

a cura di Francesco Purrello

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

Ruolo della proteina p66^{Shc} nel danno epatico, pancreatico e cardiovascolare

Annalisa Natalicchio, Giuseppina Biondi, Francesco Giorgino

Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organi, Sezione di Medicina Interna, Endocrinologia, Andrologia e Malattie Metaboliche, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

INTRODUZIONE

La proteina p66^{Shc} è la più grande di tre isoforme proteiche (p66^{Shc}, p52^{Shc} e p46^{Shc}) codificate a partire dal proto-oncogene *ShcA* (*Src* collagen homologue A) (1-2). A differenza delle altre due isoforme, p66^{Shc} possiede un dominio CH2 (collagen homologue) caratterizzato dalla presenza di un residuo di serina in posizione 36 (Ser³⁶), la cui fosforilazione è determinante per la funzionalità della proteina. Infatti, proprio attraverso tale dominio, p66^{Shc}, a differenza di p46^{Shc} e p52^{Shc}, regola negativamente la via delle MAP chinasi, interferendo nel metabolismo del glucosio, e modula lo stress ossidativo favorendo l'apoptosi in diversi tipi cellulari (3-5).

La produzione aberrante di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) è determinante nei processi di invecchiamento, nel danno cellulare e nella disfunzione d'organo, ed è alla base dell'insorgenza di disturbi cronici degenerativi. Molti studi dimostrano il ruolo dello stress ossidativo anche nella patogenesi del diabete e delle sue complicanze (6-8). Essendo la proteina p66^{Shc} ampiamente coinvolta nella regolazione dello stress ossidativo, nell'apoptosi cellulare e nella regolazione della longevità (9), il ruolo biochimico e fisiopatologico di questa proteina è stato studiato in diversi sistemi cellulari, in relazione alle patologie correlate all'aumentata produzione di ROS e all'età. p66^{Shc} è risultata determinante nella disfunzione cellulare, indotta da vari stimoli, in diversi organi e tessuti (10-11), inclusi pancreas, fegato, sistema cardiovascolare, tessuto adiposo e muscolo scheletrico e ha destato, pertanto, l'interesse della comunità scientifica come possibile target farmacologico per la prevenzione dell'insorgenza e dello sviluppo di patologie correlate allo stress ossidativo e all'invecchiamento, tra cui il diabete. Infatti, sebbene i dati sugli effetti metabolici di p66^{Shc} (insulino-sensibilità e tolleranza al glucosio) siano discordanti (12-13), numerosi studi hanno dimostrato che topi diabetici *knockout* per p66^{Shc} (p66^{Shc}^{-/-}) sono protetti dallo sviluppo di complicanze epatiche, renali e cardiovascolari rispetto alla controparte *wild-type* (14-18).

In questa rassegna, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul ruolo della proteina p66^{Shc} nel danno a carico del fegato, del pancreas endocrino e del sistema cardiovascolare, con particolare attenzione a quanto si verifica nella condizione diabetica.

RUOLO DELLA PROTEINA P66^{Shc} NEL DANNO EPATICO

Il ruolo della proteina p66^{Shc} nel mediare lo stress ossidativo nel fegato e nel produrre danni funzionali in questo organo è stato valutato in numerosi lavori scientifici mediante esperimenti condotti in sistemi cellulari e in modelli animali (*in vitro*, *ex vivo* ed *in vivo*).

L'ablazione di p66^{Shc} in epatociti di topo è risultata citoprotettiva nei confronti dell'apoptosi cellulare indotta da stress ossidativo a seguito di ipossia/riossigenazione, grazie alla aumentata attività antiossidante della Mn superossido-dismutasi (MnSOD) e del fattore-I redox (Ref-I) (19). Inoltre, in epatociti di ratto, l'inibizione di p66^{Shc} riduce il danno epatico da ischemia/riperfusion (20).

In epatociti umani HepG2, è stato anche dimostrato che l'iperespressione di p66^{Shc}, ma non di una forma mutante mancante della Ser³⁶, aumenta i livelli intracellulari di ROS e riduce l'espressione del gene antiossidante Nrf2 (NF-E2-related factor 2), inducendo un danno ossidativo del DNA (21). La conferma del ruolo di p66^{Shc} nel danno epatico indotto da ROS viene dall'osservazione di un aumento dei livelli proteici di p66^{Shc} in biopsie epatiche provenienti da soggetti con steatoepatite alcolica (ASH), patologia notoriamente correlata allo stress ossidativo, rispetto ai soggetti sani (22). Nelle stesse biopsie, l'aumento dei livelli proteici di p66^{Shc} è risultato correlato in entità al grado di severità della ASH, suggerendo che p66^{Shc} potrebbe avere nel fegato sia un ruolo di sensore che di *enhancer* dello stress ossidativo e del conseguente danno epatico. In vivo, a conferma di quanto dimostrato in sistemi cellulari, topi iperesprimenti p66^{Shc}, dopo 6 settimane di abbeveramento con acqua ed etanolo, rispetto a topi *wild-type*, hanno mostrato elevati livelli sierici di alanina aminotransferasi (ALT), rigonfiamento epatico e steatosi epatica, e queste alterazioni erano tutte significativamente attenuate nei topi p66^{Shc}^{-/-} (23). Le analisi biochimiche del tessuto epatico murino hanno evidenziato, inoltre, l'induzione della proteina p66^{Shc} da parte dell'etanolo, mentre i topi p66^{Shc}^{-/-} mostravano un aumento dell'enzima antiossidante MnSOD in risposta all'etanolo, quasi assente nei topi *wild-type*. La correlazione inversa tra i livelli di espressione di p66^{Shc} e la protezione dal danno ossidativo indotto dall'alcol è stata anche confermata in vitro in epatociti primari e in cellule HepG2-E47, una linea cellulare di epatoma responsiva all'etanolo. Infatti, in cellule epatiche isolate da topi p66^{Shc}^{-/-}, l'attivazione della MnSOD, in seguito all'esposizione a etanolo, era maggiore rispetto a cellule epatiche isolate da topi *wild-type*, mentre era del tutto soppressa in cellule HepG2 iperesprimenti p66^{Shc}. In queste ultime, inoltre, p66^{Shc} induceva la generazione di ROS, potenziando lo stress ossidativo e la depolarizzazione mitocondriale indotte dall'etanolo (23). A conferma di questi risultati, è stato dimostrato che l'acido carnosico, un estratto della pianta di rosmarino, allevia il danno alcolico epatico inibendo p66^{Shc} tramite l'attivazione della deacetilasi NAD-dipendente SIRT1 con effetti antiossidanti, anti-apoptotici ed anti-steatosi (24).

In studi successivi, è stato dimostrato che la proteina p66^{Shc} media il danno epatico indotto da ischemia/riperfusion intestinale: nel fegato di topo sottoposto a questa procedura, si osserva l'attivazione di PKC β II che comporta l'attivazione di p66^{Shc} in senso pro-ossidante e pro-apoptotico e causa danno istologico epatico, infiltrazione delle cellule infiammatorie, stress ossidativo ed apoptosi (25). Inoltre, nel fegato, p66^{Shc} rappresenta il meccanismo di congiunzione tra invecchiamento e riduzione della capacità di rigenerazione epatica: topi anziani con *knockdown* epatico di p66^{Shc} mostrano una maggiore capacità di rigenerazione epatica rispetto a topi *wild-type* in seguito a parziale epatectomia; in particolare, l'assenza di p66^{Shc} determina riduzione dello stress ossidativo secondario all'epatectomia e della conseguente apoptosi epatocitaria (26).

La malattia diabetica, come è noto, si associa spesso ad obesità e dis/iperlipidemia, condizioni che, attraverso l'induzione di stress ossidativo, favoriscono l'insorgenza di epatopatia non alcolica (NAFLD, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), ossia accumulo ectopico di trigliceridi nel fegato, con conseguenti alterazioni dell'omeostasi glicemica e della sensibilità all'insulina; quando grave, il fenomeno può progredire a vera e propria epatite non virale e non alcolica, definita NASH (Non-Alcoholic Steatosis Hepatitis). I livelli proteici di p66^{Shc} totale e fosforilata in Ser³⁶ sono stati riscontrati aumentati nel fegato di topi affetti da NASH (27) in risposta all'attivazione della proteina p53, suggerendo che la via p53/p66^{Shc} potrebbe regolare la progressione della NASH mediante il controllo dei livelli di ROS e di apoptosi. A conferma di questo, l'acido carnosico si è mostrato capace di ridurre la NAFLD indotta da una dieta ricca di acidi grassi

(HFD, High Fat Diet) somministrata a ratti e, allo stesso modo, di ridurre in vitro gli effetti pro-apoptotici dell'acido grasso saturo palmitato in cellule epatiche umane Lo2, attraverso l'inibizione della via miR-34a/SIRT1/p66Shc (28).

RUOLO DELLA PROTEINA P66^{SHC} NEL DANNO DEL PANCREAS ENDOCRINO

Un unico studio (29) ha esplorato il ruolo della proteina p66^{Shc} nel danno a carico del pancreas endocrino, specificamente nelle beta-cellule pancreatiche esposte per lungo tempo a elevati livelli di acidi grassi saturi e/o di glucosio. È noto che l'esposizione cronica delle beta-cellule pancreatiche a elevati livelli di acidi grassi, tipicamente presenti nella condizione di obesità viscerale, si traduce in un danno di vitalità e funzione beta-cellulare, alterazioni che definiscono il fenomeno della "lipotossicità", contribuendo alla patogenesi e allo sviluppo del diabete mellito di tipo 2 (30-31); allo stesso modo, elevati livelli di glucosio possono indurre "glucotossicità" beta-cellulare. Tra i meccanismi attraverso i quali la lipotossicità e la glucotossicità producono effetti dannosi, l'induzione di stress ossidativo svolge un ruolo determinante (32).

Nel lavoro di Natalicchio A. et al, è stato dimostrato che il palmitato, un acido grasso saturo a 16 atomi di carbonio, determina un aumento dell'espressione genica e proteica di p66^{Shc}, mediata dall'attivazione del fattore di trascrizione p53, così come un aumento della fosforilazione di p66^{Shc} a livello della Ser³⁶, mediata dall'attivazione della proteina JNK, sia in isole pancreatiche umane e murine che in beta-cellule di ratto (INS-1E); l'incremento dell'espressione e dell'attivazione di p66^{Shc} indotta dagli acidi grassi saturi provoca un aumento dell'apoptosi beta-cellulare, mediata, almeno in parte, da un incremento della produzione dei ROS intracellulari (Fig. 1). Allo stesso modo, in beta-cellule INS-1E, livelli cronicamente elevati di glucosio aumentano l'espressione proteica di p66^{Shc} e la sua attivazione in Ser³⁶, determinando apoptosi beta-cellulare.

A conferma del ruolo pro-apoptotico di p66^{Shc} nelle beta-cellule esposte ad acidi grassi, l'espressione genica di p66^{Shc} aumenta significativamente nelle isole pancreatiche di topi nutriti con HFD, rispetto a topi nutriti con dieta standard, ed in isole pancreatiche di pazienti obesi rispetto a soggetti magri. Un altro dato interessante è che l'aumento dell'espressione di p66^{Shc} nelle isole di pazienti obesi correla, oltre che con l'espressione di p53, anche con l'incremento di espressione dei principali geni pro-apoptotici BAX (BCL2-Associated X protein), CASP3 (Caspase 3) e CYCS (Cytochrome C Somatic) (29).

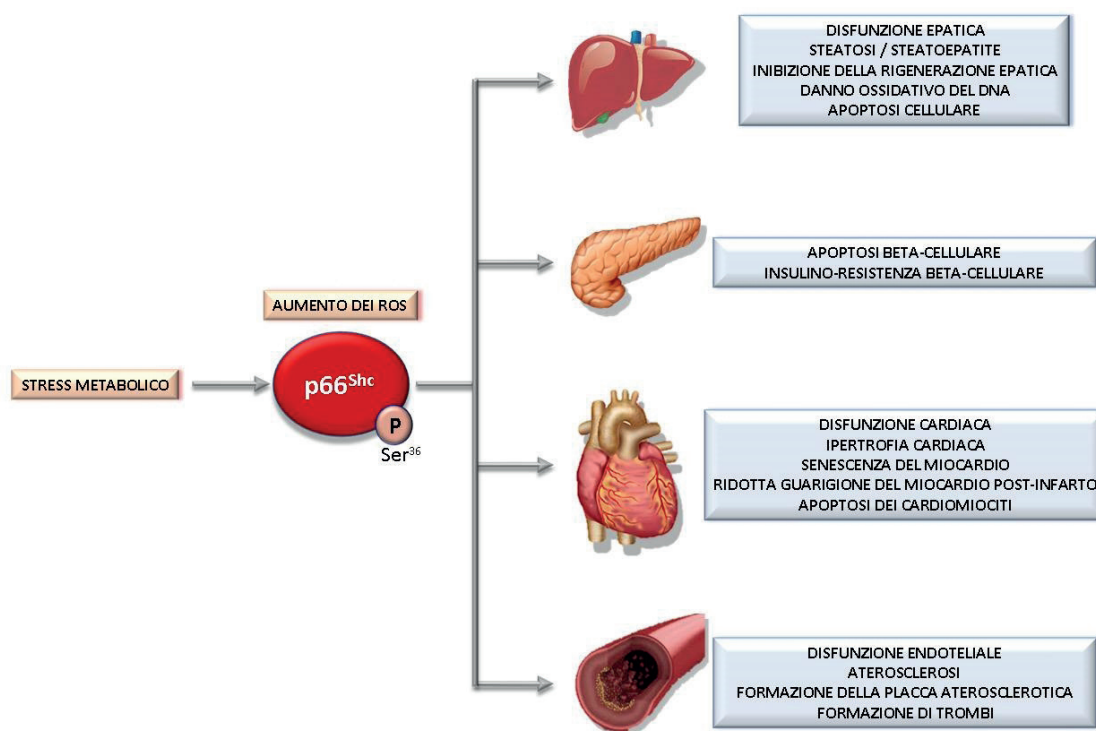
Inoltre, la p66^{Shc} sembra svolgere un ruolo anche nell'insulino-resistenza beta-cellulare indotta dall'eccesso di acidi grassi saturi. È noto infatti che l'insulina agisce in maniera autocrina sulle beta-cellule pancreatiche, inducendo la sua stessa biosintesi e secrezione (33). Così come in altri tessuti, anche nelle beta-cellule una condizione di iperlipidemia può causare inefficienza del signaling insulinico con conseguente inibizione degli effetti insulinici e realizzazione di uno stato di insulino-resistenza (34). Risultati ottenuti in cellule di insulinoma di ratto INS-1E dimostrano che p66^{Shc} ha di per sé un ruolo inibitorio sul signaling insulinico e sull'azione dell'insulina e media l'insulino-resistenza indotta dal palmitato: in particolare, l'acido grasso, aumentando l'espressione di p66^{Shc}, determina fosforilazione di IRS-1 a livello della Ser³⁰⁷ e conseguente degradazione proteica di IRS-1, che si traduce in una riduzione della capacità dell'insulina di fosforilare AKT, di indurre aumento del suo contenuto e della secrezione di C-peptide.

RUOLO DI P66^{SHC} NEL DANNO CARDIACO

Il ruolo determinante della proteina p66^{Shc} per la definizione dello stato redox cellulare è stato ampiamente studiato nelle patologie cardiovascolari, alla patogenesi delle quali i ROS e l'invecchiamento forniscono un contributo sostanziale. A livello cardiaco, così come molte altre molecole che regolano la crescita e l'apoptosi, p66^{Shc} è espressa prevalentemente nei cardiomiociti neonatali (35), dove esercita una azione anti-ipertrofica, dimostrata in ratti neonati p66^{Shc}^{-/-}, caratterizzati dall'aumento dei marker di proliferazione e di ipertrofia (36).

Il livello di espressione di p66^{Shc} si riduce nel corso della crescita e maturazione del cuore (35). Nei cardiomiociti adulti, pur essendo bassa in condizioni fisiologiche, l'espressione di p66^{Shc} può aumentare in risposta a diversi stimoli

Figura 1 ♦ Nelle beta-cellule pancreatiche, gli acidi grassi saturi inducono l'aumento dell'espressione genica e proteica di p66^{Shc}, mediata dall'attivazione del fattore di trascrizione p53, e l'incremento della fosforilazione di p66^{Shc} a livello di Ser³⁶, mediata dall'attivazione della proteina JNK, determinando, in parte tramite l'aumento della produzione di ROS, apoptosi beta-cellulare



induttori di ipertrofia e disfunzione cardiaca, suggerendo il ruolo di questa proteina nella regolazione di tali processi patologici.

Studi effettuati sia in vitro che in vivo, hanno dimostrato che l'angiotensina II, ormone che contribuisce alla precoce senescenza del cuore tipica dei pazienti con ipertensione, aterosclerosi e diabete, è in grado di incrementare l'espressione di p66^{Shc} che si traduce in apoptosi dei cardiomiociti e delle cellule endoteliali, oltre che in ipertrofia del ventricolo sinistro (37); topi adulti p66^{Shc}^{-/-}, a parità di spessore della parete del miocardio, peso cardiaco, pressione sanguigna e frequenza cardiaca, si caratterizzano per un maggior numero di cardiomiociti rispetto a topi *wild-type*, probabilmente causato da una minore attivazione della via di segnale dell'angiotensina II in assenza di p66^{Shc} (37). A conferma del ruolo di p66^{Shc} nella disfunzione cardiaca, miociti di cani con cardiomiopatia dilatativa mostrano un'aumentata espressione di p66^{Shc}, associata ad una maggiore produzione di ROS e ad un aumento dell'apoptosi cellulare (38).

La tossina Pasteurella multocida (PMT), un agonista della subunità monomerica endogena Gαq, promuove un incremento dell'espressione genica e proteica di p66^{Shc} e della sua fosforilazione in Ser³⁶ che determina ipertrofia cardiomiocitica (35). Anche la trombina induce la fosforilazione in Ser³⁶ di p66^{Shc} in fibroblasti cardiaci e in cardiomiociti, influenzandone la crescita e la sopravvivenza, anche attraverso il rimodellamento della matrice fibroblastica (35). Un ulteriore stimolo capace di esitare in danno cardiaco attraverso un aumento dell'attivazione di p66^{Shc} è l'iperglicemia. È noto infatti che lo stress ossidativo indotto dall'iperglicemia provoca difetti di crescita delle cellule progenitrici cardiache (CPC) e di formazione dei miociti, favorendo l'invecchiamento precoce del miocardio e l'insufficienza cardiaca. È interessante notare che topi diabetici p66^{Shc}^{-/-} non sviluppano senescenza o insufficienza cardiaca. Diversamente dal fenotipo apoptotico e necrotico osservato nelle cellule progenitrici cardiache e nei miociti di topi diabetici *wild-type*, le CPC di topi diabetici p66^{Shc}^{-/-} presentano una alta capacità proliferativa, suggerendo che la espansione delle CPC e dei

miociti possa essere il meccanismo tramite il quale si preserva la funzione cardiaca nei topi diabetici che mancano della p66^{Shc} (17). Tra i vari stimoli nocivi, anche l'alcol, il cui consumo eccessivo è notoriamente legato a disfunzione cardiaca, induce fosforilazione dose-dipendente di p66^{Shc}, aumentata produzione di ROS e apoptosi dei cardiomiociti (39). Mentre sembra essere chiaro il ruolo di p66^{Shc} nella ipertrofia e disfunzione cardiaca indotta dai vari stimoli su menzionati, il ruolo di p66^{Shc} nel danno cardiaco da ischemia-riperfusione rimane controverso (40-41). Un recente studio ha ipotizzato un ruolo positivo della produzione di ROS, mediata da p66^{Shc}, negli episodi di breve/media ischemia, funzionando come sistema endogeno di difesa dal danno; al contrario la produzione sostenuta di ROS da parte di p66^{Shc} in condizioni di lunga/severa ischemia e successiva riperfusione potrebbe essere nocivo, come accade nel caso della cardiomiopatia ipertensiva o diabetica (42). Infine, è stato dimostrato che la delezione di p66^{Shc} è in grado di favorire la guarigione di aree di miocardio infartuate, riducendone la fibrosi e la disfunzione contrattile (43).

RUOLO DI P66^{SHC} NEL DANNO VASCOLARE

Anche a livello endoteliale è stato ampiamente confermato il ruolo pro-ossidante della proteina p66^{Shc}, implicata nel meccanismo molecolare di collegamento tra produzione di ROS, invecchiamento dei vasi, disfunzione endoteliale, aterosclerosi e formazione di trombi.

I topi p66^{Shc}^{-/-} sono protetti dalla disfunzione endoteliale causata dall'invecchiamento, a seguito di una ridotta produzione di ROS (44). Ad ulteriore supporto del ruolo cruciale di p66^{Shc} nella disfunzione delle cellule endoteliali, l'iper-espressione di p66^{Shc} inibisce la produzione eNOS-dipendente di ossido nitrico (NO) (45), con conseguenti effetti negativi sulla vasodilatazione endotelio-dipendente.

Lo stress ossidativo è uno dei meccanismi più importanti nell'insorgenza di aterosclerosi (46). Topi *wild-type* nutriti con HFD mostrano un aumento dei livelli di colesterolo sierico e di ROS, responsabili dell'aumentata ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL); queste, legando il loro specifico recettore (lectin-like oxidized LDL receptor-1) sono in grado di incrementare ulteriormente la produzione di ROS a livello endoteliale, determinando disfunzione vascolare e aterosclerosi. In queste condizioni è stata osservata una relazione con l'aumento della fosforilazione in Ser³⁶ di p66^{Shc} nelle cellule endoteliali (47), che viene bloccata dall'inibizione chimica o dal silenziamento genico del recettore delle LDL. Viceversa, il silenziamento di p66^{Shc} impedisce la produzione di ROS indotta dalle LDL ossidate (48). A supporto di questi risultati, topi p66^{Shc}^{-/-} alimentati con HFD hanno mostrato minori livelli di stress ossidativo sistemico e di LDL ossidate nelle pareti arteriose, maggiore resistenza alla aterogenesi e ridotta apoptosi vascolare rispetto ai topi *wild-type* (49-50), confermando ulteriormente il ruolo di p66^{Shc} nella aterogenesi indotta da HFD e mediata da stress ossidativo. Ulteriori studi a supporto della capacità di p66^{Shc} di mediare il danno vascolare indotto dall'HFD includono la dimostrazione del ruolo della ipercolesterolemia nell'aumento dell'espressione di p66^{Shc} in cellule endoteliali umane con conseguente disfunzione dell'endotelio che assume caratteri pro-adesivi e pro-coagulanti (51). Infine, in topi nutriti con HFD, l'ipercolesterolemia induce un fenotipo piastrinico protrombotico, che è significativamente attenuato in topi p66^{Shc}^{-/-} (52).

L'aumentata produzione di ROS indotta dall'iperglicemia è considerata uno dei principali meccanismi che collegano il metabolismo del glucosio alla disfunzione endoteliale e all'aterosclerosi, complicanze vascolari notoriamente associate alla patologia diabetica. Il ruolo di p66^{Shc} nel mediare la disfunzione endoteliale causata dall'iperglicemia è stato recentemente valutato in un modello murino di diabete di tipo 1 indotto da streptozotocina. Topi diabetici *wild-type* mostrano disfunzione endoteliale ROS-dipendente innescata dall'iperglicemia; risultano al contrario resistenti i topi p66^{Shc}^{-/-}, che sono caratterizzati anche da una maggiore espressione endoteliale di enzimi antiossidanti, quali eme ossigenasi 1 (HO-1) ed ossido nitrico sintasi (53). Un dato interessante è che l'espressione di p66^{Shc} è aumentata nell'aorta di topi diabetici *wild-type* rispetto ai topi di controllo normoglicemici, sottolineando così una relazione causale tra i livelli elevati di glicemia e la regolazione dei livelli di espressione della proteina p66^{Shc}.

Sia in seguito a iperlipidemia che nella condizione diabetica si instaura uno stato pro-infiammatorio con produzione di citochine dannose per la funzione vascolare. In cellule endoteliali umane HUVEC è stato dimostrato che la citochina

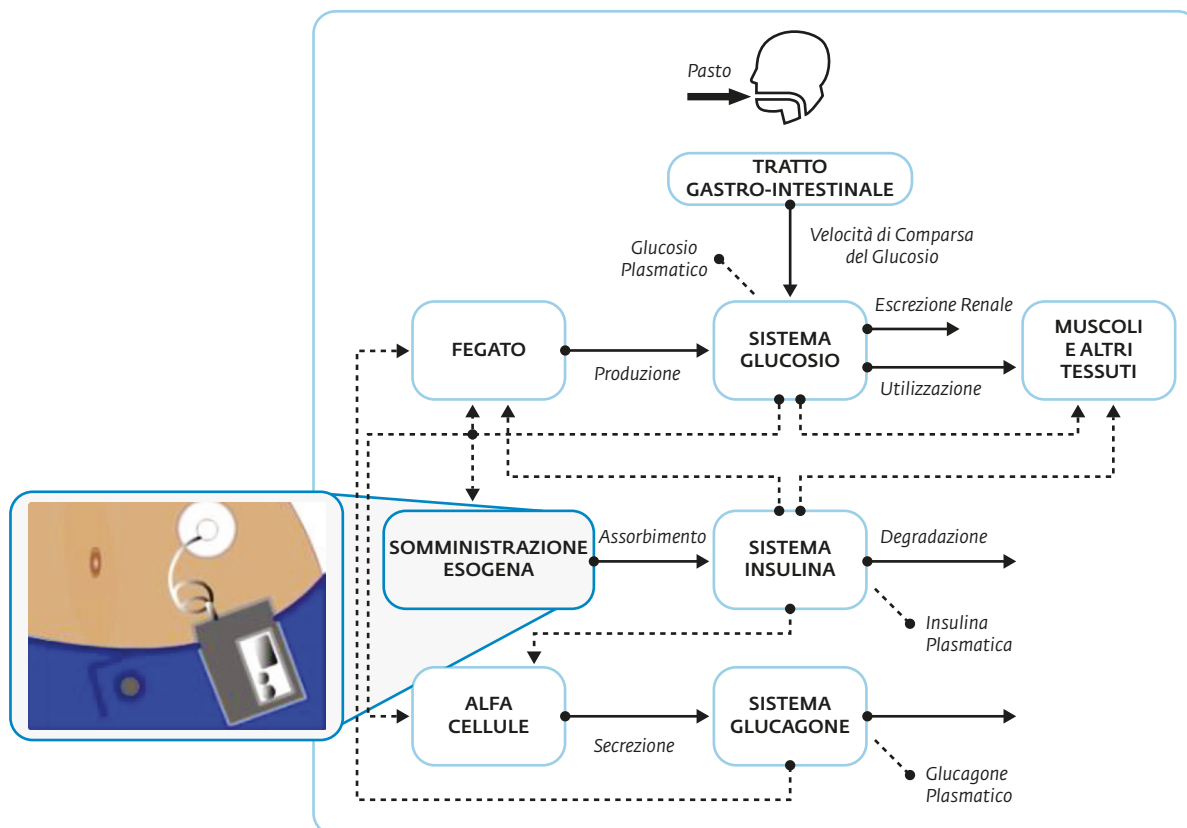
TNF α , una delle più importanti per la genesi della disfunzione endoteliale, attiva la fosforilazione in Ser³⁶ di p66^{Shc}, con conseguente incremento di ROS e dei livelli della proteina E-Selectina; questo si traduce in un aumento della permeabilità dell'endotelio e della tras migrazione leucocitaria attraverso il monostrato delle cellule endoteliali, eventi che portano a danno vascolare e che sono inibiti dal silenziamento genico di p66^{Shc} (54).

Generalmente, lo stadio avanzato di aterosclerosi si caratterizza per la formazione di placche aterosclerotiche. Anche in questo processo è stato dimostrato il ruolo della proteina p66^{Shc}, in quanto la sua delezione previene la formazione di placche in condizioni di ipercolesterolemia (55). L'espressione di p66^{Shc} è risultata aumentata nei monociti provenienti da pazienti con malattia coronarica (CAD, *Coronary Artery Disease*), ed è stata descritta una correlazione diretta tra i livelli di p66^{Shc} e il numero di vasi malati (56). D'altra parte, l'analisi delle mutazioni del gene p66^{Shc} e della sua sequenza promotore in pazienti con CAD (CAD, *Coronary Artery Disease*) non ha evidenziato elementi per una associazione con questa patologia. L'analisi delle sequenze ha riportato infatti solo due SNP eterozigoti non direttamente correlati al coinvolgimento di p66^{Shc} nella suscettibilità alla CAD (57).

CONCLUSIONI

Nel complesso, le evidenze finora riportate e qui discusse dimostrano che la proteina p66^{Shc} svolge un ruolo importante nella mediazione del danno epatico, beta-pancreatico e cardiovascolare indotto principalmente da fattori correlati allo stress ossidativo, quali lipotossicità, glucotossicità ed ischemia/riperfusione, oltre che all'invecchiamento (Fig. 2). Tali evidenze supportano una strategia di intervento mirata ad una modulazione farmacologica dell'espressione e/o

Figura 2 ♦ La proteina p66^{Shc} media il danno a carico del fegato, delle beta-cellule pancreatiche e del sistema cardiovascolare indotto da fattori correlati allo stress ossidativo



dell'attività di p66^{Shc} come obiettivo per il trattamento di patologie correlate allo stress ossidativo e all'*ageing*, fra cui il diabete e le sue complicanze. A tal fine, la generazione di topi knockout per p66^{Shc} tessuto-specifici, a tutt'oggi non ancora disponibili, potrebbe meglio chiarire il ruolo specifico di questa importante proteina in ciascun organo e tessuto.

BIBLIOGRAFIA

1. Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McClade 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(1): 93-104, 1992.
2. Ventura A, Luzi L, Pacini S, Baldari CT, Pelicci PG. The p66Shc longevity gene is silenced through epigenetic modifications of an alternative promoter. *J Biol Chem* 277(25): 22370-22376, 2002.
3. Luzi L, Confalonieri S, Di Fiore PP, Pelicci PG. Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr Opin Genet Dev* 10(6): 668-674, 2000.
4. Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pelicci G, Lai KM, Superti-Furga G, Pawson T, Di Fiore PP, Lanfrancone 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(4): 706-716, 1997.
5. 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(42): 43900-43909, 2004.
6. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, de Bittencourt PI Jr. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J* 473(24): 4527-4550, 2016.
7. Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 17(3): 189-212, 2001.
8. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40(4): 405-412, 1991.
9. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402(6759): 309-313, 1999.
10. 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(3): 116-24, 2011.
11. Natalicchio A, De Stefano F, Perrini S, Laviola L, Cignarelli A, Caccioppoli C, Quagliara A, Melchiorre M, Leonardini A, Conserva A, Giorgino F. Involvement of the p66Shc protein in glucose transport regulation in skeletal muscle myoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(2): E228-37, 2009.
12. Ciciliot S, Albiero M, Menegazzo L, Poncina N, Scattolini V, Danesi A, Pagnin E, Marabita M, Blaauw B, Giorgio M, Trinei M, Foletto M, Prevedello L, Nitti D, Avogaro A, Fadini GP. p66Shc deletion or deficiency protects from obesity but not metabolic dysfunction in mice and humans. *Diabetologia* 58(10): 2352-2360, 2015.
13. Ranieri SC, Fusco S, Panieri E, Labate V, Mele M, Tesori V, Ferrara AM, Maulucci G, De Spirito M, Martorana GE, Galeotti T, Pani G. Mammalian life-span determinant p66shcA mediates obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(30):13420-13425, 2010.
14. 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(12): 2394-2403, 2016.
15. Zhou S, Chen HZ, Wan YZ, Zhang QJ, Wei YS, Huang S, Liu JJ, Lu YB, Zhang ZQ, Yang RF, Zhang R, Cai H, Liu DP, Liang CC. Repression of P66Shc expression by SIRT1 contributes to the prevention of hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Circ Res* 109(6): 639-648, 2011.
16. Menini S, Amadio L, Oddi G, Ricci C, Pesce C, Pugliese F, Giorgio M, Migliaccio E, Pelicci P, Iacobini C, Pugliese G. Deletion of p66Shc longevity gene protects against experimental diabetic glomerulopathy by preventing diabetes-induced oxidative stress. *Diabetes* 55(6): 1642-1650, 2006.

17. Rota M, LeCapitaine N, Hosoda T, Boni A, De Angelis A, Padin-Iruegas ME, Esposito G, Vitale S, Urbanek K, Casarsa C, Giorgio M, Lüscher TF, Pelicci PG, Anversa P, Leri A, Kajstura J. Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene. *Circ Res* 99(1): 42-52, 2006.
18. Fadini GP, Albiero M, Menegazzo L, Boscaro E, Pagnin E, Iori E, Cosma C, Lapolla A, Pengo V, Stendardo M, Agostini C, Pelicci PG, Giorgio M, Avogaro A. The redox enzyme p66Shc contributes to diabetes and ischemia-induced delay in cutaneous wound healing. *Diabetes* 59(9): 2306-2314, 2010.
19. Haga S, Terui K, Fukai M, Oikawa Y, Irani K, Furukawa H, Todo S, Ozaki M. Preventing hypoxia/reoxygenation damage to hepatocytes by p66(shc) ablation: up-regulation of antioxidant and anti-apoptotic proteins. *J Hepatol* 48(3): 422-432, 2008.
20. Yan H, Jihong Y, Feng Z, Xiaomei X, Xiaohan Z, Guangzhi W, Zhenhai M, Dongyan G, Xiaochi M, Qing F, Kexin L, Xiaofeng T. Sirtuin 1-mediated inhibition of p66shc expression alleviates liver ischemia/reperfusion injury. *Crit Care Med* 42(5): e373-81, 2014.
21. Beyer TA, Xu W, Teupser D, auf dem Keller U, Bugnon P, Hildt E, Thiery J, Kan YW, Werner S. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J* 27(1): 212-223, 2008.
22. Perrini S, Tortosa F, Natalicchio A, Pacelli C, Cignarelli A, Palmieri VO, Caccioppoli C, De Stefano F, Porro S, Leonardini A, Ficarella R, De Fazio M, Cocco T, Puglisi F, Laviola L, Palasciano G, Giorgino F. The p66Shc protein controls redox signaling and oxidation-dependent DNA damage in human liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 309(10): G826-840, 2015.
23. Koch OR, Fusco S, Ranieri SC, Maulucci G, Palozza P, Larocca LM, Cravero AA, Farre' SM, De Spirito M, Galeotti T, Pani G. Role of the life span determinant P66(shcA) in ethanol-induced liver damage. *Lab Invest* 88(7): 750-760, 2008.
24. Gao L, Shan W, Zeng W, Hu Y, Wang G, Tian X, Zhang N, Shi X, Zhao Y, Ding C, Zhang F, Liu K, Yao J. Carnosic acid alleviates chronic alcoholic liver injury by regulating the SIRT1/ChREBP and SIRT1/p66shc pathways in rats. *Mol Nutr Food Res* 60(9): 1902-1911, 2016.
25. Wang G, Chen Z, Zhang F, Jing H, Xu W, Ning S, Li Z, Liu K, Yao J, Tian X. Blockade of PKC β protects against remote organ injury induced by intestinal ischemia and reperfusion via a p66shc-mediated mitochondrial apoptotic pathway. *Apoptosis* 19(9): 1342-1353, 2014.
26. Haga S, Morita N, Irani K, Fujiyoshi M, Ogino T, Ozawa T, Ozaki M. p66(Shc) has a pivotal function in impaired liver regeneration in aged mice by a redox-dependent mechanism. *Lab Invest* 90(12): 1718-1726, 2010.
27. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, Nishiyama K, Mataka N, Irie R, Minamino T, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Saito H, Shimizu I, Yoshida Y, Hokari R, Sugiyama K, Hatsuse K, Yamamoto J, Kanai T, Miura S, Hibi T. p53/p66Shc-mediated signaling contributes to the progression of nonalcoholic steatohepatitis in humans and mice. *J Hepatol* 57(4): 837-843, 2012.
28. Shan W, Gao L, Zeng W, Hu Y, Wang G, Li M, Zhou J, Ma X, Tian X, Yao J. Activation of the SIRT1/p66shc antiapoptosis pathway via carnosic acid-induced inhibition of miR-34a protects rats against nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Death Dis* 23; 6: e1833, 2015.
29. Natalicchio A, Tortosa F, Labarbuta R, Biondi G, Marrano N, Carchia E, Leonardini A, Cignarelli A, Bugliani M, Marchetti P, Fadini GP, Giorgio M, Avogaro A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. The p66(Shc) redox adaptor protein is induced by saturated fatty acids and mediates lipotoxicity-induced apoptosis in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 58(6): 1260-1271, 2015.
30. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr* 136(4): 873-876, 2006.
31. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patané G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51(5): 1437-1442, 2002.
32. Gehrman W, Elsner M, Lenzen S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β cells. *Diabetes Obes Metab* 12(Suppl 2): 149-158, 2010.

33. Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO. Insulin signaling in the pancreatic beta-cell. *Annu Rev Nutr* 28: 233-251, 2008.
34. Solinas G, Naugler W, Galimi F, Lee MS, Karin M. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(44): 16454-16459, 2006.
35. Obrezhtchikova M, Elouardighi H, Ho M, Wilson BA, Gertsberg Z, Steinberg SF. Distinct signaling functions for Shc isoforms in the heart. *J Biol Chem* 281(29): 20197-20204, 2006.
36. Guo J, Gertsberg Z, Ozgen N, Steinberg SF. p66Shc links α 1-adrenergic receptors to a reactive oxygen species-dependent AKT-FOXO3A phosphorylation pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 104(5): 660-669, 2009.
37. Graiani G, Lagrasta C, Migliaccio E, Spillmann F, Meloni M, Madeddu P, Quaini F, Padura IM, Lanfrancone L, Pelicci P, Emanuelli C. Genetic deletion of the p66Shc adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage. *Hypertension* 46(2): 433-440, 2005.
38. Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, Beltrami AP, Hintze TH, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 89(3): 279-286, 2001.
39. Wang Y, Zhao J, Yang W, Bi Y, Chi J, Tian J, Li W. High-dose alcohol induces reactive oxygen species-mediated apoptosis via PKC- β /p66Shc in mouse primary cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 456(2): 656-661, 2015.
40. Carpi A, Menabò R, Kaludercic N, Pelicci P, Di Lisa F, Giorgio M. The cardioprotective effects elicited by p66(Shc) ablation demonstrate the crucial role of mitochondrial ROS formation in ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta* 1787(7): 774-780, 2009.
41. Akhmedov A, Montecucco F, Braunersreuther V, Camici GG, Jakob P, Reiner MF, Glanzmann M, Burger F, Paneni F, Galan K, Pelli G, Vuilleumier N, Belin A, Vallée JP, Mach F, Lüscher TF. Genetic deletion of the adaptor protein p66Shc increases susceptibility to short-term ischaemic myocardial injury via intracellular salvage pathways. *Eur Heart J* 36(8): 516-526a, 2015.
42. Di Lisa F, Giorgio M, Ferdinandy P, Schulz R. New aspects of p66Shc in ischaemia reperfusion injury and other cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol* 174(12): 1690-1703, 2017.
43. Baysa A, Sagave J, Carpi A, Zaglia T, Campesan M, Dahl CP, Bilbija D, Troitskaya M, Gullestad L, Giorgio M, Mongillo M, Di Lisa F, Vaage JL, Valen G. The p66ShcA adaptor protein regulates healing after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 110(2): 13, 2015.
44. Francia P, delli Gatti C, Bachschmid M, Martin-Padura I, Savoia C, Migliaccio E, Pelicci PG, Schiavoni M, Lüscher TF, Volpe M, Cosentino F. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation* 110(18): 2889-2895, 2004.
45. Yamamori T, White AR, Mattagajasingh I, Khanday FA, Haile A, Qi B, Jeon BH, Bugayenko A, Kasuno K, Berkowitz DE, Irani K. P66shc regulates endothelial NO production and endothelium-dependent vasorelaxation: implications for age-associated vascular dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 39(6): 992-995, 2005.
46. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res* 120(4): 713-735, 2017.
47. Shi Y, Lüscher TF, Camici GG. Dual role of endothelial nitric oxide synthase in oxidized LDL-induced, p66Shc-mediated oxidative stress in cultured human endothelial cells. *PLoS One* 9(9): e107787, 2014.
48. Shi Y, Cosentino F, Camici GG, Akhmedov A, Vanhoutte PM, Tanner FC, Lüscher TF. Oxidized low-density lipoprotein activates p66Shc via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, protein kinase C- β , and c-Jun N-terminal kinase kinase in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(9): 2090-2097, 2011.
49. Napoli C, Martin-Padura I, de Nigris F, Giorgio M, Mansueto G, Somma P, Condorelli M, Sica G, De Rosa G, Pelicci P. Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4): 2112-2116, 2003.
50. Vikram A, Kim YR, Kumar S, Naqvi A, Hoffman TA, Kumar A, Miller FJ Jr, Kim CS, Irani K. Canonical Wnt signaling induces vascular endothelial dysfunction via p66Shc-regulated reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(10): 2301-2309, 2014.

51. Kim YR, Kim CS, Naqvi A, Kumar A, Kumar S, Hoffman TA, Irani K. Epigenetic upregulation of p66shc mediates low-density lipoprotein cholesterol-induced endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303(2): H189-196, 2012.
52. Kumar S, Vikram A, Kim YR, S Jacobs J, Irani K. P66Shc mediates increased platelet activation and aggregation in hypercholesterolemia. *Biochem Biophys Res Commun* 449(4): 496-501, 2014.
53. Camici GG, Schiavoni M, Francia P, Bachschmid M, Martin-Padura I, Hersberger M, Tanner FC, Pelicci P, Volpe M, Anversa P, Luscher TF, Cosentino F. Genetic deletion of p66(Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(12): 5217-5222, 2007.
54. Laviola L, Orlando MR, Incalza MA, Caccioppoli C, Melchiorre M, Leonardini A, Cignarelli A, Tortosa F, Labarbuta R, Martemucci S, Pacelli C, Cocco T, Perrini S, Natalicchio A, Giorgino F. TNF α signals via p66(Shc) to induce E-Selectin, promote leukocyte transmigration and enhance permeability in human endothelial cells. *PLoS One* 8(12): e81930, 2013.
55. Martin-Padura I, de Nigris F, Migliaccio E, Mansueto G, Minardi S, Rienzo M, Lerman LO, Stendardo M, Giorgio M, De Rosa G, Pelicci PG, Napoli C. p66Shc deletion confers vascular protection in advanced atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E knockout mice. *Endothelium* 15(5-6): 276-287, 2008.
56. Sentinelli F, Romeo S, Barbetti F, Berni A, Filippi E, Fanelli M, Fallarino M, Baroni MG. Search for genetic variants in the p66Shc longevity gene by PCR-single strand conformational polymorphism in patients with early-onset cardiovascular disease. *BMC Genet* 7: 14, 2006.
57. Noda Y, Yamagishi S, Matsui T, Ueda S, Ueda S, Jinnouchi Y, Hirai Y, Imaizumi T. The p66shc gene expression in peripheral blood monocytes is increased in patients with coronary artery disease. *Clin Cardiol* 33(9): 548-552, 2010.