



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia (LM-6)
Curriculum Biomedico-Biomolecolare

TESI DI LAUREA

**Analisi della localizzazione e funzione nucleare dell'enzima NAMPT
nelle cellule di melanoma**

Relatore: Prof. Valentina Audrito

Candidata: Beatrice Ghezzi

Matricola: 20050206

Anno accademico 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 IL MELANOMA CUTANEO	2
1.1.1 INCIDENZA E FATTORI DI RISCHIO	2
1.1.2- MORFOLOGIA, IDENTIFICAZIONE DEL MELANOMA E STADIAZIONE.....	4
1.1.3 IL RUOLO DI BRAF NEL MM.....	6
1.1.4 TERAPIE ATTUALMENTE IN USO PER IL TRATTAMENTO DEL MM	8
1.1.5 I MECCANISMI DI RESISTENZA	13
1.1.6 LA PLASTICITA' METABOLITICA NEL MM.....	14
1.2 NICOTINAMIDE ADENINA DINUCLEOTIDE (NAD): COFATTORE ENERGETICO.....	16
1.2.1 NICOTINAMIDE FOSFORIBOSILTRANSFERASI (NAMPT): L'ENZIMA LIMITANTE NELLA BIOSINTESI DI NAD	19
1.2.2 NAMPT E TUMORI	21
1.2.3 NAMPT E MELANOMA METASTATICO.....	24
1.3 STRUTTURA DEL NUCLEO	25
1.3.1- MECCANISMI DI TRASPORTO NUCLEARE	27
1.3.2 NAMPT E LOCALIZZAZIONE NUCLEARE	31
1.3.3 IL RUOLO DI GAPDH NEL TRASPPORTO NUCLEARE DI NAMPT	32
2. SCOPO DEL LAVORO	34
3. MATERIALI E METODI	36
3.1 – COLTURE CELLULARI	37
3.1.1 – LINEE CELLULARI	37
3.1.2 – CRESCITA E MANTENIMENTO DELLE COLTURE CELLULARI	38
3.1.3 TECNICHE DI CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO	39
3.1.4 CONTA CELLULARE	40
3.1.5 GENERAZIONE DI UN VETTORE LENTIVIRALE E INFEZIONE DELLE CELLULE	41
3.2 LISATI PROTEICI TOTALI.....	42
3.2.1 LISI CON SEPARAZIONE NUCLEO-CITOSOL	43
3.2.2 DISEGNO SPERIMENTALE PER IL FRAZIONAMENTO NUCLEO/CITOSOL	44
3.2.3 QUANTIFICAZIONE PROTEICA CON METODO BRADFORD	45
3.2.4 ELETTROFORESI SU GEL DI POLICRILAMMIDE	46

3.2.5 TRASFERIMENTO GEL SU MEMBRANA DI NITROCELLULOSA E WESTERN BLOT.....	47
3.2.6 ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI IN CHEMILUMINESCENZA .	48
3.2.7 ANTICORPI UTILIZZATI.....	49
3.3 MICROSCOPIA CONFOCALE	49
3.4 SAGGIO DI FORMAZIONE DI COLONIE (CFU)	50
3.4.1 DISEGNO SPERIMENTALE PER I CFU	51
3.5 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE: CCK8.....	51
3.5.1 DISEGNO SPERIMENTALE PER I CCK8.....	52
3.6 MICROARRAY TISSUTALI AD ALTA DENSITA' (TMA) e ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA.....	53
3.7 ANALISI STATISTICHE	56
4. RISULTATI.....	57
4.1 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCCOLO DI FRAZIONAMENTO NUCLEO/CITOSOL	58
4.2 NAMPT È OVERESPRESSO NELLE LINEE DI MELNAOMA RESISTENTI (BiR) UTILIZZATE IN LABORATORIO	61
4.3 NAMPT È MAGGIORMENTE PRESENTE NEI NUCLEI DELLE LINEE RESISTENTI (BiR).....	63
4.4 NAMPT È ABBONDANTE NEL NUCLEO DEI PAZIENTI EVIDENZIATO TRAMITE IMMUNOISTOCHEMICA SU TESSUTO	67
4.6 GENERAZIONE DI UNA LINEA OVERESPRESSIVAMENTE NAMPT NEL NUCLEO	72
4.7 LA LINEA A375 NLS_NAMPT CRESCE MAGGIORMENTE RISPETTO ALLA LINEA DI CONTROLLO SCR.....	73
4.8 LA LINEA A375 NLS_NAMPT ACQUISISCE UNA RESISTENZA INTRINSECA AGLI INIBITORI DI BRAF E MEK	76
5. DISCUSSIONE.....	81
6. CONCLUSIONI	86
7. BIBLIOGRAFIA.....	89

1. INTRODUZIONE

1.1 IL MELANOMA CUTANEO

Il melanoma è un tumore che si origina dalla trasformazione maligna dei melanociti della cute e delle mucose o molto più raramente, dai melanociti delle sedi extracutanee, come occhio e meningi. Il melanoma cutaneo maligno è il più frequente ed è una neoplasia potenzialmente fatale perché ha un elevato potenziale metastatico (melanoma metastatico MM) con un'eziologia complessa e multifattoriale. I melanociti costituiscono una popolazione cellulare minoritaria nell'epidermide, con solo 1500 melanociti per mm^2 (Davis et al., 2019). I melanociti sono dispersi in tutto lo strato basale dell'epidermide e possono estendere i dendriti fino a contattare 40 cheratinociti, formando "unità epidermo-melaniniche". In risposta alle radiazioni UV i cheratinociti, sotto stimolazione dei melanociti, producono l'ormone stimolante α -melanotropo (α -MSH) che si lega al recettore della melanocortina-1 (MC1R) per indurre la sintesi di melanina, un ormone che garantisce un'efficace fotoprotezione della cute (Bento-Lopes et al., 2023). I melanociti possono sintetizzare due tipi di melanina: l'eumelanina nera/marrone e la feomelanina giallo/rossa. Il rapporto tra le due forme definisce il colore della pelle: l'eumelanina è tipica delle persone scure donando un'ottima protezione contro le radiazioni UV e un minor rischio di sviluppare tumori della pelle; mentre la feomelanina offre una minore protezione contro gli UV e produce agenti cancerogeni (Morgan et al., 2013; Premi et al., 2015).

1.1.1 INCIDENZA E FATTORI DI RISCHIO

In un'epoca in cui l'incidenza di molti tumori è in diminuzione, il tasso di incidenza del melanoma è in forte aumento in tutto il mondo; nel 2020 sono stati registrati 325.000 nuovi casi nel mondo (Saginala et al., 2021), dovuto alla migrazione di persone dalla pelle chiara verso aree più vicine all'equatore dove le radiazioni UV sono maggiori e dal modo scorretto di esporsi al sole senza adeguati filtri solari. Tuttavia, sebbene l'incidenza del melanoma sia in continuo aumento in tutto il mondo, il melanoma è una malattia antica, il primo caso documentato fu registrato nel V secolo da Ippocrate di Cos (Rebecca et al., 2012).

In Italia nel 2020 sono stati diagnosticati 14.863 nuovi casi di melanoma metastatico, un valore incrementato del 20% rispetto al 2019.

A differenza di altri tumori solidi, il melanoma colpisce soprattutto le persone giovani e di mezza età; l'incidenza di questo tumore aumenta linearmente dopo i 25 anni fino

all'età di 50 anni per poi rallentare, soprattutto nelle donne (Rastrelli marco et al., 2014). La diversa prevalenza nei due sessi va analizzata in relazione all'età: il tasso di incidenza del melanoma è maggiore nelle donne rispetto agli uomini fino ai 40 anni, tuttavia, all'età di 75 anni, l'incidenza è quasi 3 volte più elevata negli uomini rispetto alle donne; anche la sede di insorgenza del cancro dipende dal sesso, le zone più comuni sono la schiena nell'uomo, braccia e gambe nelle donne (Rastrelli et al., 2014).

Il melanoma è considerata una malattia multifattoriale, tra i principali fattori di rischio troviamo:

1. Esposizione ai raggi ultravioletti (UV): è il rischio ambientale più importante e potenzialmente modificabile per lo sviluppo del melanoma. Esistono due tipi di radiazioni UV principalmente coinvolte nello sviluppo dei tumori della pelle: le radiazioni ultraviolette di tipo A (UVA, λ 315 nm-400 nm) e radiazioni ultraviolette di tipo B (UVB, λ 280 nm-315 nm). Gli UVA rappresentano il 95% della luce solare, riescono a penetrare meglio nel derma ma sono meno genotossici degli UVB (Sample & He, 2018). L'esposizione non protetta alle radiazioni UV danneggia il sistema di riparo del DNA, causando errori durante la replicazione che portano allo sviluppo di mutazioni in geni coinvolti nella proliferazione e apoptosi che a loro volta regolano vie di segnalazione cellulare che vengono deregolate promuovendo la cancerogenesi. Le proteine principalmente mutate nel melanoma sono gli oncogeni NRAS e BRAF, appartenenti alla famiglia delle proteine chinasi attivate dal mitogeno (MAPK), responsabili della crescita e differenziazione cellulare (Goel et al., 2006; Thomas et al., 2007).
2. Fattori genetici: una storia familiare di melanoma costituisce un forte fattore di rischio per la malattia. Il melanoma può essere considerato un modello di ereditarietà autosomica dominante. Le anomalie genetiche più comuni riscontrate in queste famiglie sono mutazioni nell'inibitore della chinasi ciclina-dipendente 2A (CDKN2A). Inoltre, altre patologie tumorali come retinoblastoma familiare, sindrome tumorale di Li-Fraumeni e sindrome di Lynch di tipo II, predispongono l'individuo a sviluppare con un rischio più elevato il melanoma (Eddy & Chen, 2020).
3. Caratteri personali (fototipo): carnagione chiara, occhi chiari, capelli chiari o rossi, presenza di lentiggini, storia di scottature solari (Williams et al., 2011).

4. Abbondanza di nevi: i nevi melanocitici sono lesioni cutanee benigne derivanti dalla proliferazione dei melanociti per un iniziale accumulo di mutazioni principalmente a carico di BRAF. I nevi sono considerati sia precursori che indicatori diretti di aumentato rischio di melanoma (Damsky & Bosenberg, 2017).

1.1.2- MORFOLOGIA, IDENTIFICAZIONE DEL MELANOMA E STADIAZIONE

Il melanoma presenta due stadi di crescita: uno radiale e uno verticale. La crescita radiale è la fase iniziale dove la malattia è localizzata e limitata alla pelle ed è quindi possibile intervenire chirurgicamente. Nella fase di crescita verticale si forma un nodulo tumorale che si approfonda nel derma e inizierà a dare metastasi (Heistein et al., 2024). A livello clinico si distinguono tre tipi di lesioni in base alla loro profondità:

- Sottile, massima profondità 1mm;
- Moderata, profondità tra 1 e 4mm;
- Profonda, profondità maggiore di 4 mm (Heistein et al., 2024)).

Il melanoma può essere classificato in quattro tipi principali a seconda della crescita:

- Melanoma a diffusione superficiale, presenta una fase di crescita intraepidermica breve. Rappresenta il 70% dei melanomi con lesioni di diametro medio di 2 cm di colori variegati;
- Melanoma nodulare, rappresenta il 15-30% dei melanomi, generalmente presentano una colorazione blu-nera. Presenta una prognosi peggiore insieme al melanoma lentiginoso acrale;
- Melanoma lentigo maligna, localizzato principalmente nelle zone cutanee maggiormente esposte alle radiazioni. La sua prevalenza è del 4-10%. Le lesioni inizialmente sono molto piccole per poi crescere fino a un diametro di 3cm. Presentano una pigmentazione marrone chiaro;
- Melanoma lentiginoso acrale, rappresenta il 2-8% dei melanomi nei pazienti con carnagione chiara e il 35-60% dei melanomi nei pazienti con carnagione scura. Le lesioni sono localizzate principalmente nel palmo delle mani, pianta dei piedi e letto ungueale che possono portare a ulcerazioni negli stadi successivi (Heistein et al., 2024).

L'anamnesi del melanoma, a livello fisico, prevede di sorvegliare i nevi in base ai criteri ABCDE, ovvero asimmetria, irregolarità dei bordi, variazioni di colore, diametro (>6mm) ed evoluzione. Questi criteri hanno permesso di diagnosticare

numerosi casi di melanoma; tuttavia, alcuni sono rimasti asintomatici e non diagnosticati (melanomi nodulari) per questo è stata proposta una nuova regola del “EFG”, considerando, quindi, anche l’elevazione, la compattezza e la crescita (Chamberlain et al., 2003; Friedman et al., 1985; Kelly, 2005; Marghoob et al., 2019); (Figura 1).

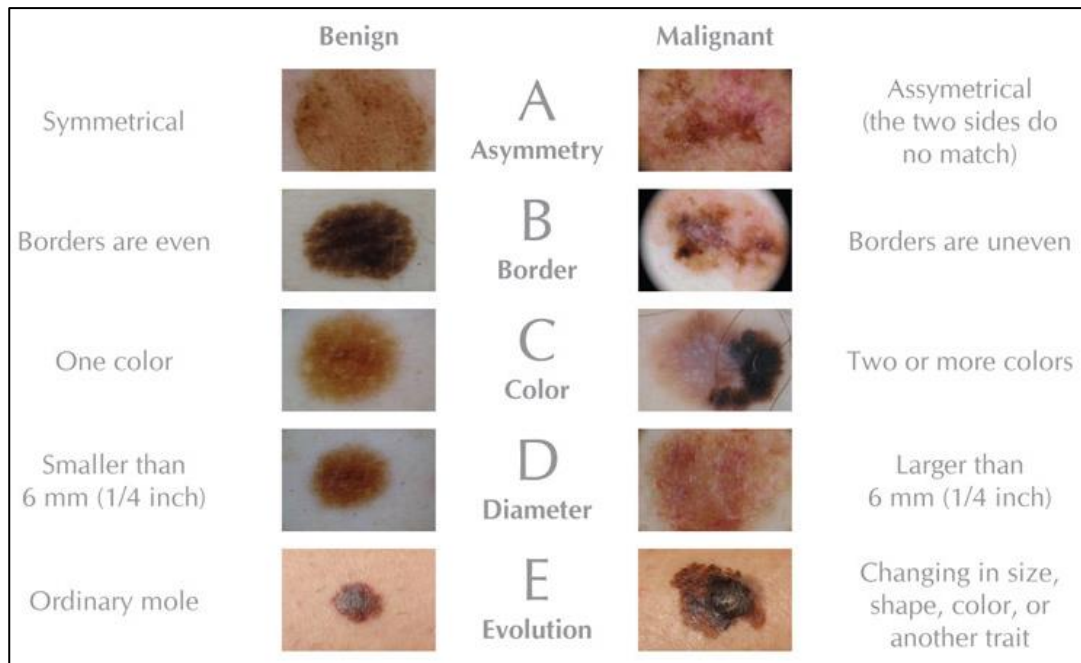


Figura 1 Valutazione ABCD EFG per anamnesi MM.

<https://www.aimatmelanoma.org>

Le lesioni possono sanguinare, prudere e ulcerarsi e sviluppare delle metastasi, causando sintomi a seconda degli organi interessati (Heistein et al., 2024).

Il melanoma si classifica secondo quattro stadi (Figura 2):

- **Stadio 0:** il melanoma è confinato agli strati superficiali della pelle senza invasione profonda né metastasi. Questo stadio è noto come "in situ" (confinato).
- **Stadio I:** 1 melanoma ha uno spessore fino a 2 mm. La lacerazione tissutale può essere presente, ma non ci sono metastasi linfonodali o viscerali. Questo stadio si divide in:
 - IA: Gravità inferiore, senza ulcerazione.
 - IB: Gravità lievemente superiore, con ulcerazione.
- **Stadio II:** Il melanoma ha uno spessore compreso tra 1.01 mm e oltre 4.00 mm e può presentare ulcerazioni. Non ci sono metastasi linfonodali o viscerali. Le sottoclassi sono:

- **IIA:** Spessore 1.01-2.00 mm con ulcerazione o 2.01-4.00 mm senza ulcerazione.
- **IIB:** Spessore 2.01-4.00 mm con ulcerazione o oltre 4.00 mm senza ulcerazione.
- **IIC:** Spessore oltre 4.00 mm con ulcerazione.
- **Stadio III:** Il melanoma può presentare metastasi ai linfonodi regionali. Le sottoclassi sono:
 - **IIIA:** Tumori di qualsiasi spessore senza ulcerazione con micrometastasi in 1-3 linfonodi.
 - **IIIB:** Tumori di qualsiasi spessore con metastasi in 1-3 linfonodi o metastasi satelliti.
 - **IIIC:** Tumori di qualsiasi spessore con macrometastasi in 4 o più linfonodi o metastasi satelliti.
- **Stadio IV:** Il melanoma presenta metastasi linfonodali distali, metastasi viscerali (polmoni, ossa, cervello).

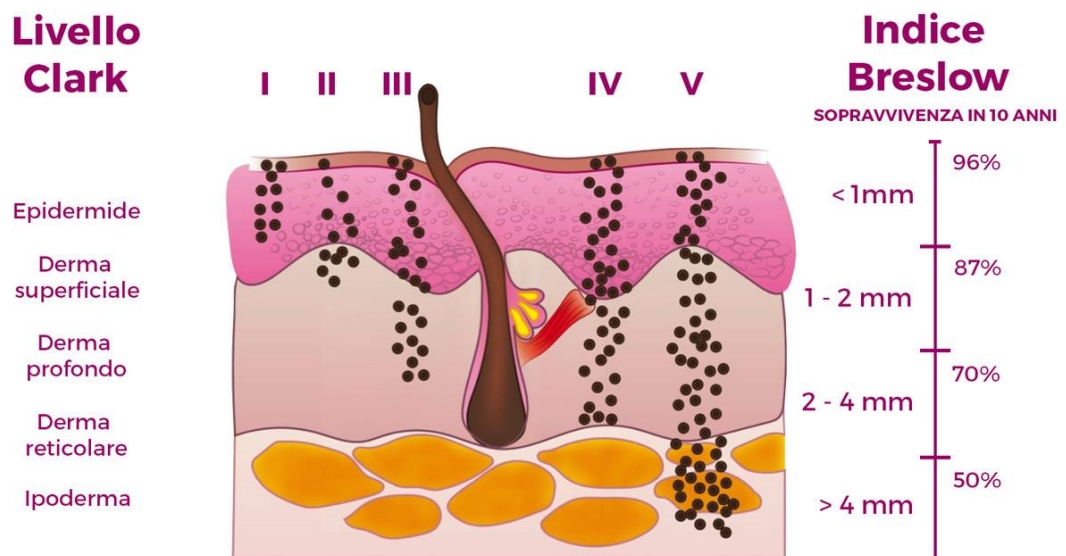


Figura 2 Stadiazione del melanoma
<https://apaim.it/melanoma/gli-stadi-del-melanoma/>

1.1.3 IL RUOLO DI BRAF NEL MM

Le mutazioni che portano all'insorgenza del melanoma attivano la via di segnalazione di MAPK, un regolatore della proliferazione, differenziamento, migrazione e apoptosi cellulare (Casula et al., 2016; Sullivan & Flaherty, 2013). Questa via viene attivata dal legame di un fattore di crescita con il recettore tirosin-chinasico (RTK) che stimola l'attività di idrolisi della guanosin-trifosfato (GTPasi) della proteina RAS. La via di

segnalazione prosegue con la fosforilazione di BRAF da parte di RAS, la proteina BRAF fosforilata è in grado di legare e fosforilare a sua volta MEK. Tale cascata di attivazione culmina con la fosforilazione e la successiva traslocazione nel nucleo di ERK, in grado di fosforilare specifici fattori di trascrizione, responsabili dell'espressione di geni coinvolti nei processi di crescita e differenziamento cellulare (Raman et al., 2007) (Figura 3). In condizioni fisiologiche la cascata delle MAPK viene inibita a monte, mediante un meccanismo di feedback negativo. Tuttavia, nelle cellule tumorali che presentano mutazioni del protooncogene BRAF, il processo di attivazione del pathway MAPK è diverso: infatti l'assenza di un fisiologico feedback negativo induce una permanente attivazione della cascata, che conduce ad una proliferazione cellulare incontrollata, una maggiore resistenza all'apoptosi e alla senescenza, maggiore capacità di neo-angiogenesi favorite dall'attivazione di hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) e Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), evasione dal sistema immunitario e capacità di dare metastasi (Ascierto et al., 2012; Lake et al., 2016; Maurer et al., 2011; Nissan et al., 2014) (Figura 3).

La proteina BRAF è una serin/treonin protein-chinasi, appartenente alla famiglia RAF, costituita da 766 aa con locus genico sul cromosoma 7. È costituita da tre domini: due con funzione regolatrice e un dominio catalitico, responsabile della fosforilazione di MEK nel pathway MAPK (Wellbrock et al., 2004). Nel melanoma, circa il 50% dei pazienti presentano mutazioni in BRAF. Tali mutazioni insorgono quasi sempre a livello della tripletta in posizione 600, che codifica per l'aminoacido valina. Circa l'80-90% delle mutazioni BRAF sono V600E (valina sostituita con acido glutammico), mentre il 5-12% sono V600K (valina sostituita da lisina) e $\leq 5\%$ sono V600D (valina sostituita da acido aspartico) o V600R (valina sostituita da arginina) (Lovly et al., 2012; Rubinstein et al., 2010).

BRAF mutato e costitutivamente attivo è una proteina fondamentale nel melanoma metastatico e rappresenta il principale target delle terapie bersaglio per contrastare il MM e attualmente utilizzate in clinica (Ascierto et al., 2012) (Figura 3).

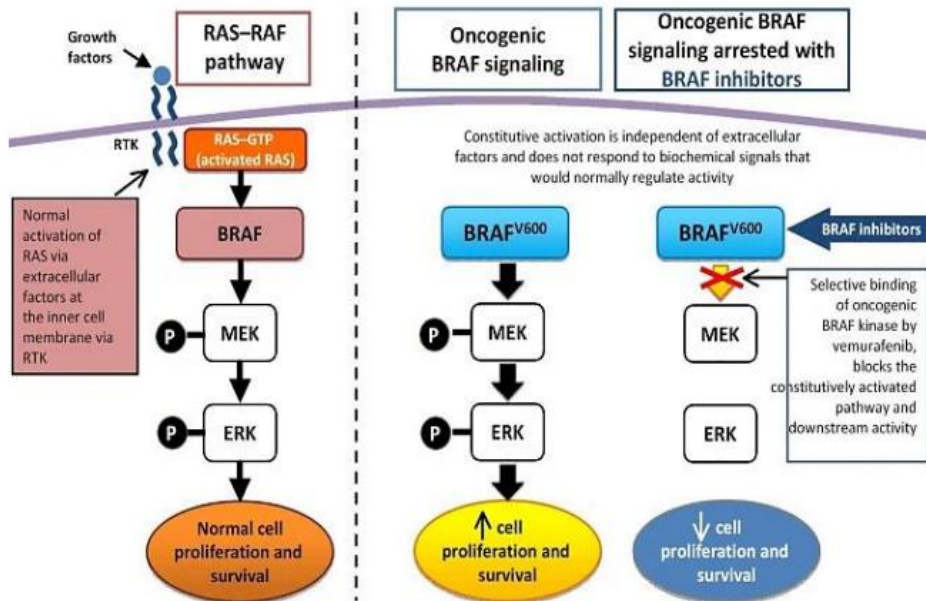


Figura 3 Via di segnalazione BRAF oncogenica

Ascierto et al., 2012

1.1.4 TERAPIE ATTUALMENTE IN USO PER IL TRATTAMENTO DEL MM

Se diagnosticato precocemente il melanoma localizzato (primitivo) può essere rimosso chirurgicamente con una buona prognosi. Quando diventa invasivo e metastatico (stadio III-V), tuttavia, si trasforma in una neoplasia più aggressiva e difficile da rimuovere chirurgicamente. Qualche decennio fa l'unica strategia era la chemioterapia che prevedeva l'utilizzo di Decarbazina. Lo scopo di una terapia chemioterapica è quello di bloccare la divisione cellulare del tumore. Considerando i pochi vantaggi e gli scarsi risultati di questo tipo di approccio, ad oggi le terapie bersaglio e l'immunoterapia sono i principali approcci adottati (Eddy & Chen, 2020).

La terapia al bersaglio o targeted therapy introdotta nel 2011 nel melanoma con il commercio del primo farmaco contro BRAF mutato (Vemurafenib) (Figura 4), utilizza molecole specifiche in grado di andare ad inibire i bersagli mutati e bloccarne gli effetti. Ad oggi nei pazienti vengono somministrati BRAF e MEK inibitori in combinazione. Gli inibitori bersagliano il sito di legame dell'ATP presente nel BRAF o nel MEK mutato (Domingues et al., 2018). La somministrazione di un BRAF inibitore ripristina la corretta funzionalità della via MEK/RAF, generando così una regolare crescita cellulare e una diminuzione della sopravvivenza delle cellule tumorali (Ascierto et al., 2012). Queste terapie sono più efficaci rispetto alla chemioterapia, con

una migliore tolleranza e minore tossicità per il paziente. Tuttavia, dopo un paio di mesi dalla fine del trattamento si instaurano dei meccanismi di resistenza (Castellani et al., 2023).

Nel 2011 la US Food and Drug Administration (FDA) ha approvato un nuovo farmaco per il trattamento dei pazienti con melanoma metastatico che va ad inibire potentemente la chinasi mutata BRAF V600E: PLX4032 Vemurafenib, provocando un arresto della proliferazione cellulare (Brummer et al., 2019). Il farmaco mostra ottima tollerabilità nella dose massima di 960 mg due volte al dì, ma ha numerosi effetti collaterali quali: artralgia, fotosensibilità, rash, affaticamento, disturbi intestinali fino allo sviluppo del carcinoma cutaneo a cellule squamose. Tuttavia, il problema principale è lo sviluppo di resistenza dopo trattamenti di alcuni mesi (Ascierto et al., 2012). Negli stessi anni è stato inserito in studi clinici un altro farmaco, il Dabrafenib, il quale va ad agire sulle principali mutazioni in BRAF, BRAF V600E e BRAF V600K. Confrontandolo con gli effetti della Decarbazina (principale farmaco chemioterapico), il Dabrafenib risulta essere meno tossico e con tassi di risposta più elevati, ma anche questo, come il Vemurafenib, può portare all'acquisizione di resistenze (Bowyer et al., 2015).

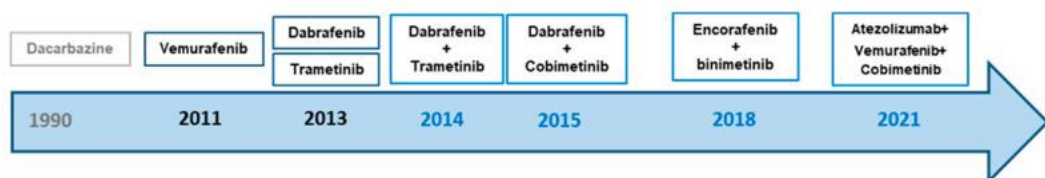


Figura 4 Cronologia dei farmaci delle terapie bersaglio approvati dalla FDA
Castellani et al., 2023

Un nuovo obiettivo nella terapia del MM è la combinazione di più farmaci per evitare, o limitare, il processo di resistenza (Figura 5). Queste terapie combinate mirano a inibire differenti vie di trasduzione del segnale per la sopravvivenza delle cellule tumorali (Michielin et al., 2020). Un altro bersaglio della target therapy è un enzima della via di segnalazione delle MAPK, la chinasi MEK che risulta essere mutata soprattutto nello stadio IV del melanoma. I MEK inibitori sono somministrati in associazione con i BRAF inibitori o, meno frequentemente perché poco efficaci, in monoterapia.

L'utilizzo di un BRAFi associato ad un inibitore di MEK (MEKi) porta all'inibizione dell'attivazione di MEK, superando così la resistenza ai farmaci contro BRAFi (Long

et al., 2019) (Figura 5). Tra questi MEKi troviamo il Trametinib, inibitore allosterico di MEK, altamente selettivo che regola l'attività e l'attivazione delle chinasi MEK1 e MEK2 (Long et al., 2019).

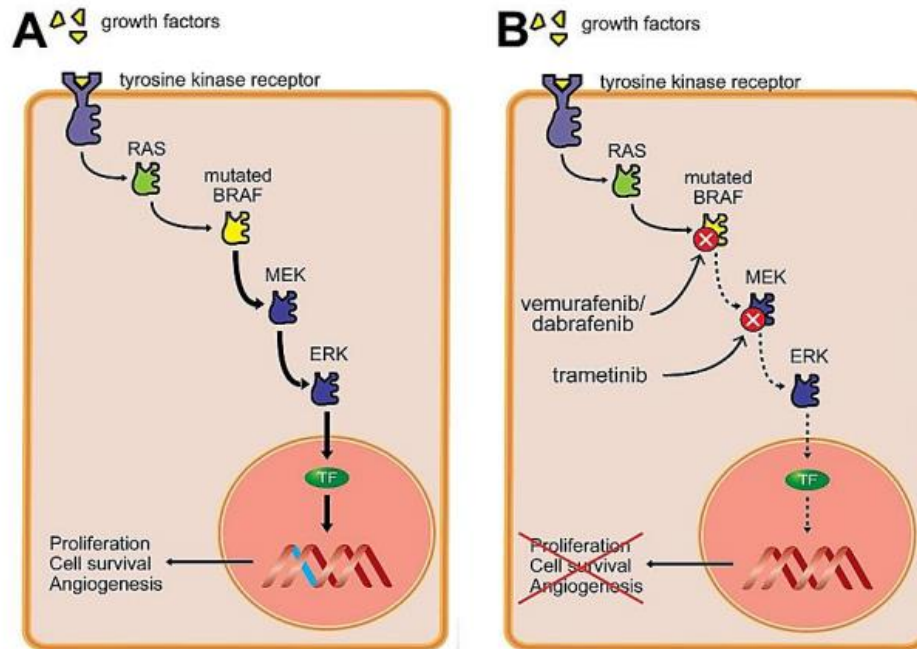


Figura 5 Meccanismo d'azione di Vemurafenib, Dabrafenib e Trametinib
Rissmann et al., 2015

Un'altra strategia terapeutica utilizzata per il MM è l'immunoterapia, una terapia con miglior efficacia e minori effetti collaterali. L'obiettivo di questa tecnica è quella di ripristinare l'immunità antitumorale del paziente, in quanto, a causa del fenomeno dell'evasione dal sistema immunitario, il sistema ha perso la capacità di agire contro le cellule neoplastiche permettendo al tumore di crescere e creare nuove metastasi (Teixidó et al., 2015).

I linfociti T e altre cellule del sistema immunitario possiedono dei meccanismi di spegnimento della risposta immunitaria, i cosiddetti checkpoint immunitari, che regolano il riconoscimento e la lisi delle cellule bersaglio per evitare l'insorgenza di patologie autoimmuni. I recettori di controllo del sistema immunitario più studiati sono la proteina-4 citotossica associata ai linfociti T (CTLA-4) e la proteina di morte cellulare programmata-1 (PD-1) (Chhabra & Kennedy, 2021; Rotte et al., 2015). L'utilizzo degli inibitori dei checkpoint immunitari (ICIs), permette di interrompere l'interazione tra i checkpoint immunitari e le cellule tumorali, consentendo così l'attivazione delle cellule T contro le cellule tumorali.

Nel 2011 l'FDA ha approvato il primo farmaco immunoterapico l'Ipilimumab, un anticorpo monoclonale che lega il CTLA4, recettore espresso sulla membrana dei linfociti T, portando a una riduzione della mortalità del MM (Chapman et al., 2011). Quando ligandi come B7-1 o B7-2, espressi da altre cellule immunitarie, interagiscono con CTLA4, quest'ultimi vengono inibiti; mentre quando Ipilimumab lega CTLA4, impedisce l'inibizione dei linfociti T che si attiveranno e andranno ad aggredire le cellule neoplastiche (Davis et al., 2019) (Figura 6).

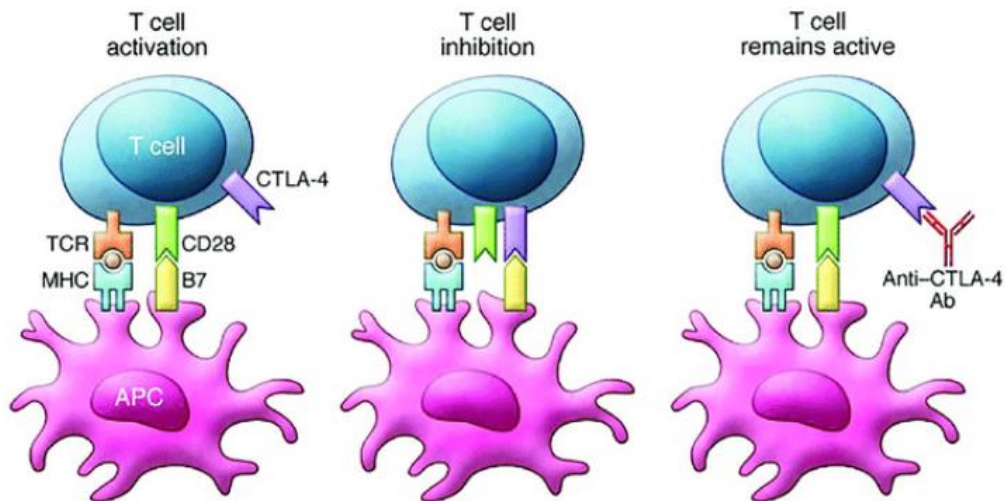


Figura 6 Meccanismo d'azione di Ipilimumab

Zang W et al., 2021

Altri farmaci immunoterapici sono anti PD-1 (Pembrolizumab/Nivolumab, Figura 7). Nivolumab agisce bloccando la proteina PD-1, recettore co-inibitorio espresso dai linfociti T attivati. Quando PD-1 lega il suo ligando PD-L1/CD274, espresso sulle cellule tumorali, si ha un'azione inibitoria del linfocita T. Il blocco di PD-1 stimola la normale risposta immunitaria, mediando la regressione tumorale (Davis et al., 2019). Recentemente, l'immunoterapia combinata di Nivolumab e Ipilimumab è stata approvata dalla FDA come terapia sistemica di prima linea nel trattamento del MM (Larkin et al., 2019; Michielin et al., 2020).

Un altro anticorpo monoclonale è il Pembrolizumab, un anti-PD-L1 (Figura 7). A differenza di Ipilimumab, insieme a Nivolumab ha un tasso di risposta del 30-40%. Pembrolizumab si è dimostrato essere addirittura più efficiente di Nivolumab in quanto va ad agire sul ligando presente sulle cellule tumorali (De Sousa Linhares et al., 2019).

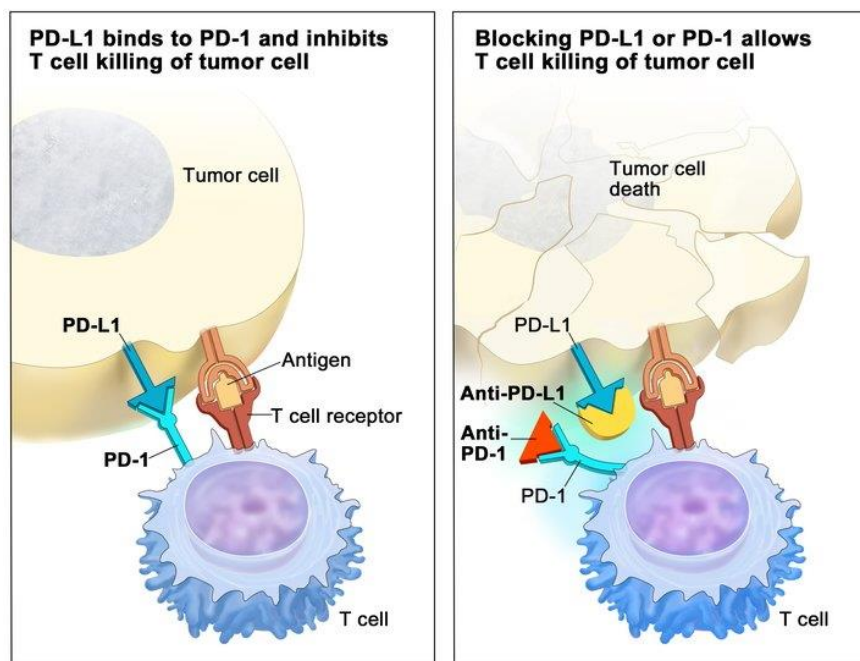


Figura 7 Attività biologica dell'immunoterapia.

Assenza (sx) e presenza (dx) di immunoterapia attraverso l'impiego di anticorpi monoclonali che bersagliano i *checkpoint* immunitari PD-1 e PD-L1
 LiStarfish.it

La combinazione di Vumerafenib, Pembrolizumab e MEK inibitori risulta ad oggi essere la migliore terapia per il trattamento del MM approvata da FDA (Gutzmer et al., 2020) (Figura 8).

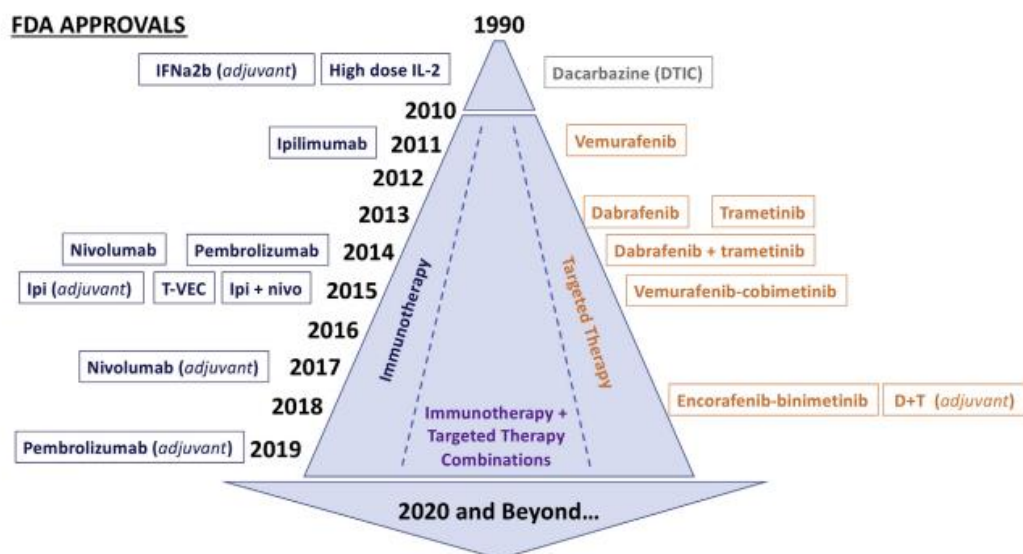


Figura 8 Approvazione dei farmaci delle terapie target e delle immunoterapie da parte della FDA

Jenkins & Fisher, 2021

1.1.5 I MECCANISMI DI RESISTENZA

Nonostante questi successi, solo una minoranza di pazienti con melanoma avanzato risponde al blocco del checkpoint, con un tasso di risposta del 10-40% con la monoterapia e fino al 58% con la terapia combinata. Pertanto, risulta necessario individuare biomarker predittivi per identificare i pazienti che hanno maggiori probabilità di trarre beneficio dal blocco dei checkpoint (Schreiber et al., 2011). Molti pazienti sviluppano dei meccanismi di resistenza dopo circa 12 mesi alla terapia al bersaglio e all'immunoterapia. Questi meccanismi possono essere innati o acquisiti, indotti da mutazioni secondarie delle cellule tumorali, per meccanismi epigenetici o modifiche del metabolismo della cellula tumorale e alterazioni del microambiente tumorale (Indini et al., 2022) (Figura 9). La resistenza primaria o innata colpisce più della metà della popolazione (fino al 60%) dove non si ha alcun tipo di beneficio dalla terapia somministrata (Indini et al., 2022). Il 15-20% di pazienti con MM sembra non mostrare alcun beneficio dalla terapia, questo può essere dovuto alla mancanza della stessa mutazione BRAF nelle cellule tumorali, secrezione di fattori endogeni, assenza di oncosoppressori (come PTEN) che vanno ad inibire la proliferazione cellulare bloccando la via PI3K/AKT (Czarnecka et al., 2020).

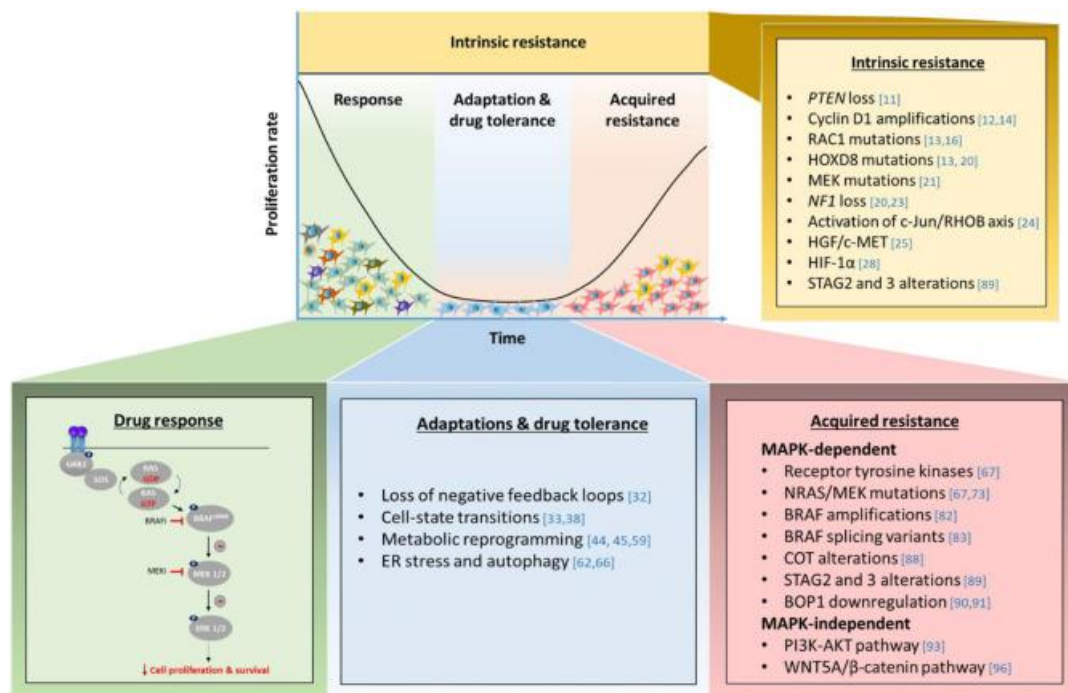


Figura 9 Rappresentazione dei principali meccanismi di resistenza intrinseca e acquisita successivi ad una fase di farmaco tolleranza da parte delle cellule tumorali trattate con le terapie bersaglio

Tangella et al., 2021

In questo contesto è stato dimostrato che l’attivazione del metabolismo di nicotinamide adenina dinucleotide (NAD) e del suo enzima biosintetico limitante nella via di riciclo della nicotinamide la nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT), sono fattori chiave nella resistenza alla target therapy e alla progressione del MM (Indini et al., 2022).

1.1.6 LA PLASTICITA’ METABOLITICA NEL MM

Le cellule di melanoma, come altri tumori, possono cambiare la loro espressione genica anche senza mutazioni genetiche ma solo in risposta a stimoli ambientali o stress terapeutico. La capacità di cambiare il proprio metabolismo in modo dinamico per adattarsi allo stress ambientale è definita plasticità metabolica, una caratteristica tipica di tutte le cellule tumorali (Grafanaki et al., 2023). Il tumore per mantenere la proliferazione incontrollata, l’invasività e la metastatizzazione delle cellule tumorali necessita di una riprogrammazione delle vie metaboliche e di un’elevata richiesta energetica (Hanahan, 2022).

Nel 1920 il fisiologo Otto Warburg descrisse per la prima volta il fenomeno dell’adattamento metabolico delle cellule tumorali, oggi conosciuto come “Effetto

Warburg”, secondo il quale le cellule tumorali non utilizzano per produrre energia la respirazione cellulare completa fino alla fosforilazione ossidativa mitocondriale (OXPHOS), ma mostrano un aumento dell’assorbimento di glucosio con parallela secrezione di lattato e acidificazione del microambiente tumorale, anche in presenza di ossigeno (glicolisi aerobia) (Figura 10). Il piruvato viene convertito in lattato mediante l’attività della lattato deidrogenasi A (LDHA), che, rilasciato nel microambiente, funge da metabolita pro-metastatico (Khajah et al., 2021; Liberti & Locasale, 2016; San-Millán & Brooks, 2017; Yang & Sauve, 2016). Warburg pensava che nei tumori i mitocondri fossero difettivi, oggi è noto che il fenotipo metabolico nei tumori è molto più complesso e le cellule tumorali sono in continua transizione metabolica e non c’è un deficit mitocondriale.

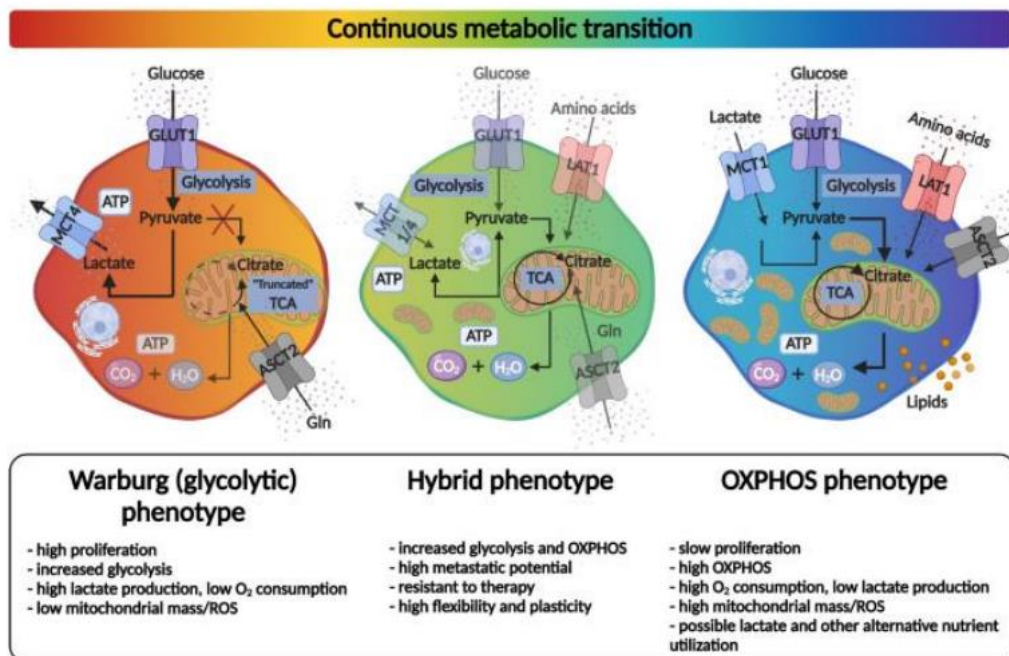


Figura 10 Transizione metabolica in cellule tumorali

Sebestyén et al., 2021

Le cellule di melanoma metabolizzano fino all’80% del glucosio in lattato, adottando un metabolismo Warburg sostenuto e rafforzato dall’attivazione oncogenica di BRAF mutato e da un ambiente ipossico (Avagliano et al., 2020). L’iperattivazione della glicolisi influenza il microambiente tumorale facilitando il processo di angiogenesi, metastasi e soppressione del sistema immunitario (Indini et al., 2022).

Durante la terapia con inibitori BRAF e MEK, che bloccano la glicolisi delle cellule di melanoma, per sopravvivere riadattano il loro metabolismo adottando un fenotipo ossidativo con elevata attività mitocondriale. Questa transizione metabolica continua

è fondamentale per promuovere la resistenza alla terapia bersaglio nel melanoma (Indini et al., 2022) (Figura 11).

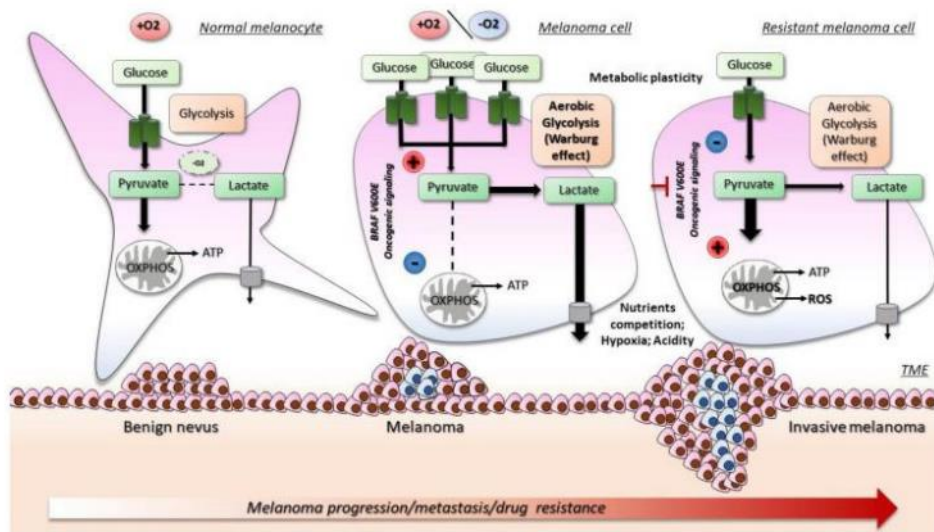


Figura 11 Plasticità metabolica nelle cellule di melanoma

Indini et al., 2022

Nei processi di riprogrammazione metabolica si osserva un'alterazione e un aumento dei livelli del co-fattore NAD, nucleotide alla base delle reazioni di ossido-riduzione impiegate nel metabolismo energetico (Chiarugi et al., 2012).

1.2 NICOTINAMIDE ADENINA DINUCLEOTIDE (NAD): COFATTORE ENERGETICO

Il NAD è un coenzima costituito da due nucleotidi, uno presenta la base azotata adenina e l'altro la nicotinamide, legati da un legame fosfoanidridico tra i rispettivi gruppi fosfato. Il NAD può essere presente in due forme: NAD⁺ ossidato e NADH forma ridotta se ha legato gli elettroni. Per questa sua caratteristica il NAD è coinvolto in reazioni di ossido-riduzione essenziali per generare ATP, ma è anche substrato di enzimi che consumano NAD come sirtuine, PARPs e NADasi come CD38, che regolano diversi processi cellulari come il riparo al DNA, l'espressione genica ed epigenetica, l'apoptosi, la trascrizione, l'immunoregolazione ed il ritmo circadiano cellulare (Figura 12) (Audrito, Managò, et al., 2020; Audrito, Messina, Moiso, et al., 2020; Chiarugi et al., 2012; Gasparrini & Audrito, 2022; Rajman et al., 2018).

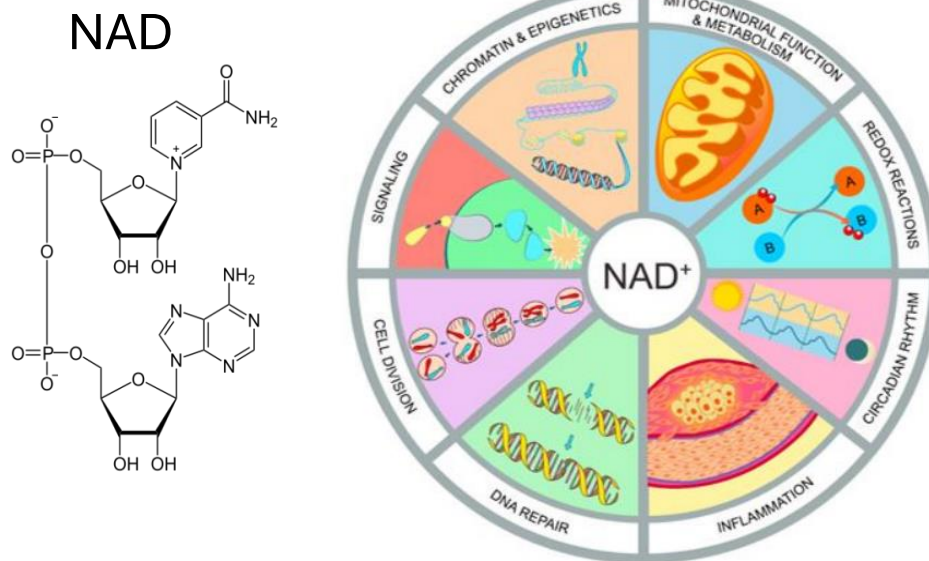


Figura 12 Funzioni del NAD

Rajman et al., 2018

Il NAD non è in grado di attraversare il doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare, ma per entrare nella cellula sfrutta gli emicanali della connessina 43 (Buonvicino et al., 2021). Inoltre, il NAD⁺ citoplasmatico può essere portato direttamente nei mitocondri dal trasportatore SLC25A51 (Luongo et al., 2020), mentre può essere secreto nello spazio extracellulare per escitosi. Il suo turn-over all'interno della cellula è dinamico, ha un'oscillazione circadiana regolata dal core CLOCK:BMAL (Nakahata et al., 2009; Ramsey et al., 2009). È importante sottolineare che l'omeostasi cellulare del NAD dipende dalla sua sintesi e consumo, ma anche dalla compartimentalizzazione subcellulare. La distribuzione cellulare del NAD(H) dipende da: espressione di enzimi biosintetici e di consumo, trasportatori specifici di ogni organello per il trasporto di NAD e suoi precursori e dalla presenza di sistemi redox che interconvertono NAD⁺ e NADH, come il ciclo di Krebs, il complesso I della catena di trasporto degli elettroni o la navetta malato-aspartato (Borst, 2020; Cantó et al., 2015).

I precursori del NAD triptofano, acido nicotinico (NA), nicotinamide (NAM), nicotinamide mononucleotide (NMN) o nicotinamide riboside (NR) vengono trasportati nella cellula tramite trasportatori specifici o per diffusione semplice. Attraverso le reazioni delle deidrogenasi citosoliche o della navetta malato-aspartato,

NAD⁺ e NADH possono essere interconvertiti per mantenere i rapporti NAD⁺: NADH citosolico e nucleare. All'interno dei mitocondri, la navetta malato-aspartato lavora in combinazione con il ciclo TCA e la catena di trasporto degli elettroni (ETC) per mantenere questo equilibrio redox (Zapata-Pérez et al., 2021).

Un corretto equilibrio tra biosintesi e degradazione del NAD è fondamentale per mantenere l'omeostasi cellulare del NAD, una qualsiasi deregolazione di tale omeostasi può portare all'insorgenza di diverse patologie. Una carenza di NAD può essere: primaria, ovvero una carenza geneticamente determinata da una ridotta sintesi di NAD o secondaria, associata a una carenza di precursori del NAD (Zapata-Pérez et al., 2021).

Nell'uomo si distinguono tre vie di biosintesi del NAD (Figura 13):

- *Sintesi de novo*: è particolarmente attiva nel fegato, nei reni, nel cervello e nel tessuto endocrino (Audrito, Messana, Moiso, et al., 2020), inizia con il catabolismo dell'amminoacido triptofano in kynurenina grazie a indolamine 2-3 dioxygenasi. La kynurenina viene metabolizzata, grazie alla via della kynurenina, in acido quinolico (QA) che viene convertito grazie a quinolato fosforibosiltransferasi (QPRT), enzima limitante, in nicotinamide mononucleotide (NaMN);
- *Preiss-Hadler pathway*: metabolizza Na (acido nicotinic) derivato dalla dieta sottoforma di vitamina B3, che viene assorbito nella cellula tramite i trasportatori Na SLC5A8 e SCL22A13 viene trasformato in NaMN dall'enzima nicotinato fosforibosiltransferasi (NAPRT) (Bogan & Brenner, 2008).

In entrambe i casi NaMN viene adenilato dalla nicotinammide mononucleotide adenil transferasi (NMNAT) in acido nicotinic adenina dinucleotide (NaAD), substrato della NAD⁺ sintasi (NADSYN) in combinazione con glutammina e ATP, per produrre NAD⁺ (Houtkooper et al., 2010).

- La terza via di sintesi è il Salvage pathway (via di riciclo) che vede coinvolto l'enzima NAMPT che metabolizza la nicotinamide (NAM) in NMN, il quale verrà convertito in NAD (Audrito, Messana, & Deaglio, 2020). In un altro salvage pathway la nicotinamide riboside (NR), proveniente dalla dieta, può essere usata dalla nicotinamide riboside chinasi (NRK) per produrre NAD.

La via di riciclo della NAM che vede coinvolto l'enzima NAMPT è la via principale nelle cellule di mammifero per rigenerare il NAD. NAM è il precursore del NAD più abbondante nel circolo sanguigno e può essere introdotto facilmente con la dieta grazie alla vitamina B3 (Di Stefano & Conforti, 2013).

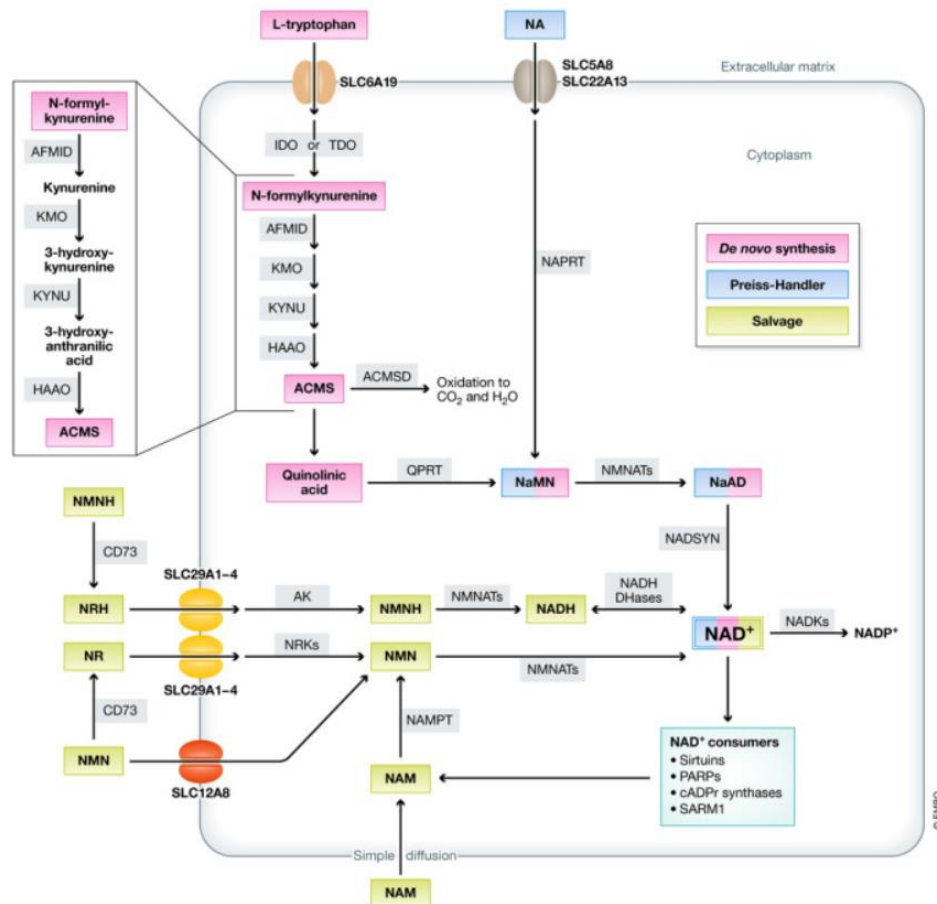


Figura 13 Vie di sintesi del NAD
Zapata-Pérez et al., 2021

1.2.1 NICOTINAMIDE FOSFORIBOSILTRANSFERASI (NAMPT): L'ENZIMA LIMITANTE NELLA BIOSINTESI DI NAD

NAMPT è un enzima che appartiene alla famiglia delle fosforibosiltransferasi dell'acido nicotinico (NAPRTasi) e catalizza la condensazione della nicotinamide con il 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) per produrre NMN (Garten et al., 2015; Gasparrini & Audrito, 2022). Ha un peso molecolare di circa 55 kDa e la sua struttura primaria comprende 491 ammino-acidi. Ha un ruolo vitale nelle cellule di mammifero in molti importanti processi biologici, tra cui il metabolismo, la risposta allo stress e l'invecchiamento. Il gene NAMPT si espande per circa 34.7 kb nel braccio lungo del cromosoma 7 (7q22) e contiene 11 esoni e 10 introni (Ognjanovic et al., 2001; Qin Zhang et al., 2011). Nella sequenza sono presenti differenti siti promoter; la regione prossimale al promoter è ricca in GC e contiene 12 siti di binding per specifica proteina 1 (SP-1), lymphoid enhancer binding factor 1 (LF-1), cAMP response element binding protein (CREB) e segnali di trasduzione e attivazione trascrizione (STAT). La regione

non codificante al 3' (3' UTR) contiene sequenze TATT, caratteristica delle citochine. La presenza di due siti di legame per i fattori di ipossia (HIF) suggerisce che il gene NAMPT viene up-regolato in condizione di ipossia.

Esistono due forme di NAMPT: iNAMPT (NAMPT intracellulare) e eNAMPT (NAMPT extracellulare). Mentre il ruolo di iNAMPT come enzima (forma omodimerica) limitante la velocità di sintesi di NAD è ben definito (Revollo et al., 2007) (Figura 14), il ruolo funzionale dell'eNAMPT è oggetto di nuovi studi. Inizialmente, l'eNAMPT, è stato identificato nel 1994 da Samal et al., (Samal et al., 1994) e descritto come un fattore solubile secreto dalle pre-B-cellule PBEF (primo nome della forma extracellulare), in grado di promuovere in modo sinergico la formazione di colonie B con il fattore di cellule staminali e IL-7 (Audrito, Messina, Moiso, et al., 2020). Successivamente la forma solubile dell'enzima è stata ritrovata secreta dal tessuto adiposo viscerale e chiamata visfatina (Audrito, Messina, Moiso, et al., 2020; Samal et al., 1994).

eNAMPT, nome ufficiale, ricopre quindi molteplici ruoli come fattore solubile (fattore di crescita, citochina e adipochina) (Chiang et al., 2023; Indini et al., 2022). ed è rilasciato da differenti tipi cellulari come cellule tumorali, cellule immunitarie, epatociti, cardiomiociti e adipociti (Grolla et al., 2016); (Tanaka et al., 2007). Il meccanismo di secrezione di eNAMPT nell'ambiente extracellulare è ancora oggetto di ricerche. In condizioni di danno cellulare, l'eNAMPT potrebbe essere rilasciato per diffusione passiva attraverso la membrana cellulare, come per gli altri DAMPs (Damage-associated molecular patterns). Una volta che viene secreto agisce come citochina andando a modulare la risposta immunitaria, attivando l'inflammosoma e promuovendo la secrezione di proteine pro e antinfiammatorie (Fernandes et al., 2012). Tuttavia, dalla maggior parte delle cellule viene rilasciato in un modo non "classico" oltrepassando il blocco di monesin e 23 brefeldin A, due inibitori della classica via secretoria del reticolo endoplasmatico-Golgi (Audrito et al., 2018; Grolla et al., 2016; Revollo et al., 2007; Tanaka et al., 2007).

Nell'ambiente extracellulare, NAMPT potrebbe legare direttamente recettori di membrana (Figura 14), come il recettore delle chemochine di tipo 5 (CCR-5), agendo come antagonista nelle cellule tumorali o promotore delle cellule staminali. Nell'ambiente extracellulare può anche legare il Toll-like 4 receptor (TLR4), presente sulle membrane di numerosi tipi cellulari, attivando specifiche cascate di segnale intracellulari come NF- κ B, via coinvolta nei meccanismi pro-infiammatori, MAPK e

STAT3, incrementando la secrezione di citochine come IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-6 ed il fattore di necrosi tumorale α (TNF α) (Audrito, Messina, & Deaglio, 2020).

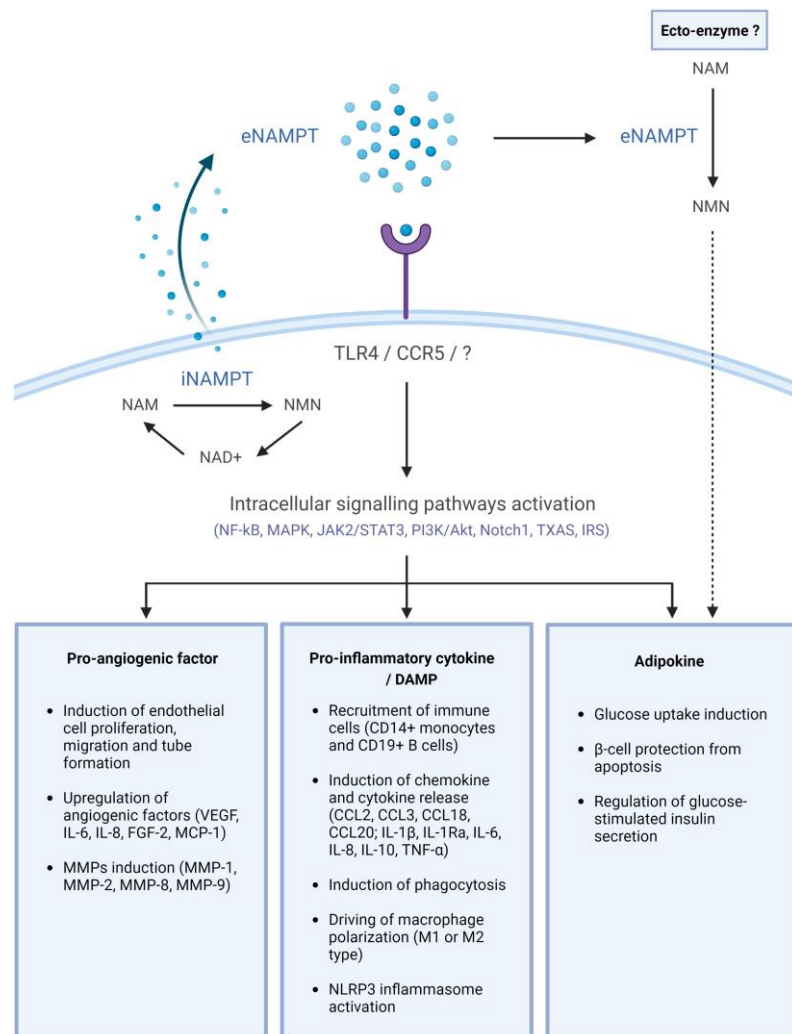


Figura 14- Funzioni di eNAMPT
Semerera E. et al, 2023

1.2.2 NAMPT E TUMORI

A causa delle loro elevate richieste metaboliche, le cellule tumorali presentano un aumento del turnover del NAD, in particolare queste cellule sono dipendenti dal salvage pathway per ripristinare il NAD⁺ (Chiarugi et al., 2012) e quindi dall'attività di NAMPT per la loro sopravvivenza e proliferazione (Dalmaga et al., 2018). È stato dimostrato che l'overspressione di NAMPT in diversi tumori è correlata a una prognosi peggiore per i pazienti e conferisce proprietà proliferative, anti-apoptotiche, pro-

infiammatorie, pro-angiogeniche e metastatiche agendo come enzima, citochina e fattore di crescita (Chiang et al., 2023) (Audrito et al., 2019) (Figura 15).

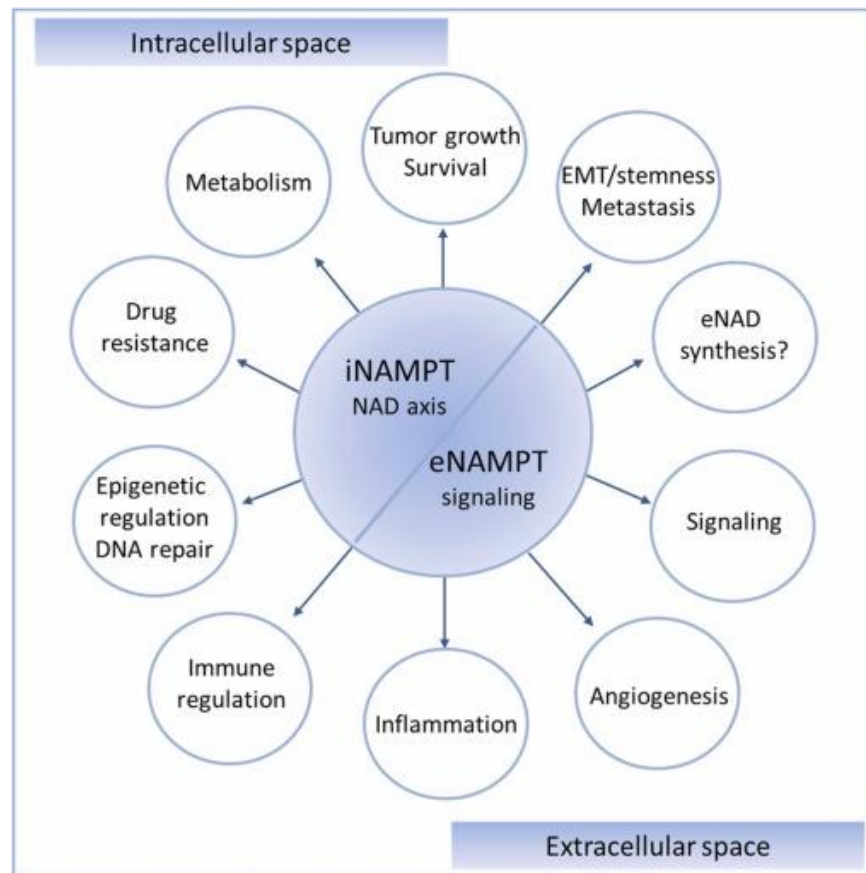


Figura 15 Schema riassuntivo dei principali processi tumorali in cui sono coinvolti iNAMPT e eNAMPT

Gasparrini & Audrito, 2022

Il NAMPT è associato ad un aumento dell'acquisizione della resistenza agli agenti chemioterapici e ad un aumento della staminalità delle cellule tumorali (Audrito, Managò, et al., 2020; Lucena-Cacace et al., 2017). In generale, il NAMPT può essere visto come un marker prognostico negativo, e un'overespressione correla con una maggiore resistenza al trattamento e ad un'inferiore sopravvivenza dei pazienti (Audrito et al., 2022).

Anche la forma solubile viene rilasciata maggiormente in circolo nei pazienti con tumore (decine di ng/ml) rispetto alla concentrazione media di individui sani circa 2 ng/ml (Gasparrini & Audrito, 2022; Semerena et al., 2023). Studi in vitro hanno dimostrato che il trattamento con eNAMPT ricombinante promuove sia l'invasione che la metastatizzazione, grazie alla stimolazione dell'attività della metalloproteinasi della matrice (MMPs) (Adya et al., 2008) ed alla modulazione della transizione

epitelio-mesenchimale tramite il fattore di crescita trasformante (TGF β) (Gasparrini & Audrito, 2022; Moschen et al., 2007; Soncini et al., 2014)).

Per il ruolo chiave nei tumori NAMPT è diventato il bersaglio di inibitori farmacologici (NAMPTi) (Figura 16) che bloccano la sua attività enzimatica e, in fase preclinica, di un anticorpo bloccante (Audrito, Managò, et al., 2020; Galli et al., 2020). In diversi modelli tumorali è stato osservato come l'inibizione di NAMPT riduca significativamente la crescita tumorale in modelli in vitro e in vivo (Vallejo et al., n.d.; Yong et al., 2023).

Agent	Mechanism of action	Indication	Trial Stage
NAMPT INHIBITORS			
APO866 (FK866)	NAMPTi	T/IC	Clinical phase I
CHS-828 (GMX 1778)	NAMPTi	T/IC	Clinical phase I
GNE-617, GNE-618	NAMPTi	T	Pre-clinical
KPT-9274	Dual NAMPTi/PAX4i	T	Clinical phase I
OT-82	NAMPTi	T	Clinical phase I
Blocking antibody	eNAMPT neutralization	T/IC	Pre-clinical

I, inhibitor; T, solid and/or hematological tumors; IC, inflammatory conditions;

Figura 16 Principali inibitori di NAMPT
Ghanem et al., 2021

Il primo inibitore specifico per NAMPT fu FK866, noto anche come APO866 (Hasmann & Schemainda, 2003). FK866 induce morte cellulare sopprimendo indirettamente l'attività respiratoria mitocondriale, inibendo selettivamente NAMPT e causando una graduale deplezione del NAD (Hasmann & Schemainda, 2003). Negli anni sono stati sviluppati nuovi inibitori a partire da FK866 come CHS828, GNE-617. Più recenti KPT-9274 e OT82 un nuovo inibitore, di cui son stati avviati gli studi clinici di Fase I nel 2019, che inibisce il NAMPT inducendo una deplezione di NAD e ATP con una conseguente morte cellulare per apoptosi. Questo inibitore non ha mostrato la stessa tossicità neurologica, cardiaca o retinica degli altri NAMPTi negli studi tossicologici condotti su topi e primati non umani (Gibson et al., 2020; Korotchkina et al., 2020; Somers et al., 2020).

Il targeting di NAMPT può quindi essere una valida strategia terapeutica nei tumori, tuttavia, è fondamentale selezionare i tumori che sono dipendenti dall'attività di NAMPT per evitare meccanismi di compensazione da parte degli altri enzimi che possono sintetizzare NAD e bypassare l'inibizione di NAMPT, come ad esempio la compensazione via NAPRT (Ghanem et al., 2021). Gli iniziali studi clinici nell'uomo con questi inibitori sono falliti per la tossicità dei primi NAMPTi, ma soprattutto anche per non aver selezionato a priori i tumori più responsivi. Inoltre, è fondamentale

ricercare marcatori predittivi di risposta ai NAMPTi. Ad oggi non si pensa ad una strategia con NAMPTi da soli ma in combinazione con le terapie già utilizzate nei diversi tumori per aumentarne l'efficacia. (Gasparrini & Audrito, 2022; Semerena et al., 2023; Tang et al., 2023)

1.2.3 NAMPT E MELANOMA METASTATICO

Durante la trasformazione tumorale dei melanociti questi aumentano la richiesta e la produzione di NAD⁺, fenomeno ulteriormente aumentato nelle cellule di melanoma resistenti ai BRAF inibitori. La maggiore produzione di NAD è dovuta ad una overespressione dell'enzima NAMPT (sia la forma intracellulare che quella solubile) che viene direttamente regolato a livello trascrizionale dall'attivazione della via oncogenica di BRAF mutato (Figura 17). L'asse NAD/NAMPT guida la riprogrammazione metabolica nel melanoma ad acquisizione di resistenza come strategia di adattamento delle cellule tumorali; inoltre, aumenta la capacità proliferativa delle cellule tumorali supportando un fenotipo maggiormente aggressivo, con elevata metastatizzazione, invasione e transizione epitelio-mesenchimale che può essere riconosciuta dalla presenza di alcuni marker (vimentina, ZEB1, Twist e trasportatori ABC) (Audrito et al., 2018; Audrito, Messana, Moiso, et al., 2020; Ohanna et al., 2018).

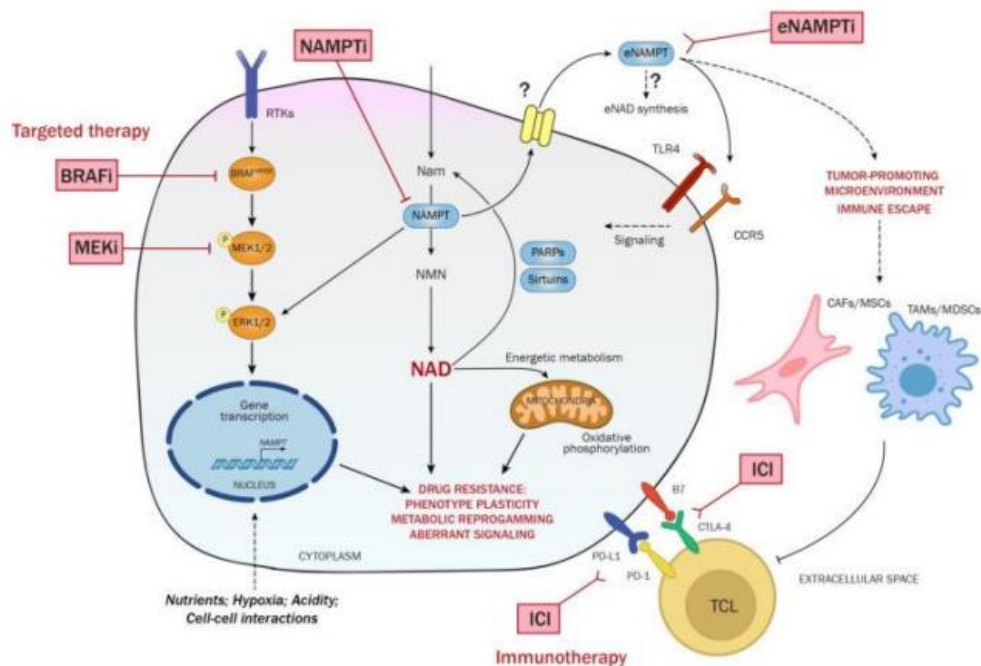


Figura 17 Ruolo di NAMPT nel MM

Indini et al., 2022

Nello specifico i dati pubblicati in questi anni dalla Dr.ssa Audrito dimostrano che le cellule di MM over-esprimenti NAMPT sono intrinsecamente resistenti ai BRAF inibitori, promuovendo una maggiore crescita tumorale sia in vivo che in vitro, rispetto alle cellule che sono sensibili a questi farmaci (Audrito, Messina, Moiso, et al., 2020). L'inibizione di NAMPT, con l'utilizzo di inibitori farmacologici specifici, in cellule di MM resistenti ai BRAF inibitori induce un blocco della via di segnale MAPK, blocco proliferativo, induzione di apoptosi e una disfunzione metabolica a livello mitocondriale con ridotti livelli di ATP e rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Audrito et al., 2018; Audrito, Messina, Moiso, et al., 2020). Il silenziamento di NAMPT fenocopia la sua inibizione enzimatica ed è in grado di ridurre l'aggressività di tali cellule (Audrito, Messina, Moiso, et al., 2020). NAMPT è direttamente correlato alla via di BRAF mutato che ne regola a livello trascrizionale l'espressione ed è amplificato geneticamente nei tumori, incluso il melanoma (Audrito et al., 2022).

È emerso che nel melanoma vi è un'augmentata secrezione di eNAMPT nel microambiente, questo è stato dimostrato dosando l'enzima su surnatanti di coltura e nel siero dei pazienti (Audrito et al., 2018). Anche un aumento di eNAMPT è correlato con una maggiore aggressività e progressione tumorale: aumenta nella malattia metastatica e al momento della progressione diventa molto elevato rispetto ai pazienti che rispondono alla terapia (Audrito et al., 2018; Indini et al., 2022).

NAMPT quindi emerge come un nuovo bersaglio terapeutico nel melanoma resistente alla terapia al bersaglio.

1.3 STRUTTURA DEL NUCLEO

Il nucleo è separato dal citoplasma da un doppio strato fosfolipidico (involucro nucleare), che permette di tenere separato il materiale genetico e l'apparato trascrizionale dal meccanismo traduzionale e metabolico presente nel citoplasma (Christie et al., 2016). Considerando che la sintesi di tutte le proteine avviene nel citoplasma, è fondamentale la presenza di un sistema di trasporto tra il citosol e il nucleo, che metta questi due compartimenti in comunicazione con un sistema altamente regolato. Questo trasporto avviene attraverso i pori nucleari (NPC), grosse strutture macromolecolari che si estendono su entrambe le membrane nucleari,

costituiti da proteine dette nucleoporine (NUP). I pori nucleari hanno una struttura complessa simmetrica conservata in più specie (Lin & Hoelz, 2019). I principali elementi che compongono l’NPC sono: l'anello citoplasmatico, il canale centrale, l'anello nucleare, il cestino nucleare e i filamenti citoplasmatici (Beck & Hurt, 2016). Ogni NPC è composto da otto subunità morfologicamente simili chiamate raggi, ciascuno composto da gruppi accoppiati di nucleoporine duplicate o strutturalmente correlate, che formano coppie di colonne omologhe, disposte attorno a un canale centrale attraverso il quale avviene il trasporto (Aitchison & Wozniak, 2007), (Figura 18).

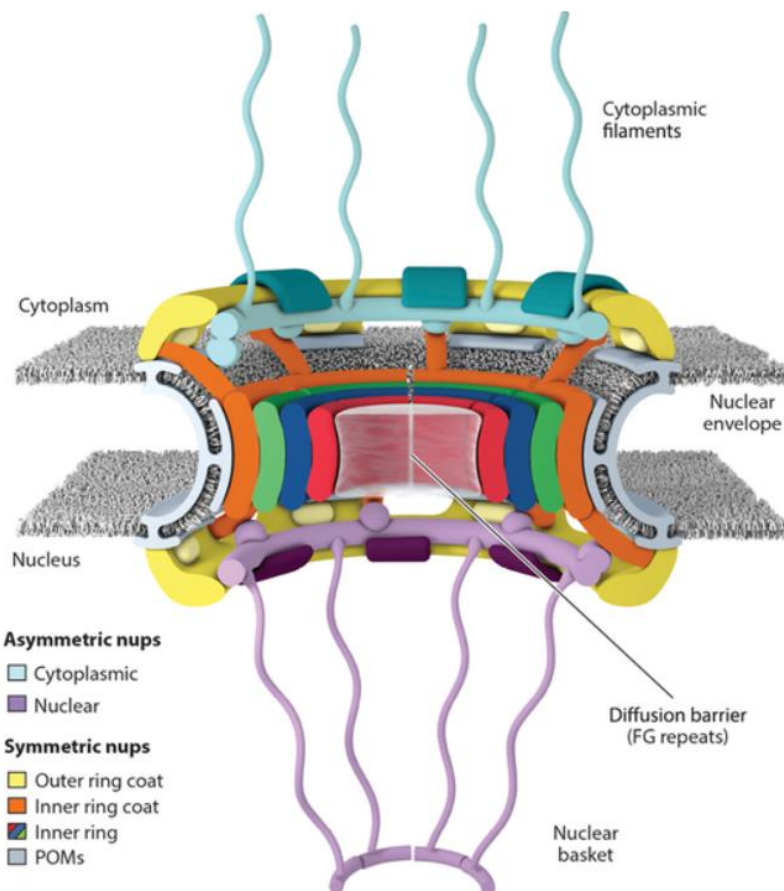


Figura 18 Struttura del poro nucleare
Lin & Hoelz, 2019

Nonostante le grosse dimensioni del NPC, le nucleoporine che lo compongono nell’uomo possono essere di 34 tipi, hanno dimensioni variabili e possono essere classificate in due categorie principali: *NUP di scaffold*, che contengono ripetizioni in tandem di strutture secondarie e svolgono ruoli architettonici; e *FG-NUP* caratterizzate dalla presenza di sequenze disordinate arricchite in fenilalanina e glicina tipiche del canale centrale del NPC. Queste sequenze non solo formano la barriera di diffusione

dell'NPC, ma servono anche come siti di legame specifici per i fattori di trasporto nucleare; infatti, presentano domini strutturali coinvolti nella funzione di scaffold (Beck & Hurt, 2016; Lin & Hoelz, 2019).

Le NUP possono essere simmetriche, ovvero presenti sia sul versante citoplasmatico che quello nucleare, oppure asimmetriche. Tra le NUP simmetriche troviamo: Nup49, Nup57, Nup100, Nup116, Nup145. Tra le NUP asimmetriche citoplasmatiche ci sono: Nup42, Nup159; mentre tra le NUP asimmetriche nucleari sono presenti: Nup1, Nup2, Nup60.

L'NPC ha un canale sufficientemente grande da consentire alle proteine inferiori a ~40 kDa di diffondersi passivamente attraverso di esso, mentre le proteine con un peso superiore utilizzano un trasporto attivo mediato da un trasportatore (Christie et al., 2016).


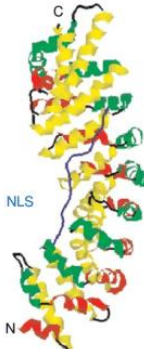
1.3.1- MECCANISMI DI TRASPORTO NUCLEARE

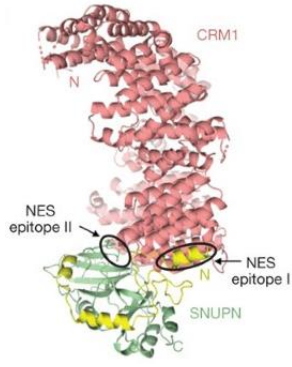
La maggior parte delle proteine che si muove tra il citosol e il nucleo ha una sequenza di segnale di localizzazione nucleare (NLS) e una sequenza di segnale di esportazione nucleare (NES). L'NLS è una breve sequenza ricca di amminoacidi basici, mentre la NES è una sequenza di amminoacidi ricca di leucina (Fukuda et al., 1997; Yagisawa, 2006). Queste sequenze di importazione/esportazione possiedono 4 caratteristiche: 1) sono necessarie per l'importazione/esportazione, 2) sono sufficienti per l'importazione/esportazione, 3) sono in grado di legare direttamente i recettori di trasporto nucleare, 4) il trasporto viene bloccato quando il fattore di trasporto è disabilitato (Lange et al., 2007).

I recettori di trasporto nucleare supportano il trasporto bidirezionale nucleocitoplasmatico grazie alla loro capacità di interagire con tre differenti proteine: il carico di trasporto (proteina cargo), FG Nups e la piccola Ran GTPasi (Xui et al., 2010). La Ran GTPasi fornisce l'energia necessaria al trasporto, passando ciclicamente da uno stato legato a GTP a uno legato a GDP. Le proteine regolatrici di questo scambio sono il fattore di scambio nucleotidico Ran guanina (RanGEF), localizzata principalmente nel nucleo e dalla proteina attivante Ran GTPasi (RanGAP), localizzata nel citoplasma. La compartimentalizzazione di queste due proteine regolatrici porta a un arricchimento di RanGTP nel nucleo e RanGDP nel citoplasma consentendo a Ran di impartire direzionalità al trasporto nucleare. Di conseguenza, i recettori di importazione nucleare legano la proteina cargo nel citoplasma in assenza di RanGTP e rilasciano il carico nel nucleo dopo il legame di RanGTP al complesso.

Al contrario, i recettori di esportazione nucleare legano la proteina cargo nel nucleo in complesso con RanGTP e la rilasciano nel citoplasma in seguito all'idrolisi del GTP in GDP (Lange et al., 2007).

Nell'uomo le proteine in grado di riconoscere NLS/NES appartengono alla famiglia della carioferina- β (Kap β), anche note come importine ed esportine. Appartengono a questa famiglia 19 proteine ciascuna delle quali riconosce un'unica famiglia di proteine o RNA, creando così molteplici percorsi di trasporto attraverso la membrana nucleare. Le tre Kap β più studiate nei meccanismi di trasporto nucleocitoplasmatico sono: importina- β (Imp β), importina- α (Imp α) ed esportina 1 (XPO1) (Azizian et al., 2020).

Nome	Funzione	Peso Molecolare	Struttura
<p>Karyopherin β+, Importin β</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Media l'importazione nucleare di substrati con cNLS; • Forma eterodimeri con karyopherin α; • Lega nucleoporine contenenti ripetizioni; • Interagisce con Ran-GTP e Ran-GDP. 	<p>94.7 KDa</p>	 <p>Goldfarb et al., 2004</p>
<p>Importin α</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Media l'importazione nucleare fungendo da proteina adattatrice; • Ha tre domini strutturali chiave: <ol style="list-style-type: none"> 1. N-terminale di legame con l'importina β (IBB), 2. Ripetizioni Armadillo (Arm), 3. C-terminale che lega CAS/CSE1L. 	<p>60 KDa</p>	 <p>Goldfarb et al., 2004</p>

<p>Esportina 1</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Media l'esportazione nucleare attraverso il riconoscimento della NES; • Il legame alla NES è migliorato da Ran-GTP e inibito dalla leptomicina. 	<p>124.1 KDa</p>	 <p>Dong et al., 2009</p>
---------------------------	--	------------------	--

L'importina β è un recettore di trasporto in grado di coordinare tre funzioni: legarsi con alta affinità a un segnale di localizzazione nucleare di base (NLS) esposto dalle proteine cargo; avidità per le FG-NUPS che sporgono nel citoplasma e rivestono l'NPC; e associarsi con alta affinità con la proteina RanGTP che innesca un cambiamento conformazionale necessario per rilasciare il carico. L'importina β può associarsi direttamente alle proteine da importare attraverso le ripetizioni HEAT o tramite degli adattatori, come l'importina α o la snurportina grazie alla presenza di un dominio di legame all'importina β (IBB) (Pumroy & Cingolani, 2015).

A differenza dell'importina β che è codificata da un unico gene in tutti gli eucarioti, esistono almeno sette isoforme dell'importina α (Pumroy & Cingolani, 2015). L'importina α è una proteina adattatrice che collega le proteine contenenti la NLS con l'importina β . Questa proteina ha tre domini strutturali chiave: un dominio N-terminale di legame con l'importina β (IBB), che svolge un duplice ruolo: lega l'importina β per indirizzare il complesso all'NPC per la traslocazione e contiene una sequenza autoinibitoria che imita una cNLS e regola il legame del carico cNLS al dominio ARM dell'importina α ; ripetizioni Armadillo (Arm), sito di legame per la sequenza NLS e una regione C-terminale che lega il fattore di esportazione nucleare dell'importina α , CAS/CSE1L che stimola il rilascio del carico cNLS (Figura 19) (Oka & Yoneda, 2018).

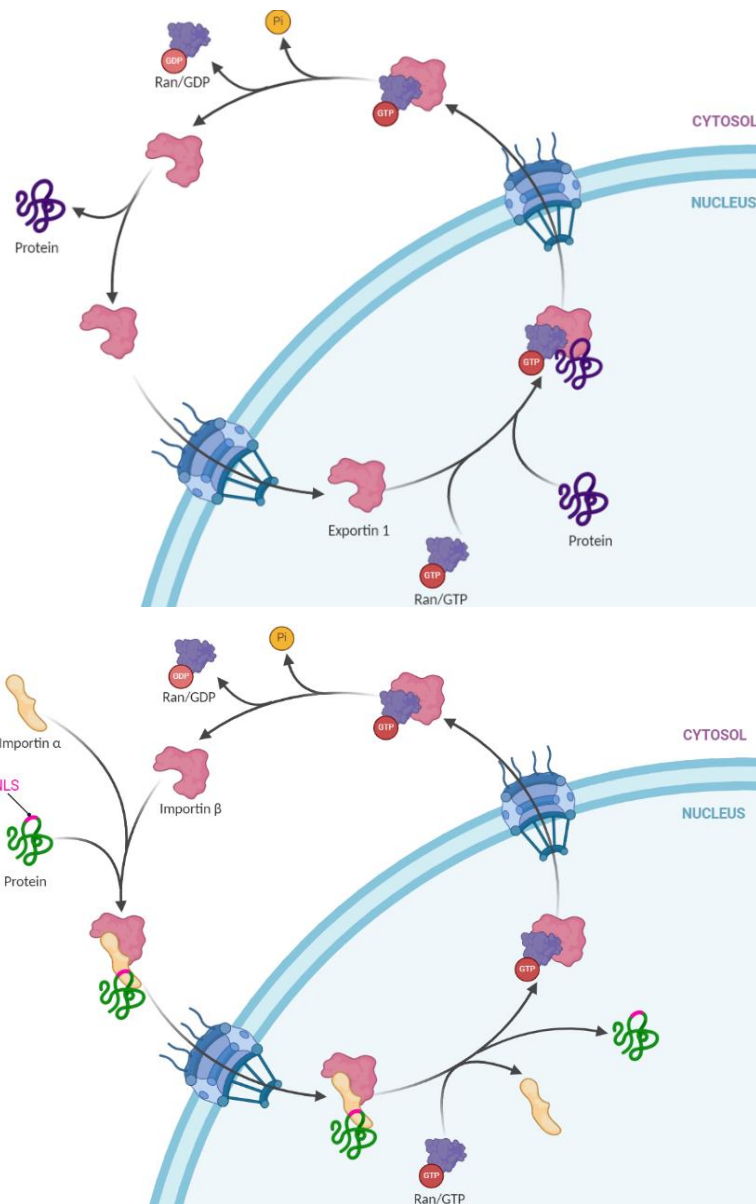


Figura 19 Il ciclo di trasporto nucleocitoplasmatico attraverso l'importina α , β e esportina 1

immagine creata con Biorander

Un analogo dell'importina α è la snurportina 1 (SNP1), una proteina adattatrice che lega l'importina β attraverso un dominio N-terminale (sIBB). Oltre all'sIBB SNP1 è costituita da una grande regione di legame del cappuccio di guanosina trimetilata C-terminale. Il complesso SNP1-importina β promuove l'importazione nucleare indipendente da Ran. Dopo l'ingresso nel nucleo, SNP1 viene riportato nel citoplasma da Crm1 in complesso con RanGTP (Mitrousis et al., 2008).

La principale proteina coinvolta nell'esportazione nucleare è l'esportina 1 (XPO1), in grado di trasportare molteplici proteine e specie di RNA. XPO1 lavora in associazione

con la RAN GTPasi, fondamentale per fornire l'energia e la direzionalità del trasporto (Becskei & Mattaj, 2003). Nel nucleo, XPO1 si lega al segnale di esportazione nucleare (NES) presente sulle proteine cargo e al RAN nella sua forma attiva, ovvero legata al GTP (RAN-GTP). Il complesso viene successivamente trasportato attraverso l'NPC. L'idrolisi di RAN-GTP in RAN-GDP ad opera dell'azione di RanBP1 o RanBP2 e RanGAP provoca il disassemblaggio del complesso e il rilascio dei carichi nel citoplasma (Figura 20) (Azizian et al., 2020).

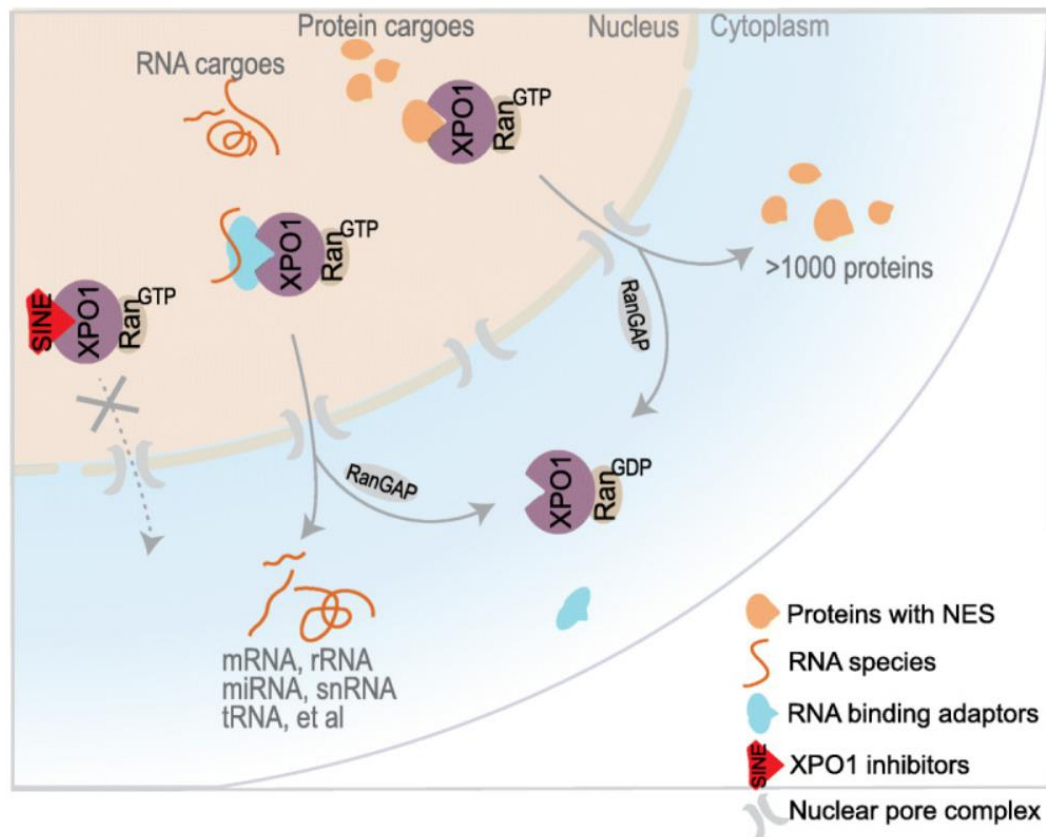


Figura 20 Meccanismo di esportazione nucleare attraverso l'esportina 1 (XPO1)
Azizian et al., 2020

1.3.2 NAMPT E LOCALIZZAZIONE NUCLEARE

Il fondamentale ruolo di NAMPT nella biosintesi del NAD fa sì che questa molecola sia richiesta in tutta la cellula e che sia distribuita nei vari compartimenti cellulari (Svoboda et al., 2019). NAMPT è una proteina principalmente citosolica, tuttavia sta emergendo come la sua localizzazione dipenda dal tipo cellulare e dalle condizioni in cui si trova la cellula, principalmente le fasi del ciclo cellulare. Nel 2003 nelle cellule Swiss 3T3 e PC-12, NAMPT è stato identificato principalmente localizzato a livello citosolico; tuttavia, è in grado di traslocare nel nucleo in seguito a trattamento con il

fattore di crescita neuronale (NGF). Inoltre, si ritrova in queste linee più a livello del citosol quando le cellule sono in attiva proliferazione e maggiormente nel nucleo in una condizione di riduzione della divisione cellulare, suggerendo che sia una proteina la cui localizzazione varia in funzione delle fasi del ciclo cellulare (Kitani et al., 2003). Questa traslocazione di NAMPT nel nucleo, in seguito all'arresto del ciclo cellulare, è stata osservata anche in cellule di carcinoma del colon retto HCT-116 (Bułdak et al., 2014). Nelle cellule umane endoteliali dei vasi sanguinei è principalmente nucleare e trasloca nel citoplasma in seguito a trattamento con IL-1 β (Romacho et al., 2013). Più recentemente dagli studi di Svoboda et al. emerge nuovamente che la localizzazione di NAMPT nucleare dipenda dalle fasi del ciclo: NAMPT viene esportato dal nucleo immediatamente dopo la mitosi per poi ritornare nel nucleo durante la progressione del ciclo. Inoltre, NAMPT è abbondante nel nucleo durante la fase S suggerendo un suo coinvolgimento nella replicazione del DNA (Svoboda et al., 2019). L'aumento di NAMPT nel nucleo è anche legato a fattori di stress che causano danni al DNA, come l'esposizione alle radiazioni UV o all'H₂O₂, che attivano le PARPs, una famiglia di proteine nucleari che svolgono la loro funzione di riparo del DNA, consumando NAD (Svoboda et al., 2019).

La sequenza di localizzazione nucleare (NLS) del NAMPT identificata da Svoboda et al. è ⁴²³KRSKKGR⁴²⁹ e si adatta a una NLS di classe 2 (Kosugi et al., 2009), suggerendo che NAMPT viene trasportato nel nucleo mediante un meccanismo che utilizza le importine α e β e la piccola GTPasi Ran (Christie et al., 2016).

1.3.3 IL RUOLO DI GAPDH NEL TRASPORTO NUCLEARE DI NAMPT

La gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è un importante enzima del metabolismo glicolitico producendo ATP e piruvato attraverso la glicolisi anaerobica nel citoplasma (Tristan et al., 2011). Tuttavia, GAPDH ha molteplici funzioni indipendenti dal suo ruolo nel metabolismo energetico, soprattutto a livello nucleare e nella regolazione della proliferazione cellulare. Nel nucleo, GAPDH può legare gli acidi nucleici per stabilizzarli, può facilitare l'esportazione del tRNA dal nucleo e proteggere i telomeri dall'accorciamento rapido indotto dai farmaci (Demarse et al., 2009; Sundararaj et al., 2004). GAPDH è anche implicato nella regolazione della trascrizione genica.

Sia NAMPT che GAPDH sono due proteine prettamente citosoliche, in grado di migrare nel nucleo in caso di stress. Grolla e colleghi nel 2020 hanno dimostrato una loro associazione fisica che promuove la traslocazione di NAMPT nel nucleo in seguito a stress. Attraverso un'immunoprecipitazione è stato dimostrato che queste due proteine, NAMPT e GAPDH, precipitano insieme. Attraverso un'analisi di cromatografia a esclusione dimensionale (SEC) e cromatografia liquida crosslinked accoppiata a spettrometria di massa (XL-LC-MS) è emerso che il complesso è composto da un dimero di NAMPT e un monomero di GAPDH (Figura 21) (Ambra Grolla et al., 2020).

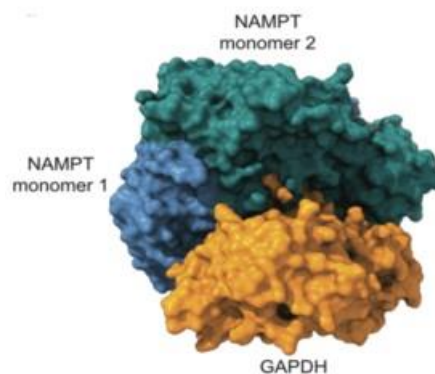


Figura 21 Complesso NAMPT₂-GAPDH
Grolla et al., 2020

Nello studio di Grolla et al. è stato dimostrato che il legame con GAPDH è necessario per permettere l'ingresso di NAMPT nel nucleo. Attraverso esperimenti di immunocitochimica, microscopia a fluorescenza ed esperimenti di frazionamento è stato dimostrato che in stimoli stressanti come quello ossidativo, lo stress indotto da monossido di azoto (NO) o da un danno al DNA, portano all'ingresso di entrambe le proteine nel nucleo per sostenere la produzione di NAD nucleare attraverso il Salvage pathway.

Tuttavia, la funzione di NAMPT nel nucleo rimane da determinare.

2. SCOPO DEL LAVORO

Il tirocinio è stato svolto presso il laboratorio di Biochimica Molecolare dei Tumori situato nel Dipartimento di Scienze ed Innovazione Tecnologica (DISIT) nella sede di Alessandria, sotto la supervisione della Dott.ssa Valentina Audrito, responsabile del laboratorio. Il progetto di ricerca del laboratorio è focalizzato sull'analisi del ruolo funzionale di nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT), come precedentemente descritto un enzima chiave nella biosintesi del NAD, nel modello malattia del melanoma metastatico (MM). La sempre più frequente comparsa di resistenza ai farmaci disponibili nel MM rimane attualmente una sfida. Il fenomeno della resistenza si basa sulla riprogrammazione metabolica, epigenetica, trascrizionale e della sintesi proteica. Le ricerche del laboratorio hanno dimostrato che NAMPT è un “driver” della resistenza alla terapia al bersaglio e della progressione nel MM.

Un nuovo filone di studio del laboratorio è la caratterizzazione della localizzazione nucleare di NAMPT nel MM e della sua funzione, che, come descritto nell'introduzione, è poco nota e merita ulteriori approfondimenti. Il mio tirocinio si è concentrato su questo filone di ricerca. In questo anno gli obiettivi specifici da raggiungere sono stati molteplici: i) mettere a punto e ottimizzare una tecnica biochimica di frazionamento nucleo/citosol per valutare la presenza di NAMPT nel nucleo; ii) studiare la localizzazione nucleare di NAMPT confrontando linee di melanoma BRAF mutate sensibili e resistenti ai BRAF inibitori; iii) analizzare la presenza di NAMPT nucleare nelle biopsie dei pazienti affetti da melanoma (in collaborazione con la patologa Prof. Daniela Massi dell'Università di Firenze); iv) over-esprimere NAMPT selettivamente nel nucleo delle cellule mediante infezione lentivirale di una linea di melanoma. Il costrutto utilizzato era stato precedentemente generato dalla Prof. Ambra Grolla (Università del Piemonte Orientale)(Ambra Grolla et al., 2020); ed infine v) iniziare a valutare la funzione nucleare di NAMPT e i meccanismi di trasporto nucleare utilizzando la linea in cui è overespresso NAMPT selettivamente nel nucleo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 – COLTURE CELLULARI

3.1.1 – LINEE CELLULARI

Negli esperimenti condotti sono state utilizzate diverse linee cellulari di melanoma metastatico; queste sono accomunate dalla mutazione nell'oncogene BRAF V600E, ma si differenziano per altre mutazioni in oncogeni od oncosoppressori.

- A375 Linea cellulare con morfologia epiteliale, isolata dalla cute di una paziente di 54 anni affetta da melanoma maligno. Presenta le seguenti mutazioni:
 - Mutation; HGNC; 1097; **BRAF**; Simple; p.Val600Glu (c.1799T>A); ClinVar=VCV000013961; Zygosity=Homozygous;
 - Mutation; HGNC; 1787; **CDKN2A**; Simple; p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val, Zygosity=Homozygous c.224G>T); ClinVar=VCV000376309;
 - Mutation; HGNC; 1787; **CDKN2A**; Simple; p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val, Zygosity=Homozygous - c.248G>T); ClinVar=VCV000376308;
 - Mutation; HGNC; 11730; **TERT**; Simple; c.1-146C>T (c.250C>T) (C250T); Zygosity=Unspecified.

Il terreno di base per questa linea cellulare è il Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) al 10% FBS, al quale vengono aggiunti Sodio Piruvato, Gentamicina, HEPES, vitamine e ammonoacidi.

- M14 Linea cellulare proveniente da melanoma amelocitico, isolata da paziente di 33 anni. Presenta le seguenti variazioni di sequenza:
 - Mutation; HGNC; 1097; **BRAF**; Simple; p.Val600Glu (c.1799T>A); ClinVar=VCV000013961; Zygosity=Heterozygous;
 - Mutation; HGNC; 1787; **CDKN2A**; Simple; c.150+2T>C (IVS1+2T>C); ClinVar=VCV000406712; Zygosity=Heterozygous; Note=Splice donor mutation;
 - Mutation; HGNC; 1787; **CDKN2A**; Simple; c.455insCdel26; Zygosity=Heterozygous;
 - Mutation; HGNC; 11998; **TP53**; Simple; p.Gly266Glu (c.797G>A); ClinVar=VCV000161516; Zygosity=Heterozygous.

Il terreno di base per questa linea cellulare è il Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) al 10% FBS, al quale vengono aggiunti Sodio Piruvato, Gentamicina, HEPES, vitamine e amminoacidi.

Per gli esperimenti sono state utilizzate anche linee cellulari di MM (BRAF mutate), nello specifico A375 ed M14, resistenti al BRAFi, il Dabrafenib (chiamate M14 BiR

e A375 BiR). Queste sono state generate aggiungendo concentrazioni crescenti di Dabrafenib al terreno di coltura, raggiungendo la concentrazione finale “di resistenza” di 1,6 μM in circa 10-12 settimane e mantenendo il farmaco in coltura sempre come fattore selettivo (Audrito et al., 2018).

3.1.2 – CRESCITA E MANTENIMENTO DELLE COLTURE CELLULARI

Le colture cellulari sono sistemi semplificati che consentono il mantenimento di cellule, con appositi nutrienti, in vitro. Essendo il melanoma metastatico un tumore solido, queste linee cellulari crescono in adesione attraverso l'utilizzo di fiasche o dish pretrattati che consentono l'adesione cellulare al substrato. Per consentirne la proliferazione bisogna diluire le cellule in coltura quando sono ad elevata confluenza. Questa manipolazione avviene ogni 48 ore, solitamente il lunedì- mercoledì-venerdì, sotto cappa biologica e tramite l'utilizzo di materiale sterile per evitare il rischio di contaminazioni. Le cellule in coltura vengono, poi, conservate all'interno di un incubatore, dove vengono ricreate tutte le condizioni necessarie alla crescita: temperatura di 37°C, umidità, 95% di ossigeno e 5% di CO₂. Solitamente le fiasche presentano un tappo con filtro per consentire gli scambi gassosi, se così non fosse bisogna allentare la chiusura del tappo. Il protocollo per il passaggio delle cellule consiste nei seguenti passaggi:

- Osservare le cellule al microscopio ottico ad obiettivo rovesciato e valutarne il grado di confluenza;
- Eliminare il terreno esausto dalla fiasca;
- Effettuare un lavaggio, aggiungendo circa 4 mL di PBS sterile (PBS tablets Gibco #18912-014) per rimuovere detriti cellulari, residui di terreno e cellule morte;
- Eliminare il PBS e aggiungere 2 mL di Tripsina (EDTA 0,5% 10X Gibco #15400-054), enzima (serin proteasi) che scinde i legami cellula-cellula e cellula-substrato.
- Incubare a 37°C per pochi minuti, in quanto un'incubazione per lungo periodo o ad elevate concentrazioni può danneggiare le cellule. Il distaccamento è aiutato anche da azione meccanica con battitura della piastra;
- Osservare al microscopio rovesciato: le cellule devono apparire tonde e galleggianti; se le cellule appaiono ancora adese è necessario rimettere in incubatore la fiasca. Ripetere questo passaggio finché non appaiono ben staccate dal substrato;
- Aggiungere una quantità di terreno, per neutralizzare la tripsina, in base alla diluizione scelta. Risospendere bene le cellule per disgregare eventuali cluster;

- Portare a volume la fiasca con terreno di coltura (5 mL in fiasca da 25 cm², 10 mL in fiasca da 75 cm², 20 mL in dish da 180 cm²).

I terreni di coltura di base sono una soluzione isotonica e tamponata in grado di fornire tutte le sostanze fondamentali per la crescita e la sopravvivenza delle cellule in coltura. Linee cellulari diverse possiedono requisiti nutrizionali differenti e necessitano di terreni di coltura distinti. Per molte linee cellulari di melanoma metastatico viene utilizzato come terreno di coltura il DMEM (1X Dulbecco's Modified Eagle Medium Gibco #21013-024). Questo terreno presenta una concentrazione 4 volte superiore di amminoacidi e vitamine rispetto al terreno MEM originario; inoltre, sono disponibili diverse formulazioni ad alto/basso contenuto di glucosio, con/senza L-glutamina, piruvato di sodio a seconda delle esigenze delle cellule in coltura. Il DMEM non essendo un terreno completo, in quanto manca di proteine, lipidi e fattori di crescita, richiede l'aggiunta di determinati componenti.

Al terreno (500 mL) vengono aggiunti:

- 50 mL di FBS 10% (Fetal bovine serum 10%, Capricorn Scientific FBS 12A), precedentemente scomplementato (in bagnetto termostato a 56°C per 30 minuti per renderlo privo del sistema del complemento che potrebbe interferire con la crescita delle cellule);
- 1 mL di Gentamicina (50 mg/mL Gibco #15750-037)
- 5 mL sodio piruvato (100 mM Gibco #11360-039);
- 5 mL amminoacidi (MEM NEAA 100X Gibco #11140-035)
- 10 mL di HEPES (1M Gibco #15630-056);
- 5 mL di vitamine (100X).

3.1.3 TECNICHE DI CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO

Per conservare le cellule, in modo sicuro e per lunghi periodi di tempo, è necessario congelarle. Solitamente i criovials con le diverse linee cellulari sono conservati alla temperatura di -80°C o in azoto liquido -196°C. Il congelamento è un processo che deve avvenire in modo lento e a freddo.

Il protocollo è il seguente:

- Staccare le cellule da fiasca/dish e trasferirle in una falcon;
- Portare a volume la falcon con terreno; ▪ Centrifugare a 1100 rpm per 15 minuti;
- Eliminare il surnatante e risospendere il pellet formatosi in siero (500 µL per criovials);

- Preparare una mix da 500 μ L per criovials, costituita da siero + 20% di DMSO (Sigma life science #D2650-100ML), agente crioprotettivo. ▪ Prelevare la mix e trasferire goccia a goccia nella falcon contenente la sospensione cellulare, mantenendo in agitazione la falcon in ghiaccio;
 - Trasferire il tutto all'interno dei criovials (volume finale 1 mL, costituito da 500 μ L di cellule e 500 μ L di mix) ▪ Porre i criovials all'interno di Mr. Frosty e posizionarlo a -80°C; questo consente un congelamento cellulare lento, facendo scendere la temperatura di un grado al minuto evitando così lo shock termico che porterebbe alla formazione di cristalli di ghiaccio e rottura della parete cellulare.
- Dopo 24-48h rimuovere i criovials da Mr. Frosty A differenza del congelamento, la tecnica di scongelamento deve essere rapida e in ghiaccio.

Il protocollo prevede di:

- Prelevare il criovials della linea cellulare scelta e metterlo in ghiaccio; ▪ Prendere una falcon e aggiungere 3-4 mL di FBS;
- Risospendere le cellule all'interno del criovial con 500 μ L di siero e trasferirlo in falcon;
- Portare a volume con terreno la falcon contenente siero e cellule;
- Centrifugare a 1100 rpm per 5 minuti;
- Eliminare surnatante e risospendere il pellet con 5 mL di terreno di coltura;
- Trasferire in fiasca o dish, portare a volume con terreno;
- Incubare a 37°C.

3.1.4 CONTA CELLULARE

Le cellule in coltura devono essere contate per monitorare la crescita e per quantificarle prima di progettare esperimenti. La conta cellulare avviene attraverso l'uso di una camera di conta apposita, che permette di valutare il numero di cellule a disposizione per mL.

Il protocollo consiste nei seguenti passaggi:

- Staccare le cellule da una fiasca/dish e trasferirle in una falcon;
- Risospendere molto bene per mantenere le cellule in sospensione;
- Prelevare 10 μ L di sospensione cellulare ed inserirli all'interno della cameretta di conta;
- Procedere con la conta al microscopio ottico, aiutandosi con un contacellule manuale.

Ogni cameretta è formata da 10 quadranti grandi, ognuno formato a sua volta da 16 quadranti più piccoli. È necessario scegliere e contare 3 quadranti grandi, preferibilmente in diagonale. Si iniziano a contare le cellule di due margini scelti per poi procedere alla conta di quelle all'interno del quadrante. Al termine della conta si esegue la seguente formula:

$$\text{Cellule per mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ cellule contate}}{\text{n}^\circ \text{ quadranti contati}} \cdot 10^4$$

Nel caso in cui le cellule siano ad una confluenza elevata è possibile effettuare una diluizione per la conta cellulare. È importante, in questo caso, ricordarsi di moltiplicare il risultato della formula precedente per il fattore di diluizione scelto.

3.1.5 GENERAZIONE DI UN VETTORE LENTIVIRALE E INFEZIONE DELLE CELLULE

In collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Grolla, dell'Università del Piemonte Orientale a Novara, abbiamo creato una linea cellulare A375 NLS_NAMPT, che overesprime NAMPT nel nucleo ottenuta tramite infezione lentivirale stabile. NLS_NAMPT (schema vettore in Figura 22) è stato ottenuto collegando all'N-terminale del FLAG-NAMPT murino l'NLS di SV40 (ATGGCAGTTCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTTGAG). NLS_NAMPT è stato clonato nel vettore lentivirale bicistronico pLV che esprime il sito di ingresso del ribosoma interno NLS-FLAG-NAMPT GFP (Ambra Grolla et al., 2020).

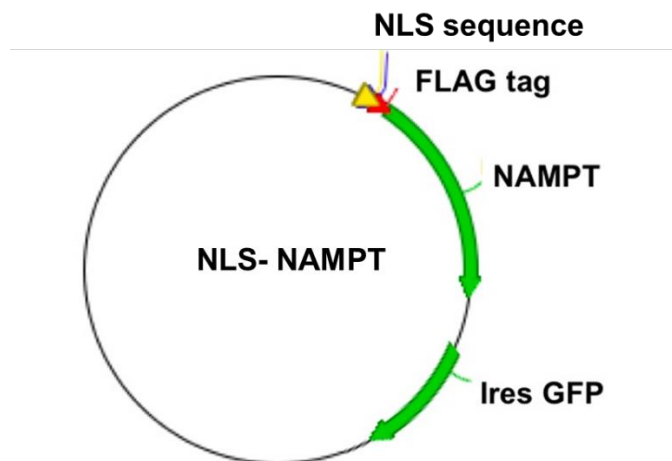


Figura 22 Schema della struttura dell'NLS_NAMPT

Le particelle lentivirali sono state prodotte nelle cellule HEK293T trasfettate con pMDLg/pRRE, pMD2.VSVG, pRSV-Rev e pLV-FLAG-NAMPT-IRES-GFP. Dopo 48 ore, il terreno di coltura è stato raccolto, filtrato e centrifugato per 2 ore a 70.000g. Le particelle virali contenute nel pellet sono state titolate, risospese a concentrazioni adeguate e utilizzate per infettare le cellule A375. Le cellule infettate A375 NLS_NAMPT fluorescenti GFP+ sono state sortate per ottenere una popolazione overesprimente omogenea e monitorate per verificare l'espressione e la localizzazione mediante immunofluorescenza e frazionamento. In parallelo è stata infettata la stessa linea A375 con un vettore di controllo (A375 SCR).

3.2 LISATI PROTEICI TOTALI

I lisati totali vengono effettuati su pellets di cellule non trattate o trattate con farmaci specifici per un tempo stabilito.

Il protocollo per la preparazione dei pellets è il seguente:

- Eliminare il terreno;
- Effettuare un lavaggio in PBS;
- Aggiungere la Tripsina e incubare per 2' a 37°C;
- Aggiungere terreno per bloccare l'azione della Tripsina e risospendere;
- Trasferire in eppendorf;
- Centrifugare a 6 000 rpm per 5';
- Eliminare tramite l'uso di una siringa il surnatante, facendo attenzione a non toccare il pellet formatosi;
- Riporre i pellets a -80°C.

Ottenuti i pellets si può procedere con la lisi totale.

Il protocollo è il seguente:

- Preparare una mix, costituita da Lysis Buffer con NP40 1% (Tab. 1) e Protease Inhibitor Cocktail (da diluire 1:100).

Tabella 1-Lysis Buffer

Tris-HCl pH 7.4	50mM
NaCl	150mM
NP40 10%	1%

- Risospendere i pellets con una quantità scelta di mix, in base alla grandezza del pellet;
- Incubare in ghiaccio per 20’;
- Centrifugare a 13200 rpm per 15’ a 4°C;
- Trasferire il surnatante in nuove eppendorf.

I lisati possono essere conservati a –80°C oppure si può procedere direttamente con la quantificazione proteica con il metodo Bradford.

3.2.1 LISI CON SEPARAZIONE NUCLEO-CITOSOL

Per il frazionamento nucleo-citosol si parte da pellets di cellule fresche appena staccate dopo aver subito i diversi trattamenti.

La separazione si svolge mediante l’utilizzo di due diverse soluzioni con differente concentrazione salina al loro interno; la separazione sfrutta l’osmosi e la diversa resistenza dei due compartimenti cellulari a questa forza. Mediante l’utilizzo della prima soluzione (Soluzione A, Tab 2) si lisa la membrana cellulare, raccogliendo così la frazione citosolica, mentre tramite la Soluzione B (Tab 3) si ottiene la frazione nucleare.

Tabella 2- Composizione della soluzione A

Saccarosio	300mM
HEPES	10mM
KCl	10mM
MgCl₂	2mM
EGTA	1mM
KOH	pH 7.9

Tabella 3- Composizione della soluzione B

HEPES	50mM
NaCl	400mM
EDTA	1mM
NaOH	pH 7.5

Il protocollo per il frazionamento è il seguente:

- Raccogliere le cellule staccate tramite tripsina;

- Mettere le cellule in falcon da 15mL e portare a volume con PBS freddo;
- Centrifugare a freddo 5' a 1 100 rpm a 4°C;
- Svuotare la falcon, risospendere il pellet con 1mL di PBS freddo e trasferirlo in eppendorf da 1.5mL;
- Portare a volume con PBS freddo e centrifugare 5' a 6 000 rpm a 4°C;
- Lasciare il pellet in ghiaccio 10';
- Risospendere il pellet in 350-400 uL di Soluzione A completa con inibitori delle proteasi 1:100 e delle fosfatasi 1:100;
- Lasciare in ghiaccio per 10';
- Aggiungere 0.15% NP40;
- Lasciare in ghiaccio 10';
- Centrifugare 5' a 2 700 rpm a 4°C;
- Raccogliere il surnatante corrispondente alla frazione citosolica;
- Lavare il pellet con la Soluzione B completa con inibitori 1:100 (100 ul) per 4 volte a 5 000 rpm;
- Aggiungere 75 ul di buffer B completo con inibitori (1:100);
- Incubare in ghiaccio 10';
- Sonicare il campione (3 cicli on/off da 30" ciascuno);
- Lasciare in ghiaccio 5';
- Centrifugare a 16 000 rpm per 15';
- Raccogliere il surnatante corrispondente alla frazione nucleare.

3.2.2 DISEGNO SPERIMENTALE PER IL FRAZIONAMENTO NUCLEO/CITOSOL

Per questo esperimento sono state utilizzate fiasche da 75cm² contenenti ognuna circa 7·10⁶ di cellule (7 mL di volume finale a fiasca). Dopo aver effettuato la conta cellulare (vedi paragrafo 3.1.4), vengono piastrate le cellule 2,5x10⁶ cells/T75 per la linea A375. Le cellule vengono fatte aderire al substrato per la notte in incubatore; il mattino successivo viene cambiato il terreno delle fiasche, per i trattamenti per lo starving di 24h e quelle con low-glucose, viene eliminato e le cellule lavate con PBS; viene poi aggiunto il terreno corrispondente al trattamento e messo in incubatore per 24 ore. Per ogni esperimento, una condizione di cellule non trattate (nominato untreated) è stata utilizzata come confronto per evidenziare variazioni di concentrazione proteica con il

trattamento. Inoltre, un campione untreated è stato poi lisato con una lisi totale ed utilizzato come controllo per saggiare la bontà del frazionamento nucleo-citosol.

Le cellule vengono trattate con due differenti terreni contenenti una minor quantità di glucosio in quello low-glucose (LG) oppure con un terreno per lo starving (St) avente una riduzione della percentuale di siero fetale bovino (FBS) rispetto al normale (0.1% contro il 10% contenuto nel terreno del controllo e del mantenimento cellulare).

Dopo un'incubazione di 24h, con o senza trattamenti, si procede con il frazionamento nucleo/citosol e la rilevazione delle proteine con SDS-PAGE/Western Blot nella frazione nucleare e nella frazione citosolica (vedi paragrafo 3.2.2 e paragrafo 3.2.5).

3.2.3 QUANTIFICAZIONE PROTEICA CON METODO BRADFORD

La quantificazione Bradford è un metodo analitico che permette di quantificare le proteine presenti all'interno di un lisato proteico totale. Il metodo utilizzato si basa sul legame del colorante Comassie-Brilliant Blue a residui amminoacidici, come il triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina: maggiore è la presenza di proteine maggiore sarà il legame con il colorante. La forma anionica, ovvero la forma legata, ha un'assorbanza massima a 959 nm (colorazione blu intensa), mentre la forma cationica (forma non legata) ha un'assorbanza massima a 470 nm (colorazione marroncina). La lettura viene effettuata attraverso l'utilizzo di uno spettrofotometro. È fondamentale quantificare i lisati proteici per poter caricare la stessa quantità di proteine nel gel di poliacrilamide. Per la quantificazione si utilizza una piastra multi-well (96 well) ed è consigliabile caricare tutto in doppio in modo da avere una stima precisa del quantitativo proteico presente all'interno di ciascun lisato.

Si procede nel seguente modo:

- Caricare 252 μ L Bradford DYE 1X (Biorad protein assay dye-reagent concentrate 5X #5000006) per ciascun well;
- Caricare 3 μ L di bianco (tampone di lisi), standards di BSA (BSA Sigma Aldrich A2153-50G) alla concentrazione 1 mg/mL; 2 mg/mL; 5 mg/mL; 7,5 mg/mL; 10 mg/mL; e di campione. È necessario vortexare gli standards e i campioni prima del caricamento.
- Risospendere per 3 volte ogni pozzetto (volume finale/well 255 μ L);
- Eliminare eventuali bolle attraverso l'uso di un ago, per evitare interferenze nella lettura;
- Coprire la plate con carta stagnola e posizionarla sul basculante per 5';

- Procedere con la lettura al Tecan (Infinite F200 Pro) a 620 nm.

Una volta ottenuta l'assorbanza del bianco, degli standards e dei campioni, si procede a calcolare la media dei valori dell'assorbanza e a sottrarre da questi la media del bianco. Inserendo i dati ottenuti nel software GraphPad Prism, si ottengono i valori interpolati ad X, che corrispondono alla concentrazione di $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ di proteina presente all'interno di ciascun campione, il coefficiente di determinazione R e la retta di calibrazione.

Si prosegue con la preparazione dei campioni da caricare nel gel. Ciascun campione avrà un volume finale di 25 μL e sarà costituito da: LaemmLi sample buffer 1X (per 1 mL: 100 μL di β mercaptoetanol Sigma-Aldrich M3148-100ML e 900 μL di LAEMLI 4X Biorad #1610747), campione e Tris-HCl a pH 6,8 e 0,5 M.

Per ottenere i μL da aggiungere al campione bisogna dividere i μg di proteina desiderata per i $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ottenuti dall'interpolazione con la retta di taratura. I μL di LaemmLi buffer 1X si calcolano sul volume finale di 25 μL : $4X * x = 1X * 25 \mu\text{L}$, dal quale si ottiene il valore 6,25 μL . Il Tris-HCl serve per portare a volume finale di 25 μL i nostri campioni dopo aver aggiunto il lisato e il LaemmLi buffer. Una volta terminata la preparazione dei campioni in LaemmLi è necessario procedere con la denaturazione delle proteine, utilizzando il termoblock a 95°C per 5 minuti.

3.2.4 ELETTROFORESI SU GEL DI POLICRILAMMIDE

L'elettroforesi è una tecnica che permette la separazione delle proteine, applicando un campo elettrico. I fattori che influenzano la mobilità elettroforetica di una molecola sono la carica elettrica, la massa della molecola (la velocità diminuisce all'aumentare del PM), la forma della molecola e l'intensità del campo elettrico. I supporti utilizzati per l'elettroforesi possono essere diversi come ad esempio gel di agarosio, gel di poliacrilamide, acetato di cellulosa.

Per gli esperimenti sono stati utilizzati gel di poliacrilammide precasted (Mini protean TGX- stain free gels Biorad #4568093). Il gel si compone di due parti: 1) stacking gel, parte superiore del gel ed ha la funzione di concentrare i campioni proteici caricati nei pozzetti in modo che tutti i campioni comincino la loro migrazione dallo stesso punto di partenza. 2) running gel, parte inferiore del gel; la sua funzione è quella di separare le proteine dei vari campioni sulla base del peso molecolare.

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- Inserire nella cameretta di corsa il gel precasted, bloccandolo tra le due pinze;

- Rimuovere il pettine per ottenere i pozzetti;
- Riempire la camera elettroforetica e la camera di corsa con il Running Buffer 1X (Tris-Glicina SDS buffer 10X (Biorad #1610732) diluita in acqua milliQ);
- Caricare 5 μ L di marker (Biorad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Cat. #1610394) all'interno del pozzetto scelto;
- Caricare 25 μ L di campione a pozzetto, rispettando l'ordine scelto per il caricamento;
- Chiudere la camera elettroforetica, assicurandosi che gli elettrodi siano nella posizione corretta;
- Avviare la corsa elettroforetica, con voltaggio basso (95 V), per permettere la fuoriuscita dei campioni e del marker dallo stacking gel; questo permette di concentrare i campioni caricati nei pozzetti in modo che tutti i campioni comincino dallo stesso punto di partenza.
- Aumentare il voltaggio (190 V) quanto i campioni raggiungono il running gel;
- Attendere il termine della corsa.

3.2.5 TRASFERIMENTO GEL SU MEMBRANA DI NITROCELLULOSA E WESTERN BLOT

Terminata la corsa elettroforetica, è necessario trasferire il gel con le proteine su una membrana di nitrocellulosa, utilizzando il Trans-Blot® Turbo™ Transfer System Biorad. Successivamente, si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'incubazione con un anticorpo specifico.

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- Immergere il primo strato di carta filtro nel Trans-blot buffer 5X (Biorad #10026938), strizzarlo per togliere l'eccesso e posizionarlo all'interno del cassetto. Il Trans-blot buffer 1X viene preparato con il Trans-blot turbo 5X, etanolo 99% e acqua milliQ;
- Immergere la membrana di nitrocellulosa nel Trans-blot buffer e posizionarlo dentro al cassetto sopra alla carta filtro precedentemente posizionata;
- Posizionare il gel sulla membrana di nitrocellulosa facendo attenzione a non romperlo. In questa fase è necessario avere i guanti umidi.
- Immergere il secondo strato di carta filtro nel Transl-blot e posizionarlo sopra al gel, dentro al cassetto;
- Eliminare le bolle con un rullo dal sandwich appena formato;
- Accendere il macchinario e avviare il programma scelto (High: 1,3 A, 15 V e 15 minuti);

- Al termine del programma, aprire il sandwich e prelevare la membrana;
- Immergere per qualche minuto la membrana nel Rosso Ponceau (Ponceau S solution Sigma #P7170-1L);
- Togliere l'eccesso con acqua deionizzata e verificare che il trasferimento sia avvenuto correttamente. Procedere con eventuali tagli della membrana;
- Incubare 1 ora in latte (Nonfat dried milk powder Panreac Applichem #P16031E). Permette di saturare i siti della membrana non occupati dalle proteine, in modo da impedire il legame aspecifico dell'anticorpo primario;
- Effettuare 3 lavaggi in PBS Tween (Panreac applichem 20 for molecular biology #P160308) da 10 minuti sul basculante;
- Incubare con anticorpi primari overnight a 4°C;
- Dopo l'incubazione overnight, recuperare l'anticorpo primario ed effettuare 3 lavaggi da 10 minuti in PBS Tween sul basculante;
- Preparare l'anticorpo secondario a seconda dell'origine dell'anticorpo primario, rabbit (diluizione 1:2500 in PBS Tween) o mouse (diluizione 1:2000 in PBS Tween);
- Incubare la membrana con l'anticorpo secondario 1 ora sul basculante;
- Effettuare 3 lavaggi in PBS Tween da 10 minuti;
- Procedere con l'acquisizione delle immagini in chemiluminescenza.

3.2.6 ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI IN CHEMILUMINESCENZA

Al termine dei lavaggi si può procedere alla lettura in chemiluminescenza al Chemidoc iBright Imaging System Model #: CL1500 (Invitrogen ThermoScientific), tramite l'utilizzo dei reagenti (Clarity Western ECL Substrate, luminol/enhancer solution and peroxide solution, Bio-Rad) Al termine dell'incubazione con gli anticorpi specifici per le proteine di interesse, la membrana deve essere incubata con una proteina housekeeping che funge da controllo. Per gli esperimenti sono stati utilizzati come proteine housekeeping l'actina (diluizione 1:2000 in latte) e la vinculina (diluizione 1:500 in latte). Entrambe sono dirette marcate con perossidasi di rafano (HRP).

Le bande proteiche visualizzate in chemiluminescenza attraverso l'utilizzo del Chemidoc sono state successivamente quantificate a livello densitometrico, utilizzando il software ImageLab 6.1 di Biorad.

3.2.7 ANTICORPI UTILIZZATI

Gli anticorpi primari sono stati diluiti 1:1000 in BSA al 5% (azide 1:1000) per quelli della marca Cell Signalling o in BSA al 1% per quelli della marca Bethyl. Una volta risospesi vengono conservati a 4°C.

Gli anticorpi primari utilizzati negli esperimenti svolti sono i seguenti:

- NAMPT è un rabbit polyclonal (Bethyl #A300-779a) con peso molecolare 52 KDa.
- Exportin-1 è un rabbit mAb (Cell Signaling #46249S) con peso molecolare 123 KDa.
- Importin α (IPOA5) è un rabbit mAb (Proteintech #18137-1AP) con peso molecolare 60KDa.
- Importin β è un rabbit mAb (Cell Signaling # 51186S) con peso molecolare 90 KDa.
- Lamina A è un rabbit mAb (Cell Signaling #13435) con peso molecolare 68 KDa.
- Anti-FLAG è un rabbit mAb (Sigma #F7425-2MG) con peso molecolare 55 KDa.
- Vinculin (7F9) (sc -73614), diretta marcata con HRP, con diluizione 1:2000 in latte. Il suo peso molecolare è 117 kDa.

L'anticorpo secondario è mouse anti-Rabbit IgG HRP (sc-2357), viene diluito 1:2500 in latte. Deve essere preparato fresco ad ogni utilizzo. È marcato HRP e consente la visualizzazione del legame dell'anticorpo primario alla proteina in chemiluminescenza.

3.3 MICROSCOPIA CONFOCALE

Le cellule sono state seminate 100000/pozzetto (piastra da 24 pozzetti) sopra un vetrino "cover-slip" in terreno completo per 24 ore. Successivamente il terreno è stato eliminato, e si è effettuato un lavaggio in PBS. I vetrini sono stati fissati con paraformaldeide al 4% (PFA, 10 minuti, temperatura ambiente RT), permeabilizzati con saponina allo 0,1% in PBS (20 minuti, RT) e saturati con siero di capra pre-immune (1 ora, 4 °C). Le cellule immobilizzate sui vetrini sono state quindi incubate con l'anticorpo primario indicato (anti-NAMPT Bethyl 1:200, per l'intera notte a 4 °C), seguono 2 lavaggi in PBS e l'incubazione con l'anticorpo secondario di coniglio coniugato con il fluorocromo AlexaFluor 488 (1:100, 1 ora, 4 °C, Thermo Fisher Scientific). Le cellule sono state poi contro colorate con falloidina coniugata con AlexaFluor 568 (1:100, 30 minuti RT, Thermo Fisher Scientific) per visualizzare la morfologia delle cellule e 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, 1: 30.000, 10 minuti RT, Thermo Fisher Scientific) per evidenziare i nuclei. Il cover-slip è stato poi montato

su un vetrino portaoggetti da microscopia. La fluorescenza è stata acquisita mediante microscopia confocale (confocale laser TCS SP5, software LAS AF, Leica Microsystem, Milano, IT), utilizzando un obiettivo 63× a immersione in olio.

I file sono stati elaborati con Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA). L'intensità dei pixel della fluorescenza di NAMPT (verde) è stata calcolata con il software ImageJ analizzando i soli nuclei delle cellule con un ROI specifica (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3.4 SAGGIO DI FORMAZIONE DI COLONIE (CFU)

Il saggio di formazione delle colonie sfrutta la capacità di una cellula di proliferare e differenziarsi per formare una colonia. Il saggio è stato effettuato sulla linea cellulare A375 ingegnerizzata per overesprimere NAMPT nel nucleo (paragrafo 3.1.5) e chiamata A375 NLS_NAMPT e la linea di controllo SCR per valutare la loro capacità di formazione di colonie in condizioni non trattate (basale) e in seguito a trattamento con BRAF inibitori e MEK inibitori (vedi disegno sperimentale) a diverse concentrazioni in singolo e in combinazione. Le cellule vengono staccate con tripsina, contate e vengono piastrate a 500 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti in 2 ml di volume finale di terreno. Le cellule vengono fatte crescere in incubatore umidificato e ogni 3 giorni viene cambiato il terreno di coltura con o senza farmaci.

Per quantificare e analizzare le colonie queste vengono fissate utilizzando il metanolo e in seguito colorate con il Crystal Violet. Il protocollo per la fissazione e colorazione dei CFU è il seguente:

- portare a secco il pozzetto e fare un veloce lavaggio con PBS;
- aggiungere 2ml di metanolo (34860-2.5L-R, Sigma-Aldrich) ghiacciato (-20°C) e incubare 10' al buio a temperatura ambiente;
- eliminare il metanolo;
- aggiungere circa 2ml di soluzione di Crystal violet (V5265, Sigma-Aldrich) e incubare 30' al buio a temperatura ambiente;
- recuperare il colorante ed effettuare due lavaggi con acqua;
- lasciare asciugare le piastre all'aria.

L'analisi dei CFU è stata effettuata con il software ImageLab.

3.4.1 DISEGNO SPERIMENTALE PER I CFU

Per i test dei CFU sono state utilizzate delle piastre da 6 pozzetti (2 ml di volume finale per pozzetto). Dopo aver effettuato la conta cellulare (vedi paragrafo 3.1.4), si piastrano 500 cellule a pozzetto. Le cellule vengono fatte aderire al substrato per circa 2 ore in incubatore per poi essere trattate. Il disegno sperimentale prevede 3 pozzetti a condizione. Per ogni esperimento è sempre necessario avere un basale (condizione in cui le cellule non vengono trattate) che consentirà di confrontare le colonie formatesi con le colonie cresciute nei pozzetti trattati.

Gli inibitori utilizzati in questo esperimento sono:

- VEMURAFENIB (VEM) (CAT:hy-12057/CS-0216, MedChemExpress): un BRAF inibitore utilizzato alla concentrazione di 0,2 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M e 2 μ M. Lo stock di partenza è una soluzione 10mM, per trattare le cellule viene effettuata una diluizione intermedia 1:100.
- UO126 (UO) (CAT:hy-12031/CS0173, MedChemExpress): un MEK inibitore utilizzato alla concentrazione di 0,2 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M e 2 μ M. Lo stock di partenza è una soluzione 10mM, per trattare le cellule viene effettuata una diluizione intermedia 1:100.
- Combinazione dei due farmaci: VEM0,2/UO0,2; VEM0,5/UO0,5; VEM1/UO1; VEM2/UO2.

Le cellule vengono incubate per 72 ore in incubatore al termine delle quali viene cambiato il terreno. I CFU vengono fissati e colorati dopo 12 giorni seguendo il protocollo (vedi paragrafo 3.5).

3.5 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE: CCK8

Il saggio Cell Counting kit-8 (CCK8; BCCJ102, Sigma-Aldrich) è un test di citotossicità e vitalità cellulare, che sfrutta il sale idrosolubile WST-8 [2-(2-metossi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disolfofenil)-2H-tetrazolio,sale monosodico] che viene ridotto dalle deidrogenasi delle cellule vitali in un colorante formazano idrosolubile. Tale reazione provoca un cambiamento colorimetrico quantificabile misurando l'assorbanza a 450nm.

Le cellule vengono seminate (2000 cellule/pozzetto, in triplicato sperimentale) in una piastra da 96 pozzetti, fatte aderire al supporto e in seguito trattate (100 μ l di volume

finale a pozzetto). Dopo 72 ore alle cellule vengono aggiunti 10 μ l di WST-8 lasciato ad agire per 4 ore in incubatore al buio per far formare il precipitato. terminate le 4 ore la piastra viene letta al lettore Tecan (Infinite F200 pro) in assorbanza a 450 nm. In ogni piastra sono inclusi 3 pozzetti senza cellule ma con terreno ai quali viene aggiunto il WST-8. Questo valore medio di assorbanza costituisce il “bianco” (valore di assorbanza medio da sottrarre a tutti i valori registrati nei pozzetti con le cellule). I valori medi di assorbanza dei campioni nelle condizioni sperimentali sono graficati o come optical density unit (O.D.) a 450 nm oppure rapportati al valore di assorbanza del campione in condizioni non-trattate (valore a 100) nel paragone con i trattamenti (% di proliferazione).

3.5.1 DISEGNO SPERIMENTALE PER I CCK8

Per il saggio dei CCK8 vengono utilizzate delle piastre da 96 pozzetti (100 μ l di volume finale per ogni pozzetto). Dopo aver effettuato la conta cellulare (vedi paragrafo 3.1.4), si piastrano 2000 cellule a pozzetto. Le cellule vengono fatte aderire al substrato per circa due ore in incubatore per poi essere trattate. Il disegno sperimentale prevede 3 pozzetti a condizione, all'interno della piastra, oltre alla condizione basale, una condizione 0 viene utilizzato come controllo negativo e bianco, in cui non vengono seminate cellule ma solo il terreno.

Gli inibitori utilizzati in questo esperimento sono:

- VEMURAFENIB (VEM) (CAT:hy-12057/CS-0216, MedChemExpress): un BRAF inibitore utilizzato alla concentrazione di 0,2 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M e 10 μ M. Lo stock di partenza è una soluzione 10mM, per trattare le cellule viene effettuata una diluizione intermedia 1:100.
- UO126 (UO) (CAT:hy-12031/CS0173, MedChemExpress): un MEK inibitore utilizzato alla concentrazione di 0,2 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M 2 μ M, 5 μ M e 10 μ M. Lo stock di partenza è una soluzione 10mM, per trattare le cellule viene effettuata una diluizione intermedia 1:100.
- Combinazione dei due farmaci: VEM0,2/UO0,2; VEM0,5/UO0,5; VEM1/UO1; VEM2/UO2; VEM5/UO5 e VEM10/UO10.

La cinetica dell'esperimento è di 72 ore. Per staccare l'esperimento vengono aggiunti 10 μ l di Cell Counting kit (CCK-8) e la piastra viene incubata per 4 ore in incubatore al buio al termine delle quali viene effettuata una lettura al tecan (Infinite F200 pro) a 450 nm.

I risultati ottenuti vengono poi mediati tra i replicati delle varie condizioni, a cui viene, inoltre, sottratta l'assorbanza del bianco. I risultati ottenuti vengono poi rapportati al controllo non trattato per valutare la citotossicità.

3.6 MICROARRAY TISSUTALI AD ALTA DENSITA' (TMA) e ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

I TMA ad alta densità sono stati costruiti da tessuto Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) di 129 pazienti con MM BRAF mutati (73) e BRAF wild-type (WT 56, di cui 23 negativi per mutazioni in BRAF, ma anche in NRAS e c-Kit) (coorte di pazienti diagnosticati e trattati presso il Maria Sklodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Varsavia, Polonia, Dr.ssa Anna Szumera-Ciećkiewicz, vedi tabella sotto) includendo 3 prelievi di tessuto (tissue "cores") rappresentativi da 1,0 mm di ciascun campione, utilizzando il sistema automatico (TMA Grand Master, 3DHitech*). In tutti i TMA sono stati inseriti controlli positivi e controlli negativi (tonsilla, testicolo, fegato, appendice e cute normale). I TMA (processati presso il laboratorio di anatomia patologica dell'Università di Firenze, Prof. Massi), sono stati colorati mediante tecnica di immunohistochemica con l'anticorpo anti NAMPT (monoclonale di topo, clone OMNI379, 20A-0034, 1:300, Adipogen, San Diego, CA) utilizzando lo strumento automatizzato per immunohistochemica (Ventana Benchmark XT). Il segnale è stato sviluppato con UltraMap DAB anti-Mouse Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina. I tessuti sono stati sottoposti a scansione digitale a un ingrandimento di 400× (piattaforma Aperio AT2 Leica Biosystems, Wetzlar, DE) per la valutazione con un'analisi semiquantitativa dell'espressione di NAMPT definita come punteggio H-score (Audrito et al., 2022). In breve, la percentuale di cellule positive al NAMPT (dallo 0% al 100%) è stata moltiplicata per una scala di intensità di colorazione (1, debole; 2, moderato; 3, forte), con un punteggio complessivo compreso tra 0 e 300. Un valore <1% di cellule positive è stato considerato un risultato negativo. La positività di NAMPT nel nucleo è definita come % di nuclei positivi per l'espressione di NAMPT.

Tabella 4 – Tabella delle sezioni di pazienti con MM incluse in TMA

No	Number in TMA	BRAF: 0-no mutation, 1-p.V600E, 2-p.V600K, 3-p.V600D, 4-p.H585Y, 5-p.V600_K601delinsE, 6-p.E586K, 8-G469E, 9-not evaluated	NRAS: 0 - no mutation, 1-Q61R, 2-Q61K, 3-Q61L, 4-Q61H, 5-G13R, 6-G13D, 9-not evaluated	C-KIT: 0-no mutation, 1-W557R, 2-V559A, 3-L576P, 4-K642E, 9-not evaluated	H-score=%strong*3+%moderate*2+%weak*1	% of positive nuclei
29	40/15243/06	2	0	9	15	90
30	42/9113/06	1	0	9	12	30
33	51/15359/03	1	0	9	12	100
34	48/14146/03	0	1	9	11	10
35	46/6584/0	1	0	9	12	80
38	53/8510/03	1	0	9	12	30
39	54/4293/03	1	0	9	12	80
41	66/6467/08	1	0	9	12	1
45	67/560/08	1	0	9	12	10
46	72/8458/04	0	0	0	0	1
47	74/145/04	1	0	9	12	70
48	75/16289/04	0	0	4	4	10
49	81/660/04	2	0	9	15	20
52	78/8965/04	0	0	1	1	50
53	82/6470/04	1	0	9	12	1
54	83/12824/04	0	0	0	0	0
55	84/3423/04	1	0	9	12	40
56	86/8308/04	1	0	9	12	0
57	87/12324/04	0	2	9	13	20
58	88/9142/04	1	0	9	12	80
59	89/2255/04	1	0	9	12	15
60	90/261/04	0	3	9	15	0
61	95/4244/09	1	0	9	12	30
62	93/11008/04	1	0	9	12	30
63	92/15250/04	1	0	9	12	15
64	91/15941/04	1	0	9	12	100
66	98/6627/09	1	0	9	12	1
67	99/6459/09	1	0	9	12	100
68	102/14298/0	0	0	0	0	10
70	105/9731/07	1	0	9	12	20
71	104/1674/07	1	0	9	12	20
72	103/5930/07	1	0	9	12	10
73	108/7034/07	0	1	9	11	80
74	109/4506/07	0	2	9	13	10
75	110/16221/0	0	1	9	11	60
76	111/15115/0	0	1	9	11	50
77	118/14253/0	0	3	9	15	70
79	114/2425/07	0	2	9	13	100
81	119/5889/07	2	0	9	15	0
82	120/1078/05	0	1	9	11	10
83	121/8976/05	1	0	9	12	100
84	122/13763/0	1	0	9	12	40
85	123/5702/05	5	0	9	24	20
86	124/7492/05	1	0	9	12	20
87	125/16589/0	0	1	9	11	10
89	139/4981/06	1	0	9	12	10
90	132/1912/04	1	0	9	12	20
91	129/9347/04	0	5	9	19	80
92	128/2406/04	1	0	9	12	70
93	138/8966/03	0	0	0	0	0
94	140/3288/06	1	0	9	12	1
95	144/3972/06	1	0	9	12	40
97	150/15004/0	0	2	9	13	30
100	147/4845/09	1	0	9	12	1
101	154/11009/0	0	1	9	11	5
102	155/3619/02	0	0	0	0	60
103	161/5368/02	0	1	9	11	10
104	163/15462/0	1	0	9	12	60
105	167/7936/02	1	0	9	12	20
106	166/9184/02	1	0	9	12	30

107	00	0	0	0	0	1
108	00	0	3	9	15	0
111	170/8909/02	0	2	9	13	0
112	171/11554/0	1	0	9	12	90
113	172/2104/02	1	0	9	12	70
114	173/4341/02	1	0	9	12	10
115	174/8227/02	1	0	9	12	20
118	179/11138/9	0	0	0	0	10
119	177/8626/98	1	0	9	12	1
120	176/13857/0	0	0	0	0	10
121	181/2816/98	0	1	9	11	60
122	182/114/98	1	0	9	12	50
123	183/11087/9	1	0	9	12	100
124	184/11724/9	1	0	9	12	20
125	188/12921/9	1	0	9	12	30
126	187/3564/99	0	0	0	0	40
128	185/11824/9	0	0	0	0	0
129	189/10996/0	1	0	9	12	20
130	190/14240/9	1	0	9	12	1
131	191/12501/9	0	1	9	11	100
132	193/10208/9	0	1	9	11	30
133	197/13888/9	0	1	9	11	10
134	196/9813/97	1	0	0	3	10
136	194/7471/97	0	0	9	9	20
137	198/14249/9	0	1	9	11	20
138	199/12383/9	1	0	9	12	10
139	200/2924/97	1	0	9	12	40
140	201/4951/95	0	0	0	0	0
141	205/2355/95	0	0	0	0	0
144	211/5330/01	1	0	9	12	20
145	217/2662/01	1	0	9	12	20
147	213/9537/01	1	0	9	12	70
148	212/7103/01	0	2	9	13	1
149	218/1047/01	0	0	0	0	20
150	219/5095/06	1	0	9	12	100
151	220/7166/06	1	0	9	12	0
152	221/3476/06	1	0	9	12	60
153	227/9419/96	0	1	9	11	100
154	226/4874/99	0	0	0	0	90
155	224/7874/03	1	0	9	12	100
156	223/5839/02	1	0	9	12	40
157	228/8726/96	0	0	0	0	0
158	229/9358/96	1	0	9	12	30
159	230/8473/96	0	1	9	11	1
160	231/11629/9	1	0	9	12	20
161	237/3675/97	1	0	9	12	80
163	235/6263/97	0	9	9	27	30
164	233/13100/9	1	0	9	12	100
165	238/5246/98	1	0	9	12	20
167	250/5581/09	1	0	9	12	20
168	251/1718/09	2	0	9	15	10
169	252/3033/09	0	2	9	13	10
170	253/2267/09	0	0	0	0	10
171	254/107/12	1	0	9	12	80
172	255/4849/12	0	0	0	0	30
173	263/3873/08	0	0	0	0	100
174	260/3540/08	1	0	9	12	30
175	257/6656/03	1	0	9	12	1
177	264/4575/03	1	0	9	12	1
178	265/6775/06	0	0	0	0	0
179	266/9874/06	0	0	0	0	1
180	267/12446/0	0	2	9	13	50
181	322/406808/	0	0	0	0	1
182	321/332598/	1	0	0	3	100
183	320/319104	0	0	0	0	0
184	319/328805-	0	2	0	4	0
185	324/337617/	0	1	0	2	10
186	50/11975/08	0	0	0	0	0
187	133/13610/0	1	0	9	12	1

3.7 ANALISI STATISTICHE

Per le analisi statistiche è stato utilizzato il software GraphPad Prism 8.4.3. Per tutte le analisi è stato applicato un t-test parametrico o non parametrico (Mann-Whitney) per dati non appaiati, t-test parametrico o non parametrico per dati appaiati test di Wilcoxon, o un test ANOVA. I grafici sono degli istogrammi che rappresentano media \pm SEM. La significatività è così espressa: *P-value \leq 0,05; **P-value \leq 0,01; ***P-value \leq 0,001; ****P-value \leq 0,0001.

4. RISULTATI

4.1 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI FRAZIONAMENTO NUCLEO/CITOSOL

Il frazionamento nucleo/citosol è una tecnica biochimica che permette di ottenere una frazione con il contenuto proteico citoplasmatico e una frazione con il contenuto proteico nucleare, attraverso l'utilizzo di due buffer con concentrazioni saline diverse e di centrifugazioni dei campioni applicando diverse forze centrifughe per una sedimentazione differenziale.

Il protocollo di frazionamento nucleo/citosol è descritto nel capito 3.2.2 ed è stato ottimizzato con diverse prove sperimentali per le linee cellulari di melanoma metastatico BRAF mutate A375 e M14 utilizzate in questo studio (Figura 23).

Il campione di partenza deve essere un pellet di cellule appena staccate dalla piastra in coltura; quindi, non devono essere state precedentemente congelate/scongelate poiché questo passaggio causa la lisi del nucleo. Il pellet viene inizialmente lisato con la soluzione A, completata con inibitori delle proteasi e delle fosfatasi, per i primi 10', e successivamente viene aggiunto il detergente NP-40 0,15% per ulteriori 10'. Un fattore limitante è la quantità di soluzione A utilizzata per risospendere il pellet, una quantità inferiore a 400 µl di soluzione A è insufficiente per lisare un pellet di circa $6-8 \times 10^6$ di cellule di melanoma (circa 80% confluenza in fiasca). Questo primo passaggio provoca la lisi della membrana citoplasmatica. Si prosegue con la prima centrifugazione a bassa velocità che permette la separazione dei componenti cellulari in base alla loro densità: i nuclei che sono più densi si concentrano nel pellet sul fondo della provetta, il contenuto citosolico rimane nel surnatante (parte liquida superiore). Si recupera il surnatante conservandolo come **frazione citosolica**; per evitare contaminazioni nucleari si recupera l'80% del surnatante. Successivamente si prosegue con una serie di lavaggi con la soluzione B per eliminare i residui di citosol e ottenere una frazione nucleare pulita. Il numero di lavaggi ottimale è 4, più lavaggi rendono i nuclei eccessivamente viscosi e difficili da disgregare. Terminati i lavaggi il campione viene lasciato 10' in ghiaccio con la soluzione B per iniziare la lisi della membrana nucleare. Per lisare in modo ottimale i nuclei avviene anche una lisi meccanica attraverso 3 cicli ON/OFF da 30'' utilizzando il sonicatore. Alla fine della lisi meccanica il campione viene centrifugato ad alta velocità ottenendo un pellet con i residui delle membrane e il surnatante con la **frazione nucleare** che viene recuperata.

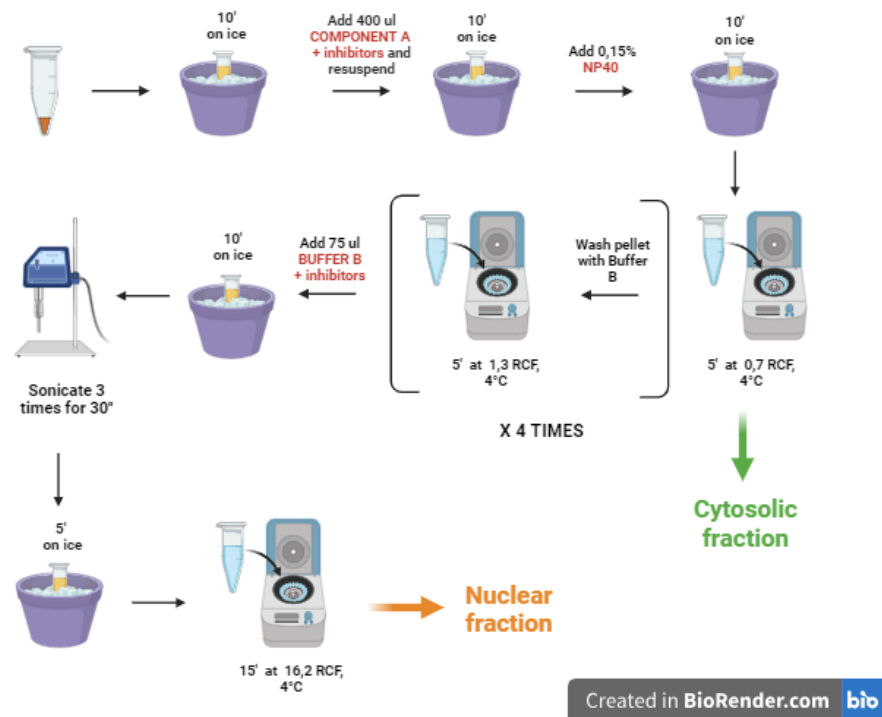
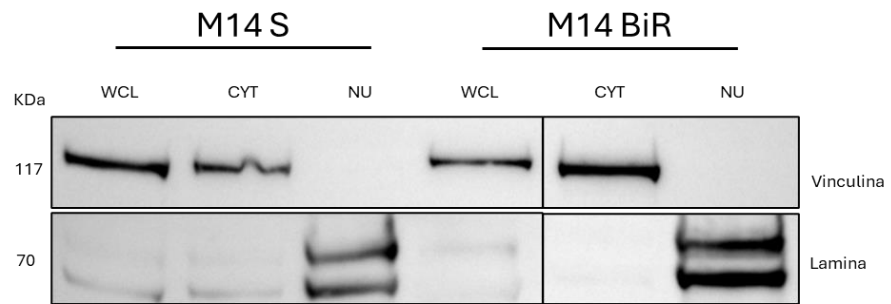
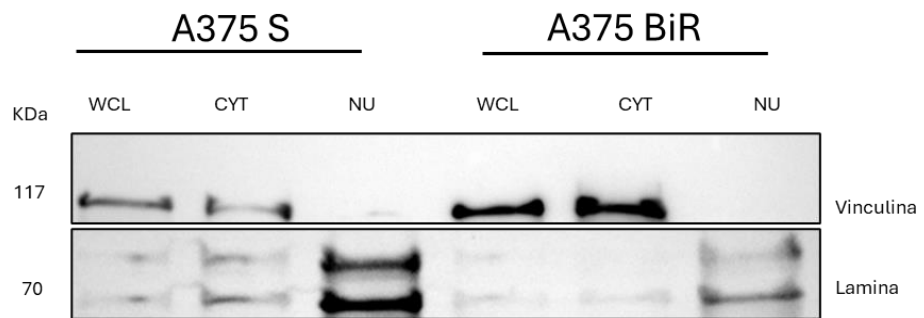


Figura 23 Schema del frazionamento nucleo/citosol

Le frazioni ottenute vengono quantificate per la loro abbondanza proteica e fatte correre su gel di poliacrilammide seguito da western blot dove, oltre a visualizzare la proteina di interesse, vengono sempre analizzati due controlli interni di purezza del frazionamento: la vinculina e la lamina. La vinculina è una proteina del citoscheletro quindi prettamente citosolica che deve essere presente esclusivamente nella frazione citosolica (indicazione di purezza della frazione nucleare che non sia contaminata da residui di citosol). La lamina è una componente del poro nucleare che viene utilizzata per verificare che la frazione citoplasmatica sia pulita e non contenga proteine nucleari. Le immagini rappresentative incluse Figura 24 A-B dimostrano la bontà del metodo, avendo ottenuto frazioni citosoliche (Cyt) e nucleari (Nu) con un buon grado di purezza nella linea M14 e A375 sensibile (S) e resistente ai BRAF inibitori (BiR). Un lisato di estratto totale (WCL) è incluso nella corsa elettroforetica.

A**B****Figura 24 Frazionamento citosol/nucleo nelle linee di melanoma.**

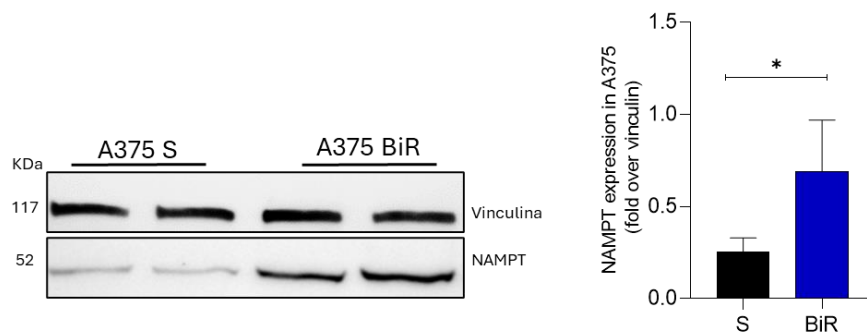
Western blot rappresentativi sulla metodica di frazionamento. Sono stati caricati 20 μ g di proteine nella corsa elettroforetica per ogni campione. WCL= lisato cellulare totale; CYT= frazione citosolica; NU= frazione nucleare. La vinculina è utilizzata nel western blot come marcatore citosolico, mentre la lamina è espressa principalmente a livello nucleare. In **(A)** è rappresentata la linea M14, mentre in **(B)** l'A375, nelle varianti sensibile (S) e resistente (BiR).

4.2 NAMPT È OVERESPRESSO NELLE LINEE DI MELNAOMA RESISTENTI (BiR) UTILIZZATE IN LABORATORIO

I dati pubblicati hanno dimostrato che NAMPT è overespresso nelle linee cellulari di melanoma umano e nei pazienti resistenti ai BRAFi supportandone la riprogrammazione metabolica, meccanismo alla base dell'acquisizione della resistenza (Audrito et al., 2018; Ohanna et al., 2018).

In laboratorio sono disponibili le linee A375 e M14 precedentemente rese resistenti ai BRAF inibitori (Audrito et al., 2018). Come prima cosa abbiamo riconfermato l'overespressione di NAMPT, attraverso l'analisi western blot su lisati totali, nella versione BiR anche nelle linee A375 (Figura 25 A) e M14 (Figura 25 B) che ho scongelato e utilizzato durante la tesi per questo studio. È riportato un western blot rappresentativo e a lato, a destra, la quantificazione densitometrica cumulativa (n=4) di NAMPT nelle varianti cellulari.

A



B

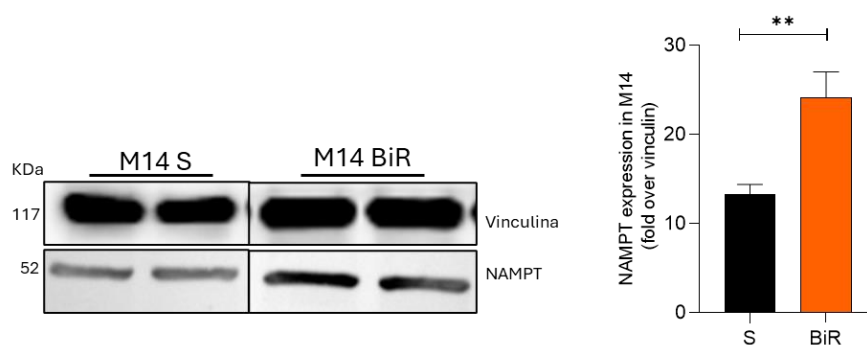


Figura 25 Overespressione basale di NAMPT nelle linee A375 BiR e M14 BiR.

Western Blot rappresentativi dell'espressione basale di NAMPT nelle linee A375 (A) e M14 (B) nella forma S e BiR. Caricati 20 µg di proteine in estratti totali per ogni campione. La vinculina è utilizzata come controllo di caricamento nel gel. Sulla destra dell'immagine sono riportati i grafici cumulativi dell'analisi densitometrica dell'espressione di NAMPT normalizzato su Vinculina di 4 esperimenti indipendenti. t-test. I dati in figura sono rappresentati con media ± SEM. La significatività è rappresentata come: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$.

4.3 NAMPT È MAGGIORMENTE PRESENTE NEI NUCLEI DELLE LINEE RESISTENTI (BiR)

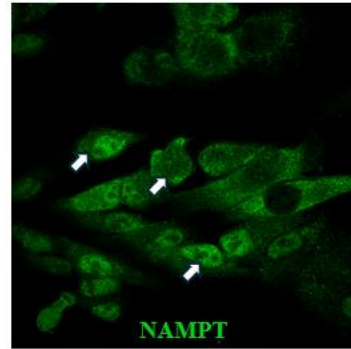
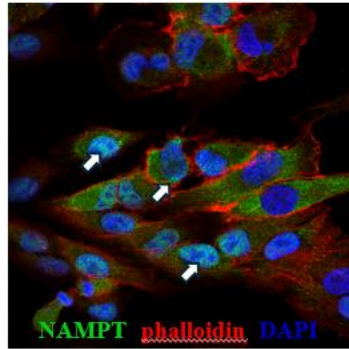
Confermata l'overespressione di NAMPT nelle nostre linee BiR abbiamo iniziato a valutare l'espressione differenziale di NAMPT nel compartimento citosol/nucleo confrontando la linea S *vs* BiR.

Come prima cosa abbiamo valutato la localizzazione nucleare di NAMPT su M14 S e BiR e A375 S e BiR rianalizzando immagini di microscopia confocale precedentemente ottenute dalla Dott.ssa Audrito presso l'Università di Torino. I vetrini erano stati colorati (vedi materiali e metodi capitolo 3.3) utilizzando un anticorpo specifico per NAMPT (fluorescenza verde), un tracciante citoscheletro la falloidina (fluorescenza rossa) e un tracciante nucleare il DAPI (fluorescenza blu). L'analisi di NAMPT nucleare è stata effettuata mediante il disegno di un'area di analisi dell'intensità di fluorescenza (ROI) intorno ai nuclei e quantificata attraverso ImageJ. Come si evidenzia in queste immagini di confocale rappresentative la fluorescenza di NAMPT nucleare è più evidente nelle linee BiR, come evidenziato anche dalle frecce (Figura 26A-B).

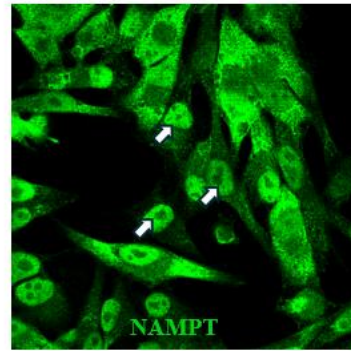
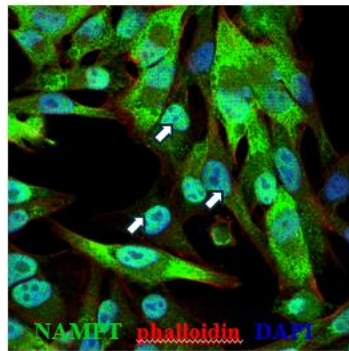
In figura 26C sono riportati i grafici cumulativi dell'espressione di NAMPT nucleare (intensità di fluorescenza) derivati dall'analisi di 3 differenti campi di 4 immagini di 2 esperimenti indipendenti.

A

M14 S

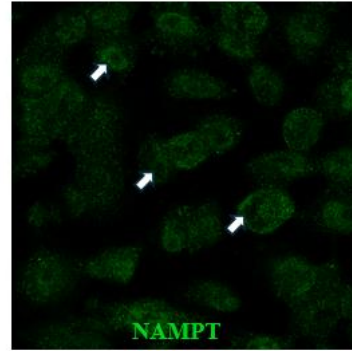
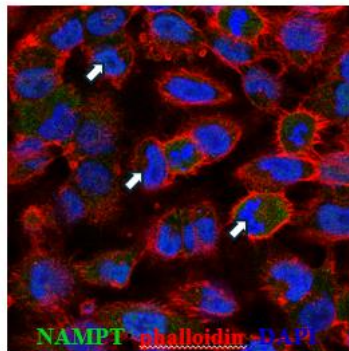


M14 BiR

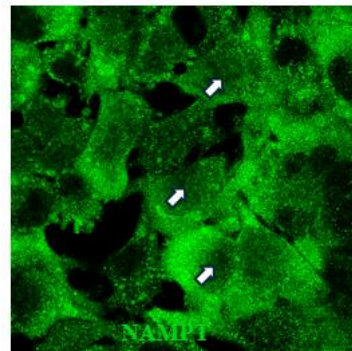
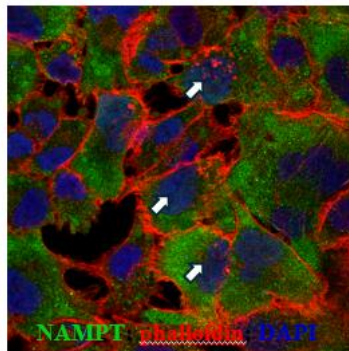


B

A375 S



A375 BiR



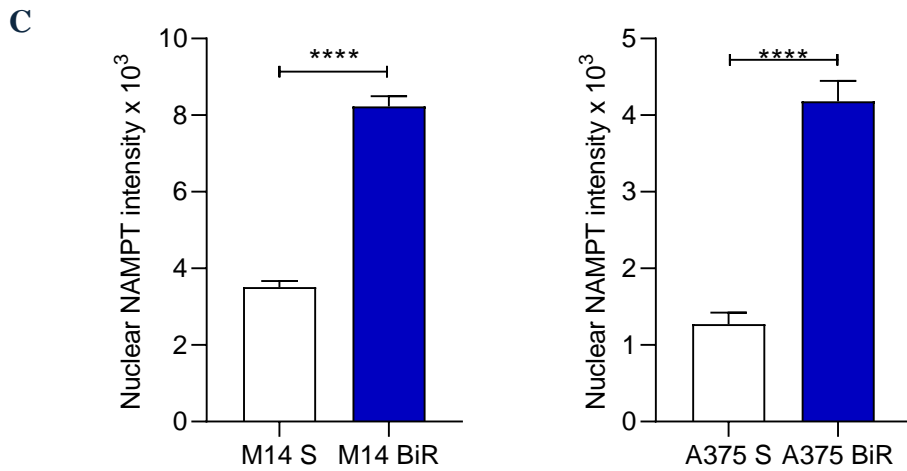
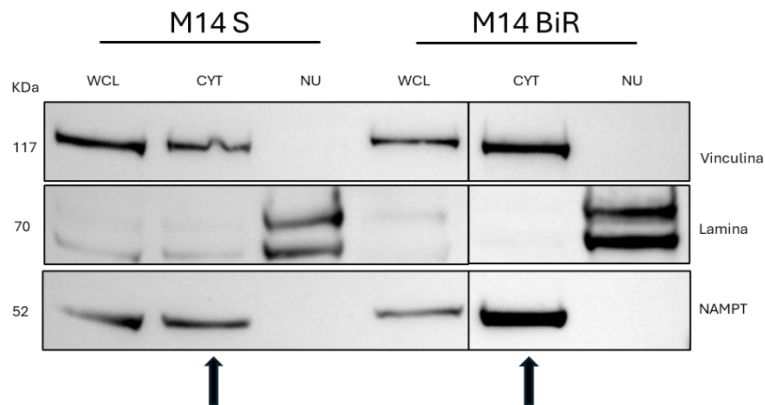


Figura 26 Espressione di NAMPT in microscopia confocale

A-B) Immagini rappresentative di microscopia confocale per valutare l'espressione di NAMPT (fluorescenza verde) in cellule di melanoma M14 (A) A375 (B) S e BiR (ingrandimento originale 63x, Scale bar = 50 μ m). Le frecce in bianco indicano dei nuclei. **C)** Istogrammi cumulativi rappresentanti l'intensità di fluorescenza di NAMPT a livello nucleare. Mann-Whitney t-test. I dati in figura sono rappresentati con media \pm SEM. La significatività è rappresentata come: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$.

L'aumento di NAMPT a livello nucleare nelle BiR è stato confermato anche attraverso frazionamento biochimico. Questa differenza è visivamente poco evidente dal blot dove sono stati fatti correre sia le frazioni citosoliche che quelle nucleari per le due linee (Figura 27 A-B), poiché il forte segnale di NAMPT nel citosol copre il segnale più debole della frazione nucleare.

A



B

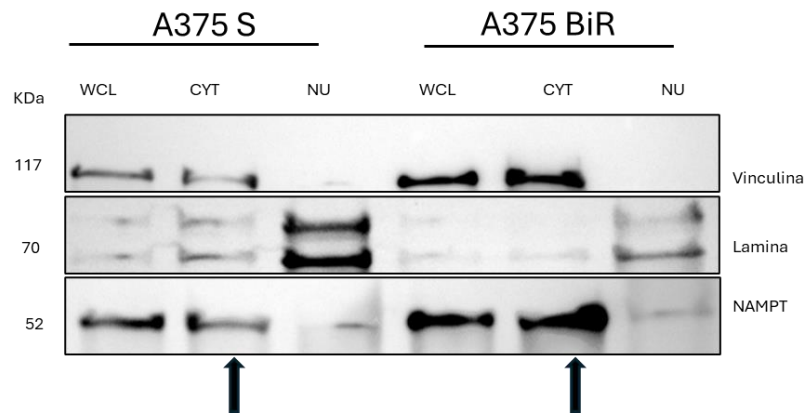


Figura 27 Espressione di NAMPT nella frazione citosolica e nucleare nelle linee A375 e M14

Blot rappresentativi l'espressione di NAMPT nella frazione citosolica e nucleare ottenute tramite frazionamento biochimico nelle linee M14 (A) e A375 (B) nella forma S e BiR. Caricati 20 µg di proteine di ogni frazione. WCL: lisato cellulare totale; CYT: frazione citosolica; NU: frazione nucleare. La vinculina è utilizzata come marcatore citosolico, mentre la lamina come marcatore nucleare. Essendo NAMPT un enzima prettamente citosolico la banda citosolica è spessa e durante lo sviluppo della membrana tale fluorescenza tende a coprire la piccola frazione di NAMPT nucleare.

Di conseguenza, stabilito che il frazionamento nucleo/citosol è ottimizzato per le linee di melanoma A375 e M14 sia nella forma sensibile che quella resistente (risultato 4.1), abbiamo fatto correre nel gel di poliaccrilammide solo le frazioni nucleari (Figura 28) dove la differenza è più apprezzabile.

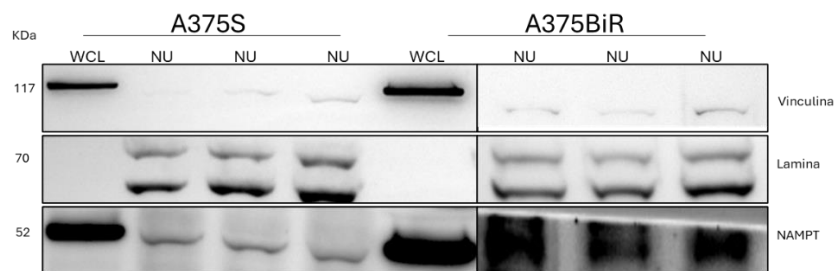


Figura 28 Espressione di NAMPT nella frazione nucleare nella linea A375

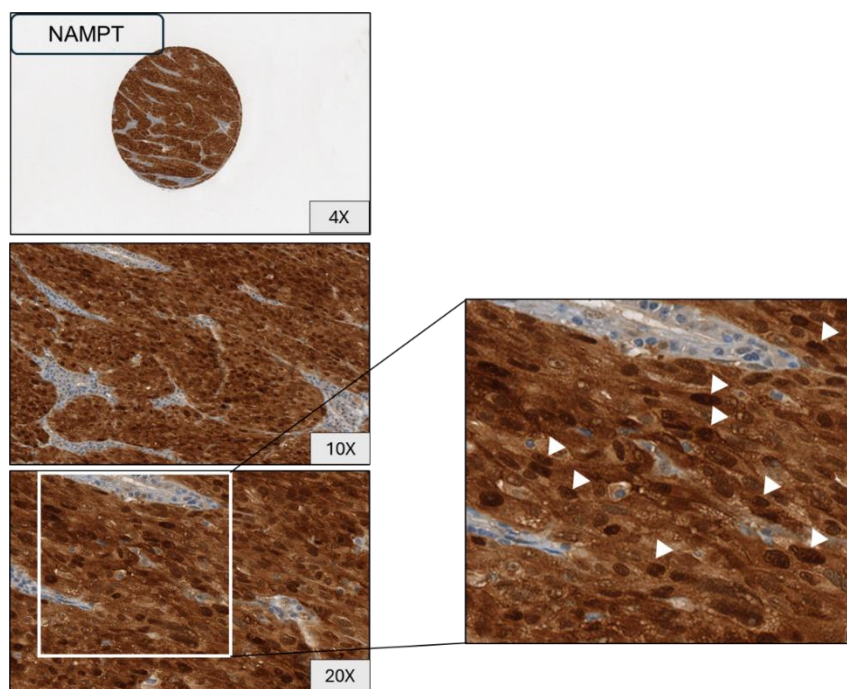
Blot rappresentativi l'espressione di NAMPT nella frazione nucleare ottenute tramite frazionamento biochimico nella linea A375 nella forma S e BiR. Caricati 50 µg di proteine di ogni frazione. WCL: lisato cellulare totale; NU: frazione nucleare. La vinculina è utilizzata come marcatore citosolico, mentre la lamina come marcatore nucleare. Anche attraverso il frazionamento biochimico si confermano i risultati ottenuti con la microscopia confocale e la quantità di NAMPT nucleare nelle linee resistenti è maggiore rispetto alle sensibili.

4.4 NAMPT È ABBONDANTE NEL NUCLEO DEI PAZIENTI EVIDENZIATO TRAMITE IMMUNOISTOCHEMICA SU TESSUTO

Nelle linee cellulari di melanoma abbiamo dimostrato che NAMPT viene overespresso nelle linee BiR e assume una maggiore localizzazione nucleare. È dimostrato che l'overespressione di NAMPT è associata con l'attivazione del pathway oncogenico di BRAF. Studi precedenti della Dott.ssa Audrito dimostrano che pazienti con mutazione in BRAF presentano aumentati livelli di NAMPT rispetto a pazienti WT (Audrito et al., 2022).

Per avere una conferma della localizzazione nucleare di NAMPT e della sua associazione con le mutazioni in BRAF non solo su linee cellulari ma anche su pazienti, in collaborazione con la Prof.ssa Massi dell'Università di Firenze, è stata effettuata un'analisi in immunohistochemica di NAMPT su un microarray di tessuto (TMA) di 129 pazienti di melanoma (vedi paragrafo 3.6, tabella 4). In questa nuova analisi dei tessuti dei pazienti abbiamo quantificato la percentuale di nuclei positivi per NAMPT (immagine rappresentativa Figura 29A) confrontando tessuti derivati da pazienti BRAF mutati (73) BRAF WT (33) e BRAF all WT (23 pazienti senza mutazioni in BRAF, NRAS e c-Kit), tabella 4. Le analisi cumulative evidenziano una maggiore e significativa % di nuclei positivi per NAMPT nei pazienti BRAF mutati (media \pm SD: $38,08 \pm 34,15$), rispetto ai pazienti WT ($25,55 \pm 31,81$) e all WT ($16,7 \pm 29,07$) (Figura 29B).

A



B

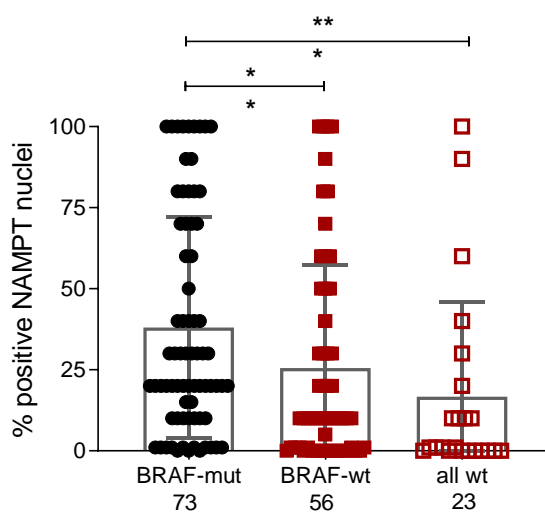


Figura 29 Analisi di NAMPT in immunohistochimica su TMA di pazienti con melanoma

A) Immagine rappresentativa di un “core” del TMA che evidenzia un’elevata espressione di NAMPT in immunohistochimica nel tessuto e anche a livello dei nuclei (freccie bianche sull’inserito ingrandito). A partire dall’alto immagine con ingrandimento 4X, al centro immagine con ingrandimento 10X, infine ingrandimento 20X e inserito ingrandito sulla destra.

B) Box plot dell’analisi cumulativa della percentuale di positività dei nuclei per l’espressione di NAMPT su pazienti di MM (129) di cui 73 BRAF mutati; 56 BRAF WT di cui 23 negativi per mutazioni in BRAF, NRAS e c-Kit. Mann-Whitney t-test *P-value \leq 0,05; **P-value \leq 0,01; ***P-value \leq 0,001; ****P-value \leq 0,0001.

4.5 NAMPT POTREBBE ASSOCIARSI A IMPORTINA E ESPORTINA PER ENTRARE NEL NUCLEO

Le principali proteine coinvolte nel trafficking nucleare appartengono alla famiglia delle Karioferine (Xu et al., 2010). Sono incluse in questa famiglia le importine e le esportine. Come dettagliatamente descritto nel capitolo introduttivo 1.3.1, l'importina β è un recettore di trasporto cruciale nel traffico nucleare che facilita l'importazione delle proteine nel nucleo. Essa si lega con alta affinità ai segnali di localizzazione nucleare (NLS) delle proteine cargo, interagisce con le nucleoporine FG (FG-NUPS) che rivestono il complesso del poro nucleare (NPC) nel citoplasma, e si associa con la proteina RanGTP, la quale induce un cambiamento conformazionale essenziale per il rilascio del carico all'interno del nucleo. L'importina β può legarsi direttamente alle proteine da importare tramite le ripetizioni HEAT o attraverso adattatori come l'importina α , grazie alla presenza di un dominio di legame all'importina β (IBB) (Pumroy & Cingolani, 2015). L'importina α possiede tre domini strutturali chiave: un dominio N-terminale che lega l'importina β e regola il legame del carico cNLS; il dominio ARM (ripetizioni Armadillo) che fungono da sito di legame per la sequenza NLS e una regione C-terminale che, interagendo con il fattore di esportazione nucleare CAS/CSE1L facilita il rilascio del carico cNLS (Oka & Yoneda, 2018). L'esportina 1 è una delle principali proteine coinvolte nell'esportazione nucleare. XPO1 si lega ai segnali di esportazione nucleare (NES) presenti sulle molecole cargo e collabora con la RAN GTPasi, la quale fornisce l'energia necessaria per il trasporto attraverso il poro nucleare (NPC).

Inizialmente abbiamo indagato l'espressione basale di queste tre proteine nelle linee cellulari di melanoma utilizzate: A375 e M14 nella forma S e BiR, per verificare che esprimessero livelli apprezzabili di tutte e tre le proteine l'importina α , l'importina β e l'esportina 1. In Figura 30 è rappresentato un western blot rappresentativo delle A375 (A) e M14 (B) che mostra una buona espressione delle proteine, apparentemente omogenea tra S e BiR. Esportina 1 e importina β sembrano le più espresse, minore è l'espressione dell'importina α .

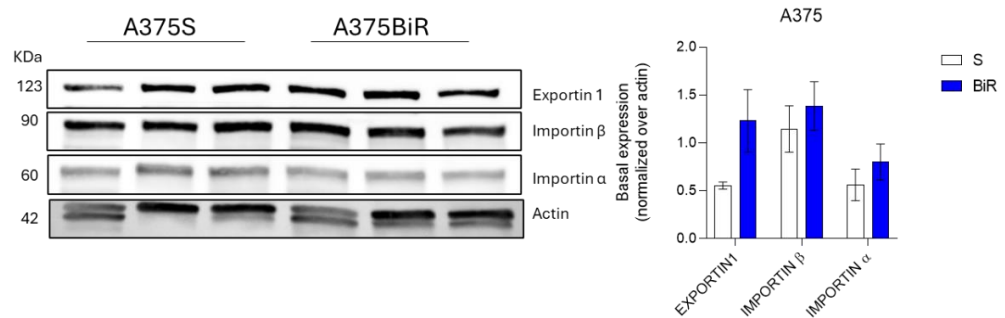
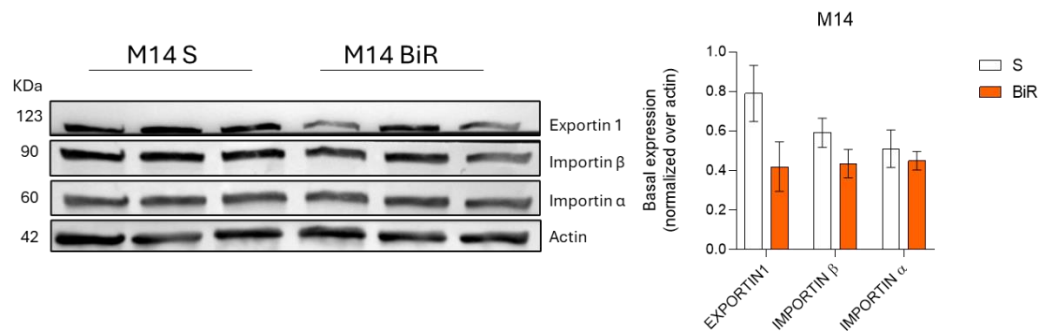
A**B**

Figura 30 Espressione di importina α , importina β e esportina 1 nelle linee di melanoma.

A sinistra blot rappresentativo l'espressione basale dell'esportina 1, importina β e importina α nelle linee A375 (A) e M14 (B). Nel gel di poliacrilamide sono stati caricati 20 μ g di proteine di lisato totale di ogni campione. L'actina è stata utilizzata come controllo di caricamento del gel. Sulla destra dell'immagine sono riportati i grafici cumulativi dell'analisi densitometrica dell'espressione delle tre principali proteine coinvolte nei meccanismi di trafficking nucleare (esportina 1, importina β e importina α) normalizzato su actina di 3 esperimenti indipendenti. t-test. I dati in figura sono rappresentati con media \pm SEM. La significatività è rappresentata come: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$.

La nostra ipotesi è che NAMPT possa fisicamente interagire con queste proteine ed entrare/uscire dal nucleo mediante questi meccanismi importine/esportine-mediati. Per un altro progetto del laboratorio per identificare l'interattoma di NAMPT è stato effettuato un esperimento di immunoprecipitazione (IP) di NAMPT da estratti proteici totali derivati dalla linea cellulare M14 S e BiR, seguito da analisi di proteomica

utilizzando la spettrometria di massa (MS). Dall'analisi proteomica applicando dei cut-off statistici le proteine rilevate sono state considerate arricchite nella condizione IP-NAMPT (rispetto a IP-IgG di controllo) per un p value <0.05 e un log2 del fold change (FC) tra IP-NAMPT rispetto a IP-IgG >1.5, per restringere l'analisi a potenziali e più certi interattori di NAMPT. Da tale analisi è emerso che l'importina beta (KPNB1) e l'esportina 1 (XPO1) possono essere potenziali interattori di NAMPT con un maggiore arricchimento nella linea resistente rispetto alla linea sensibile: XPO1 FC in M14 BiR 4,51 vs FC in S 2,51; KPN1 FC in M14 BiR 4,64 vs FC in S 2,30 (Figura 31). Questi risultati, che dovranno essere confermati con esperimenti di co-IP e western blot, avvalorano la nostra ipotesi sul meccanismo di trafficking di NAMPT al nucleo mediato da importine ed esportine più evidente nelle cellule resistenti.

Name	M14 BIR				M14 S			
	Avg NAMPT	Avg IgG	FC	p-Value	Avg NAMPT	Avg IgG	FC	p-Value
Exportin-1 XPO1	218446,10	48479,18	4,51	0,0127509	217799,01	86759,27	2,51	0,0044010
Importin subunit beta-1 KPNB1	37181,35	8019,49	4,64	0,0000674	38340,54	16687,16	2,30	0,0048105

Figura 31 XPO1 e KPNB1: potenziali interattori di NAMPT.

Nella tabella sono riportati i dati derivati dall'immunoprecipitazione di NAMPT e successiva analisi MS. I dati riportati indicano l'abbondanza delle proteine immunoprecipitate con un Ab anti-NAMPT o una IgG di controllo. Il fold change (FC) è calcolato rispetto all'IgG. Dal dato di FC e dal p-value emerge come l'esportina 1 e l'importina β siano più arricchite come potenziale legame a NAMPT nella linea BiR.

4.6 GENERAZIONE DI UNA LINEA OVERESPRIMENTE NAMPT NEL NUCLEO

La quota di NAMPT nucleare rispetto a quella citoplasmatica è, seppur arricchita nelle linee BiR, molto ridotta almeno in condizioni basali. Per poter definire il ruolo funzionale di NAMPT nel nucleo abbiamo quindi generato una linea A375 NLS_NAMPT in cui abbiamo forzato l'espressione di NAMPT nel nucleo manipolando la linea parentale. Questa linea è stata generata in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Grolla, dell'Università del Piemonte Orientale a Novara. L'overespressione stabile nucleare di NAMPT è stata ottenuta tramite infezione lentivirale di un costrutto NLS_NAMPT precedentemente ottenuto in Grolla et al. (Ambra Grolla et al., 2020), vedi materiali e metodi paragrafo 3.1.5 e schema Figura 32. NLS_NAMPT è stato ottenuto legando all'N-terminale della sequenza del NAMPT murino addizionata di una sequenza FLAG(FLAG-NAMPT) l'NLS del virus SV40 (ATGGCAGTTCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTTGAG). Il costrutto così ottenuto NLS_NAMPT è stato clonato nel vettore lentivirale bicistronico pLV che esprime il sito di ingresso del ribosoma interno NLS-FLAG-NAMPT GFP (Ambra Grolla et al., 2020). Come controllo dell'infezione lentivirale è stata creata una linea A375 SCR in cui è stata infettata la linea A375 S con un vettore vuoto. Le cellule infettate sono state selezionate mediante FACS sorting delle sole cellule GFP+, per ottenere una linea omogenea.

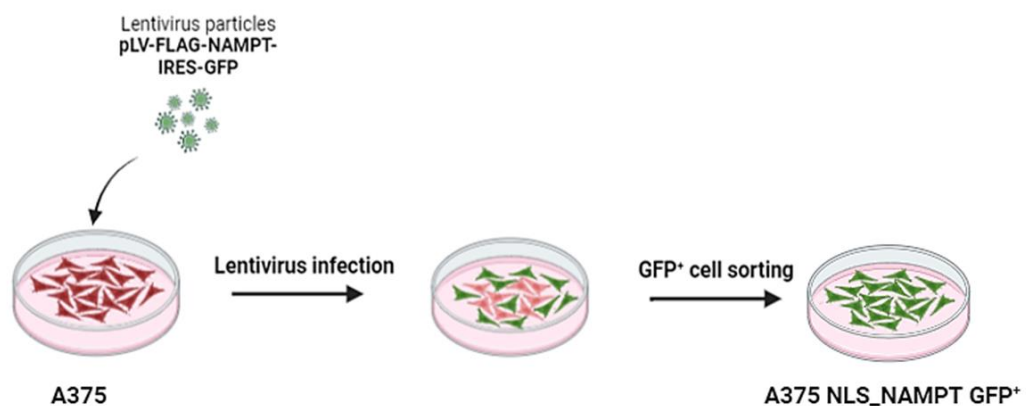


Figura 32 Schema del protocollo di generazione della line A375 NLS_NAMPT e A375 SCR

Per confermare l'avvenuta infezione delle cellule abbiamo fatto un frazionamento biochimico dove abbiamo visualizzato tramite western blot il FLAG evidente come atteso solo nella linea A375 NLS_NAMPT. L'espressione di NAMPT nei lisati totali

è comparabile nelle due linee (Figura 33). Inoltre, è mostrata in Figura 34 una immagine rappresentativa acquisita al microscopio a fluorescenza che mostra le cellule GFP+.

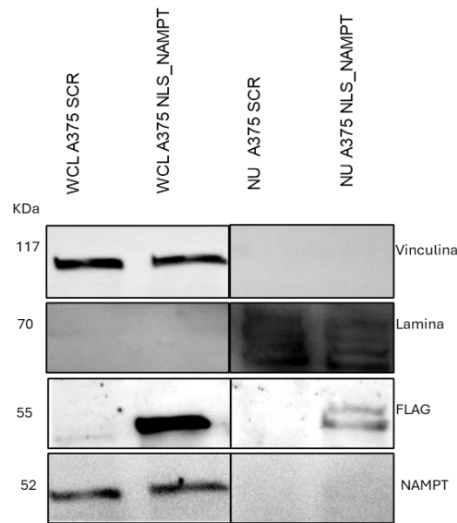


Figura 33 Frazionamento citosol/nucleo nelle linee A375 NLS_NAMPT e SCR.

Western blot rappresentativi sulla metodica di frazionamento. WCL= lisato cellulare totale; NU= frazione nucleare. Sono stati caricati 10 µg di proteine nella corsa elettroforetica per ogni campione WCL e 50 10 µg di proteine per ogni NU. La vinculina è utilizzata nel western blot come marcatore citosolico, mentre la lamina è espressa principalmente a livello nucleare. La membrana è stata blottata con un anticorpo anti-FLAG (evidente la banda solo nelle NLS_NAMPT come atteso) e con un anticorpo anti-NAMPT di controllo che evidenzia una quantità comparabile di NAMPT nei lisati totali.

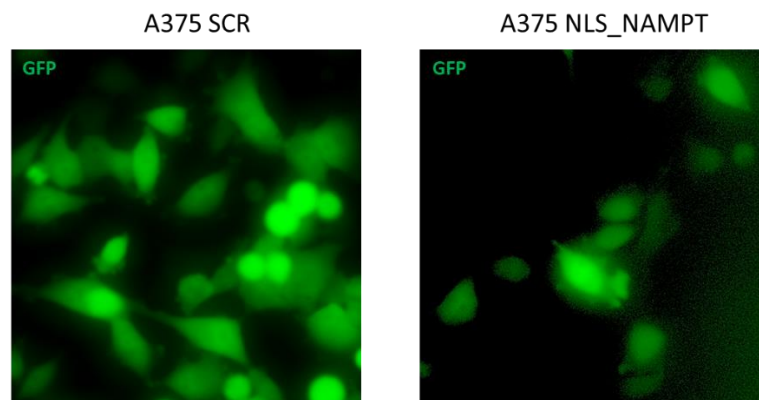


Figura 34 Espressione di NAMPT nelle A375 NLS_NAMPT e A375 SCR al microscopio a fluorescenza

Immagini rappresentative di microscopia a fluorescenza (ingrandimento 20x) per valutare l'espressione della GFP (fluorescenza verde) in cellule di melanoma overesprimenti NAMPT nel nucleo (A375 NLS_NAMPT) e nella linea di controllo (A375 SCR).

4.7 LA LINEA A375 NLS_NAMPT CRESCE MAGGIORMENTE RISPETTO ALLA LINEA DI CONTROLLO SCR

L'ipotesi dietro questa tesi è come l'overespressione di NAMPT nel nucleo possa avere un ruolo funzionale nel modulare processi biologici in cui una regolazione alterata delle concentrazioni di NAD possa giocare un ruolo chiave. Un aumento di NAMPT nel nucleo, e di conseguenza maggiori livelli di NAD, può influire sull'attività di enzimi nucleari NAD dipendenti come le sirtuine e le PARP (Chiarugi et al., 2012), e quindi di conseguenza alterare il riparo al DNA e la regolazione epigenetica dell'espressione genica. Prima di concentrarci su sirtuine e PARP, che saranno esperimenti futuri, siamo andati a valutare un potenziale impatto di un aumento di NAMPT nucleare sulla modulazione della crescita delle cellule di melanoma e della loro sensibilità a BRAF e MEK inibitori.

Interessatamente, le cellule A375 NLS_NAMPT hanno dimostrato di avere un potenziale replicativo maggiore rispetto alla linea di controllo A375 SCR. Questo dato è stato confermato attraverso due metodiche differenti: i) un saggio di proliferazione CCK8 (Figura 35) a 72 ore, in condizioni basali ovvero ponendo le cellule con un terreno completo, e ii) un saggio di formazione di colonie a 12 giorni (Figura 36 A-B).

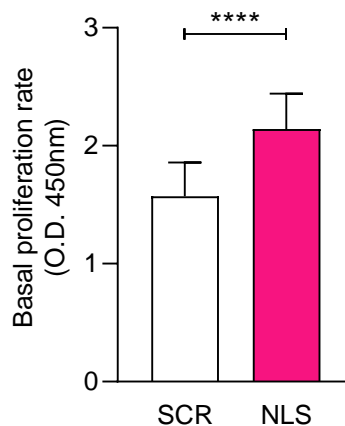


Figura 35 Analisi della proliferazione cellulare delle linee A375 NLS_NAMPT e SCR

Negli istogrammi sono rappresentati i dati cumulativi delle assorbanze (O.D.) registrate con il saggio CCK-8 dopo 72 ore (4 esperimenti indipendenti in triplicato sperimentale). Negli istogrammi è riportata la media \pm la deviazione standard della proliferazione delle due linee A375 NLS_NAMPT e SCR. Mann-Whitney t-test. *P-value \leq 0,05; **P-value \leq 0,01; ***P-value \leq 0,001; ****P-value \leq 0,0001.

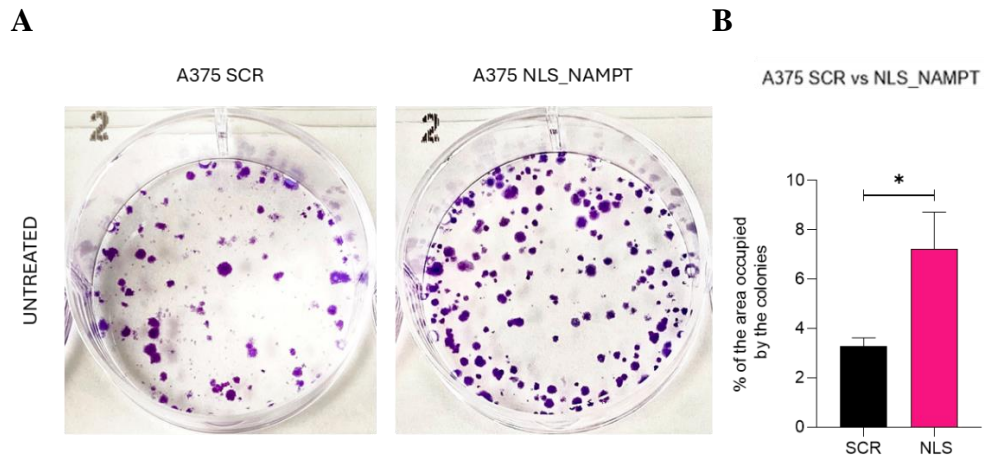


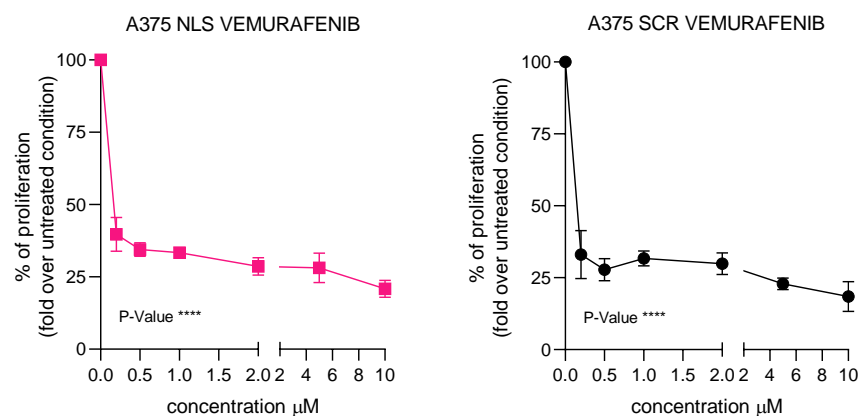
Figura 36 Analisi della formazione di colonie CFU nelle linee A375 NLS_NAMPT e SCR.

A) L'immagine rappresentativa del saggio CFU, realizzato con le linee cellulari A375 SCR ed NLS_NAMPT, mostra una ridotta formazione di colonie nella linea SCR rispetto alla linea NLS_NAMPT in condizioni basali. La tempistica del saggio è stata di 72h. **B)** Anche l'analisi cumulativa, riportante la % di area occupata dalle colonie, conferma che la % di area occupata dalle colonie nella linea A375 SCR è inferiore rispetto a quella della linea NLS NAMPT. La percentuale dell'area è stata calcolata utilizzando una roi uguale per tutte le linee (ImageJ software). Il test statistico applicato è un t-test unpaired. *P-value \leq 0,05; **P-value \leq 0,01; ***P-value \leq 0,001; ****P-value \leq 0,0001.

4.8 LA LINEA A375 NLS_NAMPT ACQUISISCE UNA RESISTENZA INTRINSECA AGLI INIBITORI DI BRAF E MEK

I BRAF e MEK inibitori sono la terapia di prima linea nel MM definita terapia al bersaglio (Brummer et al., 2019; Long et al., 2019; Michielin et al., 2020). La loro attività blocca l'attivazione oncogenica della via delle MAP chinasi inducendo un blocco della crescita tumorale. Come atteso, anche sulle nostre linee A375 NLS_NAMPT e SCR questi farmaci inducono un significativo blocco della crescita dose dipendente (Figura 34 A-C linea NLS_NAMPT e SCR) valutato con il saggio CCK-8 dopo 72 ore in terreno completo senza o con i farmaci alle dosi indicate (0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 μM) dati singolarmente o in combinazione. Come emerge dai grafici cumulativi nelle due linee, il Vemurafenib, un BRAF inibitore, è potente anche usato singolarmente a basse concentrazioni (0.2 μM e 0.5 μM) (Figura 37 A). UO126, un MEK inibitore, da solo induce un blocco della crescita, come noto, solo a concentrazioni più elevate (1 μM e 2 μM) (Figura 37 B). In combinazione l'attività è sinergica con un significativo blocco molto evidente già alla dose minore (0,2 μM di Vemurafenib e UO126, Figura 37 C); infatti, i pazienti con MM attualmente vengono trattati con la combinazione degli inibitori (Michielin et al.,2020).

A



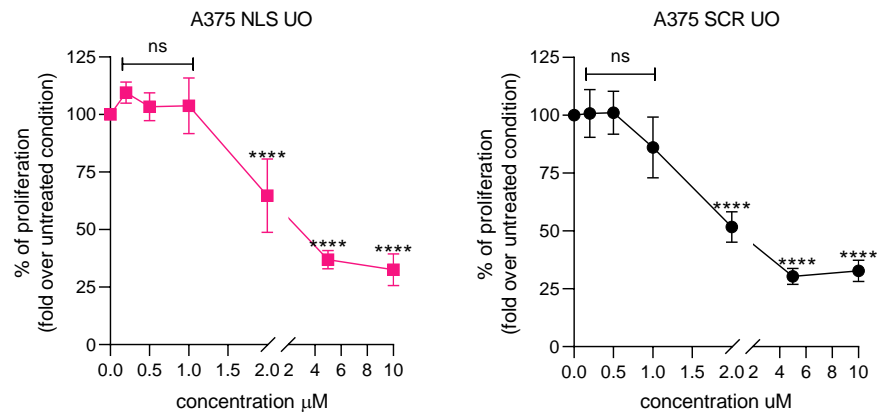
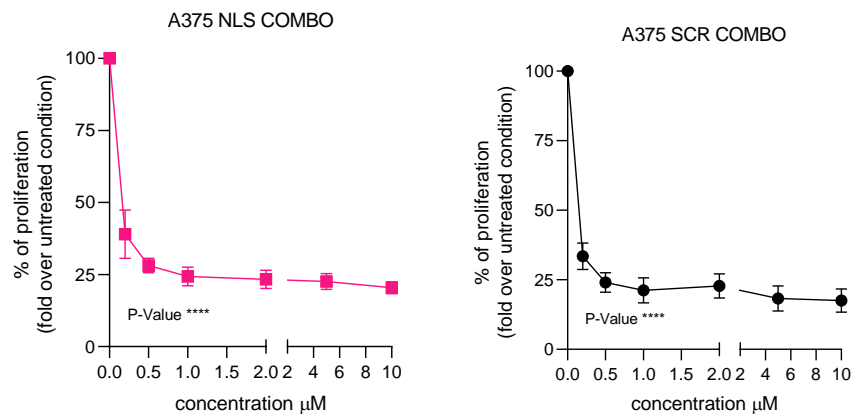
B**C**

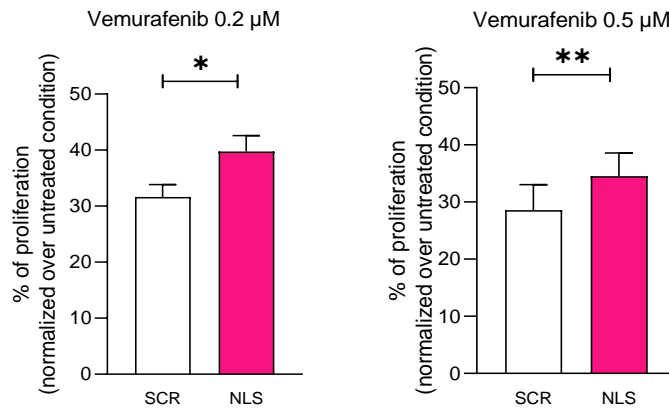
Figura 37 Analisi della proliferazione delle linee A375 SCR e NLS_NAMPT in seguito a trattamento con BRAF e/o MEK inibitori

Grafici rappresentanti la proliferazione cellulare dopo 72 ore, ottenuta mediante saggio CCK8, delle linee A375 SCR e NLS espressa in percentuale rispetto alla condizione non trattata (UN), a seguito di trattamento a differenti dosi di BRAFi e MEKi. **A)** Grafici rappresentanti le linee trattate con Vemurafenib a differenti dosi (0.2 μM -0.5 μM -1 μM -2 μM -5 μM -10 μM) dopo 72 ore di trattamento. **B)** Grafici rappresentanti le linee trattate con UO-126 a differenti dosi (0.2 μM -0.5 μM -1 μM -2 μM -5 μM -10 μM) dopo 72 ore di trattamento. **C)** Grafici rappresentanti le linee trattate con la combinazione di Vemurafenib e UO-126 equimolari a differenti dosi (0.2 μM -0.5 μM -1 μM -2 μM -5 μM -10 μM) dopo 72 ore di trattamento. L'analisi statistica utilizzata è un ANOVA test con comparazioni multiple rispetto alla condizione UN. *P-value \leq 0,05; **P-value \leq 0,01; ***P-value \leq 0,001; ****P-value \leq 0,0001.

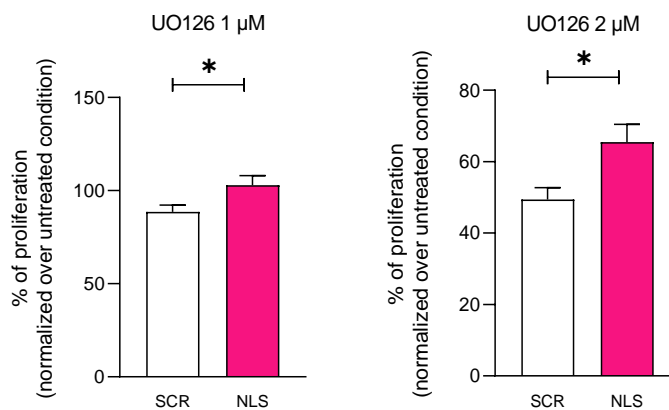
+

Tuttavia, sorprendentemente, avvalorando la nostra ipotesi, l'aumento selettivo di NAMPT nel nucleo (nella linea A375 NLS_NAMPT) induce un'acquisizione di resistenza ai farmaci. Confrontando le due linee A375 NLS_NAMPT e A375 SCR la linea A375 NLS_NAMPT nei saggi di proliferazione CCK-8 a 72 ore sembra aver acquisito una maggior resistenza intrinseca ai BRAF e MEK inibitori, come riportato in Figura 35. La differenza di vitalità cellulare è significativa trattando le cellule alle dosi più basse di Vemurafenib 0.2 μ M e 0.5 μ M (Figura 38 A); UO126 alle concentrazioni 1 μ M e 2 μ M (Figura 38 B) e rimane una differenza significativa anche combinando i farmaci alle concentrazioni di 0.2 μ M e 0.5 μ M (Figura 38 C).

A



B



C

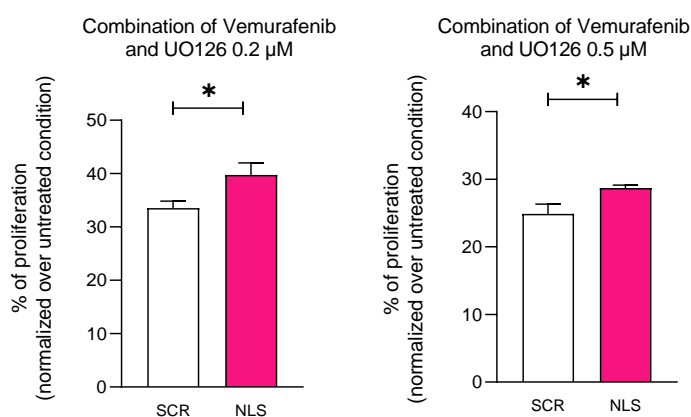


Figura 38 Grafici mostrandoti la proliferazione ottenuta mediante CCK8, delle linee cellulari A375 SCR e NLS alle dosi più efficaci

Istogrammi rappresentanti la proliferazione cellulare dopo 72 ore, ottenuta mediante saggio CCK8, delle linee A375 SCR e NLS espressa in percentuale, a seguito di trattamento alle dosi più efficaci di BRAFi e MEKi. **A)** Grafici rappresentanti le linee trattate con Vemurafenib alle dosi che si son rivelate più efficaci (0.2 μM e 0.5 μM) dopo 72 ore di trattamento. **B)** Grafici rappresentanti le linee trattate con UO-126 alle dosi che si son rivelate più efficaci (1 μM e 2 μM) dopo 72 ore di trattamento. **C)** Grafici rappresentanti le linee trattate con la combinazione di Vemurafenib e UO-126 equimolari alle dosi che si son rivelate più efficaci (0.2 μM e 0.5 μM) dopo 72 ore di trattamento. Il test statistico applicato è un t-test unpaired. *P-value≤0,05; **P-value≤0,01; ***P-value≤0,001; ****P-value≤0,0001.

L'aumento della resistenza intrinseca alla target therapy della linea NLS_NAMPT rispetto alla linea di controllo è stata valutata anche tramite il saggio dei CFU a 12 giorni. Sono stati effettuati solo due replicati per linea che non permettono una analisi statistica significativa, ma dall'analisi visiva di tali esperimenti preliminari sembrerebbe confermarsi il risultato ottenuto dal saggio di proliferazione a 72 ore (CCK8), ovvero un aumento della resistenza intrinseca ai BRAF e MEK inibitori della linea NLS_NAMPT rispetto alla linea SCR. In Figura 39 sono riportate le immagini rappresentative dei CFU nelle varie condizioni nelle due linee.

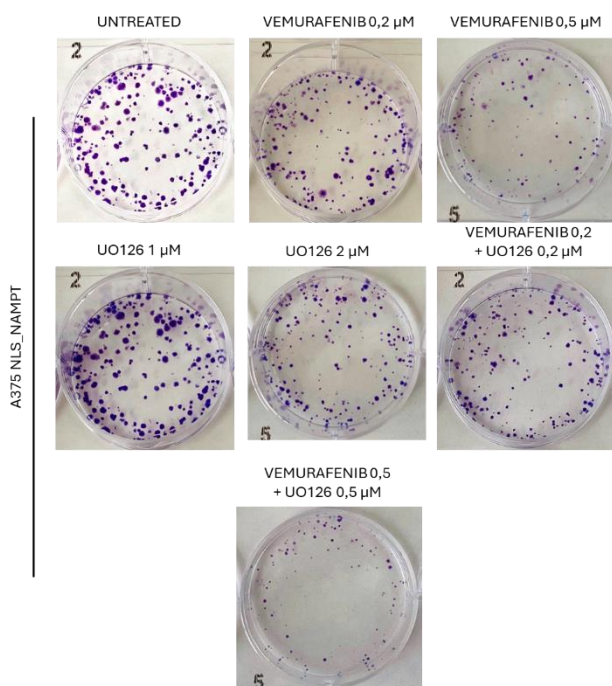
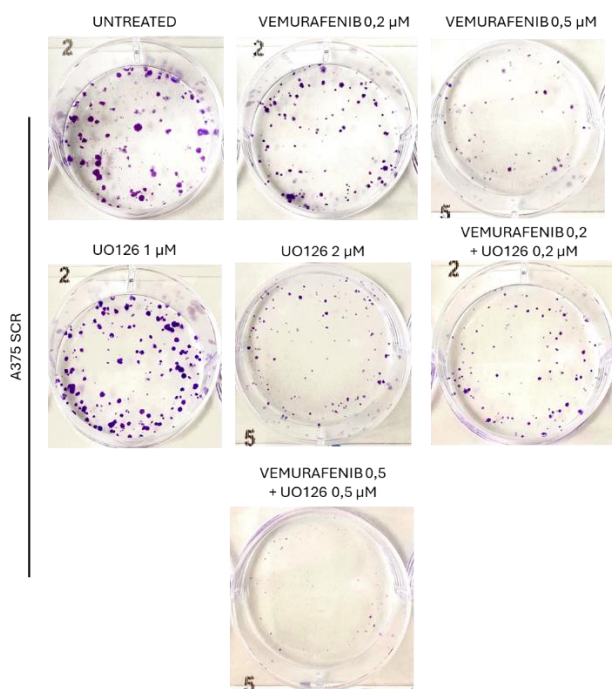
A**B**

Figura 39 Immagini dei CFU delle linee A375 NLS_NAMPT e SCR

Dalle immagini rappresentative i CFU della linea NLS_NAMPT (A) e la linea SCR (B) è visibile l'aumento del numero di colonie, a parità di condizione, della linea NLS_NAMPT rispetto alla linea SCR. Il saggio ha una durata di 12 giorni, terminati i quali le colonie vengono fissate in metanolo e colorate con il Crystal Violet. Per entrambe le linee sono stati seminati tre pozzetti a condizione ciascuno con 500 cellule/pozzetto. Le condizioni dei CFU sono: Untreated, Vemurafenib 0.2 μM-0.5 μM; UO126 1 μM-2 μM-5 μM-10 μM e la combinazione dei due farmaci alle concentrazioni 0.2 μM-0.5 μM.

5. DISCUSSIONE

Il cofattore nicotinamide dinucleotide (NAD) è essenziale in numerose reazioni redox e non redox del metabolismo energetico cellulare e per diversi enzimi NAD-dipendenti, come le sirtuine e le PARPs, coinvolte nella regolazione dell'espressione genica e nel riparo del DNA, rispettivamente. L'omeostasi del NAD è quindi fondamentale nel regolare molteplici processi chiave nella vita della cellula quali la trascrizione, la divisione cellulare e la morte cellulare programmata (Chiarugi et al., 2012).

I livelli di NAD aumentano nelle cellule tumorali per supportare la loro proliferazione incontrollata e il processo di riprogrammazione metabolica, caratteristica principale dei tumori (Chiarugi et al., 2012; Hannah et al., 2022). Il NAD nei tumori viene principalmente sintetizzato a partire dalla nicotinamide, più abbondante precursore, attraverso l'attività dell'enzima limitante la via di riciclo NAMPT (Audrito et al., 2018; Garten et al., 2015). NAMPT spesso è overespresso nei tumori, sia come enzima intracellulare che come fattore solubile nel microambiente, garantendo un'elevata produzione di NAD e supportando numerosi processi legati a una maggiore aggressività tumorale e alla modulazione dell'interazione tra tumore e ospite (Gasparrini & Audrito, 2022; Semerena et al., 2023). Recentemente, in diversi modelli tumorali NAMPT è stato dimostrato essere "driver" nell'acquisizione della resistenza ai farmaci come nel modello malattia in studio in questo elaborato: il melanoma metastatico (Audrito et al., 2018, 2022; Ohanna et al., 2018).

NAMPT è un enzima espresso in praticamente tutti i tessuti e cellule, prettamente con una localizzazione citosolica, ma può anche essere secreto nello spazio extracellulare, dove, i suoi livelli correlano con una maggiore aggressività e progressione tumorale. Inoltre, pochi lavori pubblicati recentemente hanno evidenziato che NAMPT può anche traslocare nel nucleo in particolari condizioni di stress (Bułdak et al., 2014; Christie et al., 2016; Kitani et al., 2003; Kosugi et al., 2009; Romacho et al., 2013; Svoboda et al., 2019). Dagli studi di Svoboda e colleghi emerge che la localizzazione di NAMPT nucleare dipenda dalle fasi del ciclo: NAMPT viene esportato dal nucleo immediatamente dopo la mitosi per poi ritornare nel nucleo durante la progressione del ciclo. Inoltre, NAMPT è abbondante nel nucleo durante la fase S suggerendo un suo coinvolgimento nella replicazione del DNA (Svoboda et al., 2019). L'aumento di NAMPT nel nucleo è anche legato a fattori di stress che causano danni al DNA, come l'esposizione alle radiazioni UV o all' H_2O_2 , che attivano le PARPs, una famiglia di proteine nucleari che svolgono la loro funzione di riparo del DNA, consumando NAD

(Svoboda et al., 2019). Nel 2020 Grolla e colleghi hanno dimostrato che in seguito a stress cellulare, per esempio trattamento con chemioterapici, NAMPT, associandosi fisicamente a GAPDH trasloca nel nucleo (Ambra Grolla et al., 2020). Il complesso è composto da un dimero di NAMPT e un monomero di GAPDH (Ambra Grolla et al., 2020).

La sequenza di localizzazione nucleare (NLS) del NAMPT identificata da Svoboda e colleghi (Svoboda et al., 2019) è ⁴²³KRSKKGR⁴²⁹ e si adatta a una NLS di classe 2 (Kosugi et al., 2009), suggerendo che NAMPT possa essere trasportato nel nucleo mediante un meccanismo che utilizza le importine α e β e la piccola GTPasi Ran (Christie et al., 2016). Tuttavia, come il NAMPT traslochi nel nucleo, in seguito a quali differenti stress cellulari, e quale sia la sua funzione nucleare è ancora poco nota e oggetto di studio. Proprio per questa ragione un filone del progetto di ricerca del laboratorio in cui ho fatto la tesi è dedicato a rispondere a queste domande.

NAMPT è coinvolto nell'acquisizione della resistenza ai BRAF/MEK inibitori, come precedentemente pubblicato (Audrito et al., 2018, 2022; Ohanna et al., 2018).

Dai risultati ottenuti in questa tesi è emerso come NAMPT, overespresso nelle linee cellulari resistenti alla terapia e nei pazienti di MM, si ritrovi maggiormente a livello nucleare quando le cellule acquisiscono la resistenza ai farmaci. Questo dato è stato dimostrato dalle analisi biochimiche attraverso i frazionamenti nucleo/citosol e dai dati emersi analizzando le immagini di microscopia confocale confrontando le linee di MM resistenti e sensibili ai BRAF inibitori. Inoltre, questo aumento nucleare di NAMPT non è limitato ai modelli cellulari utilizzati e generati in laboratorio, ma lo si apprezza anche nelle cellule dei pazienti come emerge dai dati di espressione di NAMPT in immunohistochimica sui TMA. I pazienti con mutazione in BRAF, che attivano la via oncogenica del pathway delle MAPK acquisendo poi resistenza alle terapie, hanno una % di NAMPT nucleare maggiore rispetto ai pazienti BRAF wt. Queste evidenze suggeriscono un coinvolgimento del NAMPT nucleare nell'acquisizione della resistenza, anche se il ruolo funzionale è ancora da definire. La generazione di una linea di melanoma A375 NLS_NAMPT in cui è stato forzato l'ingresso di NAMPT nel nucleo ci ha permesso di iniziare a studiare il ruolo di NAMPT nucleare. I dati dimostrano che una maggiore quantità di NAMPT nel nucleo accelera la proliferazione di queste cellule e le rende maggiormente resistenti ai BRAF e MEK inibitori, come evidenziato dai saggi di proliferazione (CCK8, 72h; CFU, 12 giorni). Questi dati ovviamente dovranno essere ulteriormente confermati, anche in una seconda linea, ma

incoraggiano a ipotizzare a una specifica funzione di NAMPT nel nucleo. Inoltre, riguardo al meccanismo molecolare di ingresso/uscita di NAMPT dal nucleo, attualmente sconosciuto, i nostri dati evidenziano una buona espressione nelle linee di melanoma di esportina e importina che potrebbero mediare la traslocazione di NAMPT dentro e fuori dal nucleo. Da una analisi proteomica mediante spettrometria di massa sull'interattoma di NAMPT esportina 1 (XPO1) e importina β (KPNB1) sono emerse come potenziali interattori, con una maggiore significatività e arricchimento nella linea resistente. Successive analisi di co-immunoprecipitazione, e trattamento con specifici inibitori di queste proteine, dovranno confermare questo dato preliminare, e definire il meccanismo attraverso il quale NAMPT riesce ad entrare e uscire dal nucleo e in seguito a quali stress cellulari.

Riassumendo, i risultati ottenuti attraverso questo lavoro di tesi, suggeriscono che il trasporto di NAMPT tra citosol e nucleo sia un processo regolato. L'ipotesi più accreditata sul ruolo funzionale della traslocazione nucleare di NAMPT è legata alla sua capacità di sintetizzare il NAD a livello nucleare e poter quindi supportare l'attività di enzimi NAD-dipendenti che lavorano nel nucleo come PARPs e sirtuine. Tuttavia, in una visione più ampia l'asse NAMPT/NAD potrebbe avere un ruolo nel modulare l'acetiloma e, da provare sperimentalmente, nel modulare direttamente l'accessibilità alla cromatina attivando/reprimendo l'espressione genica, come avviene per altri enzimi/metaboliti (Lin & Hoelz, 2019). Queste funzioni potrebbero essere non solo limitate al melanoma ma diventare delle nuove funzioni di NAMPT anche in altri modelli patologici.

In ultimo, strettamente legato al modello melanoma e ai pazienti resistenti ai BRAF/MEK inibitori, l'aumento dei livelli di NAMPT nel nucleo correla con una maggiore resistenza alla terapia al bersaglio e capacità proliferativa cellulare, suggerendo che la traslocazione di NAMPT nel nucleo possa andare a modulare processi legati alla resistenza. Anche questo sarà oggetto di futuri studi.

In un'ottica di inibire NAMPT, come strategia per la cura dei tumori, numerosi studi hanno dimostrato ottimi risultati nella riduzione della crescita tumorale utilizzando NAMPT inibitori (Gibson et al., 2020; Indini et al., 2022; Schuster et al., 2015), tuttavia la scoperta di una nuova funzione e localizzazione di NAMPT nel nucleo apre e ad un "targeting" di NAMPT mirato a quell'organello per interferire con il ruolo dell'enzima a livello nucleare, riducendo i livelli di NAD e deregolando funzioni nucleari NAD-dipendenti, risparmiando quindi, i processi metabolici nel citosol e nei

mitocondri e diminuendo la tossicità causata dall'inibizione dell'attività enzimatica di NAMPT. Viceversa, in altri contesti, verrà magari definita una strategia per promuoverne la localizzazione nucleare di NAMPT e supportare la generazione di NAD.

6. CONCLUSIONI

L'enzima NAMPT, limitante nella sintesi del NAD, è overespresso in numerosi modelli tumorali, tra cui il melanoma metastatico. Dati ottenuti nel Laboratorio di Biochimica dei Tumori della professoressa Valentina Audrito, laboratorio dove ho svolto il mio periodo di tirocinio, hanno dimostrato come NAMPT sia presente con livelli aumentati nelle linee A375 e M14 BRAF mutate nella forma resistente (BiR) rispetto alla forma sensibile (S), diventando un “driver” nell’acquisizione della resistenza alla terapia al bersaglio. Una maggiore espressione e attività di NAMPT cellulare garantisce alti livelli di NAD, un cofattore essenziale per numerose reazioni redox, e per molti enzimi NAD dipendenti come le sirtuine e le PARPs, rispettivamente coinvolte nella regolazione epigenetica e nel riparo del danno al DNA. Nonostante NAMPT sia un enzima prettamente citosolico può traslocare nel nucleo in particolari condizioni di stress che causano danni al DNA, come l’esposizione alle radiazioni UV o all’H₂O₂. Tuttavia, ad oggi, il ruolo, la funzione e il meccanismo di traslocazione nucleare di NAMPT sono poco studiati.

Questo lavoro di tesi ha avuto come obiettivo lo studio della localizzazione nucleare di NAMPT nel MM e un inizio di studio sulla sua funzione e trafficking citosol/nucleo. Dai risultati ottenuti in questa tesi è emerso come NAMPT, overespresso nelle linee cellulari resistenti alla terapia e nei pazienti di MM, si ritrovi maggiormente a livello nucleare quando le cellule acquisiscono la resistenza ai farmaci. L’aumento di NAMPT nel nucleo è stato dimostrato non solo attraverso frazionamento biochimico nucleo/citosol e microscopia confocale nelle linee in laboratorio ma anche nei pazienti dall’analisi in immunistochemica. Grazie alla generazione di una linea NLS_NAMPT in cui è stato forzato l’ingresso di NAMPT nel nucleo, si è dimostrato che l’aumento di NAMPT nucleare porta a un vantaggio di crescita e un aumento di resistenza ai BRAF/MEK inibitori.

In conclusione, i risultati ottenuti attraverso questo lavoro di tesi, suggeriscono che il trasporto di NAMPT tra citosol e nucleo è un processo regolato. L’ipotesi più accreditata sul ruolo funzionale della traslocazione nucleare di NAMPT è legata alla sua capacità di sintetizzare il NAD, che a livello nucleare sarà disponibile per supportare l’attività di enzimi NAD-dipendenti che lavorano nel nucleo come PARPs e sirtuine. Diversi altri studi dovranno essere effettuati per comprendere a fondo la funzione di NAMPT nel nucleo; tuttavia, potremmo ipotizzare in futuro ad una mirata inibizione di NAMPT nel nucleo, piuttosto che in tutta la cellula, per contrastare

processi NAD-dipendenti nucleari evitando una tossicità cellulare derivante dalla deplezione di NAD nel citosol e nel mitocondrio.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adya, R., Tan, B. K., Chen, J., & Randeve, H. S. (2008). Nuclear Factor- κ B Induction by Visfatin in Human Vascular Endothelial Cells Its role in MMP-2/9 production and activation. *Diabetes Care*, 31(4), 758–760. <https://doi.org/10.2337/DC07-1544>
- Aitchison, J. D., & Wozniak, R. W. (2007). Pore puzzle. *Nature* 2007 450:7170, 450(7170), 621–622. <https://doi.org/10.1038/450621a>
- Ascierto, P. A., Kirkwood, J. M., Grob, J.-J., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F. M., & Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. <http://www.translational-medicine.com/content/10/1/85>
- Audrito, V., Managò, A., Gaudino, F., & Deaglio, S. (2020). Targeting metabolic reprogramming in metastatic melanoma: The key role of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 98, pp. 192–201). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.001>
- Audrito, V., Managò, A., Gaudino, F., Sorci, L., Messina, V. G., Raffaelli, N., & Deaglio, S. (2019). NAD-Biosynthetic and Consuming Enzymes as Central Players of Metabolic Regulation of Innate and Adaptive Immune Responses in Cancer. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01720>
- Audrito, V., Managò, A., La Vecchia, S., Zamporlini, F., Vitale, N., Baroni, G., Cignetto, S., Serra, S., Bologna, C., Stingi, A., Arruga, F., Vaisitti, T., Massi, D., Mandalà, M., Raffaelli, N., & Deaglio, S. (2018). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a Therapeutic Target in BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 110(3), 290–303. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJX198>
- Audrito, V., Messina, V. G., & Deaglio, S. (2020). NAMPT and NAPRT: Two Metabolic Enzymes With Key Roles in Inflammation. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00358>
- Audrito, V., Messina, V. G., Moiso, E., Vitale, N., Arruga, F., Brandimarte, L., Gaudino, F., Pellegrino, E., Vaisitti, T., Riganti, C., Piva, R., & Deaglio, S. (2020). NAMPT Over-Expression Recapitulates the BRAF Inhibitor Resistant Phenotype Plasticity in Melanoma. *Cancers*, 12(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12123855>
- Audrito, V., Moiso, E., Ugolini, F., Messina, V. G., Brandimarte, L., Manfredonia, I., Bianchi, S., De Logu, F., Nassini, R., Szumera-Ciećkiewicz, A., Taverna, D., Massi, D., & Deaglio, S. (2022). Tumors carrying BRAF-mutations over-express NAMPT that is genetically amplified and possesses oncogenic properties. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 118. <https://doi.org/10.1186/S12967-022-03315-9>
- Avagliano, A., Fiume, G., Pelagalli, A., Sanità, G., Ruocco, M. R., Montagnani, S., & Arcucci, A. (2020). Metabolic Plasticity of Melanoma Cells and Their Crosstalk With Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.00722>
- Azizian, N. G., Azizian, N. G., Li, Y., & Li, Y. (2020). XPO1-dependent nuclear export as a target for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00903-4>
- Beck, M., & Hurt, E. (2016). The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016 18:2, 18(2), 73–89. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.147>
- Becskei, A., & Mattaj, I. W. (2003). The strategy for coupling the RanGTP gradient to nuclear protein export. *CELL BIOLOGY*. PNAS February, 18(4), 1717–1722. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.252766999

- Bento-Lopes, L., Cabaço, L. C., Charneca, J., Neto, M. V., Seabra, M. C., & Barral, D. C. (2023). Melanin's Journey from Melanocytes to Keratinocytes: Uncovering the Molecular Mechanisms of Melanin Transfer and Processing. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14). <https://doi.org/10.3390/IJMS241411289>
- Bogan, K. L., & Brenner, C. (2008). Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: A molecular evaluation of NAD⁺ precursor vitamins in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 28(Volume 28, 2008), 115–130. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NUTR.28.061807.155443/CITE/REFWORKS>
- Borst, P. (2020). The malate-aspartate shuttle (Borst cycle): How it started and developed into a major metabolic pathway. <https://doi.org/10.1002/iub.2367>
- Bowyer, S., Lee, R., Fusi, A., & Lorigan, P. (2015). Melanoma Management part of DRUG EVALUATION Dabrafenib and its use in the treatment of metastatic melanoma. 2(3), 199–208. <https://doi.org/10.2217/MMT.15.21>
- Brummer, C., Faerber, S., Bruss, C., Blank, C., Lacroix, R., Haferkamp, S., Herr, W., Kreutz, M., & Renner, K. (2019). Metabolic targeting synergizes with MAPK inhibition and delays drug resistance in melanoma. *Cancer Letters*, 442, 453–463. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2018.11.018>
- Buładak, R. J., Skonieczna, M., Buładak, Matysiak, N., Mielańczyk, Wyrobiec, G., Kukła, M., Michalski, M., & Żwirska-Korczała, K. (2014). Changes in Subcellular Localization of Visfatin in Human Colorectal HCT-116 Carcinoma cell Line After Cytochalasin-B Treatment. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 58(3), 239–246. <https://doi.org/10.4081/EJH.2014.2408>
- Buonvicino, D., Ranieri, G., Pittelli, M., Lapucci, A., Braghiola, S., & Chiarugi, A. (2021). SIRT1-dependent restoration of NAD⁺ homeostasis after increased extracellular NAD⁺ exposure. *The Journal of Biological Chemistry*, 297(1), 100855–100856. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100855>
- Cantó, C., Menzies, K. J., & Auwerx, J. (2015). NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis - a balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metabolism*, 22(1), 31. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2015.05.023>
- Castellani, G., Buccarelli, M., Arasi, M. B., Rossi, S., Pisanu, M. E., Bellenghi, M., Lintas, C., & Tabolacci, C. (2023). BRAF Mutations in Melanoma: Biological Aspects, Therapeutic Implications, and Circulating Biomarkers. <https://doi.org/10.3390/cancers15164026>
- Casula, M., Colombino, M., Satta, M. P., Cossu, A., Ascierio, P. A., Bianchi-Scarrà, G., Castiglia, D., Budroni, M., Rozzo, C., Manca, A., Lissia, A., Carboni, A., Petretto, E., Satriano, S. M. R., Botti, G., Mantelli, M., Ghiorzo, P., Stratton, M. R., Tanda, F., & Palmieri, G. (2016). BRAF Gene Is Somatic Mutated but Does Not Make a Major Contribution to Malignant Melanoma Susceptibility: The Italian Melanoma Intergroup Study. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 22(2), 286–292. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.07.112>
- Chamberlain, A. J., Fritschi, L., & Kelly, J. W. (2003). Nodular melanoma: Patients' perceptions of presenting features and implications for earlier detection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(5), 694–701. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.216>
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierio, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S. J., Sosman, J. A., Kirkwood, J. M., ... Group, B.-3 S. (2011). Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *The New England Journal of Medicine*, 364(26), 2507. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1103782>

- Chhabra, N., & Kennedy, J. (2021). A Review of Cancer Immunotherapy Toxicity: Immune Checkpoint Inhibitors. *Journal of Medical Toxicology*, 17(4), 411. <https://doi.org/10.1007/S13181-021-00833-8>
- Chiang, Y.-F. ;, Huang, K.-C. ;, Chen, H.-Y. ;, Huang, T.-C. ;, Ali, M. ;, Chang, H.-Y. ;, Shieh, T.-M. ;, Shih, Y.-H. ;, Wang, K.-L. ;, Huang, Y.-J. ;, Chiang, Y.-F., Huang, K.-C., Chen, H.-Y., Huang, T.-C., Ali, M., Chang, H.-Y., Shieh, T.-M., Shih, Y.-H., Wang, K.-L., ... Hsia, S.-M. (2023). Citation: The Adipokine Visfatin Modulates Cancer Stem Cell Properties in Triple-Negative Breast Cancer. *The Adipokine Visfatin Modulates Cancer Stem Cell Properties in Triple-Negative Breast Cancer*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020297>
- Chiarugi, A., Dölle, C., Felici, R., & Ziegler, M. (2012). The NAD metabolome — a key determinant of cancer cell biology. *Nature Reviews Cancer* 2012 12:11, 12(11), 741–752. <https://doi.org/10.1038/nrc3340>
- Christie, M., Chang, C. W., Róna, G., Smith, K. M., Stewart, A. G., Takeda, A. A. S., Fontes, M. R. M., Stewart, M., Vértessy, B. G., Forwood, J. K., & Kobe, B. (2016). Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *Journal of Molecular Biology*, 428(10), 2060–2090. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2015.10.023>
- Czarnecka, A. M., Synoradzki, K., Firlej, W., Bartnik, E., Sobczuk, P., Fiedorowicz, M., Grieb, P., & Rutkowski, P. (2020). Molecular Biology of Osteosarcoma. *Cancers*, 12(8), 1–27. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12082130>
- Dalamaga, M., Christodoulatos, G. S., & Mantzoros, C. S. (2018). The role of extracellular and intracellular Nicotinamide phosphoribosyl-transferase in cancer: Diagnostic and therapeutic perspectives and challenges. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 82, 72–87. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2018.01.001>
- Damsky, W. E., & Bosenberg, M. (2017). Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene*, 36(42), 5771. <https://doi.org/10.1038/ONC.2017.189>
- Davis, L. E., Shalin, S. C., & Tackett, A. J. (2019). Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*, 20. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>
- De Sousa Linhares, A., Battin, C., Jutz, S., Leitner, J., Hafner, C., Tobias, J., Wiedermann, U., Kundi, M., Zlabinger, G. J., Grabmeier-Pfistershammer, K., & Steinberger, P. (2019). Therapeutic PD-L1 antibodies are more effective than PD-1 antibodies in blocking PD-1/PD-L1 signaling. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-47910-1>
- Demarse, N. A., Ponnusamy, S., Spicer, E. K., Apohan, E., Baatz, J. E., Ogretmen, B., & Davies, C. (2009). DIRECT BINDING OF GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE TO TELOMERIC DNA PROTECTS TELOMERES AGAINST CHEMOTHERAPY-INDUCED RAPID DEGRADATION NIH Public Access. *J Mol Biol*, 394(4), 789–803. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.062>
- Di Stefano, M., & Conforti, L. (2013). Diversification of NAD biological role: the importance of location. *The FEBS Journal*, 280(19), 4711–4728. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12433>
- Domingues, B., Lopes, J. M., Soares, P., & Pópulo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and Therapy*, 7, 35. <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>
- Eddy, K., & Chen, S. (2020). Overcoming Immune Evasion in Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–48. <https://doi.org/10.3390/IJMS21238984>
- Fernandes, C. A., Fievez, L., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., Bureau, F., & Vanbever, R. (2012). Sirtuin inhibition attenuates the production of inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(4), 857–861. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2012.03.088>

- Friedman, R. J., Rigel, D. S., & Kopf, A. W. (1985). Early detection of malignant melanoma: The role of physician examination and self-examination of the skin. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 35(3), 130–151. <https://doi.org/10.3322/CANJCLIN.35.3.130>
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., & Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 1997 390:6657, 390(6657), 308–311. <https://doi.org/10.1038/36894>
- Galli, U., Colombo, G., Travelli, C., Tron, G. C., Genazzani, A. A., & Grolla, A. A. (2020). Recent Advances in NAMPT Inhibitors: A Novel Immunotherapeutic Strategy. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00656>
- Garten, A., Schuster, S., Penke, M., Gorski, T., De Giorgis, T., & Kiess, W. (2015). Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nature Reviews Endocrinology* 2015 11:9, 11(9), 535–546. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.117>
- Gasparrini, M., & Audrito, V. (2022). NAMPT: A critical driver and therapeutic target for cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 145, 106189. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2022.106189>
- Ghanem, M. S., Monacelli, F., & Nencioni, A. (2021). Advances in NAD-Lowering Agents for Cancer Treatment. *Nutrients*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/NU13051665>
- Gibson, A. E., Yeung, C., Issaq, S. H., Collins, V. J., Gouzoulis, M., Zhang, Y., Ji, J., Mendoza, A., & Heske, C. M. (2020). Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) with OT-82 induces DNA damage, cell death, and suppression of tumor growth in preclinical models of Ewing sarcoma. *Oncogenesis*, 9(9). <https://doi.org/10.1038/S41389-020-00264-0>
- Goel, V. K., Lazar, A. J. F., Warneke, C. L., Redston, M. S., & Haluska, F. G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), 154–160. <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700026/ASSET/74AE9D62-6222-4B56-891E-0F01722B230E/MAIN.ASSETS/GR1.JPG>
- Grafanaki, K., Grammatikakis, I., Ghosh, A., Gopalan, V., Olgun, G., Liu, H., Kyriakopoulos, G. C., Skeparnias, I., Georgiou, S., Stathopoulos, C., Hannenhalli, S., Merlino, G., Marie, K. L., & Day, C. P. (2023). Noncoding RNA circuitry in melanoma onset, plasticity, and therapeutic response. *Pharmacology & Therapeutics*, 248, 108466. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2023.108466>
- Grolla, A. A., Travelli, C., Genazzani, A. A., & Sethi, J. K. (2016). Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine. *British Journal of Pharmacology*, 173(14), 2182. <https://doi.org/10.1111/BPH.13505>
- Grolla, A. A., Miggiano, R., Di Marino, D., Bianchi, M., Gori, A., Giuseppe Orsomando, Gaudino, F., Galli, U., Erika Del Grosso, Mazzola, F., Angeletti, C., Guarneri, M., Torretta, S., Calabrò, M., Boumya, S., Fan, Colombo, G., Travelli, C., Rocchio, F., ... Silvia Garavaglia, (2020). A nicotinamide phosphoribosyltransferase-GAPDH interaction sustains the stress-induced NMN/NAD salvage pathway in the nucleus. *JBC*. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010571>
- Gutzmer, R., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Robert, C., Lewis, K., Protsenko, S., Pereira, R. P., Eigentler, T., Rutkowski, P., Demidov, L., Manikhas, G. M., Yan, Y., Huang, K. C., Uyei, A., McNally, V., McArthur, G. A., & Ascierto, P. A. (2020). Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAFV600 mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 395(10240), 1835–1844. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30934-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30934-X)

- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hasmann, M., & Schemainda, I. (2003). FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res.*, 63(21), 7436–7442.
- Heistein, J. B., Acharya, U., & Mukkamalla, S. K. R. (2024). Malignant Melanoma. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470409/>
- Houtkooper, R. H., Cantó, C., Wanders, R. J., & Auwerx, J. (2010). The Secret Life of NAD⁺: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways. *Endocrine Reviews*, 31(2), 194. <https://doi.org/10.1210/ER.2009-0026>
- Indini, A., Fiorilla, I., Ponzzone, L., Calautti, E., & Audrito, V. (2022). NAD/NAMPT and mTOR Pathways in Melanoma: Drivers of Drug Resistance and Prospective Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17). <https://doi.org/10.3390/IJMS23179985>
- Kelly, J. W. (2005). Nodular melanoma: how current approaches to early detection are failing. *J Drugs Dermatol*, 4(6), 790–793.
- Khajah, M. A., Khushaish, S., & Luqmani, Y. A. (2021). Lactate Dehydrogenase A or B Knockdown Reduces Lactate Production and Inhibits Breast Cancer Cell Motility in vitro. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.747001>
- Kitani, T., Okuno, S., & Fujisawa, H. (2003). Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor 1. *FEBS Letters*, 544(1–3), 74–78. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00476-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00476-9)
- Korotchkina, L., Kazyulkin, D., Komarov, P. G., Polinsky, A., Andrianova, E. L., Joshi, S., Gupta, M., Vujcic, S., Kononov, E., Toshkov, I., Tian, Y., Krasnov, P., Chernov, M. V., Veith, J., Antoch, M. P., Middlemiss, S., Somers, K., Lock, R. B., Norris, M. D., ... Gudkov, A. V. (2020). OT-82, a novel anticancer drug candidate that targets the strong dependence of hematological malignancies on NAD biosynthesis. *Leukemia*, 34(7), 1828–1839. <https://doi.org/10.1038/S41375-019-0692-5>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25), 10171. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0900604106>
- Lake, D., Corrêa, S. A. L., & Müller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(23), 4397. <https://doi.org/10.1007/S00018-016-2297-8>
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2007). Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin α . *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5101. <https://doi.org/10.1074/JBC.R600026200>
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.-J., Rutkowski, P., Lao, C. D., Cowey, C. L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Hogg, D., Hill, A., Márquez-Rodas, I., Haanen, J., Guidoboni, M., Maio, M., Schöffski, P., ... Wolchok, J. D. (2019). Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 381(16), 1535–1546. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1910836>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2015.12.001>

- Lin, D. H., & Hoelz, A. (2019). The Structure of the Nuclear Pore Complex (An Update). *Annual Review of Biochemistry*, 88, 725–783. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-062917-011901>
- Long, G. V., Saw, R. P. M., Lo, S., Nieweg, O. E., Shannon, K. F., Gonzalez, M., Guminski, A., Lee, J. H., Lee, H., Ferguson, P. M., Rawson, R. V., Wilmott, J. S., Thompson, J. F., Kefford, R. F., Ch'ng, S., Stretch, J. R., Emmett, L., Kapoor, R., Rizos, H., ... Menzies, A. M. (2019). Neoadjuvant dabrafenib combined with trametinib for resectable, stage IIIB–C, BRAFV600 mutation-positive melanoma (NeoCombi): a single-arm, open-label, single-centre, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 20(7), 961–971. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30331-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30331-6)
- Lovly, C. M., Dahlman, K. B., Fohn, L. E., Su, Z., Dias-Santagata, D., Hicks, D. J., Hucks, D., Berry, E., Terry, C., Duke, M. K., Su, Y., Sobolik-Delmaire, T., Richmond, A., Kelley, M. C., Vnencak-Jones, C. L., Iafrate, A. J., Sosman, J., & Pao, W. (2012). Routine Multiplex Mutational Profiling of Melanomas Enables Enrollment in Genotype-Driven Therapeutic Trials. *PLoS ONE*, 7(4), 35309. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0035309>
- Lucena-Cacace, A., Otero-Albiol, D., Jiménez-García, M. P., Peinado-Serrano, J., & Carnero, A. (2017). NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 59). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Luongo, T. S., Eller, J. M., Lu, M. J., Niere, M., Raith, F., Perry, C., Bornstein, M. R., Oliphant, P., Wang, L., McReynolds, M. R., Migaud, M. E., Rabinowitz, J. D., Johnson, F. B., Johnsson, K., Ziegler, M., Cambronne, X. A., & Baur, J. A. (2020). SLC25A51 is a mammalian mitochondrial NAD⁺ transporter. *Nature*, 588(7836), 174. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2741-7>
- Marghoob, N. G., Liopyris, K., & Jaimes, N. (2019). Dermoscopy: A review of the structures that facilitate melanoma detection. *Journal of the American Osteopathic Association*, 119(6), 380–390. https://doi.org/10.7556/JAOA.2019.067/ASSET/GRAPHIC/J_JAOA.2019.067_FIG_003.JPG
- Maurer, G., Tarkowski, B., & Baccarini, M. (2011). Raf kinases in cancer—roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* 2011 30:32, 30(32), 3477–3488. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.160>
- Michielin, O., Atkins, M. B., Koon, H. B., Dummer, R., & Ascierto, P. A. (2020). Evolving impact of long-term survival results on metastatic melanoma treatment. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(2), 948. <https://doi.org/10.1136/JITC-2020-000948>
- Mitrousis, G., Olia, A. S., Walker-Kopp, N., & Cingolani, G. (2008). Molecular Basis for the Recognition of Snurportin 1 by Importin β . *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7877–7884. <https://doi.org/10.1074/JBC.M709093200>
- Morgan, A. M., Lo, J., & Fisher, D. E. (2013). How does pheomelanin synthesis contribute to melanomagenesis?: Two distinct mechanisms could explain the carcinogenicity of pheomelanin synthesis. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 35(8), 672. <https://doi.org/10.1002/BIES.201300020>
- Moschen, A. R., Kaser, A., Enrich, B., Mosheimer, B., Theurl, M., Niederegger, H., & Tilg, H. (2007). Visfatin, an Adipocytokine with Proinflammatory and Immunomodulating Properties. *The Journal of Immunology*, 178(3), 1748–1758. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.3.1748>
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., & Sassone-Corsi, P. (2009). circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5927), 654. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1170803>

- Nissan, M. H., Pratilas, C. A., Jones, A. M., Ramirez, R., Won, H., Liu, C., Tiwari, S., Kong, L., Hanrahan, A. J., Yao, Z., Merghoub, T., Ribas, A., Chapman, P. B., Yaeger, R., Taylor, B. S., Schultz, N., Berger, M. F., Rosen, N., & Solit, D. B. (2014). Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Research*, 74(8), 2340. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2625>
- Ognjanovic, S., Bao, S., Yamamoto, S. Y., Garibay-Tupas, J., Samal, B., & Bryant-Greenwood, G. D. (2001). Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *Journal of Molecular Endocrinology*, 26(2), 107–117. <https://doi.org/10.1677/JME.0.0260107>
- Ohanna, M., Cerezo, M., Nottet, N., Bille, K., Didier, R., Beranger, G., Mograbi, B., Rocchi, S., Yvan-Charvet, L., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2018). Pivotal role of NAMPT in the switch of melanoma cells toward an invasive and drug-resistant phenotype. *Genes and Development*, 32(5–6), 448–461. <https://doi.org/10.1101/GAD.305854.117/-/DC1>
- Oka, M., & Yoneda, Y. (2018). Importin α : functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 94(7), 259. <https://doi.org/10.2183/PJAB.94.018>
- Premi, S., Wallisch, S., Mano, C. M., Weiner, A. B., Bacchiocchi, A., Wakamatsu, K., Bechara, E. J. H., Halaban, R., Douki, T., & Brash, D. E. (2015). Chemiexcitation of Melanin Derivatives Induces DNA Photoproducts Long after UV Exposure. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6224), 842. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1256022>
- Pumroy, R. A., & Cingolani, G. (2015). Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. *The Biochemical Journal*, 466(1), 13. <https://doi.org/10.1042/BJ20141186>
- Qin Zhang, L., Heruth, D. P., & Qing Ye, S. (2011). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Human Diseases. <https://doi.org/10.4172/1948-593X.1000038>
- Rajman, L., Chwalek, K., & Sinclair, D. A. (2018). Therapeutic potential of NAD-boosting molecules: the in vivo evidence. *Cell Metabolism*, 27(3), 529. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2018.02.011>
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:22, 26(22), 3100–3112. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210392>
- Ramsey, K. M., Yoshino, J., Brace, C. S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H. K., Chong, J. L., Buhr, E. D., Lee, C., Takahashi, J. S., Imai, S. I., & Bass, J. (2009). Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD⁺ Biosynthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5927), 651. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1171641>
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C. R., & Alaibac M. (2014). Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In Vivo*, 6(28), 1005–1011.
- Rebecca, V. W., Sondak, V. K., & Smalley, K. S. M. (2012). A Brief History of Melanoma: From Mummies to Mutations. *Melanoma Research*, 22(2), 114. <https://doi.org/10.1097/CMR.0B013E328351FA4D>
- Revollo, J. R., Körner, A., Mills, K. F., Satoh, A., Wang, T., Garten, A., Dasgupta, B., Sasaki, Y., Wolberger, C., Townsend, R. R., Milbrandt, J., Kiess, W., & Imai, S. ichiro. (2007). Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in β cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metabolism*, 6(5), 363. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2007.09.003>
- Romacho, T., Villalobos, L. A., Cercas, E., Carraro, R., Sánchez-Ferrer, C. F., & Peiró, C. (2013). Visfatin as a Novel Mediator Released by Inflamed Human Endothelial Cells. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078283>

- Rotte, A., Bhandaru, M., Zhou, Y., & McElwee, K. J. (2015). Immunotherapy of melanoma: Present options and future promises. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(1), 115–128. <https://doi.org/10.1007/S10555-014-9542-0/FIGURES/1>
- Rubinstein, J. C., Sznol, M., Pavlick, A. C., Ariyan, S., Cheng, E., Bacchiocchi, A., Kluger, H. M., Narayan, D., & Halaban, R. (2010). Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *Journal of Translational Medicine*, 8, 67. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-67>
- Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of Melanoma. *Medical Sciences*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/MEDSCI9040063>
- Samal, B., Sun, Y., Stearns, Chunshan Xie, G., Suggs, And, S., & Mcniece2, I. (1994). Cloning and Characterization of the cDNA Encoding a Novel Human Pre-B-Cell Colony-Enhancing Factor. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 1431–1437.
- Sample, A., & He, Y. Y. (2018). Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 34(1), 13. <https://doi.org/10.1111/PHPP.12329>
- San-Millán, I., & Brooks, G. A. (2017). Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis*, 38(2), 119. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGW127>
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024), 1565–1570. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1203486/SUPPL_FILE/1565.MP3
- Schuster, S., Penke, M., Gorski, T., Gebhardt, R., Weiss, T. S., Kiess, W., & Garten, A. (2015). FK866-induced NAMPT inhibition activates AMPK and downregulates mTOR signaling in hepatocarcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(2), 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.111>
- Sebestyén, A., Dankó, T., Sztankovics, D., Moldvai, D., Raffay, R., Cervi, C., Krencz, I., Zsiros, V., Jeney, A., & Petővári, G. (2021). The role of metabolic ecosystem in cancer progression — metabolic plasticity and mTOR hyperactivity in tumor tissues. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 40, Issue 4, pp. 989–1033). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-10006-2>
- Semerena, E., Nencioni, A., & Masternak, K. (2023). Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase: role in disease pathophysiology and as a biomarker. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1268756>
- Somers, K., Evans, K., Cheung, L., Karsa, M., Pritchard, T., Kosciolk, A., Bongers, A., El-Ayoubi, A., Forgham, H., Middlemiss, S., Mayoh, C., Jones, L., Gupta, M., Kees, U. R., Chernova, O., Korotchikina, L., Gudkov, A. V., Erickson, S. W., Teicher, B., ... Henderson, M. J. (2020). Effective targeting of NAMPT in patient-derived xenograft models of high-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 34(6), 1524–1539. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0683-6>
- Soncini, D., Caffa, I., Zoppoli, G., Cea, M., Cagnetta, A., Passalacqua, M., Mastracci, L., Boero, S., Montecucco, F., Sociali, G., Lasigliè, D., Damonte, P., Grozio, A., Mannino, E., Poggi, A., D, V. G., Monacelli, F., Provenzani, A., Odetti, P., ... Nencioni, A. (2014). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition as a Soluble Factor Independent of Its Enzymatic Activity *. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.594721>
- Sullivan, R. J., & Flaherty, K. (2013). MAP kinase signaling and inhibition in melanoma. In *Oncogene* (Vol. 32, Issue 19, pp. 2373–2379). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.345>

- Sundararaj, K. P., Wood, R. E., Ponnusamy, S., Salas, A. M., Szulc, Z., Bielawska, A., Obeid, L. M., Hannun, Y. A., & Ogretmen, B. (2004). Rapid Shortening of Telomere Length in Response to Ceramide Involves the Inhibition of Telomere Binding Activity of Nuclear Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 6152–6162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310549200>
- Svoboda, P., Krizova, E., Sestakova, S., Vapenkova, K., Knejzlik, Z., Rimpelova, S., Rayova, D., Volfova, N., Krizova, I., Rumlova, M., Sykora, D., Kizek, R., Haluzik, M., Zidek, V., Zidkova, J., & Skop, V. (2019). Nuclear transport of nicotinamide phosphoribosyltransferase is cell cycle-dependent in mammalian cells, and its inhibition slows cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(22), 8676. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA118.003505>
- Tanaka, M., Nozaki, M., Fukuhara, A., Segawa, K., Aoki, N., Matsuda, M., Komuro, R., & Shimomura, I. (2007). Visfatin is released from 3T3-L1 adipocytes via a non-classical pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(2), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.096>
- Tang, H., Wang, L., Wang, T., Yang, J., Zheng, S., Tong, J., Jiang, S., Zhang, X., & Zhang, K. (2023). Recent advances of targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) for cancer drug discovery. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 258). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115607>
- Teixidó, C., González-Cao, M., Karachaliou, N., Rosell, R., & Biotech, P. (2015). Predictive factors for immunotherapy in melanoma. *Ann Transl Med*, 3(15), 208. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.07>
- Thomas, N. E., Edmiston, S. N., Alexander, A., Millikan, R. C., Groben, P. A., Hao, H., Tolbert, D., Berwick, M., Busam, K., Begg, C. B., Mattingly, D., Ollila, D. W., Tse, C. K., Hummer, A., Lee-Taylor, J., & Conway, K. (2007). Number of Nevi and Early-Life Ambient UV Exposure Are Associated with BRAF-Mutant Melanoma. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-1038>
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W., & Sawa, A. (2011). The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal*. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.08.003>
- Vallejo, F. A., Sanchez, A., Cuglievan, B., Walters, W. M., De Angulo, G., Vanni, S., & Graham, R. M. (n.d.). NAMPT Inhibition Induces Neuroblastoma Cell Death and Blocks Tumor Growth. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.883318>
- Wellbrock, C., Karasarides, M., & Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 5, Issue 11, pp. 875–885). <https://doi.org/10.1038/nrm1498>
- Williams, P. F., Olsen, C. M., Hayward, N. K., & Whiteman, D. C. (2011). Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: A meta-analysis and estimates of population burden. *International Journal of Cancer*, 129(7), 1730–1740. <https://doi.org/10.1002/IJC.25804>
- Xu, D., Farmer, A., & Chook, Y. M. (2010). Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- β proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(6), 782. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2010.09.008>
- Yagisawa, H. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of phospholipase C- δ 1: A link to Ca²⁺. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(2), 233–243. <https://doi.org/10.1002/JCB.20677>
- Yang, Y., & Sauve, A. A. (2016). NAD⁺ metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1864, Issue 12, pp. 1787–1800). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.014>

Yong, J., Cai, S., & Zeng, Z. (2023). Targeting NAD⁺ metabolism: dual roles in cancer treatment. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1269896>

Zapata-Pérez, R., Wanders, R. J. A., van Karnebeek, C. D. M., & Houtkooper, R. H. (2021). NAD⁺ homeostasis in human health and disease. *EMBO Molecular Medicine*, 13(7). <https://doi.org/10.15252/emmm.202113943>