



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL
FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN CHIMICA E
TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

NAMPT (nicotinammide fosforibosiltransferasi) come
possibile bersaglio molecolare nella terapia del
glioblastoma multiforme

Relatore: *Prof.ssa Mayra Paolillo*

Correlatore: *Prof.ssa Cristina Travelli*

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di
Angelica Mancassola

Anno Accademico 2023/2024

Sommario

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Glioblastoma multiforme	1
1.1.1 Epidemiologia	1
1.1.2 Eziologia	2
1.1.3 Aspetti clinici	4
1.1.4 Diagnosi	4
1.1.5 Terapia	5
1.1.6 Sfide relative al trattamento	8
1.1.7 Cellule staminali tumorali	10
1.2 NAMPT (nicotinammide fosforibosiltransferasi)	12
1.2.1 Caratteristiche e biosintesi di NAD ⁺	13
1.2.2 Struttura di NAMPT	15
1.2.3 iNAMPT ed eNAMPT	16
2. SCOPO DELLA TESI	18
3. MATERIALI E METODI	18
3.1 Linee cellulari	18
3.1.1 Crescita e mantenimento delle culture cellulari	19
3.1.2 Conta cellulare	21
3.2 Estrazione delle proteine dalle colture cellulari	22
3.3 Dosaggio di Bradford	23
3.4 Western blot	25
3.5 Estrazione di RNA	28
3.6 Dosaggio di RNA	29
3.7 Real-time PCR quantitativa	30
3.8 Saggio di vitalità cellulare (MTS)	32
3.9 Inibizione di iNAMPT	34
3.10 Inibitori di NAMPT	34
3.11 Immunocitochimica	38
4. RISULTATI	41
4.1 Espressione di NAMPT mRNA mediante q-PCR	41

4.2 Espressione di NAMPT proteina mediante Western Blot	43
4.3 Diminuzione della vitalità cellulare in seguito al trattamento con gli inibitori di NAMPT	45
4.4 Visualizzazione di NAMPT all'interno delle cellule mediante ICC	47
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE.....	49
6. BIBLIOGRAFIA	52

1. INTRODUZIONE

1.1 Glioblastoma multiforme

1.1.1 Epidemiologia

I gliomi sono i più comuni tumori cerebrali del sistema nervoso centrale (SNC) negli adulti e hanno origine da cellule gliali come astrociti, oligodendrociti e cellule ependimali.¹ Sulla base di criteri isto-molecolari, i gliomi sono classificati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) in diverse categorie: Astrocitoma, IDH-mutato (enzima isocitrato deidrogenasi mutato) di grado 2,3,4; Oligodendroglioma, IDH-mutato e 1p/19q codeleto e Glioblastoma IDH-*wildtype*.²

L'astrocitoma, IDH-mutato di grado 2 si manifesta con un aspetto infiltrante, istopatologicamente ben differenziato, senza segni indicativi di anaplasia (atipie nucleari), dotato di attività mitotica nulla o scarsa e privo di proliferazioni microvascolari e necrosi.

L'astrocitoma, IDH-mutato di grado 3 presenta le stesse caratteristiche dell'astrocitoma di grado 2, tranne per il maggior affollamento cellulare, presenza di atipie nucleari e la capacità di attività mitotica.

L'astrocitoma, IDH-mutato di grado 4 possiede proliferazioni microvascolari e necrosi.

L'oligodendroglioma, IDH-mutato e 1p/19q codeleto può essere associato a grado 2 o grado 3.

Il Glioblastoma IDH-*wildtype* (glioblastoma multiforme) è per definizione di grado 4, si manifesta come neoplasia gliale di aspetto diffusamente infiltrante, che presenta: proliferazioni microvascolari, necrosi, mutazione del promotore del gene *TERT*, amplificazione del gene *EGFR*, guadagno del cromosoma 7 e delezione del cromosoma 10. Si pensa che le mutazioni del promotore *TERT* promuovano la crescita del tumore, mentre l'amplificazione di *EGFR* porta a un aumento della segnalazione pro-

sopravvivenza e pro-divisione cellulare. Si conosce molto meno la funzione del cromosoma 7 aggiunto e della perdita del cromosoma 10.²

Il Glioblastoma Multiforme (GBM) è la forma più aggressiva di tumore maligno al cervello: rappresenta il 14,5% di tutti i tumori del sistema nervoso centrale (SNC) e il 48,6% dei tumori maligni relativi a questo.^{1,3}

Negli ultimi decenni sono stati ottenuti pochi progressi terapeutici, i tassi di sopravvivenza sono del 27% a due anni e del 10% a 5 anni dalla diagnosi.¹

La sopravvivenza media complessiva è di circa 15 mesi.³

Il glioblastoma multiforme si riscontra tipicamente nelle persone di età superiore ai 60 anni.⁴

L'incidenza del GBM è difficile da definire, aumenta con l'età ed è maggiore negli uomini rispetto alle donne⁵, varia da 3,19 a 4,17 casi ogni 100.000 persone all'anno. L'incidenza nella popolazione pediatrica (0-18 anni) rappresenta il 3-15% dei tumori cerebrali primari, è il più comune tra i tumori solidi nei bambini.³

La diffusione del tumore oltre il SNC è rara, le sedi più comuni di metastasi extra-craniche sono i polmoni e la pleura.⁵

Sebbene i GBM si verifichino quasi esclusivamente nel cervello, possono anche comparire nel tronco encefalico, nel cervelletto e nel midollo spinale. Il 61% di tutti i gliomi primari si manifesta nei quattro lobi del cervello: frontale (25%), temporale (20%), parietale (13%) e occipitale (3%).⁶

1.1.2 Eziologia

I Glioblastomi possono essere classificati come primari o *de novo* qualora insorgano senza un precursore noto, oppure come secondari se un tumore di basso grado si trasforma nel tempo in GBM. La maggior parte dei glioblastomi sono primari e questi pazienti sono generalmente più anziani e manifestano una prognosi peggiore rispetto ai pazienti con GBM secondari.

Le alterazioni genetiche tipiche del GBM primario sono la sovraespressione del fattore di crescita epidermico (*EGFR*), le mutazioni del fosfato e tensina

omologo (PTEN) e la perdita del cromosoma *10q*. Nel GBM secondario si osservano frequentemente mutazioni dell'isocitrato deidrogenasi I (IDH I), mutazioni di p53 e la perdita del cromosoma 19q.⁶

Sulla base dei loro marcatori genetici ed epigenetici, i GBM sono stati precedentemente classificati dal *Cancer Genome Atlas* (TCGA) in quattro sottogruppi: mesenchimali, classici, proneurali e neurali.

I GBM mesenchimali sono caratterizzati dalla mutazione del gene oncosoppressore della neurofibromina 1 (NF1) e da frequenti mutazioni nei geni oncosoppressori PTEN e TP53.

Il sottotipo classico è altamente proliferativo e caratterizzato dall'amplificazione dell'EGFR, ma non dalla mutazione di TP53. Il GBM proneurale è frequentemente associato alla mutazione di TP53 e in modo univoco alle mutazioni di IDH1 e PDGFRA.

I sottotipi mesenchimale e classico sono tipicamente tumori più aggressivi, mentre il sottotipo proneurale è meno aggressivo e più spesso riscontrato in pazienti più giovani. La transizione del fenotipo proneurale-mesenchimale è associata alla resistenza del GBM. Sebbene il TCGA abbia categorizzato il GBM in quattro sottogruppi, studi recenti mostrano che diversi sottogruppi di GBM variano spazialmente e temporalmente all'interno dello stesso tumore.⁷

I fattori che dimostrano un aumento del rischio di sviluppo di glioma sono le radiazioni ionizzanti, ulteriori variabili si osservano in alcune malattie genetiche specifiche, come la neurofibromatosi 1 e 2, la sclerosi tuberosa, la sindrome di Li-Fraumeni, il retinoblastoma e la sindrome di Turcot; tuttavia, meno dell'1% dei pazienti con glioma presenta una malattia ereditaria nota.⁶

Altri elementi come il fumo, i fattori di rischio nutrizionali, i campi elettromagnetici dei telefoni cellulari, gravi lesioni alla testa, i fattori di rischio occupazionale e l'esposizione ai pesticidi, non sono state collegate in modo conclusivo al GBM. Secondo alcuni studi, lo sviluppo del GBM potrebbe essere influenzato dagli ormoni steroidei ovarici. Inoltre, si pensa che le allergie e le infezioni proteggono dal GBM attivando meccanismi di sorveglianza

immunitaria. Secondo una meta-analisi del 2007, i soggetti con allergie presentano un rischio inferiore del 40% di contrarre gliomi rispetto a quelli senza allergie. È stato scoperto che i gliomi sono ereditari, ma il gene di suscettibilità è ancora sconosciuto. Sono stati identificati solo il 5-10% dei casi con predisposizione genetica.⁴

1.1.3 Aspetti clinici

I sintomi che si manifestano in pazienti affetti da GBM sono l'aumento della pressione intracranica, tra cui mal di testa e deficit neurologici focali o progressivi. La crisi epilettica è il sintomo iniziale in circa il 25% dei pazienti e può verificarsi in una fase successiva della malattia in circa il 50% dei pazienti. A molti vengono prescritti corticosteroidi al momento della diagnosi per aiutarli a controllare l'edema vasogenico e ad alleviare i segni e i sintomi concomitanti.⁶

1.1.4 Diagnosi

Le due tecniche per effettuare *l'imaging* diagnostico iniziale sono la tomografia computerizzata (TC) o la risonanza magnetica (RM).⁶ Quest'ultima, grazie alla sua elevata risoluzione, può chiarire molti aspetti come i margini del tumore, i vasi sanguigni nel tumore, la necrosi, l'emorragia e la perfusione sanguigna.

L'imaging a fluorescenza intraoperatoria e la risonanza magnetica sono strumenti utili per gestire le problematiche legate allo "spostamento cerebrale". Quest'ultimo causa discrepanze durante l'intervento chirurgico creando ostacoli nell'individuazione della posizione esatta del tumore, può generare differenze tra le posizioni del tumore e le strutture cerebrali critiche negli studi di *imaging* preoperatori e in sala operatoria. Alcuni spostamenti possono essere fino a 2 cm di distanza e derivano da cause che possono essere fisiche (posizione del paziente o gravità), chirurgiche (tipo di apparecchiatura utilizzata, perdita di tessuti/fluidi durante la procedura) o biologiche (tipo o posizione del tumore e farmaci utilizzati per gestire la pressione intracranica).

L'aumento della durata dell'intervento chirurgico può intensificare questi spostamenti.⁴

L'imaging a fluorescenza consiste nel somministrare al paziente per via orale, 24 ore prima dell'intervento una fluorescenza oncologica: l'acido 5-ammino-levulinico (5-ALA). 5-ALA è un precursore della sintesi di emoglobina quindi porta all'accumulo di porfirine fluorescenti in particolare di protoporfirina IX nel GBM che lo illumina con una colorazione rossa/rosa.

Con questo metodo le cellule tumorali vengono rilevate con maggiore facilità in campo chirurgico.

La diagnosi definitiva si basa su analisi istopatologiche del tumore rimosso utilizzando metodi istologici, citologici e istochimici tradizionali.⁵

1.1.5 Terapia

La terapia standard per il GBM comprende la resezione chirurgica seguita da chemioradioterapia, utilizzando Temozolomide (TMZ).⁷

Dopo la resezione chirurgica si procede con radioterapia e chemioterapia, viene somministrata Temozolomide (TMZ) concomitante per via orale ad una concentrazione di 75 mg/m² per 6 settimane e contemporaneamente si procede con la radioterapia erogando un totale di 60 Gray (Gy) in 30 sedute, effettuate 5 giorni alla settimana per 6 settimane. A seguito di tutto ciò, viene somministrata Temozolomide adiuvante alla dose di 150 mg/m² per 5 giorni ogni 28 giorni, per un totale di 6 cicli.⁶

La radioterapia con raggi X conferisce un basso trasferimento di energia lineare che si traduce in danni biologici sia diretti che indiretti. Il danno diretto al DNA costituisce circa un terzo dell'effetto del trattamento e gli effetti indiretti (la ionizzazione dell'acqua per produrre radicali liberi che danneggiano il DNA), costituiscono circa due terzi.

Vengono utilizzate diversi tipi di RT:

RT conforme 3D: colpisce la maggior parte delle cellule di GBM residue che non possono essere rimosse con l'intervento chirurgico, risparmiando il tessuto cerebrale sano e di conseguenza minimizzando gli effetti collaterali cognitivi. RT a intensità modulata: utilizza collimatori multi-laminati, può ridistribuire le radiazioni ionizzanti sul bersaglio a seconda della sua posizione e sensibilità. Questa strategia impiega diversi fasci collimati per evitare lesioni a strutture critiche, tra cui la cornea, i nervi ottici e il tronco encefalico.

Radiochirurgia stereotassica (SRS): vengono erogati più fasci di radiazioni convergenti e non paralleli. La dose viene somministrata in meno frazioni e a dosi più elevate. La radiazione gamma deriva da una sorgente di cobalto-60 ed è diretta al tumore tramite collimatori. Le proprietà di trasferimento del calore dei raggi gamma consentono di erogare dosi elevate di radiazioni in modo molto specifico al bersaglio del tumore risparmiando i tessuti sani adiacenti. Queste 3 tipologie di radioterapia agiscono con lo stesso meccanismo d'azione: creano rotture del doppio filamento di DNA e ROS.

La radioterapia risulta meno efficace in condizioni di ipossia tumorale, poiché l'ossigeno è necessario per reagire con i radicali liberi e provocare danni cellulari irreversibili. In un ambiente povero di ossigeno, invece, il DNA danneggiato ha più tempo per ripararsi, riducendo così l'effetto delle radiazioni.⁷

La Temozolomide (3,4-diidro-3-metil-4-ossimidazo-1,2,3,5-tetrazin-8-carbossammide) è un farmaco chemioterapico di prima linea approvato nel 1999 dall'FDA per il trattamento del GBM.⁵

La Temozolomide è una mostarda azotata, un agente alchilante del DNA che danneggia direttamente i tumori metilando le basi puriniche del DNA. L'azione citotossica è determinata dall'aggiunta di gruppi metilici ai siti N7 e O6 delle guanine e al sito O3 delle adenine nel DNA genomico.⁸ L'effetto citotossico principale della TMZ deriva dalla formazione di lesioni a carico della 6-metilguanina, che inducono apoptosi, autofagia e senescenza nelle cellule tumorali.⁴

Inoltre, TMZ presenta proprietà di sensibilizzazione alle radiazioni, dunque somministrata in concomitanza con la radioterapia, il farmaco incrementa la probabilità di rotture a doppio filamento del DNA indotte dalle radiazioni, favorendo così la morte cellulare.⁷

Un meccanismo di resistenza alla Temozolomide è causato dalla metilazione del promotore del gene che codifica per metilguanina metiltransferasi (MGMT). MGMT è un enzima coinvolto nei processi di riparazione del DNA che contrastano la mutagenesi da agenti alchilanti. Livelli elevati di MGMT nelle cellule tumorali portano ad un fenotipo resistente agli agenti alchilanti ed è probabile che MGMT svolga un ruolo importante nel fallimento terapeutico. Il silenziamento epigenetico del gene MGMT provoca la perdita di espressione di MGMT e la diminuzione dell'attività di riparazione del DNA. La metilazione del promotore è stata anche associata a una sopravvivenza complessiva più lunga nei pazienti con glioblastoma trattati con TMZ.⁹

I pazienti che hanno ricevuto TMZ e RT mostrano una sopravvivenza media di 14,6 mesi rispetto ai 12,1 mesi con la sola RT.⁶

L'effetto collaterale più comune della TMZ è la tossicità ematologica. La trombocitopenia è stata identificata nel 10-20% dei pazienti. Le tossicità non ematologiche sono meno comuni e includono nausea, anoressia, affaticamento ed epatotossicità.

Sono stati studiati altri farmaci nitrosoureici: Carmustina e Lomustina.

La Carmustina è un derivato di mostarda azotata ed un agente alchilante, induce legami crociati tra le basi guanina e citosina del DNA.⁷ Alcune problematiche del farmaco come la breve emivita, la bassa concentrazione intratumorale, la difficoltà nell'attraversamento attraverso la barriera ematoencefalica e le tossicità sistemiche sono stati ritenuti fattori limitanti per un uso diffuso.¹⁰

Per affrontare questi problemi, la Carmustina viene somministrata tramite dei *wafers Gliadel*, i quali sono dischi biodegradabili approvati dalla FDA che vengono inseriti tramite un'operazione chirurgica nella cavità di resezione per favorire un lento rilascio del farmaco nell'arco di due settimane. Gli effetti

terapeutici alchilanti della Carmustina possono essere inibiti dall'enzima alchil guanina transferasi (AGT). Pertanto, viene talvolta utilizzata insieme agli inibitori di AGT per garantire l'efficacia terapeutica. Gli effetti collaterali includono una guarigione anomala delle ferite e infezioni intracraniche poiché i wafer si presentano come corpi estranei.

Un altro farmaco antitumorale alchilante è la Lomustina, grazie alla sua elevata lipofilia e alle piccole dimensioni può attraversare la barriera emato-encefalica; quindi, può essere somministrata per via orale.

Per quanto riguarda la terapia anti-angiogenica consideriamo Bevacizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato, viene somministrato per via endovenosa. Il suo meccanismo d'azione consiste nel legarsi ed inibire il fattore di crescita endoteliale vascolare A (VEGF-A), che avvia la crescita di nuovi vasi sanguigni quando si lega al suo recettore. Si stima che i livelli di VEGF-A nel GBM siano circa 30 volte superiori rispetto agli astrocitomi di basso grado, rendendolo un bersaglio terapeutico interessante. Bevacizumab non apporta un beneficio significativo alla sopravvivenza globale nei pazienti con glioblastoma di nuova diagnosi. Viene utilizzato prevalentemente per trattare glioblastomi ricorrenti. Gli effetti collaterali più comuni sono ipertensione e leucopenia.⁷

1.1.6 Sfide relative al trattamento

Quasi tutti i tumori GBM sono resistenti ai trattamenti convenzionali come chemioterapia e radioterapia, nella maggioranza dei casi recidivano localmente dopo il trattamento. Ci sono diverse sfide nel trattamento del GBM e nella somministrazione dei farmaci al sito di azione. Le sfide in corso per il trattamento del GBM includono la sua resezione incompleta, la barriera ematoencefalica (BBB), l'eterogeneità intertumorale, intratumorale e il microambiente immunosoppressivo.^{4,7}

La resezione chirurgica completa del GBM è difficile perché questi tumori sono spesso invasivi, non presentano un margine chiaro e si trovano spesso in aree

eloquenti del cervello, comprese le aree che controllano la parola, la funzione motoria e i sensi. Le cellule tumorali infiltranti rimangono all'interno del cervello circostante, portando a una progressione o recidiva della malattia.⁶

Un'altra sfida per il trattamento del glioblastoma è la barriera ematoencefalica (BBB), quest'ultima è un confine protettivo tra il sistema circolatorio e lo spazio extracellulare del sistema nervoso centrale. La BBB è composta principalmente da cellule endoteliali che formano una barriera stretta lungo la parete dei vasi sanguigni e limitano selettivamente i composti che possono attraversare il parenchima. Le giunzioni strette sono di dimensioni inferiori a 1 nm e impediscono la penetrazione di piccole molecole di una percentuale superiore al 98%.⁷ Grazie all'intervento di proteine come la glicoproteina P (P-gp) e le proteine di resistenza multifarmaco (MDRP), la BBB inibisce anche l'ingresso di farmaci e riduce l'accumulo di farmaci nel cervello, rendendo così inefficace la terapia.⁴ A differenza del tessuto cerebrale sano, la BBB nel GBM mostra una migliore permeabilità a causa di vasi sanguigni malformati e permeabili, una sovraregolazione delle proteine trasportatrici e una sottoespressione delle proteine delle giunzioni strette. Tuttavia, la barriera emato-encefalica non è uniforme all'interno di un tumore, le giunzioni strette vengono interrotte dalla formazione di nuove vascolarizzazioni.^{4,7} I pazienti con GBM hanno una rottura della BBB variabile ed eterogenea e regioni della BBB intatte, ciò limita il passaggio di un farmaco attraverso la barriera e il raggiungimento del sito del tumore. L'edema cerebrale vasogenico determina un aumento della pressione intracranica con perdita di BBB, l'aumento della pressione riduce la diffusione passiva dei farmaci. Queste condizioni di scarsa perfusione sanguigna, elevato fluido interstiziale intratumorale, interruzione variabile della BBB e meccanismi di resistenza attiva ai farmaci determinano una scarsa efficacia terapeutica nel GBM.⁴ Anche se un farmaco chemioterapico riuscisse a superarla, spesso non riuscirebbe a raggiungere livelli terapeutici nelle cellule tumorali a causa della sovraregolazione delle pompe di efflusso da parte delle cellule di glioblastoma.⁷

Una delle sfide più grandi nel trattamento del GBM è l'eterogeneità intertumorale, che si riferisce al fatto che diverse regioni all'interno di un singolo tumore GBM possono avere profili molecolari e genetici diversi. Questa eterogeneità rende difficile sviluppare trattamenti efficaci che colpiscano tutte le regioni del tumore. Le cause dell'eterogeneità intertumorale nel GBM sono la presenza di cellule staminali cancerose e il microambiente all'interno del cervello.⁴

Un'altra sfida è l'eterogeneità intratumorale, ossia diverse cellule all'interno di un singolo tumore GBM possono avere profili molecolari e genetici diversi. Questa eterogeneità rende difficile sviluppare trattamenti efficaci che colpiscano tutte le cellule all'interno del tumore. Può derivare da molteplici cambiamenti genetici ed epigenetici, come mutazioni, delezioni e amplificazioni di geni, che possono verificarsi durante l'evoluzione del tumore.⁴

Il GBM è privo di infiltrazione preesistente di cellule T tumorali, il che porta a una resistenza del tumore al sistema immunitario. Questi tumori sono ulteriormente caratterizzati dalla mancanza di antigeni tumorali, da difetti nella presentazione degli antigeni e dall'alta accumulazione di cellule immunosoppressive.⁷

1.1.7 Cellule staminali tumorali

I tumori maligni, incluso il glioblastoma, sono costituiti da diversi tipi di cellule, come cellule cancerose, cellule stromali, cellule endoteliali e cellule immunitarie. Le cellule cancerose proliferano attivamente, accumulano mutazioni e formano cloni geneticamente diversi contribuendo ad aumentare la diversità cellulare del tumore. Inoltre, sotto l'influenza di stimoli provenienti dal microambiente, si verificano cambiamenti epigenetici nelle singole cellule tumorali. Questo processo genera una significativa eterogeneità delle cellule tumorali, specifiche per ogni paziente e per ogni sito di crescita del tumore.¹¹

Le cellule staminali tumorali (CSC) sono una sottopopolazione minore di cellule maligne auto-rinnovabili che mantengono un livello basso ma costante di proliferazione illimitata. La proliferazione illimitata mantiene il tumore, ma la rapida crescita dipende dalla progenie in rapida divisione delle CSC. La bassa attività mitotica delle CSC le protegge dagli approcci terapeutici diretti contro le cellule in divisione attiva. Pertanto, le CSC possono sopravvivere al trattamento e dare origine a recidive. La bassa attività proliferativa, la bassa abbondanza all'interno del tumore, la resistenza al trattamento e l'associazione tra CSC e recidiva tumorale sono accettate come caratteristiche generali delle cellule staminali cancerose. Queste caratteristiche sono state dimostrate nelle cellule staminali gliali (GSC) nel glioblastoma.

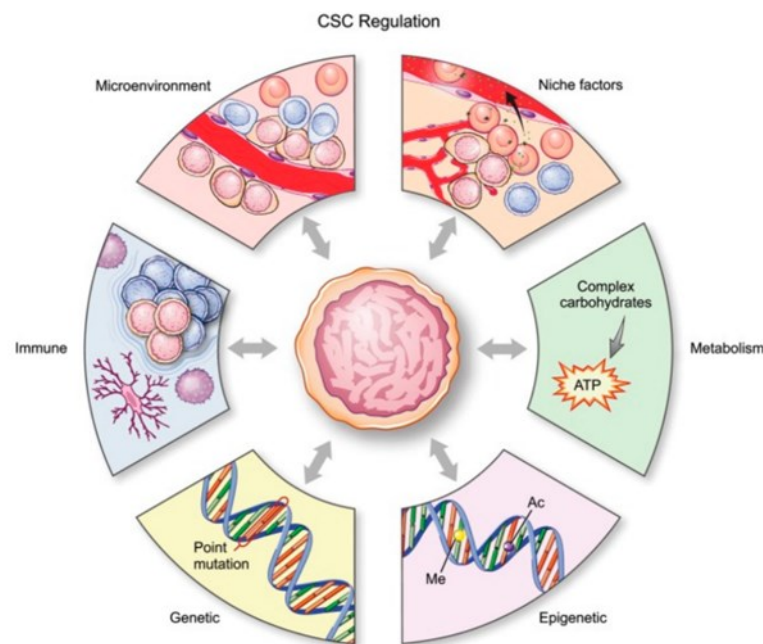


Figura 1: Caratteristiche delle GSC

Il microambiente tumorale (TME) è costituito da tutti gli elementi non maligni presenti nel tumore che mantengono, supportano o ostacolano l'evoluzione del tumore. Le cellule staminali possono interagire con il microambiente tumorale, promuovendo così la crescita del tumore e il microambiente può contribuire alla generazione di cellule staminali.¹²

Le GSC sono ritenute responsabili per le recidive del glioblastoma e la sua resistenza alla terapia, a causa dei loro meccanismi di riparazione del DNA e alle strategie di elusione del sistema immunitario.¹³ Promuovono la proliferazione endoteliale attraverso la produzione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), l'angiogenesi e la trans-differenziazione delle GSC in periciti, i quali sostengono i vasi sanguigni, inoltre favoriscono la differenziazione M2 dei macrofagi associati al glioma (GAM) attraverso la secrezione di periostina, che aumenta la crescita del tumore tramite l'integrina $\alpha\text{v}\beta 3$. Allo stesso modo, i neutrofili associati al tumore e le cellule soppressorie derivate dai mieloidi promuovono la progressione del GBM. Al contrario, le cellule dendritiche presentano antigeni ai linfociti T, inducendo una risposta immunitaria specifica per l'antigene contro la neoplasia, inoltre regolano anche l'equilibrio tra reazioni immunitarie infiammatorie e inibitorie. Le GSC contribuiscono all'ambiente immunosoppressivo dei gliomi inibendo l'attivazione dei linfociti T citotossici, innescando l'apoptosi in essi e attivando i linfociti T regolatori.

I geni più comunemente mutati nel glioblastoma sono stati segnalati per la prima volta da *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) *Research Network* nel 2008 e poi aggiornati nel 2014. I geni più comunemente mutati nel GBM sono:

TP53: promuove la migrazione e l'autorinnovamento delle GSC

PTEN: induce un fenotipo maligno nelle cellule staminali neurali

NF1: favorisce la trasformazione maligna in glioma nelle cellule progenitrici degli oligodendrociti.

EGFR: mantiene le GSC attraverso il percorso AKT (proteina chinasi B).

IDH1: l'espressione è correlata al fenotipo aggressivo nelle GSC.¹²

1.2 NAMPT (nicotinammide fosforibosiltransferasi)

La nicotinammide fosforibosil transferasi (NAMPT) è l'enzima limitante del percorso di recupero del NAD^+ ed è la principale fonte di NAD^+ nelle cellule

viventi, contribuendo in modo determinante al mantenimento, al riciclaggio e all'omeostasi del NAD^+ .¹⁴ Agisce anche come modulatore citochinico delle risposte infiammatorie, metaboliche e immunitarie.

Livelli aumentati di NAMPT sono stati riscontrati sia in neoplasie ematologiche che in vari tumori solidi, tra cui colon, prostata, seno, tiroide, stomaco e glioblastoma: pertanto è stato classificato come oncogene. L'enzima è in grado di aumentare le proprietà tumorigeniche delle cellule, come la proliferazione cellulare, la formazione di cloni e la resistenza all'apoptosi, consentendo così l'inizio e la progressione del tumore.¹⁵

1.2.1 Caratteristiche e biosintesi di NAD^+

NAD^+ è un importante metabolita nell'omeostasi cellulare che agisce come cofattore essenziale nelle reazioni di ossidoriduzione (redox) in vari processi di produzione di energia, come il ciclo di Krebs, l'ossidazione degli acidi grassi, la glicolisi e la biosintesi della serina. Inoltre, alti livelli di NAD^+ sono richiesti poiché esso partecipa a molti altri processi molecolari non redox, come la riparazione del DNA, le modifiche post-traduzionali, la segnalazione cellulare, la senescenza, le risposte infiammatorie e l'apoptosi.¹⁵

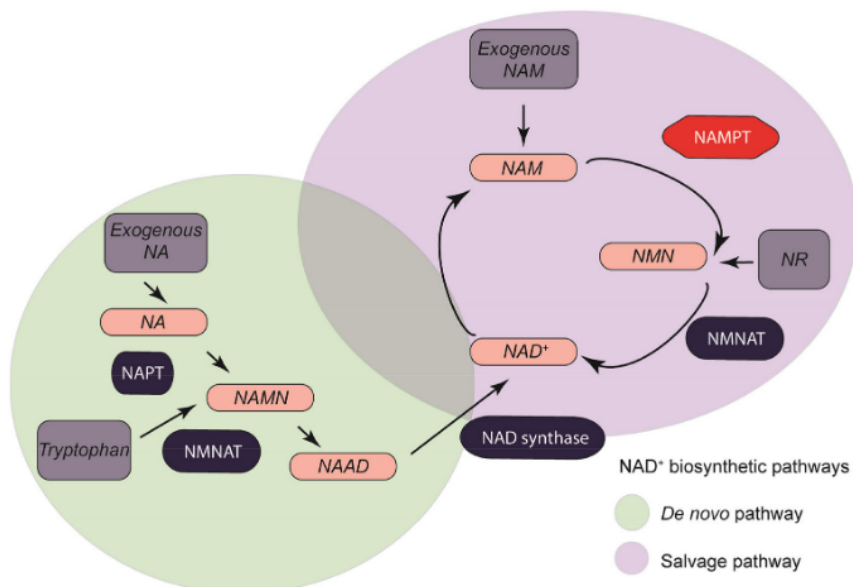


Figura 2: vie di sintesi del NAD^+

Il NAD può essere sintetizzato attraverso 3 vie principali: *De Novo Pathway*, *Salvage Pathway* e *Preiss-Handler pathway*. Nel percorso *de novo*, il triptofano, introdotto con la dieta, viene prima convertito in acido chinolinico (QA) attraverso una serie di passaggi; il QA viene convertito in mononucleotide dell'acido nicotinico (NAMN) tramite la chinolinato fosforibosiltransferasi (QPRT) e viene quindi convertito in NAD^+ tramite la nicotinammide nucleotide adenililtransferasi (NMNAT) e la NAD sintetasi (NADS). Durante il *Preiss-Handler pathway* l'acido nicotinico (NA) viene convertito in NAMN tramite il nicotinato fosforibosiltransferasi (NAPRT), un enzima ampiamente espresso nei tessuti normali ma non sempre espresso nelle cellule tumorali. NAMN viene quindi convertito in NAD^+ tramite l'attività di NMNAT e NADS, come nel pathway *de novo*.

Attraverso la *salvage pathway*, la nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT) converte la nicotinammide (NAM) in nicotinammide mononucleotide (NMN), che viene quindi convertito in NAD^+ tramite NMNAT. Questo è il passaggio limitante la velocità nel percorso di salvataggio del NAD^+ .¹⁶

I processi cellulari dipendenti da NAD^+ sono collegati ai più importanti eventi molecolari che potrebbero portare al cancro: alterazioni genomiche, squilibri metabolici e cambiamenti nei modelli di trascrizione di candidati oncogeni o soppressori tumorali.¹⁵

Rapporti NAD^+/NADH e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ più elevati si trovano nelle cellule cancerose rispetto alle cellule non cancerose. NAD^+ regola anche la riprogrammazione guidata dal punto di vista epigenetico. Le metiltransferasi (NNMT) sono essenziali nel metabolismo del gruppo metilico. L'espressione di NNMT aumenta nelle cellule staminali mesenchimali, il che promuove un aumento di S-adenosil-metionina, SAM, un donatore di metile dalla metionina. Le cellule staminali del glioma mostrano una diminuzione di SAM e, quindi, di metionina ed hanno livelli aumentati di NAD^+ e ipometilazione, promuovendo i tumori a manifestare proprietà mesenchimali, una maggiore

migrazione e un fenotipo più maligno. La downregulation di NNMT diminuisce la disponibilità del donatore di metile e diminuisce la proliferazione cellulare.¹⁷

1.2.2 Struttura di NAMPT

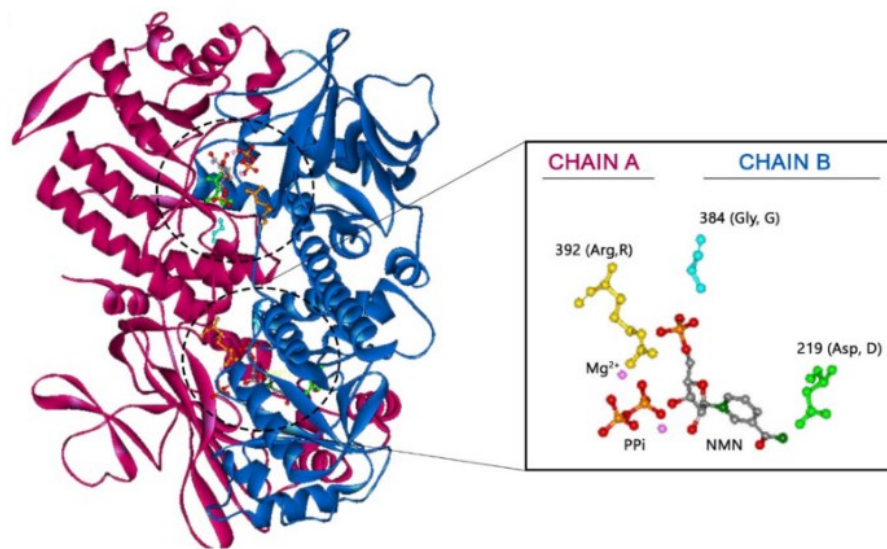


Figura 3: Struttura di NAMPT

Il gene NAMPT è localizzato sul cromosoma 7 nel locus 7q22.3 e contiene 11 esoni e 10 introni. Si prevede che circa 19 RNA messaggeri e 14 varianti siano prodotti attraverso lo *splicing* alternativo. Di tutte queste varianti, solo quattro producono probabilmente proteine: la variante 1 con una dimensione di 491 aminoacidi (aa), la variante 2 con 368 aa, la variante 3 con 88 aa e la variante 4 con 60 aa. La variante predominante è la variante 1, NAMPT1, che è l'unica variante che possiede l'attività enzimatica necessaria per la conversione di NAM in NMN. Gli aminoacidi che compongono il sito catalitico si trovano nelle posizioni D219 (acido aspartico), G384 (glicina) e R392 (arginina). Inoltre, gli aminoacidi R196 (arginina), H247 (istidina) e R311 (arginina) formano il sito di legame del cofattore PRPP (fosforibosilfosfato). Per essere funzionale, NAMPT1 deve formare un omodimero con due siti catalitici, ognuno dei quali è costituito da due aa da una catena e un aa dall'altra catena.

Nei mammiferi, sembra che NAMPT possa essere attivato tramite autofosforilazione. Quindi affinché avvenga la sintesi di NMN, l'istidina 247 deve prima essere fosforilata tramite idrolisi dell'ATP e in presenza di Mg^{2+} . È stato dimostrato che NAMPT fosforilata è più attiva della sua forma non fosforilata. Una volta che l'enzima è attivo, i suoi substrati si legano, prima PRPP e poi NAM, ciascuno al suo corrispondente sito di legame. Le altre varianti che sono state previste (NAMPT2, NAMPT3 e NAMPT4) non contengono questi amminoacidi necessari per l'attività enzimatica assegnata a NAMPT1, e al momento non si sa se abbiano una qualche funzione nella cellula.¹⁵

1.2.3 iNAMPT ed eNAMPT

Esistono due forme di NAMPT: extracellulare (eNAMPT) ed intracellulare (iNAMPT). La forma extracellulare di NAMPT è comunemente chiamata visfatina, è secreta principalmente da adipociti, macrofagi, linfociti e cellule endoteliali infiammate ed è coinvolta nei processi infiammatori e nei disturbi metabolici come obesità e cancro.

La forma intracellulare di NAMPT (iNAMPT) è espressa in tutti i tessuti, principalmente in quelli che richiedono più energia, come midollo osseo, fegato e muscoli. All'interno della cellula, si trova prevalentemente nel citoplasma e nel nucleo.¹⁵

È sovraespresso in diverse tipologie di tumori solidi, tra cui il glioma, il cancro del colon e i carcinomi del seno, della prostata, della tiroide e gastrici. NAMPT è un potente oncogene in grado di promuovere la proliferazione cellulare aumentando il pool di NAD^+ , portando a una maggiore progressione e sviluppo del tumore. Nei tumori, come il cancro gastrico, il glioma e il cancro del colon-retto, una maggiore espressione di NAMPT è correlata a uno stadio tumorale più aggressivo, metastasi, resistenza al trattamento e prognosi peggiore. Inoltre, l'espressione di NAMPT in un ambiente molecolare con p53

mutante, IDH o EGFR mutanti è associata alla sopravvivenza più bassa dei pazienti con glioblastoma.¹⁷

Il cervello è un organo estremamente attivo dal punto di vista metabolico che ricava energia in gran parte dal glucosio ma richiede comunque fonti extra di NAD^+ per mantenere uno stato metabolico anormale. Per mantenere questo metabolismo, le cellule tumorali diventano meno dipendenti dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale dipendente dall'ossigeno e si affidano a percorsi alternativi per facilitare l'attività enzimatica, come la glicolisi anaerobica o il percorso di recupero del NAD^+ . Pertanto, la produzione di NAD^+ potrebbe svolgere un ruolo chiave nell'insorgenza, nella progressione e nella recidiva del tumore al cervello. L'inibizione di NAMPT porta all'esaurimento del NAD^+ , che a sua volta inibisce la sintesi di ATP. Questo effetto alla fine provoca l'attenuazione della proliferazione e della morte delle cellule cancerose. L'inibizione di NAMPT porta anche all'attenuazione della glicolisi, con conseguente perturbazione del metabolismo dei carboidrati nelle cellule cancerose. Pertanto, NAMPT è stato proposto come un promettente bersaglio antitumorale.¹⁸

In campo terapeutico, eNAMPT può essere bersaglio terapeutico di anticorpi neutralizzanti che inibiscono l'attivazione della via recettoriale indotta dall'enzima, riducendo la risposta infiammatoria. eNAMPT influenza sia l'immunità innata sia l'immunità adattiva. eNAMPT, una volta rilasciato, interagisce con alcuni recettori: recettore della chemochina di tipo 5 (CCR5) e *Toll-Like Receptor 4* (TLR4).¹⁹

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è stato studiare e analizzare NAMPT (nicotinammide fosforibosiltransferasi) come possibile target terapeutico nel trattamento del glioblastoma multiforme (GBM).

Gli obiettivi del nostro lavoro sono stati, innanzitutto, esaminare l'espressione di mRNA e della proteina iNAMPT in un modello di coltura cellulare *in vitro*, utilizzando astrociti umani, cellule staminali di glioblastoma (GSC) e diverse linee differenziate di GBM (U251 e U373). Inoltre, abbiamo verificato se l'inibizione di iNAMPT potesse influire sulla sopravvivenza delle cellule tumorali, applicando basse dosi di tre inibitori specifici per iNAMPT: FK866, MV78 e MV87.

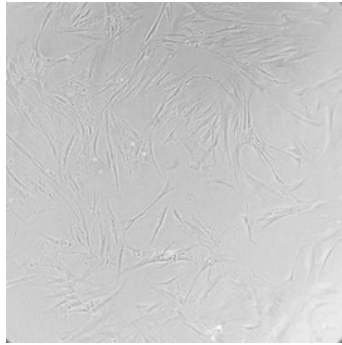
Abbiamo anche visualizzato, tramite microscopia confocale, le immagini di NAMPT nelle cellule GSC 1 e negli astrociti umani.

3. MATERIALI E METODI

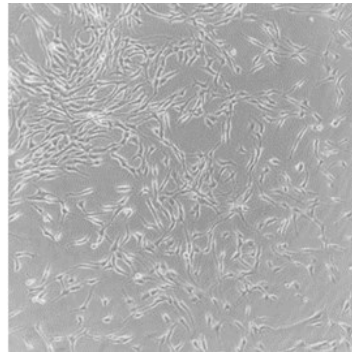
3.1 Linee cellulari

In laboratorio sono state impiegate linee cellulari differenziate di glioblastoma di grado IV di origine umana, denominate U251 e U373, acquistate presso la *European Cell Culture Collection* (Regno Unito), oltre a cellule staminali di

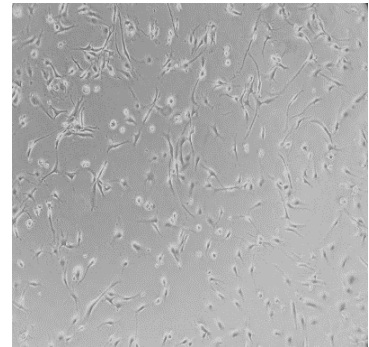
glioma (GSC 1 e 2) ottenute da pazienti dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova. Come controllo sono stati utilizzati astrociti umani non tumorali.



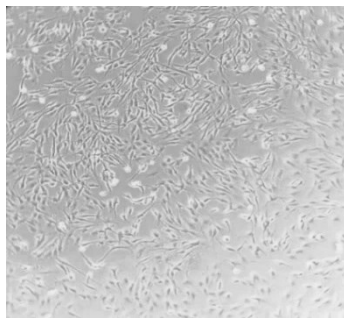
Astrociti umani



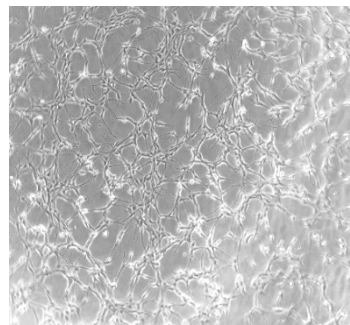
GSC 1



GSC 2



U373



U251

3.1.1 Crescita e mantenimento delle culture cellulari

Le cellule sono coltivate in flask da 25cm² e 75cm². A seconda della linea cellulare, vengono preparati due terreni diversi. Per le cellule GSC 1 e 2, il terreno che è stato utilizzato è a base di DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12), Neurobasal medium in rapporto 1:1, GlutaMAXTM 100x, 100 µg/ml Penicillina/Streptomicina (1%), B27 (1%), N2 (1%), 10 ng/ml di basic fibroblast growth factor (bFGF) e 20 ng/ml di epidermal growth factor (EGF). Prima della piastratura, per favorire l'adesione delle cellule GSC alla flask, quest'ultima è stata incubata 3 ore con 2 ml polyLysina, la quale è un fattore di adesione. Successivamente è stata lavata 3 volte con 2 ml di PBS+ (tampone fosfato salino) e ricoperta con una soluzione di Laminina 20 g/ml

(20ul di Laminina in 2 ml di terreno) e collocata in incubatore a 37°C per 3 ore. Al termine bisogna rimuovere la soluzione di Laminina e procedere con la piastratura delle cellule.

Per le cellule U251, U373 e astrociti umani è stato preparato un terreno a base di DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) addizionato di 10% di FBS (Fetal Bovin Serum), 2mM di glutammina e 1000 u/ml di Penicillina/Streptomicina.

La crescita delle cellule è garantita cambiando il terreno ogni due giorni, che consiste nell'effettuare 3 lavaggi con 2 ml di PBS+ per le flask da 25 cm² e 3 ml di PBS+ per le flask da 75 cm² e al termine del lavaggio aggiungere il terreno, circa 4 ml per le flask da 25 cm² e 5,5 ml per quelle da 75 cm².

Quando le cellule sono a confluenza ossia occupano circa l'80% della flask, è necessario svolgere lo *splitting*. In questa operazione, per prima cosa si effettuano 3 lavaggi con PBS- (tampone fosfato salino privo di ioni Ca²⁺ e Mg²⁺), in seguito vengono aggiunti 2 ml di due reagenti di dissociazione: Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) o Accutase (Sigma-Aldrich) per favorire la rimozione delle cellule dalla superficie della flask. Accutase è stata utilizzata per le linee cellulari GSC, mentre per le linee cellulari U251, U373 e astrociti si utilizza la soluzione Tripsina-EDTA. Per ottimizzare l'azione del reagente di dissociazione, le flask contenenti l'enzima vengono poste in incubatore per circa 3 minuti. In un secondo momento, per neutralizzare l'azione di Tripsina-EDTA, sono stati aggiunti 200 µl di FBS (siero fetale bovino) filtrato, invece per bloccare l'azione dell'Accutase si aggiungono 2 ml di terreno per le cellule GSC. La sospensione di cellule, enzima e agente neutralizzante sono stati trasferiti dalla flask ad una falcon di 15 ml e sottoposta a centrifugazione per 5 minuti a 1200 rpm, grazie a questa operazione il pellet di cellule ed il surnatante (soluzione di terreno ed enzima), si separano. La centrifuga che è stata utilizzata è: *GT1 centrifuge* della *Fisherbrand*. Dopo la centrifugazione, è stato aspirato il surnatante con una pasteur collegata ad una pompa da vuoto, il pellet cellulare rimanente viene risospeso in 2 ml di terreno. La sospensione cellulare

ottenuta viene aggiunta in flask da 25 cm², 75 cm² e piastra Petri in base all'esperimento richiesto, preventivamente addizionati di terreno fresco.

Per il normale passaggio cellulare, vengono trasferiti circa 200 µl di sospensione in una flask da 25cm² e 300/400 µl in una flask da 75cm², con l'aggiunta rispettivamente di 4,8 ml e 5,7 ml di terreno. La sospensione cellulare viene aggiunta nella piastra Petri quando si deve eseguire l'estrazione di RNA o di proteine. La piastra Petri presenta un diametro di 60 mm e viene aggiunta circa 200 µl di sospensione in 1,8 ml di terreno.

Tutte le operazioni descritte sono stata condotte in condizioni di sterilità, sotto cappa biologica a flusso laminare verticale di classe II munita di filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air filter*) e dotata di lampada germicida a raggi UV-C.

Tutte le colture cellulari sono state incubate a temperatura costante di 37°C in condizioni di umidità e atmosfera controllata (5% CO₂, 95% aria) al fine di ricreare le condizioni chimico-fisiche necessarie per la loro proliferazione (approvvigionamento di elementi essenziali per il metabolismo cellulare, omeostasi di temperatura e pH).

3.1.2 Conta cellulare

La conta cellulare è una procedura utilizzata per determinare il numero di cellule presenti in una sospensione. Dopo aver risospeso il pellet (ottenuto in seguito a centrifugazione) con 2 µl di terreno, vengono prelevati 20 µl di sospensione e miscelati con 20 ml di *Trypan Blue* 0,04% (Sigma-Aldrich). Il *Trypan Blue* 0,04% è un colorante che penetra nelle cellule morte perché presentano una membrana danneggiata, mentre le cellule vive non consentono l'ingresso del colorante all'interno del citoplasma, per cui non vengono colorate. Avvenuta la miscelazione tra *Trypan* e sospensione, vengono prelevati 10 µl e inseriti nella camera di Neubaurer (Bio Sigma).

La camera di Neubauer è un dispositivo per la conta costituito da una lastra di vetro spesso e si suddivide in tre zone, una centrale per il conteggio e due laterali di appoggio. I 10 µl vengono inseriti in uno spazio sottostante il vetrino di conta. Le cellule vengono contate tramite microscopio in un numero predefinito di quadrati all'interno della griglia. Mediante un calcolo matematico è stato possibile determinare il volume di sospensione da prelevare per avere il numero di cellule desiderate. Con la seguente operazione: $m \times 2 \times 2 \times 10^4$ si ottengono le cellule totali presenti nella sospensione, dove m è la media di cellule contate nei 6 quadrati, 2 rappresenta il fattore di diluizione e l'altro 2 è la velocità di sospensione. Per determinare il volume sospensione che si devono prelevare si svolge la seguente operazione: (numero di cellule che si vogliono piastrare $\times$ numero di pozzetti) $\times 2$ / cellule totali.

3.2 Estrazione delle proteine dalle colture cellulari

Per l'estrazione delle proteine è stata utilizzata una piastra Petri da 60 mm con una coltura cellulare avente una confluenza dell'80%. La lisi cellulare è stata facilitata impiegando il tampone RIPA, a cui sono stati aggiunti diversi inibitori delle proteasi con una concentrazione finale di 1 mM. Il tampone RIPA, grazie alla combinazione di detergenti e sali, rompe efficacemente le membrane cellulari e solubilizza le proteine intracellulari. Gli inibitori delle proteasi, invece, prevengono la degradazione proteica inattivando le proteasi durante il processo di estrazione.

Le operazioni sono state eseguite su ghiaccio e fuori dalla cappa. Dopo aver eliminato il terreno di coltura, la piastra Petri è stata risciacquata con PBS+ e successivamente sono stati aggiunti 80 µl di tampone RIPA con inibitori. Utilizzando uno *scraper*, le cellule sono state raschiate e il lisato cellulare è stato trasferito in una microprovetta da 1,5 ml. Il campione è stato quindi sonicato con un output del 40% per 15 secondi e centrifugato con lo strumento MIKRO a 4°C per 8 minuti a 10.000 rpm. Al termine della centrifugazione, il

surnatante è stato trasferito in una nuova microprovettona, mentre il pellet è stato eliminato.

La concentrazione proteica è stata determinata mediante dosaggio con il metodo Bradford. Al termine di tutte le operazioni, le microprovette contenenti i lisati sono state conservate a -20°C. Le proteine estratte sono state successivamente analizzate tramite Western Blot.

RIPA buffer	935 µl
Pepstatina 250X	1 µl
PMSF 250X	4 µl
Na ₃ VO ₄ 200x	5 µl
Na ₂ O ₇ P ₂ 200x	5 µl
AEBSF 100x	10 µl
NaF 100x	10 µl
Aprotinina 100x	10 µl
EDTA 100x	10 µl
Leupeptina 100x	10 µl

Tabella 1: quantità di sostanze per ottenere RIPA *buffer*

3.3 Dosaggio di Bradford

Per quantificare le proteine totali dopo l'estrazione è stato impiegato il saggio di Bradford, una tecnica analitica spettroscopica che si avvale del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Questo metodo si basa sul legame del colorante, a pH acido, con residui basici come arginina, istidina, fenilalanina, triptofano e tirosina. Il colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* può presentarsi in tre forme: anionica (blu), neutra (verde) e cationica (rossa). In ambiente acido, la forma cationica rossa si trasforma in quella blu, legandosi alle proteine presenti. In assenza di proteine, la soluzione mantiene un colore marrone. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla quantità di proteine nel campione. Poiché l'assorbimento ottico è correlato alla quantità di colorante legato, e quindi alla concentrazione proteica, l'assorbimento del campione è stato confrontato

con quello di una soluzione standard a concentrazione nota di BSA (albumina sierica bovina).

È stata quindi costruita una curva di calibrazione, che permette di determinare la quantità di proteine nel campione in esame attraverso un confronto con campioni di riferimento. Per la curva standard, sono state utilizzate concentrazioni note di BSA come standard di riferimento.

	BSA	H₂O milli-Q
Bianco	/	20 µl
1	1 µl	19 µl
2,5	2,5 µl	17,5 µl
5	5 µl	15 µl
7,5	7,5 µl	12,5 µl
10	10 µl	10 µl

Tabella 2: quantità di BSA e Acqua per saggio di Bradford

Per ottenere la retta di calibrazione, l'assorbanza è stata misurata a diverse concentrazioni crescenti di BSA e, come riferimento, è stato misurato il bianco, rappresentato dalla soluzione priva di proteina. In ciascun pozzetto della piastra multiwell sono state aggiunte le quantità corrispondenti di BSA e acqua distillata, in ordine crescente, insieme a 180 µl di reagente Bradford. Nei pozzetti destinati ai campioni di cui si vuole conoscere la concentrazione, sono stati invece aggiunti 2 µl di campione, 18 µl di acqua distillata e 180 µl di reagente Bradford.

L'assorbanza è stata letta a 595 nm mediante il lettore di micropiastre *Microplate Reader Synergy™ HT (BioTek)*. La curva di calibrazione è stata poi costruita riportando i valori di assorbanza sull'asse y e le concentrazioni crescenti di BSA sull'asse x. Grazie all'equazione della retta ottenuta, è possibile determinare la concentrazione proteica del campione incognito.

3.4 Western blot

L'analisi qualitativa dell'enzima NAMPT è stata effettuata utilizzando la combinazione di SDS-PAGE e Western Blot, per studiarne l'espressione nelle linee cellulari GSC 1, GSC 2, U251, U373 e negli astrociti umani. La miscela proteica è stata dapprima sottoposta a elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE), che permette di separare le proteine in base alla dimensione, alla carica e ad altre proprietà. Le proteine, una volta separate sul gel, sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa tramite un processo di *blotting*, dove sono state rilevate usando anticorpi specifici per NAMPT.

La separazione elettroforetica è stata condotta nella cella verticale *Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell*, dotata di un supporto con due lastre di vetro avanti spessore di 1,5 mm. Tra le lastre sono stati inseriti il *resolving* gel e lo *stacking* gel, per ottenere una matrice in cui sono stati formati i pozzetti mediante un pettine posizionato tra le lastre, permettendo il caricamento dei campioni in modo uniforme. Il *resolving* gel ha consentito la separazione delle proteine in funzione del loro peso molecolare.

RESOLVING GEL	
H ₂ O milli-Q	4,840 ml
Acrilammide 40%	2,5 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	10 µl

STACKING GEL	
H ₂ O milli-Q	2,84 ml
Acrilammide 40%	810 µl
Tris 1,5 M pH 8,8	1,250 ml
SDS 10%	50 µl
APS 10%	10 µl
TEMED	5 µl

Tabella 3 e 4: quantità di sostanze utilizzate per ottenere *Resolving* e *Stacking* gel

Dopo la formazione del gel, il pettinino è stato rimosso e i pozzetti sono stati riempiti con tampone di corsa 1X (*Running Buffer*), che crea un ambiente conduttivo per consentire il flusso di corrente attraverso il gel. Questo tampone è composto da Tris-EDTA, glicina, SDS e acqua milli-Q. I campioni destinati ai pozzetti sono stati preparati calcolando il volume necessario per ottenere 40 µg di proteina; a ciascun campione sono stati aggiunti RIPA, DTT e *buffer* di caricamento. I campioni sono stati riscaldati a 90°C per 5 minuti in un *thermoblock*, centrifugati brevemente con un minispinn e quindi caricati nei pozzetti con una pipetta automatica e capillari. Nel primo pozzetto a sinistra è stato caricato il *marker* colorato *PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoScientific)*, una miscela di 10 proteine colorate in blu, arancione e verde, con peso molecolare variabile tra 10 e 180 kDa. La separazione di queste bande durante la corsa elettroforetica consente di identificare la posizione delle proteine in base al loro peso molecolare (Figura 5). I pozzetti non utilizzati sono stati riempiti con il *buffer* di caricamento.

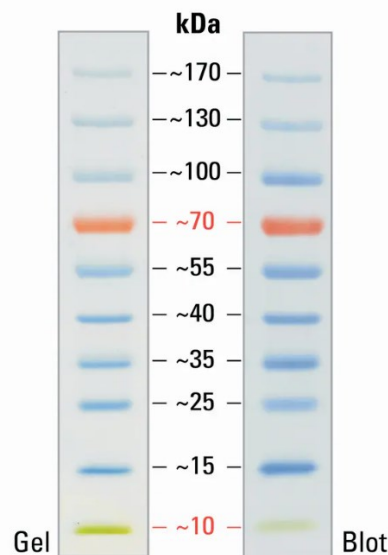


Figura 4: separazione del marker

Dopo il caricamento dei campioni, i vetrini sono stati inseriti nella cella elettroforetica, riempita con tampone di corsa, e gli elettrodi sono stati collegati al *power supply*. La tensione è stata impostata a 120V e, dopo 1 ora e 30 minuti, la corsa elettroforetica si è conclusa. Terminata la corsa, gli elettrodi sono stati scollegati e i vetrini rimossi per procedere al taglio del gel, orientandosi sul peso molecolare della proteina d'interesse. Grazie alle bande colorate del *marker*, il gel è stato tagliato tra la banda rossa e quella blu sottostante, in modo da includere la banda a 55 kDa (peso di NAMPT) e quella a 43 kDa (peso di β -actina).

Per il trasferimento, il gel è stato posizionato su una membrana di nitrocellulosa e collocato nello strumento *Trans-Blot Turbo Transfer BioRad*, che applica una corrente per generare un campo elettrico, favorendo il trasferimento delle proteine caricate negativamente dal gel alla membrana. La membrana in nitrocellulosa è stata poi incubata per 1 ora a temperatura ambiente su un agitatore basculante, in una soluzione al 5% di latte (0,4 grammi di latte in 8 ml di TBST), per bloccare i siti aspecifici della membrana che potrebbero legare l'anticorpo primario, consentendo così all'anticorpo primario di legarsi esclusivamente ai siti specifici. Dopo il bloccaggio, sono stati effettuati tre lavaggi di 5 minuti con TBST, sempre sull'agitatore basculante.

Successivamente, la membrana è stata incubata per una notte, a 4°C, con l'anticorpo primario specifico per NAMPT, diluito in un rapporto 1:2000 (4 μ l di anticorpo in 8 ml di latte al 5%). Il giorno seguente, la membrana è stata lavata tre volte con TBST e incubata con l'anticorpo secondario *anti-mouse*, specifico per l'anticorpo primario, per il rilevamento. L'anticorpo secondario è stato preparato in un rapporto 1:5000, diluendo 1,6 μ l di anticorpo in 8 ml di latte al 5%, e incubato sulla membrana a temperatura ambiente su un agitatore basculante a bassa velocità per 1 ora. Al termine,

la membrana è stata nuovamente risciacquata con TBST prima di passare allo sviluppo.

Per sviluppare la membrana è stato utilizzato il kit *WesternBright™*, che include una soluzione di perossido di idrogeno e una di luminolo, miscelate in rapporto 1:1 immediatamente prima dell'uso. La membrana è stata posizionata sul vassoio di lettura dello strumento, su cui è stata applicata a gocce la soluzione. Una volta inserito il vassoio nello strumento, si è proceduto alla lettura chemiluminescente in modalità automatica.

3.5 Estrazione di RNA

L'estrazione dell'RNA è una tecnica che permette di ottenere l'RNA dalle cellule, che poi verrà retrotrascritto in cDNA, il quale viene utilizzato nella tecnica della PCR. L'estrazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando il kit RNeasy Mini. La procedura consiste nel lisare il campione utilizzando un tampone di lisi (RTL *buffer*), a base di fenolo acido/guanidina isotiocianato che consente il passaggio del DNA nella fase organica del lisato cellulare se il fenolo è tamponato con una soluzione a pH acido (pH 5-6); in questo modo l'RNA rimane in fase acquosa, va incontro a precipitazione alcolica e successivamente raccolto mediante centrifugazione. Le cellule vengono fatte crescere in una Petri, quando hanno raggiunto la confluenza dell'80% viene aspirato il terreno e vengono effettuati due lavaggi con PBS⁺. Alla piastra Petri vengono aggiunti 350 µl di RLT buffer (tampone di lisi) e viene incubata 5 minuti a temperatura ambiente. Trascorsi 5 minuti, le cellule vengono staccate utilizzando uno *scraper* e raccolte in una microprovetta, a cui vengono aggiunti 350 µl di etanolo al 70%. La sospensione viene trasferita nella cartuccia fornita dal kit e viene centrifugata nello strumento *Hettich Mikro 220R* a 13.000 rpm 15 secondi a 4°C. Dopo la centrifugazione, l'eluato ottenuto viene scartato e all'RNA, trattenuto dalla colonna sono stati aggiunti 700 µl di RW1 *buffer* e

centrifugato a 13.000 rpm per 15 secondi a 4°C. Viene scartato nuovamente l'eluato, vengono aggiunti 500 µl di RPE e viene ripetuta la centrifugazione nelle medesime condizioni. Vengono aggiunti altri 500 µl di RPE e centrifugazione a 13.000 rpm per 2 minuti a 4°C. Dopo aver scartato l'eluato, viene ripetuta la centrifugazione a 4°C 13.000 rpm per 1 minuto per eliminare i residui del solvente. Successivamente vengono aggiunti 30 µl di RNAsi free water e deve essere eseguita l'ultima centrifuga a 4°C 13.000 rpm per 1 minuto. L'eluato ottenuto, contenente l'RNA, viene trasferito in una microprovetta nuova, successivamente deve essere dosato e retro-trascritto in cDNA.

3.6 Dosaggio di RNA

Per il dosaggio dell'RNA viene utilizzato lo strumento *QuantusTM Fluorometer di Promega* (E6150 Promega), un fluorimetro a doppio canale per la quantificazione dell'RNA, del DNA e delle proteine. Misura la rilevazione fluorescente in maniera altamente sensibile usando sonde a filo singolo o doppio. Il dosaggio di RNA è stato ottimizzato con impostazioni pre-programmate per il sistema *QuantiFluor®*. Lo strumento, prima dell'utilizzo, deve essere calibrato. Per la misurazione viene preparata una soluzione sonda contenente 0,5 µl di sonda colorata RNA *Quantifluor* in rapporto 1:400 e 199,5 µl di *buffer* TE 1X. A questa soluzione viene aggiunto 1 µl di campione RNA ottenuto dall'estrazione. La soluzione viene *vortexata* e incubata 5 minuti al buio a temperatura ambiente. In seguito, viene rilevato dallo strumento il valore della concentrazione di RNA espresso in ng/µl. Il volume da prelevare per eseguire la retro-trascrizione dell'RNA si calcola dividendo 0,5 µg per la concentrazione espressa in ng/µl ottenuta dal dosaggio.

3.7 Real-time PCR quantitativa

La Real-Time PCR quantitativa è una tecnica che simultaneamente amplifica e quantifica il DNA o l'RNA in tempo reale. Questa tecnica prevede che specifici segmenti di DNA o RNA vengano amplificati enzimaticamente *in vitro*, utilizzando coloranti fluorescenti che consentono di monitorare e misurare continuamente il processo di amplificazione mentre si verifica. Per l'esecuzione di questa tecnica è stato utilizzato il kit *Quantitect SYBR Green PCR di Quiagen* ed è stato usato l'apparecchio *CFX Opus 96 di Biorad*.

Per ogni campione viene preparata una miscela di reazione costituita da:

- 10 µl di *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* (contenente HotStarTaq DNA polimerasi, dNTPs, colorante fluorescente SYBR Green I, tampone di reazione, 5 mM MgCl₂ a pH 8,7);
- 2,5 µl del *primer reverse e forward* (50µM);
- 2 µl del campione di cDNA;
- 5,5 µl di *RNasi-Free Water del kit*.

Ciascuna miscela di reazione presenta un volume di 20 µl e viene trasferita nei rispettivi pozzetti della piastra da 96. La piastra viene posizionata nel blocco campione dello strumento utilizzato per l'analisi, che presenta una temperatura di 105°C. L'apparecchiatura genera delle variazioni cicliche di temperatura che sono in grado di attivare e arrestare le diverse fasi del processo di amplificazione genica.

La Real-Time PCR prevede tre fasi:

1. Denaturazione in cui la doppia elica di DNA viene denaturata in singoli filamenti a causa dell'elevata temperatura (solitamente intorno ai 95°C). Questo permette ai primer di legarsi ai siti bersaglio.
2. *Annealing* in cui la temperatura viene abbassata (generalmente tra 50°C e 65°C) permettendo ai primer specifici di legarsi al DNA bersaglio.

3. Prolungamento del filamento, in cui viene attivata la Taq polimerasi a 72°C, la quale lega il DNA a livello dei primers e ne determina l'allungamento in direzione 5'-3'.

Queste tre fasi costituiscono un ciclo di reazione.

Per monitorare e misurare continuamente il processo di amplificazione sono stati utilizzati dei coloranti fluorescenti, tra cui il SYBR Green I, in grado di legarsi al solco minore del DNA e di generare un aumento di fluorescenza all'aumentare del numero di copie dell'amplicone.

Le condizioni di amplificazione eseguite dal macchinario CFX Opus 96 sono le seguenti: 3 minuti a 95°C, 30 secondi a 95°C, 30 secondi a 59°C, 30 secondi a 72°C, per un totale di 39 cicli.

La Real-Time PCR viene utilizzata per misurare quantitativamente l'espressione genica di un campione in condizioni biologiche specifiche esprimendola in cicli soglia (Ct) di PCR. Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione (*threshold*) e il corrispondente Ct è inversamente proporzionale alla quantità di DNA stampo iniziale contenuto nel campione. Ct è un valore relativo che rappresenta il numero di ciclo a cui la quantità di DNA amplificato raggiunge il livello di soglia.

Il sistema di analisi acquisisce il segnale emesso da ciascun campione durante l'intera durata della PCR e converte le variazioni di fluorescenza in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione. Contemporaneamente, il software identifica il ciclo soglia (Ct), che rappresenta il ciclo di reazione in cui si verifica un'effettiva emissione di fluorescenza dovuta all'amplificazione del target, distinguendola dal rumore di fondo. Il numero di cicli di reazione necessari per raggiungere il Ct è inversamente proporzionale alla quantità iniziale del target presente nel campione. Una volta superato il valore del ciclo soglia, la fluorescenza aumenta linearmente fino a raggiungere un plateau.

La quantificazione genica al ciclo soglia è condotta durante la fase esponenziale della PCR.

Al termine della reazione, il programma Bio-Rad CFX Maestro Properties permette di visualizzare i valori di Ct per ciascun campione e di analizzare la curva di *melting*, utile per individuare eventuali impurezze nel campione. La curva di *melting*, infatti, rappresenta la variazione della fluorescenza in funzione della temperatura e può essere visualizzata come un picco o una curva. Un picco ben definito e singolo indica che il prodotto amplificato è specifico e privo di contaminanti o dimeri di primer; quindi, fornisce informazioni sulla specificità e purezza del prodotto amplificato.

Per eseguire l'espressione differenziale, i valori Ct normalizzati (ΔCt) di tutte le repliche biologiche tra i gruppi di campioni vengono confrontati gene per gene. I risultati vengono normalizzati attraverso il metodo ΔCt , utilizzando il gene *housekeeping* GAPDH. Il ΔCt corrisponde al quantitativo del campione di interesse, ottenuto sottraendo al Ct del campione il Ct del gene GAPDH.

Confrontando l'espressione normalizzata (ΔCt) delle due condizioni, è possibile calcolare il *fold change* dell'espressione di mRNA ($-\Delta\Delta Ct$). Il *fold change* è un rapporto di espressione genica, calcolato come il rapporto tra l'espressione del gene nella condizione sperimentale e quella nel controllo. Se il *fold change* è positivo significa che l'espressione genica nella condizione sperimentale rispetto al controllo è aumentata, e quindi il gene è sovraespresso; se il *fold change* è negativo significa che è sottoespresso rispetto al controllo.

3.8 Saggio di vitalità cellulare (MTS)

Il saggio di vitalità cellulare è una tecnica colorimetrica utilizzata per determinare il numero di cellule vitali in proliferazione, utilizzando il reagente MTS, che è un sale di tetrazolio di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio, stabilizzato da un reagente di accoppiamento elettronico, PES (Fenazina Metosolfato). Questo saggio è stato utilizzato per valutare la vitalità cellulare e l'attività metabolica delle linee cellulari GSC 1, GSC2, U373, U251 e astrociti umani in risposta a trattamenti e condizioni sperimentali diverse.

Le diverse linee cellulari sono state trattate con 3 inibitori differenti alle concentrazioni di 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 5 nM e 1 nM e dopo 48 ore è stata eseguita la lettura spettrofotometrica a 490 nm.

Per questa tecnica sono state utilizzate multiwell da 96 pozzetti. Per ogni linea cellulare sono state eseguite 4 repliche ad ogni concentrazione, per un totale di 24 pozzetti relativi ad ogni linea cellulare. Sono state seminate in ogni pozzetto 3500 cellule. In ogni pozzetto sono stati incubati 100 μ l di sospensione cellulare per 48 ore in presenza delle diverse concentrazioni di inibitori. Dopo 48 ore, il trattamento è stato rimosso ed è stata preparata una soluzione (DMEM 1% o terreno per GSC e reagente MTS) contenente il 10% di reagente MTS. Vengono aggiunti in ogni pozzetto 100 μ l di questa soluzione. Le deidrogenasi mitocondriali delle cellule metabolicamente attive sono in grado di ridurre l'MTS a Formazano, un prodotto colorato solubile nel terreno di coltura, mentre le cellule morte non sono in grado di farlo in quanto il loro metabolismo non è più funzionante. Dopo 90 minuti di incubazione, è stata misurata l'assorbanza a 490 nm utilizzando lo strumento *Microplate Reader SynergyTMHT (BioTek)* e la quantità di formazano, misurata come valore di assorbanza, risulta direttamente proporzionale al numero di cellule vive in coltura. Grazie a questo saggio è stato possibile valutare la vitalità cellulare delle diverse linee cellulari in risposta al trattamento con tre inibitori selettivi di NAMPT.

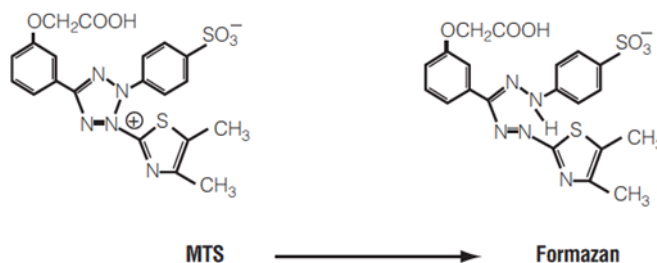


Figura 5: riduzione di MTS a Formazano

3.9 Inibizione di iNAMPT

Il cervello è un organo estremamente attivo dal punto di vista metabolico che ricava energia in gran parte dal glucosio ma richiede comunque fonti extra di NAD^+ per mantenere uno stato metabolico anormale. Per mantenere questo metabolismo, le cellule tumorali diventano meno dipendenti dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale dipendente dall'ossigeno e si affidano a percorsi alternativi per facilitare l'attività enzimatica, come la glicolisi anaerobica o il percorso di recupero del NAD^+ . Pertanto, la produzione di NAD^+ potrebbe svolgere un ruolo chiave nell'insorgenza, nella progressione e nella recidiva del tumore al cervello.¹⁸ Nelle cellule tumorali, l'emivita del NAD è di circa solo 1 ora, quindi è necessaria una maggiore sintesi di NAD che serve per compensare una degradazione così rapida. Sulla base di questo, è stato ipotizzato che l'interruzione del metabolismo del NAD e quindi la riduzione della riserva di NAD nelle cellule tumorali, potrebbe essere una tecnica promettente nella terapia del cancro.²⁰ L'inibizione del NAMPT porta all'esaurimento del NAD^+ , che a sua volta inibisce la sintesi di ATP. Questo effetto alla fine provoca l'attenuazione della proliferazione e della morte delle cellule cancerose. L'inibizione di NAMPT porta anche all'attenuazione della glicolisi, con conseguente ulteriore perturbazione del metabolismo dei carboidrati nelle cellule cancerose. Pertanto, NAMPT è stato proposto come un promettente bersaglio antitumorale.¹⁸

3.10 Inibitori di NAMPT

Il primo inibitore ad essere sviluppato è stato FK866, un inibitore parzialmente non competitivo che si lega all'interfaccia tra le due subunità dell'omodimero NAMPT, coprendo parzialmente il sito di legame del NAM. L'inibizione di NAMPT da parte di FK866 può aumentare i livelli di ROS e diminuire il consumo di glucosio, la produzione di ATP, la sintesi di acidi grassi e i livelli

di NAD^+ , influenzando negativamente l'attività di tutti gli enzimi dipendenti da NAD^+ come SIRT e PARP.¹⁵ Inoltre, inibisce la proliferazione, limita il metabolismo ossidativo portando all'arresto del ciclo cellulare, potenzia gli effetti delle radiazioni e della TMZ in vitro e in vivo.²¹ L'inibitore sopprime indirettamente l'attività respiratoria mitocondriale, causando una graduale deplezione di NAD. La riduzione di NAD^+ può essere molto tossica per le cellule non tumorali; quindi, è stato preso in considerazione l'uso di precursori NAD^+ (ad esempio, acido nicotinico) come adiuvanti. Diversi studi hanno scoperto che la co-somministrazione di acido nicotinico (NA) con alcuni inibitori NAMPT (GMX1778, GNE617, LSN3154567, MPC-9528 e STF-31) aiuta a prevenire gli effetti tossici, come la tossicità ematologica e retinica nei roditori, mantenendo l'efficacia del farmaco. La citotossicità di FK866 sembra essere maggiore in alcuni tipi di tumore che esprimono livelli più elevati di NAMPT e sono relativamente più dipendenti dalla glicolisi.

A partire dal 2007, FK866 è in fase 2 di sperimentazione clinica, gli altri inibitori non sono entrati in sperimentazioni cliniche a causa di problemi di tossicità e solubilità dovuti alle loro strutture chimiche lipofile. Per questo motivo, è stata adottata la strategia di incorporare gruppi polari e ionizzabili nelle loro strutture per migliorare la solubilità. Questo approccio, oltre a ridurre la tossicità, ridurrebbe la permeabilità di questi composti in modo che possano agire anche sulla forma extracellulare di NAMPT (eNAMPT).¹⁵

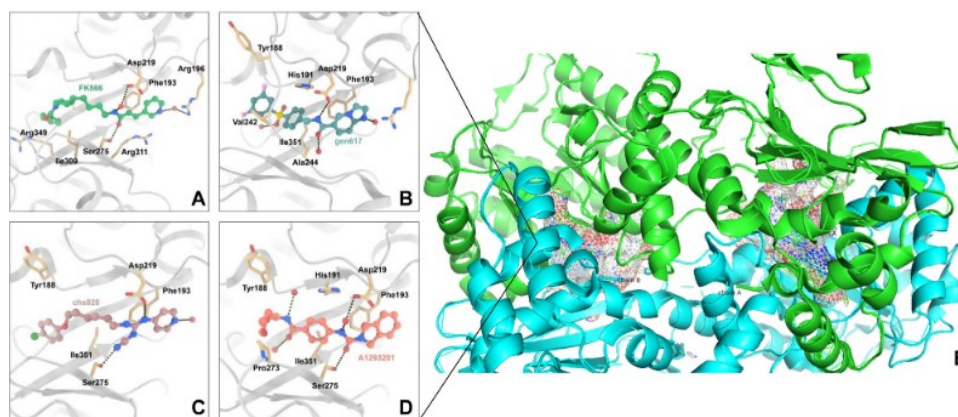


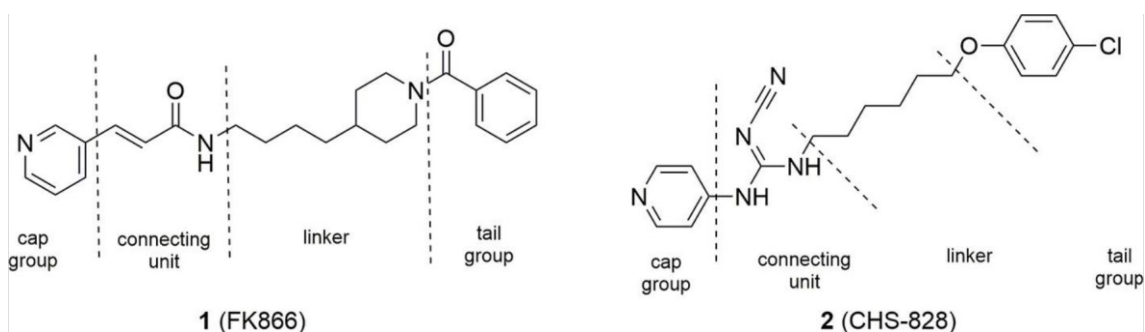
Figura 6: struttura cristallografica di NAMPT

NAMPT è un omodimero con due cavità a forma di tunnel adiacenti a ciascun sito attivo. Studi cristallografici del complesso di FK866 e NAMPT hanno rivelato che FK866 si lega alla cavità tunnel di NAMPT. La famiglia di inibitori di NAMPT appartenenti a questa classe sono costituiti da una porzione aromatica in testa simile alla piridina, un linker che è una porzione che interagisce con il tunnel e gruppi di coda, ossia un gruppo esposto al solvente.²⁰

NAMPT è stato anche identificato come il principale bersaglio biologico del potente agente citotossico CHS-828.²² FK866 è progredito in studi clinici di fase II, ma ha una bassa biodisponibilità e una rapida clearance endovenosa. CHS828 è progredito in studi preclinici di fase I, ma ha effetti collaterali dose-limitanti come la trombocitopenia.²³

Il confronto tra FK866 e CHS-828 ha portato all'identificazione di una struttura farmacoforica comune per gli inibitori di NAMPT. Il sito di legame dell'enzima è un tunnel formato dalla dimerizzazione testa-coda di due unità NAMPT. Una piridina (o un anello eterociclico simile alla piridina) come gruppo cap imita e si lega nella stessa posizione della nicotinammide, il substrato naturale di NAMPT. Quindi, un'unità di collegamento, come un'ammide, con la capacità di accettare legami idrogeno, è legata a un linker idrofobico caratterizzato da una lunghezza e una geometria appropriate in grado di sporgere dal tunnel. Infine, un gruppo di coda che sporge sulla regione esposta al solvente completa il modello farmacoforico.

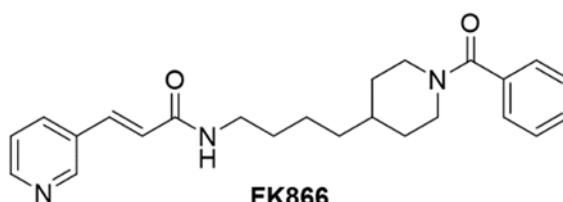
Sulla base di questo modello farmacoforico sono stati ottenuti altri due inibitori, MV78 e MV87, modificando il gruppo esposto al solvente.²²



MV78 è una molecola che appartiene ad una classe di inibitori caratterizzata da una forte attività inibitoria dell'enzima NAMPT (IC_{50} tra 3 e 30 nM) e dalla capacità di ridurre il NAD^+ intracellulare a concentrazioni simili.

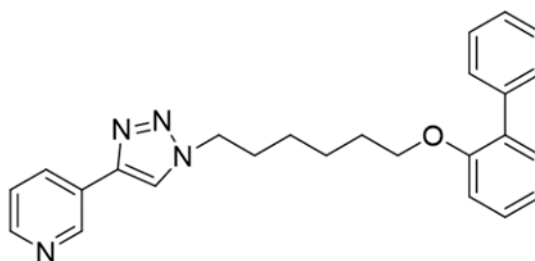
A partire dalla molecola MV78 è stata sintetizzata la molecola MV87. È stata modificata la struttura chimica per diminuire la tossicità e favorire le caratteristiche farmacocinetiche.

Gli inibitori di NAMPT presentano alcuni effetti collaterali, tra cui cardiotossicità e la retinopatia, alcuni inibiscono il CYP e hanno scarse proprietà farmacocinetiche, ad esempio la solubilità. Per cui sono ancora in corso studi per ricercare molecole con minori effetti collaterali.²⁴



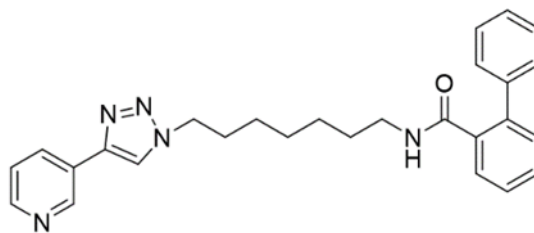
FK866

Molecular Weight: 392



MV87

Molecular Weight: 399



MV78

Molecular Weight: 440

3.11 Immunocitochimica

L'immunocitochimica (ICC) è una tecnica che permette di individuare o visualizzare specifiche proteine all'interno delle cellule.

Questa tecnica prevede diverse fasi:

- 1- Lavare i vetrini: sono stati lavati i vetrini (12 mm di diametro) con idrossido di sodio (NaOH 2 N), quindi sono stati collocati in Petri con diametro di 60mm in presenza di NaOH e lasciati sulla basculante per 2 ore.
- 2- Eliminare l'idrossido di sodio e lavare i vetrini con acqua Milli-Q due volte, successivamente è stato messo etanolo al 70% ed è stato lasciato *overnight* sulla basculante.
- 3- Lasciare asciugare i vetrini sotto cappa in una multiwell da 24 pozzetti.
- 4- Effettuare *coating* con polyisina: i vetrini sono stati ricoperti con una soluzione di polyisina (500µl), successivamente la multiwell è stata posta in incubatore per 4 ore. In seguito, sono stati eseguiti 3 lavaggi in PBS-sterile e sono stati lasciati ad asciugare sotto cappa con UV per 30 minuti.
- 5- Sono state piastrate 20.000 cellule per pozzetto nella multiwell da 24.
- 6- Fissare con paraformaldeide (PFA) 2%: a distanza di 2 giorni da quando le cellule sono state piastrate, è stato aspirato il terreno dai pozzetti, è stato effettuato un lavaggio con PBS- sterile e sono stati aggiunti 500µl di PFA 2%. Quest'ultima dopo 20 minuti è stata rimossa.

Dalla fase 3 alla 6 si lavora in condizioni di sterilità, sotto cappa biologica. I passaggi successivi non si effettuano in condizioni di sterilità.

- 7- Fase di *blocking*: serve per prevenire legami aspecifici degli anticorpi, migliora la qualità del segnale. Nei pozzetti contenenti i vetrini è stato aggiunto 400 µl il *blocking buffer* (BSA 3% + Tryton 0,1% in PBS-).
- 8- Anticorpo primario: ha la funzione di legarsi al target di interesse, nel nostro caso il target è NAMPT. Sono stati aggiunti 400 µl di anticorpo primario per pozzetto (1:500). L'anticorpo primario che è stato utilizzato è anti-NAMPT (Visfatin/PBEF), un anticorpo che riconosce NAMPT umano. Dopo aver lasciato l'anticorpo un'ora sulla basculante, la multiwell è stata lasciata overnight a 4°C. Il giorno seguente, la multiwell è stata riposta sulla basculante per un'ora, poi è stato rimosso l'anticorpo primario e sono stati effettuati 3 lavaggi di 5 minuti con PBS-.
- 9- Anticorpo secondario: si lega all'anticorpo primario, è stato utilizzato Alexa Fluor 568, con una concentrazione 1:2000. Sono stati aggiunti 400 µl per pozzetto, lasciato un'ora sulla basculante, rimosso e poi sono stati effettuati 3 lavaggi da 5 minuti con PBS-.
- 10- Molecola fluorescente: è stata utilizzata la molecola DAPI (4,6-diamidin-2-fenilindolo) ad una concentrazione 1: 10.000 in PBS 1x. È stato posto contatto con il vetrino per 10 minuti a temperatura ambiente e poi sono stati effettuati 2 lavaggi da 5 minuti con PBS.
- 11- È stato montato il vetrino sul porta oggetto ed è stata usata una goccia di mowiol.

Il vetrino è stato visualizzato tramite microscopio confocale presso la Facility di microscopia ottica del Centro Grandi Strumenti dell'Università di Pavia, utilizzando un Leica TCS SP8. Questo strumento permette un'ottimale risoluzione delle immagini, superiore rispetto ai tradizionali microscopi a fluorescenza. Grazie alla sua capacità di eliminare la luce fuori fuoco generata

nella fluorescenza a campo largo, offre un miglior controllo della profondità di campo, maggiore risoluzione assiale e un rapporto segnale-rumore migliorato. Inoltre, è possibile creare immagini tridimensionali attraverso l'acquisizione di sezioni ottiche seriali, rendendo il confocale particolarmente adatto per ottenere immagini dettagliate e contrastate che illustrano fenomeni cellulari e molecolari.

Dal punto di vista tecnico, il microscopio confocale è costituito da un sistema ottico che scansiona il campione punto per punto, selezionando solo la luce proveniente dai piani a fuoco grazie a un diaframma (pinhole) posizionato strategicamente per eliminare i segnali da piani fuori fuoco. La fonte di illuminazione è focalizzata direttamente sul campione tramite l'obiettivo, generando fluorescenza che viene catturata solo dal piano a fuoco, mentre un sistema automatizzato permette di acquisire immagini lungo l'asse z per ottenere una ricostruzione tridimensionale.

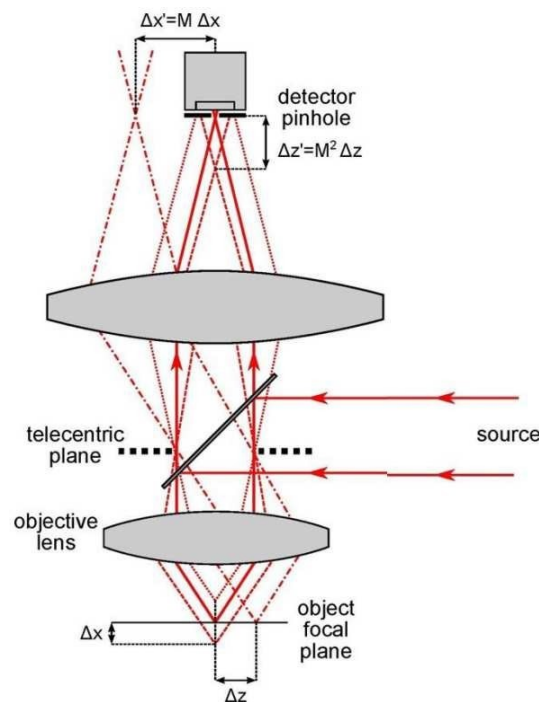


Figura 7: Struttura schematica di un microscopio confocale

4. RISULTATI

4.1 Espressione di NAMPT mRNA mediante q-PCR

L'obiettivo di questo studio è la valutazione dell'espressione di NAMPT nelle linee cellulari di glioblastoma multiforme (GSC 1, GSC 2, U251 e U373) a confronto con le cellule non tumorali di astrociti umani.

Una tecnica utilizzata per valutare i livelli di mRNA NAMPT nelle linee cellulari è la PCR quantitativa (qPCR). Per ogni campione è stata ottenuta una curva di amplificazione e il relativo Ct (ciclo soglia), che è inversamente proporzionale alla quantità di mRNA contenuta nel campione. L'analisi dei dati ottenuti è stata effettuata mediante il modello matematico di ΔCt .

Come gene *housekeeping* è stata utilizzata la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GADPH), gene costitutivo la cui espressione non varia nei campioni rispetto al controllo, utilizzata al fine di normalizzare il campione, cioè, di escludere variazioni dovute al caricamento di quantità diverse tra un campione e l'altro. Il modello matematico per l'analisi dei dati:

1. Calcolare $\Delta Ct = Ct \text{ campione incognito} - Ct \text{ Housekeeping}$
2. Calcolare $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ campione incognito} - \Delta Ct \text{ campione scelto come controllo}$. Questo passaggio serve per confrontare il ΔCt di ciascun campione con quello di riferimento.
3. Calcolare $fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Il valore ottenuto ci consente di determinare la concentrazione relativa del gene target nel campione incognito rispetto al controllo (astrociti umani).

Se $\Delta\Delta Ct < 0,5$ il gene target nel campione incognito è meno espresso rispetto al campione di riferimento.

Se $0,5 < \Delta\Delta Ct < 2$ non c'è differenza di espressione tra il campione incognito e il campione di riferimento.

Se $\Delta\Delta Ct > 2$ il gene target è più espresso rispetto al campione di riferimento.

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GSC 1	4,47
GSC 2	5,13
U251	1,5
U373	1,2
Astroцитi umani	1

Tabella 5: fold change delle linee cellulari GSC 1, GSC 2, U251, U373, astroцитi umani

Dai nostri dati è evidente che nelle linee cellulari di GSC 1 e 2 il gene target è più espresso rispetto agli astroцитi umani, usati come campione di riferimento, in quanto hanno un *fold change* maggiore di 2, rispettivamente di 4,47 e 5,13. Ciò significa che nelle due linee cellulari GSC 1 e 2, NAMPT, il nostro gene target, è maggiormente espresso rispetto agli astroцитi umani.

I risultati ottenuti dalle linee cellulari differenziate U251 e U373 indicano che l'espressione di NAMPT è comunque maggiore rispetto agli astroцитi, ma non è particolarmente significativa in quanto hanno un *fold change* compreso tra 0,5 e 2.

Nel grafico 1 è evidente che GSC 1 e GSC 2 presentano una maggiore espressione di mRNA NAMPT rispetto alle altre linee cellulari. I risultati ottenuti sono la media di 3 repliche.

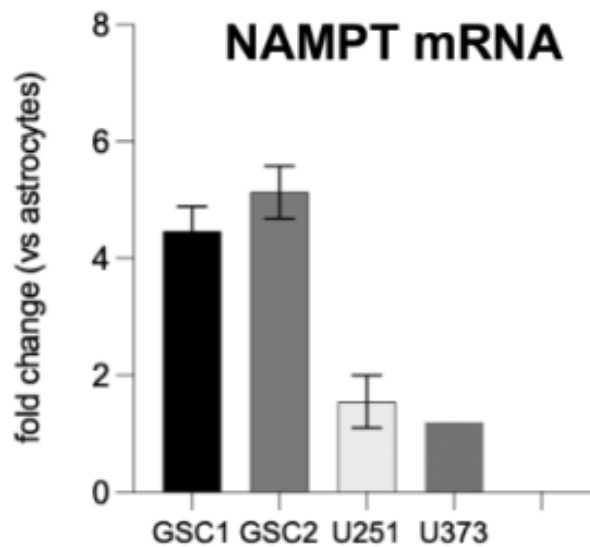


Grafico 1: Livelli di mRNA NAMPT nelle linee cellulari GSC 1, GSC 2, U251 e U373 normalizzati rispetto gli astroцитi umani.

4.2 Espressione di NAMPT proteina mediante Western Blot

Le proteine estratte dalle linee cellulari GSC 1, GSC 2, U251, U373 e astroцитi umani sono state risolte su *SDS-Page*. In seguito alla corsa elettroforetica, il gel è stato tagliato in corrispondenza della banda colorata riferita a 55 kDa (peso molecolare di NAMPT) e 43 kDa (peso molecolare di β -actin). Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa è avvenuto con lo strumento Trans-Blot Turbo Transfer BioRad. Le proteine sono state rilevate con l'anticorpo primario e secondario specifici per NAMPT e sono state risolte mediante analisi di chemiluminescenza. Successivamente la membrana di nitrocellulosa è stata incubata con l'anticorpo primario e secondario specifici per β -actin. Si utilizza β -actin come controllo del caricamento Western Blot poiché è espressa in tutti i tipi di cellule utilizzate e non è influenzata dai trattamenti cellulari. L'espressione della proteina di controllo non dovrebbe cambiare a causa della procedura sperimentale e sia la

proteina di interesse che la proteina di controllo dovrebbero rientrare nell'intervallo di rilevamento.

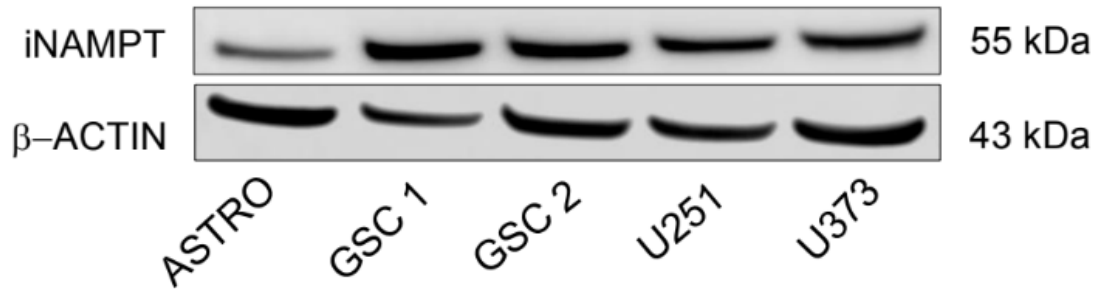


Figura 8: Espressione di NAMPT

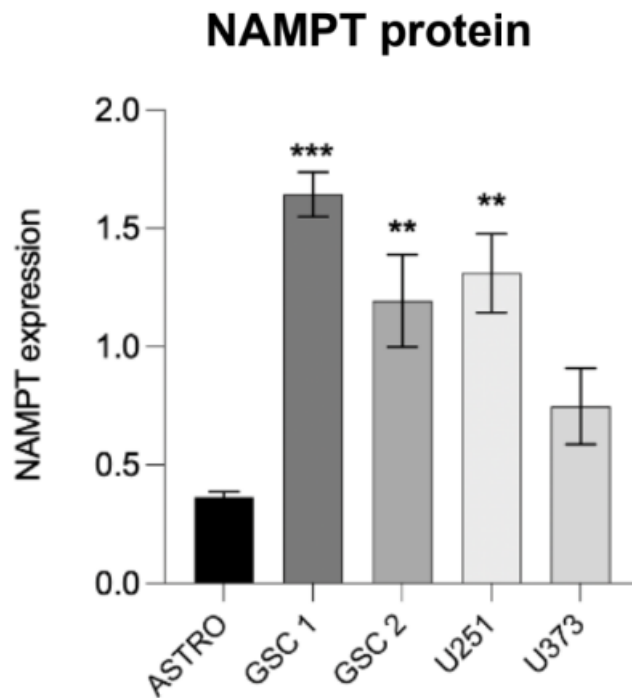


Grafico 2: espressione di NAMPT proteina

In seguito alla rilevazione i dati sono stati analizzati. Dal grafico 2 emerge che NAMPT è espresso maggiormente nelle linee cellulari GSC e nelle linee cellulari U251 e U373, rispetto agli astrociti umani. I risultati ottenuti sono la media di 3 repliche.

4.3 Diminuzione della vitalità cellulare in seguito al trattamento con gli inibitori di NAMPT

Le linee cellulari GSC 1, GSC 2, U251, U373 e astrociti umani sono state sottoposte a trattamento con inibitori di iNAMPT (FK866, MV78 ed MV87) alle concentrazioni di 1 nM, 5 nM, 10 nM, 100 nM e 1 μ M. Le cellule sono state piastrate in multiwell da 96 pozzetti, a distanza di 2 giorni sono state trattate con gli inibitori. Dopo 48 ore di trattamento è stato effettuato il saggio MTS per valutare la vitalità cellulare che è stata analizzata a 490 nm mediante spettrofotometro.

Gli inibitori agiscono inibendo iNAMPT, impedendo la conversione di nicotinamide (NAM) in nicotinammide mononucleotide (NMN), da cui deriva NAD⁺, cofattore essenziale per il fabbisogno energetico e per la proliferazione delle cellule tumorali.

FK866 risulta essere molto citotossico anche a basse concentrazioni (1nM), riducendo la vitalità cellulare maggiormente in GSC 1e 2. (Grafico 3)

Per quanto riguarda le linee cellulari U251 e U373, a basse concentrazioni non si nota alcuna variazione della vitalità cellulare, ma a concentrazione più alte (100 nM e 1 μ M) la vitalità cellulare diminuisce del 50%.

Gli astrociti umani, utilizzati come riferimento, non sono sensibili al trattamento con FK866, mantenendo un'elevata vitalità cellulare. Ciò significa che FK866 non manifesta un particolare effetto citotossico sulle linee cellulari non tumorali, come gli astrociti umani.

Analizzando i dati ottenuti dal trattamento delle linee cellulari GSC 1 e 2 con gli inibitori MV78 e MV87, è possibile notare che la vitalità cellulare si riduce gradualmente all'aumentare della concentrazione di inibitore. Come mostrato in grafico, la vitalità cellulare è abbastanza alta a basse concentrazioni (1nM e 5 nM) e si riduce a dosi più elevate (100 nM e 1 μ M). (Grafico 4 e 5)

Per le linee cellulari U251 e U373 la vitalità cellulare è di circa 100% a basse dosi, si riduce di circa la metà ad elevate dosi (100 nM e 1 μ M).

Il trattamento con MV78 e MV87 nelle linee cellulari non tumorali (astrociti umani) è ininfluenza, la vitalità cellulare è del 100%, come visto anche per l'inibitore FK866. Questo dato è molto promettente, a dimostrazione che il trattamento terapeutico con gli inibitori di NAMPT risulta letale per le cellule tumorali, non intaccando le linee cellulari non tumorali.

MV78 e MV87 mostrano un minore effetto citotossico a basse dosi rispetto a FK866, in quanto è stata modificata la struttura chimica che le ha rese meno tossiche.

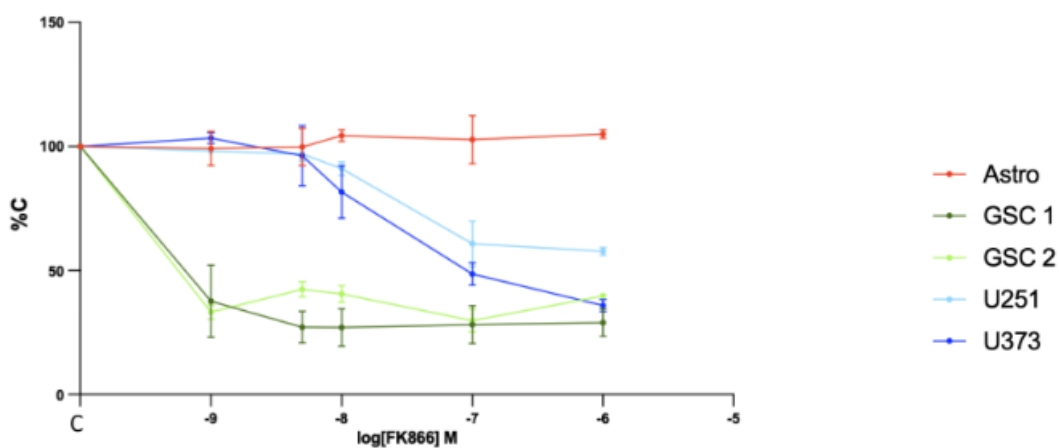


Grafico 3: curva dose-risposta

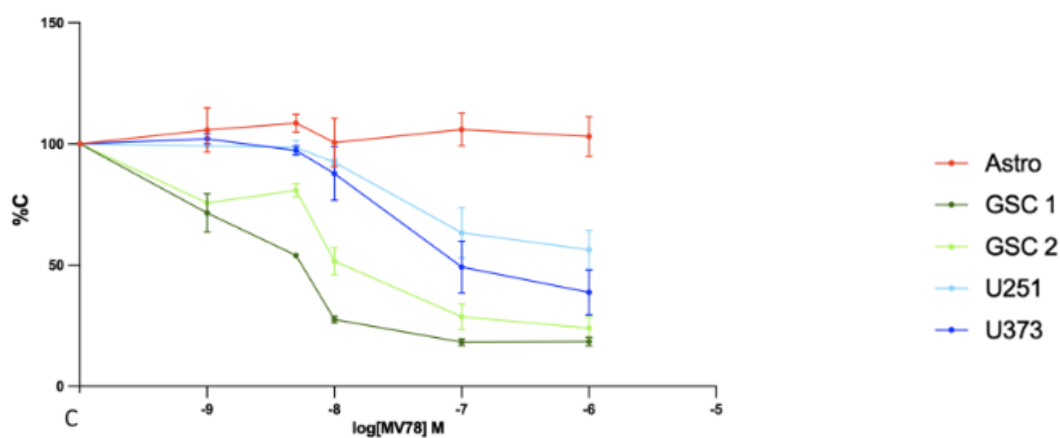


Grafico 4

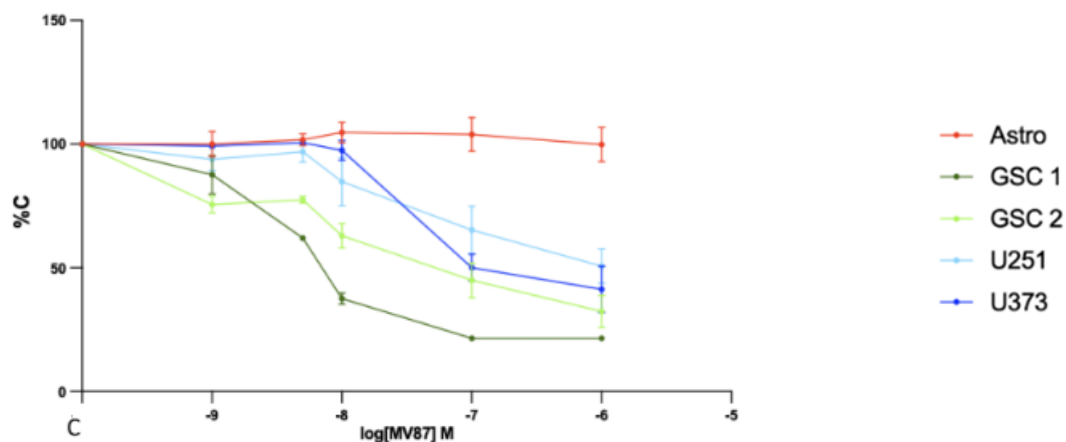


Grafico 5

4.4 Visualizzazione di NAMPT all'interno delle cellule mediante ICC

NAMPT è stato visualizzato all'interno di cellule GSC 1 e astrociti tramite la tecnica di immunocitochimica. NAMPT viene riconosciuto da un complesso anticorpo primario-anticorpo secondario e rilevato tramite fluorescenza, la colorazione rossa indica la presenza di NAMPT. Dapi (4,6-diamidin-2-fenilindolo) è una molecola fluorescente utilizzata per identificare le cellule: si lega preferenzialmente al DNA a doppia elica, il legame con il DNA aumenta notevolmente la fluorescenza. Quando il DAPI è legato al DNA, emette una fluorescenza di colore blu con una lunghezza d'onda intorno a 461 nm se eccitato con luce ultravioletta.

Sono state analizzate mediante microscopio confocale le cellule GSC 1 e gli astrociti umani per valutare la differenza di espressione di NAMPT tra le due linee. Come si vede dalla figura 9 le cellule GSC 1 mostrano un'elevata espressione di NAMPT, a differenza della figura 10 che raffigura gli astrociti umani evidenziando la bassa espressione di NAMPT. In entrambe le linee cellulari NAMPT è principalmente localizzato a livello del citosol.

DAPI NAMPT

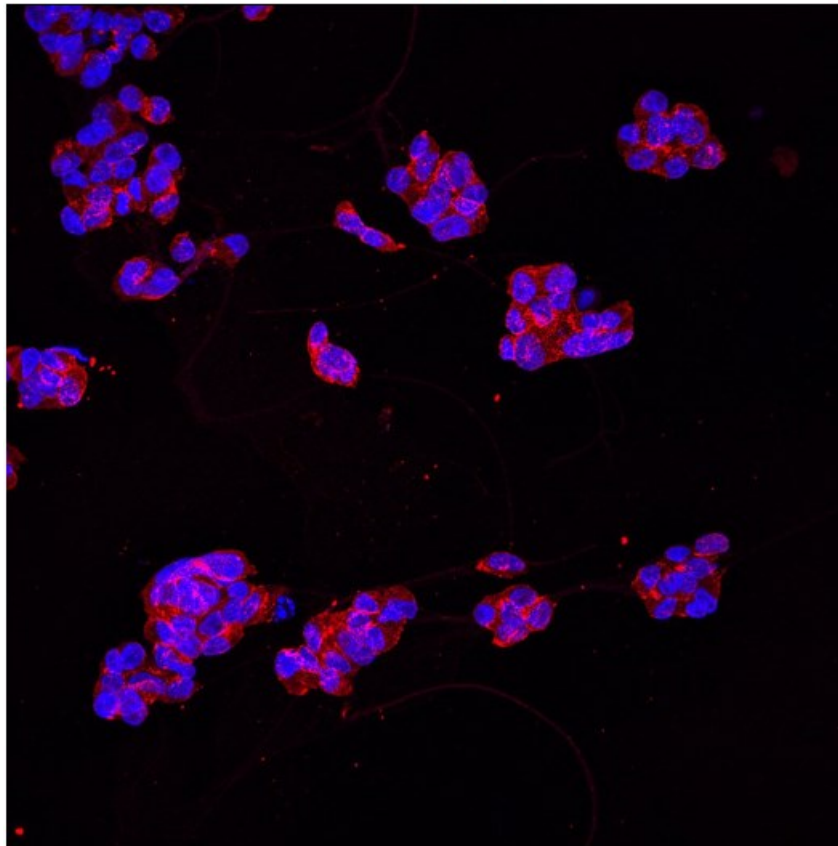


Figura 9: immagine delle cellule GSC 1 ottenuta mediante microscopia confocale con ingrandimento 40X. In blu sono rappresentati i nuclei, in rosso la proteina NAMPT.

DAPI NAMPT

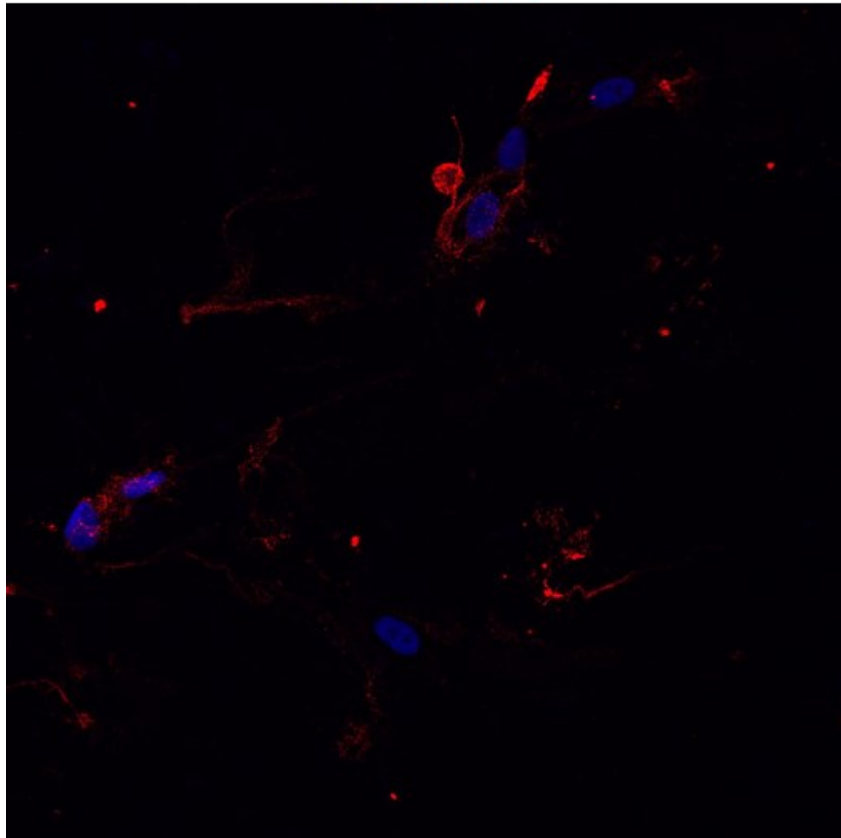


Figura 10: immagine delle cellule astrociti umani ottenuta mediante microscopia confocale con ingrandimento 40X. In blu sono rappresentati i nuclei, in rosso la proteina NAMPT.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Il Glioblastoma multiforme è il tipo più aggressivo di tumore cerebrale maligno, negli ultimi decenni sono stati ottenuti pochi progressi terapeutici.¹ Questa situazione è attribuibile a diversi fattori che ostacolano lo sviluppo di terapie efficaci come: la difficoltà di attraversamento della barriera emato-encefalica, l'eterogeneità intertumorale, intratumorale e la resistenza delle cellule staminali cancerose.⁴ Queste ultime mantengono un livello costante di

proliferazione illimitata e sono resistenti agli approcci terapeutici, quindi possono sopravvivere al trattamento e dare origine a recidive.²⁵

La terapia standard prevede il trattamento con Temozolomide in associazione a radioterapia, ma non sta avendo molto successo, non si sono visti significativi miglioramenti.⁴

NAMPT è l'enzima limitante la biosintesi del NAD⁺, è stato localizzato sia a livello intracellulare (iNAMPT) che extracellulare (eNAMPT).¹⁵ eNAMPT è coinvolto nella risposta infiammatoria¹⁹, invece iNAMPT è sovraespresso in diversi tipi di tumori, è un potente oncogene in quanto promuove la proliferazione cellulare aumentando la sintesi di NAD⁺. Tutto ciò causa una maggior progressione e sviluppo del tumore.¹⁷ Nel GBM si sono verificati livelli aumentati di NAMPT, l'inibizione di quest'ultimo causa l'esaurimento del contenuto di NAD⁺ nella cellula, portando all'inibizione della sintesi di ATP. Questo effetto può causare una diminuzione della proliferazione delle cellule tumorali e della morte cellulare, principalmente per apoptosi.

Per confermare NAMPT come potenziale bersaglio terapeutico, è stata studiata la sua espressione in vitro su diverse linee cellulari: le glioma stem cells (GSC) 1 e 2 e le linee cellulari differenziate U251 e U373. Con tecniche come la PCR quantitativa (qPCR) e il Western Blot, si è misurata l'espressione di mRNA e proteine di NAMPT, rilevando una sovraespressione di iNAMPT sia nelle GSC sia nelle linee cellulari GBM differenziate rispetto agli astrociti umani, utilizzati come controllo non tumorale.

Successivamente, le cellule sono state trattate con tre inibitori di iNAMPT (FK866, MV78 e MV87) a cinque diverse concentrazioni (1nM, 5nM, 10nM, 100nM, 1µM). FK866 ha dimostrato un'elevata citotossicità nelle GSC 1 e 2 anche a basse dosi, risultando selettivo per le cellule tumorali senza compromettere la vitalità degli astrociti umani. Nelle linee cellulari differenziate U251 e U373, FK866 ha mostrato citotossicità solo a concentrazioni più elevate.

Gli inibitori MV78 e MV87, invece, sono risultati meno citotossici rispetto a FK866, a causa di modifiche strutturali. Questi composti hanno mostrato un effetto significativo solo a concentrazioni elevate (100nM e 1 μ M), inibendo iNAMPT nelle GSC e riducendo la vitalità cellulare del 50% nelle linee U251 e U373. Tuttavia, tutti e tre gli inibitori hanno avuto un impatto minimo sulla vitalità degli astrociti umani, confermando sia una minore espressione di iNAMPT in queste cellule sia la specificità degli inibitori per le linee tumorali. Le immagini ottenute mediante microscopia confocale confermano i risultati ottenuti tramite Western Blot e PCR: è presente una sovraespressione di NAMPT nelle cellule GSC 1 e 2, mentre negli astrociti umani NAMPT è poco espresso.

Questi risultati forniscono una base promettente per lo sviluppo di nuovi inibitori di iNAMPT, selettivi come potenziale terapia per il trattamento del glioblastoma multiforme.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Pandey R, Caflisch L, Lodi A, Brenner AJ, Tiziani S. Metabolomic signature of brain cancer. *Mol Carcinog.* 2017;56(11):2355-2371. doi:10.1002/mc.22694
2. Whitfield BT, Huse JT. Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathol.* 2022;32(4):e13062. doi:10.1111/bpa.13062
3. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, et al. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers.* 2022;14(10):2412. doi:10.3390/cancers14102412
4. Yalamarty SSK, Filipczak N, Li X, et al. Mechanisms of Resistance and Current Treatment Options for Glioblastoma Multiforme (GBM). *Cancers.* 2023;15(7):2116. doi:10.3390/cancers15072116
5. Czarnywojtek A, Borowska M, Dyrka K, et al. Glioblastoma Multiforme: The Latest Diagnostics and Treatment Techniques. *Pharmacology.* 2023;108(5):423-431. doi:10.1159/000531319
6. Davis M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs.* 2016;20(5):S2-S8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8
7. Wu W, Klockow JL, Zhang M, et al. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacol Res.* 2021;171:105780. doi:10.1016/j.phrs.2021.105780
8. Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* 2016;3(3):198-210. doi:10.1016/j.gendis.2016.04.007
9. Paolillo M, Boselli C, Schinelli S. Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. *Brain Sci.* 2018;8(1):15. doi:10.3390/brainsci8010015
10. Nelson TA, Dietrich J. Investigational treatment strategies in glioblastoma: progress made and barriers to success. *Expert Opin Investig Drugs.* 2023;32(10):921-930. doi:10.1080/13543784.2023.2267982
11. Gisina A, Kholodenko I, Kim Y, Abakumov M, Lupatov A, Yarygin K. Glioma Stem Cells: Novel Data Obtained by Single-Cell Sequencing. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22):14224. doi:10.3390/ijms232214224

12. Biserova K, Jakovlevs A, Uljanovs R, Strumfa I. Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. *Cells*. 2021;10(3):621. doi:10.3390/cells10030621
13. Agosti E, Zeppieri M, De Maria L, et al. Glioblastoma Immunotherapy: A Systematic Review of the Present Strategies and Prospects for Advancements. *Int J Mol Sci*. 2023;24(20):15037. doi:10.3390/ijms242015037
14. Lucena-Cacace A, Umeda M, Navas LE, Carnero A. NAMPT as a Dedifferentiation-Inducer Gene: NAD⁺ as Core Axis for Glioma Cancer Stem-Like Cells Maintenance. *Front Oncol*. 2019;9:292. doi:10.3389/fonc.2019.00292
15. Navas LE, Carnero A. Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) Metabolism as a Relevant Target in Cancer. *Cells*. 2022;11(17):2627. doi:10.3390/cells11172627
16. Heske CM. Beyond Energy Metabolism: Exploiting the Additional Roles of NAMPT for Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2020;9:1514. doi:10.3389/fonc.2019.01514
17. Navas LE, Carnero A. NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):2. doi:10.1038/s41392-020-00354-w
18. Lucena-Cacace A, Otero-Albiol D, Jiménez-García MP, Peinado-Serrano J, Carnero A. NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis. *Oncotarget*. 2017;8(59):99514-99530. doi:10.18632/oncotarget.20577
19. Travelli C, Colombo G, Aliotta M, et al. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) neutralization counteracts T cell immune evasion in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2023;11(10):e007010. doi:10.1136/jitc-2023-007010
20. Wei Y, Xiang H, Zhang W. Review of various NAMPT inhibitors for the treatment of cancer. *Front Pharmacol*. 2022;13:970553. doi:10.3389/fphar.2022.970553
21. Perryman R, Chau TW, De-Felice J, O'Neill K, Syed N. Distinct Capabilities in NAD Metabolism Mediate Resistance to NAMPT Inhibition in Glioblastoma. *Cancers*. 2024;16(11):2054. doi:10.3390/cancers16112054
22. Galli U, Colombo G, Travelli C, Tron GC, Genazzani AA, Grolla AA. Recent Advances in NAMPT Inhibitors: A Novel Immunotherapeutic Strategy. *Front Pharmacol*. 2020;11:656. doi:10.3389/fphar.2020.00656

23. Zhang S long, Xu T ying, Yang ZL, Han S, Zhao Q, Miao C yu. Crystal structure-based comparison of two NAMPT inhibitors. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(2):294-301. doi:10.1038/aps.2017.80
24. Travelli C, Aprile S, Mattoteia D, et al. Identification of potent triazolylpyridine nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors bearing a 1,2,3-triazole tail group. *Eur J Med Chem.* 2019;181:111576. doi:10.1016/j.ejmech.2019.111576
25. Piper K, DePledge L, Karsy M, Cobbs C. Glioma Stem Cells as Immunotherapeutic Targets: Advancements and Challenges. *Front Oncol.* 2021;11:615704. doi:10.3389/fonc.2021.615704