina o Treonina (47).

La produzione di ROS può avere un ruolo fisiologico nel regolare il metabolismo cellulare, senza necessariamente indurre apoptosi. L'insulina è in grado di attivare la produzione di H₂O₂ in pre-adipociti di grasso bruno, ma non in assenza di p66Shc (48), e questo evento è necessario per modulare l'attività della via Akt-Foxo1. Una corretta risposta alla stimolazione insulinica permette ai pre-adipociti sia bruni che bianchi l'accumulo di trigliceridi, favorendo l'importazione dei trigliceridi negli adipociti e l'inibizione della beta-ossidazione degli acidi grassi. Nel medesimo studio è stato dimostrato come nel tessuto adiposo bruno dei topi p66Shc^{-/-} vi sia un maggiore contenuto della proteina UCP1, che contribuisce a dissipare il potenziale di membrana mitocondriale. Inoltre il metabolismo di questi topi è leggermente più alto rispetto ai WT. Questo fatto spiega probabilmente perché la temperatura basale dei topi p66Shc^{-/-} fosse mediamente più alta rispetto ai topi WT (a 22°C). A differenza dello studio iniziale sui topi p66Shc^{-/-} (4), rispetto ai controlli questi topi crescevano meno dal punto di vista ponderale, nonostante introducessero la stessa quantità di calorie e avessero la stessa attività locomotoria. La differenza di peso era dovuta principalmente ad una diminuzione della massa grassa, soprattutto a livello addominale. Inoltre, la crescita dei topi p66Shc^{-/-} a seguito di dieta ad alto contenuto di grassi risultava notevolmente inferiore rispetto ai topi di controllo nutriti con la medesima dieta. Un'ultima interessante osservazione riguardava l'adattamento al freddo dei topi p66Shc^{-/-}: dopo 3 ore a 5° C la temperatura corporea di questi topi cala di 6 gradi, mentre cala della metà, ma dopo 4 ore, nei topi WT di controllo.

Tabella 1 ♦ **Coerenze ed incoerenze negli studi sperimentali su p66Shc**

CONDIZIONE	OSSERVAZIONE
Longevità	I dati iniziali secondo cui la delezione di p66Shc prolunghi la longevità non sono stati mai confermati.
Incremento ponderale	Tutti i lavori effettuati con il modello ShcP dimostrano che la delezione di p66Shc previene l'incremento ponderale indotto dalla dieta ad alto contenuto di grassi o dall'assenza di leptina. Secondo uno studio p66Shc è richiesto per l'effetto adipogenico dell'insulina. Tuttavia il modello knockout ShcL dimostra una differente suscettibilità all'incremento ponderale.
Metabolismo	Anche nel modello ShcP, nonostante il minor incremento ponderale, i dati sugli effetti metabolici (insulino-sensibilità e tolleranza al glucosio) sono estremamente discordanti.
Stress ossidativo	La maggior parte degli studi in vitro ed in vivo dimostrano che p66Shc media il danno da stress ossidativo e da iperglicemia e che la delezione di p66Shc protegge da molte condizioni patologiche associate a stress ossidativo.

Questo fenomeno probabilmente rende conto di un minore isolamento termico nei topi *knockout*, dovuto a una minore massa grassa. Uno studio successivo ha confermato questa ipotesi, dimostrando selezione negativa dei topi p66Shc^{-/-} mantenuti non nelle condizioni controllate della stabulazione sperimentale, ma nell'ambiente aperto esterno (49). Tale studio in particolare rivela perché p66Shc sia stato filogeneticamente conservato nonostante il suo ruolo nell'induzione di danno da stress ossidativo: p66Shc potrebbe essere importante per garantire la sopravvivenza in condizioni di pressione ambientale, mentre il suo ruolo metabolico potrebbe diventare competitivamente sfavorevole in relazione a condizioni di vita "moderne", favorendo lo sviluppo di obesità e sindrome metabolica.

È stato successivamente dimostrato come topi p66Shc^{-/-} resi geneticamente obesi (per incrocio con topi Lep^{Ob/Ob}) ingrassino meno rispetto ai p66Shc^{+/+} Lep^{Ob/Ob}, e abbiano una migliore tolleranza al glucosio e sensibilità all'insulina (50). Tale risultato, ribattuto anche da numerose agenzie di stampa italiane, identificava quindi p66Shc come un possibile target di terapie contro lo sviluppo di obesità e diabete. Un nostro studio più recente (51) ha tuttavia prodotto risultati contrastanti riguardo a quest'ultima parte, pur usando un modello simile, benché con un ceppo murino più omogeneo dal punto di vista genetico. Infatti topi p66Shc^{-/-} Lep^{Ob/Ob} risultavano essere sì più magri dei controlli p66Shc^{+/+}, ma non risultavano protetti dalle alterazioni metaboliche associate all'iperalimentazione ed all'obesità. Tale considerazione è stata confermata anche per quanto riguarda i topi p66Shc^{-/-} in dieta ad alto contenuto di grassi. Inoltre, i dati ottenuti negli animali erano supportati da uno studio su campioni umani, in cui si osservava che una ridotta espressione genica di p66Shc nel tessuto adiposo viscerale era associata ad un più basso BMI, ma in assenza di un miglioramento di diabete, dislipidemia ed ipertensione. I risultati di questi lavori sperimentali e clinici sono ulteriormente in contrasto con un altro studio (5), in cui è stato prodotto un nuovo modello p66Shc^{-/-}, denominato ShcL. A differenza dell'originario ShcP, è opinione degli autori del lavoro che questo nuovo modello non presenti perturbazioni nell'espressione di p52Shc e p46Shc, per questo motivo risulta suscettibile e non protetto all'ingrassamento dovuto a dieta ad alto contenuto di grassi. Gli autori imputano questa differenza ad una sovra-espressione di p46Shc nel tessuto adiposo dei topi ShcP. Tuttavia, questa ipotesi rimane al momento speculativa e non è corroborata da dati sperimentali.

Infine, un recente lavoro ha smentito il sorprendente effetto del knockout di p66Shc^{-/-} sulla longevità (52), usando un maggior numero di topi rispetto allo studio originale (4). Gli autori notano come la longevità media e massima dei topi WT usati nello studio originale fosse insolitamente bassa, forse a causa di uno stress ambientale. Tuttavia, il sospetto che p66Shc non fosse implicato nella longevità era già stato insinuato da uno studio su uomini centenari, in cui l'espressione di p66Shc risultava elevata e non ridotta (53). Il ruolo di p66Shc nella determinazione della longevità è stato ulteriormente indagato in un altro studio in cui è stato generato un modello di topo doppio KO per p66Shc e TERC (*telomerase RNA component*). I topi TERC^{-/-} presentano un accorciamento della durata media della vita ed è stato osservato che la contemporanea delezione di p66Shc non è in grado di ripristinare la *lifespan*, ma riesce a migliorare alcuni degli aspetti progerici dei topi TERC^{-/-}, come la sterilità, la

perdita di peso e l'atrofia multiorgano. Purtroppo, l'esatto fenotipo metabolico di questi animali non è stato ancora determinato in dettaglio (54).

CONCLUSIONI

L'utilizzo di modelli animali è stato indubbiamente di fondamentale importanza per lo studio della funzione di p66Shc. Mentre il meccanismo molecolare di azione di p66Shc è abbastanza ben chiarito, molti dubbi rimangono per quanto riguarda il suo ruolo metabolico, vista la presenza di dati contrastanti in letteratura (Tab. 1). A tal proposito, la generazione di altri modelli murini *knockout* inducibili e condizionali potrebbe permettere uno studio più dettagliato, consentendo di isolare l'effetto dell'eliminazione di p66Shc solo in alcuni tessuti. Il fatto di poter poi indurre il *knockout* in tessuti adulti, potrebbe evitare problemi di possibile compensazione o sbilanciamento dell'espressione di altri membri del *locus* ShcA. Lo studio del ruolo fisiologico e fisiopatologico di p66Shc ha contribuito a chiarire alcuni dei complessi rapporti tra longevità e metabolismo (55).

BIBLIOGRAFIA

1. Pelicci G, Lanfranccone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T & Pelicci PG. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70: 93-104, 1992.
2. Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pelicci G, Lai KM, Superti-Furga G, Pawson T, Di Fiore PP, Lanfranccone L & Pelicci PG. Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J* 16: 706-716, 1997. doi: 10.1093/emboj/16.4.706.
3. Luzi L, Confalonieri S, Di Fiore PP & Pelicci PG. Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr Opin Genet Dev* 10: 668-674, 2000.
4. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfranccone L & Pelicci PG. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402: 309-313, 1999. doi: 10.1038/46311.
5. Tomilov AA, Ramsey JJ, Hagopian K, Giorgio M, Kim KM, Lam A, Migliaccio E, Lloyd KC, Berniakovich I, Prolla TA, et al. The Shc locus regulates insulin signaling and adiposity in mammals. *Aging Cell* 10: 55-65, 2011. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00641.x.
6. Lai KM & Pawson T. The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes Dev* 14: 1132-1145, 2000.
7. Hardy WR, Li L, Wang Z, Sedy J, Fawcett J, Frank E, Kucera J & Pawson T. Combinatorial ShcA docking interactions support diversity in tissue morphogenesis. *Science* 317: 251-256, 2007. doi: 10.1126/science.1140114.
8. Vanderlaan RD, Hardy WR, Kabir MG, Pasculescu A, Jones N, deTombe PP, Backx PH & Pawson T. The ShcA phosphotyrosine docking protein uses distinct mechanisms to regulate myocyte and global heart function. *Circ Res* 108: 184-193, 2011. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233924.
9. McFarland KN, Wilkes SR, Koss SE, Ravichandran KS & Mandell JW. Neural-specific inactivation of ShcA results in increased embryonic neural progenitor apoptosis and microencephaly. *J Neurosci* 26: 7885-7897, 2006. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3524-05.2006.
10. Zhang L, Lorenz U & Ravichandran KS. Role of Shc in T-cell development and function. *Immunol Rev* 191: 183-195, 2003.
11. Zhang L, Camerini V, Bender TP & Ravichandran KS. A nonredundant role for the adapter protein Shc in thymic T cell development. *Nat Immunol* 3: 749-755, 2002. doi: 10.1038/ni820.
12. Bonfini L, Migliaccio E, Pelicci G, Lanfranccone L & Pelicci PG. Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem Sci* 21: 257-261, 1996.
13. Marshall MS. Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 9: 1311-1318, 1995.
14. Bhat SS, Anand D & Khanday FA. p66Shc as a switch in bringing about contrasting responses in cell growth: implications on cell proliferation and apoptosis. *Mol Cancer* 14: 76, 2015. doi: 10.1186/s12943-015-0354-9.
15. Okada S, Kao AW, Ceresa BP, Blaikie P, Margolis B & Pessin JE. The 66-kDa Shc isoform is a negative regulator of the epidermal growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 272: 28042-28049, 1997.
16. Pacini S, Pellegrini M, Migliaccio E, Patrussi L, Ulivieri C, Ventura A, Carraro F, Naldini A, Lanfranccone L, Pelicci P, et al. p66SHC promotes apoptosis and antagonizes mitogenic signaling in T cells. *Mol Cell Biol* 24: 1747-1757, 2004.

17. Xi G, Shen X & Clemmons DR). p66shc negatively regulates insulin-like growth factor I signal transduction via inhibition of p52shc binding to Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 leading to impaired growth factor receptor-bound protein-2 membrane recruitment. *Mol Endocrinol* 22: 2162-2175, 2008. doi: 10.1210/me.2008-0079.
18. Khanday FA, Santhanam L, Kasuno K, Yamamori T, Naqvi A, Dericco J, Bugayenko A, Mattagajasingh I, Disanza A, Scita G, et al. Sos-mediated activation of rac1 by p66shc. *J Cell Biol* 172: 817-822, 2006. doi: 10.1083/jcb.200506001.
19. Arany I, Faisal A, Nagamine Y & Saffirstein RL. p66shc inhibits pro-survival epidermal growth factor receptor/ERK signaling during severe oxidative stress in mouse renal proximal tubule cells. *J Biol Chem* 283: 6110-6117, 2008. doi: 10.1074/jbc.M708799200.
20. Natalicchio A, Tortosa F, Perrini S, Laviola L & Giorgino F. p66Shc, a multifaceted protein linking Erk signalling, glucose metabolism, and oxidative stress. *Arch Physiol Biochem* 117: 116-124, 2011. doi: 10.3109/13813455.2011.562513.
21. Pinton P & Rizzuto R. p66Shc, oxidative stress and aging: importing a lifespan determinant into mitochondria. *Cell Cycle* 7: 304-308, 2008. doi: 10.4161/cc.7.3.5360.
22. Di Lisa F, Giorgio M, Ferdinandy P & Schulz R. New aspects of p66Shc in ischemia reperfusion injury and cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol*, 2016. doi: 10.1111/bph.13478.
23. De Marchi E, Baldassari F, Bononi A, Wieckowski MR & Pinton P. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 564961, 2013. doi: 10.1155/2013/564961.
24. Trinei M, Migliaccio E, Bernardi P, Paolucci F, Pelicci P & Giorgio M. p66Shc, mitochondria, and the generation of reactive oxygen species. *Methods Enzymol* 528: 99-110, 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-405881-1.00006-9.
25. Le S, Connors TJ & Maroney AC. c-Jun N-terminal kinase specifically phosphorylates p66ShcA at serine 36 in response to ultraviolet irradiation. *J Biol Chem* 276: 48332-48336, 2001. doi: 10.1074/jbc.M106612200.
26. Pinton P, Rimessi A, Marchi S, Orsini F, Migliaccio E, Giorgio M, Contursi C, Minucci S, Mantovani F, Wieckowski MR, et al. Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science* 315: 659-663, 2007. doi: 10.1126/science.1135380.
27. Orsini F, Moroni M, Contursi C, Yano M, Pelicci P, Giorgio M & Migliaccio E. Regulatory effects of the mitochondrial energetic status on mitochondrial p66Shc. *Biol Chem* 387: 1405-1410, 2006. doi: 10.1515/BC.2006.176.
28. Orsini F, Migliaccio E, Moroni M, Contursi C, Raker VA, Piccini D, Martin-Padura I, Pelliccia G, Trinei M, Bono M, et al. The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J Biol Chem* 279: 25689-25695, 2004. doi: 10.1074/jbc.M401844200.
29. Cosentino F, Francia P, Camici GG, Pelicci PG, Luscher TF & Volpe M. Final common molecular pathways of aging and cardiovascular disease: role of the p66Shc protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 622-628, 2008. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.156059.
30. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122: 221-233, 2005. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.011.
31. Galimov ER. The Role of p66shc in Oxidative Stress and Apoptosis. *Acta Naturae* 2: 44-51, 2010.
32. Andreyev AY, Kushnareva YE, Murphy AN & Starkov AA. Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. *Biochemistry (Mosc)* 80: 517-531, 2015. doi: 10.1134/S0006297915050028.
33. Trinei M, Giorgio M, Cicalese A, Barozzi S, Ventura A, Migliaccio E, Milia E, Padura IM, Raker VA, Maccarana M, et al. A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene* 21: 3872-3878, 2002. doi: 10.1038/sj.onc.1205513.
34. Miyazawa M & Tsuji Y. Evidence for a novel antioxidant function and isoform-specific regulation of the human p66Shc gene. *Mol Biol Cell* 25: 2116-2127, 2014. doi: 10.1091/mbc.E13-11-0666.
35. Sansone P, Storci G, Giovannini C, Pandolfi S, Pianetti S, Taffurelli M, Santini D, Ceccarelli C, Chieco P & Bonafe M. p66Shc/Notch-3 interplay controls self-renewal and hypoxia survival in human stem/progenitor cells of the mammary gland expanded in vitro as mammospheres. *Stem Cells* 25: 807-815, 2007. doi: 10.1634/stemcells.2006-0442.
36. Kim CS, Jung SB, Naqvi A, Hoffman TA, DeRicco J, Yamamori T, Cole MP, Jeon BH & Irani K. p53 impairs endothelium-dependent vasomotor function through transcriptional upregulation of p66shc. *Circ Res* 103: 1441-1450, 2008. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181644.

37. Weindruch R & Walford RL. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* 215: 1415-1418, 1982.
38. Weindruch R, Walford RL, Fligiel S & Guthrie D. The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr* 116: 641-654, 1986.
39. Li Q, Kim YR, Vikram A, Kumar S, Kassan M, Gabani M, Lee SK, Jacobs JS & Irani K. P66Shc-Induced MicroRNA-34a Causes Diabetic Endothelial Dysfunction by Downregulating Sirtuin1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36: 2394-2403, 2016. doi: ATVBHA.116.308321 [pii].
40. Zhou S, Chen HZ, Wan YZ, Zhang QJ, Wei YS, Huang S, Liu JJ, Lu YB, Zhang ZQ, Yang RF, et al. Repression of P66Shc expression by SIRT1 contributes to the prevention of hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Circ Res* 109: 639-648, 2011. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243592.
41. Menini S, Amadio L, Oddi G, Ricci C, Pesce C, Pugliese F, Giorgio M, Migliaccio E, Pelicci P, Iacobini C, et al. Deletion of p66Shc longevity gene protects against experimental diabetic glomerulopathy by preventing diabetes-induced oxidative stress. *Diabetes* 55: 1642-1650, 2006. doi: 55/6/1642 [pii].
42. Rota M, LeCapitaine N, Hosoda T, Boni A, De Angelis A, Padin-Iruegas ME, Esposito G, Vitale S, Urbanek K, Casarsa C, et al. Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene. *Circ Res* 99: 42-52, 2006. doi: 01.RES.0000231289.63468.08 [pii].
43. Fadini GP, Albiero M, Menegazzo L, Boscaro E, Pagnin E, Iori E, Cosma C, Lapolla A, Pengo V, Stendardo M, et al. The redox enzyme p66Shc contributes to diabetes and ischemia-induced delay in cutaneous wound healing. *Diabetes* 59: 2306-2314, 2010. doi: 10.2337/db09-1727.
44. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P & Le Bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421: 182-187, 2003. doi: 10.1038/nature01298.
45. Natalicchio A, Laviola L, De Tullio C, Renna LA, Montrone C, Perrini S, Valenti G, Procino G, Svelto M & Giorgino F. Role of the p66Shc isoform in insulin-like growth factor I receptor signaling through MEK/Erk and regulation of actin cytoskeleton in rat myoblasts. *J Biol Chem* 279: 43900-43909, 2004. doi: 10.1074/jbc.M403936200.
46. Natalicchio A, De Stefano F, Perrini S, Laviola L, Cignarelli A, Caccioppoli C, Quagliara A, Melchiorre M, Leonardini A, Conserva A, et al. Involvement of the p66Shc protein in glucose transport regulation in skeletal muscle myoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E228-237, 2009. doi: 10.1152/ajpendo.90347.2008.
47. Haller M, Khalid S, Kremser L, Fresser F, Furlan T, Hermann M, Guenther J, Drasche A, Leitges M, Giorgio M, et al. Novel Insights into the PKCbeta-dependent Regulation of the Oxidoreductase p66Shc. *J Biol Chem* 291: 23557-23568, 2016. doi: M116.752766 [pii].
48. Berniakovich I, Trinei M, Stendardo M, Migliaccio E, Minucci S, Bernardi P, Pelicci PG & Giorgio M. p66Shc-generated oxidative signal promotes fat accumulation. *J Biol Chem* 283: 34283-34293, 2008. doi: 10.1074/jbc.M804362200.
49. Giorgio M, Berry A, Berniakovich I, Poletaeva I, Trinei M, Stendardo M, Hagopian K, Ramsey JJ, Cortopassi G, Migliaccio E, et al. The p66Shc knocked out mice are short lived under natural condition. *Aging Cell* 11: 162-168, 2012. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00770.x.
50. Ranieri SC, Fusco S, Panieri E, Labate V, Mele M, Tesori V, Ferrara AM, Maulucci G, De Spirito M, Martorana GE, et al. Mammalian lifespan determinant p66shcA mediates obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13420-13425, 2010. doi: 10.1073/pnas.1008647107.
51. Ciciliot S, Albiero M, Menegazzo L, Poncina N, Scattolini V, Danesi A, Pagnin E, Marabita M, Blaauw B, Giorgio M, et al. p66Shc deletion or deficiency protects from obesity but not metabolic dysfunction in mice and humans. *Diabetologia* 58: 2352-2360, 2015. doi: 10.1007/s00125-015-3667-8.
52. Ramsey JJ, Tran D, Giorgio M, Griffey SM, Koehne A, Laing ST, Taylor SL, Kim K, Cortopassi GA, Lloyd KC, et al. The influence of Shc proteins on life span in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69: 1177-1185, 2014. doi: 10.1093/gerona/glt198.
53. Pandolfi S, Bonafe M, Di Tella L, Tiberi L, Salvioli S, Monti D, Sorbi S & Franceschi C. p66(shc) is highly expressed in fibroblasts from centenarians. *Mech Ageing Dev* 126: 839-844, 2005. doi: 10.1016/j.mad.2005.03.004.
54. Giorgio M, Stendardo M, Migliaccio E & Pelicci PG. P66SHC deletion improves fertility and progeric phenotype of late-generation TERC-deficient mice but not their short lifespan. *Aging Cell* 15: 446-454, 2016. doi: 10.1111/accel.12448.
55. Fadini GP, Ceolotto G, Pagnin E, de Kreutzenberg S & Avogaro A. At the crossroads of longevity and metabolism: the metabolic syndrome and lifespan determinant pathways. *Aging Cell* 10: 10-17, 2011. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00642.x.