



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
Area del Farmaco e Trattamenti Innovativi

CICLO XXXII

COORDINATORE Prof. Teodori Elisabetta

**Identificazione della via di recupero del NAD
come nuova via di tossificazione nella terapia antitumorale**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14

Dottorando

Dott. Ranieri Giuseppe

Tutore

Prof. Chiarugi Alberto

Coordinatore

Prof. Teodori Elisabetta

Anni 2016/2019

Sommario

Parte I: Introduzione	7
1. Nicotinammide Adenina Dinucleotide	8
1.1. Biosintesi del NAD	9
1.2. <i>Pathway</i> che consumano NAD	11
2. Metabolismo del NAD nelle cellule tumorali	13
2.1. NAMPT regola la proliferazione e la sopravvivenza tumorale	14
2.2. Enzimi che consumano NAD: ruolo nel cancro	15
2.2.1. Sirtuine nel cancro	16
2.2.2. PARP nel cancro	17
2.2.3. CD38 nel cancro	18
3. Compartimentalizzazione del NAD: ruolo nel cancro.....	19
3.1. <i>Pool</i> mitocondriale	19
3.2. <i>Pool</i> nucleare	22
3.3. <i>Pool</i> citosolico	23
3.4. <i>Pool</i> extracellulare.....	25
4. Il metabolismo del NAD nella terapia antitumorale.....	28
4.1. La sintesi del NAD come <i>target</i> terapeutico	28
4.1.1. Inibizione della NAMPT come strategia antitumorale.....	29
4.1.2. NAMPT nel metabolismo del tumore	30
4.1.3. NMNATs: nuovi <i>target</i> nel metabolismo tumorale	31
4.2. Enzimi che consumano NAD come <i>target</i> terapeutico	32
4.2.1. Sirtuine	32
4.2.2. PARP	32
4.2.3. CD38.....	33

Parte II: Scopo della Tesi	35
5. Scopo della tesi	36
Parte III: Materiali e Metodi	38
6. Modelli sperimentali	39
6.1. Colture cellulari	39
6.2. Xenotrapianto del tumore <i>in vivo</i>	39
7. Metodi.....	41
7.1. Determinazione di NAD, NADH e ATP	41
7.2. Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale	41
7.3. Frazionamento cellulare.....	42
7.4. Analisi del consumo di ossigeno.....	42
7.5. Dosaggio del lattato	42
7.6. Dosaggio metabolico mediante radioattività	43
7.7. Preparazione degli enzimi ricombinanti umani NAMPT e NMNATs.....	43
7.8. Preparazione di VMN e VAD	44
7.9. Cinetica e studi di inibizione di NAMPT e NMNATs.....	45
7.9.1. Analisi in HPLC.....	45
7.9.2. Sintesi di VMN mediata dalla NAMPT	45
7.9.3. Sintesi di VAD mediata dalle NMNATs	46
7.9.4. Effetto del Vacor, VMN e VAD sull'attività delle NMNATs	46
7.9.5. Effetto del Vacor sull'attività della NAMPT	47
7.10. Effetti del VAD sull'attività delle deidrogenasi	48
7.11. Determinazione dei nucleotidi e metaboliti del Vacor in lisati cellulari	48
7.12. <i>Modeling</i> molecolare	49
7.13. Estrazione dell'RNA, RT-PCR e qPCR	50
7.14. <i>Imaging</i> in spettrometria di massa	51
7.15. Elettrospray-spettrometria di massa ad alta risoluzione	51

7.16. Quantificazioni e analisi statistiche	52
Parte IV: Risultati e Discussione	53
8. Risultati	54
8.1. Il Vacor compromette il metabolismo del NAD e la vitalità cellulare.....	54
8.2. Il Vacor non funziona come un classico NAMPT-inibitore	58
8.3. Il Vacor è un substrato della NAMPT, che lo metabolizza in VMN	61
8.4. L'adenilazione di VMN porta alla sintesi di VAD, analogo del NAD	65
8.5. Il VAD compromette il metabolismo energetico e causa la necrosi.....	71
8.6. Il metabolismo del Vacor ha effetti antineoplastici <i>in vivo</i>	73
8.7. NMNAT2 è over-espressa in melanomi umani.....	77
8.8. UPF2616 e UPF2619 sono potenti analoghi del Vacor.....	79
9. Discussione.....	81
Referenze	84
Ringraziamenti	103

Parte I: Introduzione

1. Nicotinamide Adenine Dinucleotide

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), meno noto come difosforidin nucleotide (DPN), è un cofattore presente in tutte le cellule viventi. È un dinucleotide in quanto consiste di due nucleotidi; uno contenente un'adenina, e l'altro una nicotinamide, legati tra loro mediante i loro gruppi fosfato (Fig. 1). Esso esiste in due forme: una forma ossidata, a cui ci si riferisce con l'abbreviazione NAD^+ , e una forma ridotta, a cui ci si riferisce con l'abbreviazione NADH; l'acronimo NAD, invece, è usato per indicare la molecola indipendentemente dal suo stato di ossidazione.

Il NAD, e la sua forma fosforilata NADP(H), sono metaboliti essenziali, classificati, in seguito alla loro scoperta, come cofattori per reazioni redox; come tali, essi vengono costantemente convertiti dalla forma ossidata $[\text{NAD(P)}^+]$ a quella ridotta $[\text{NAD(P)H}]$, e viceversa [1]. La glicolisi, il ciclo di Krebs, la fosforilazione ossidativa, la β -ossidazione e la biosintesi della serina sono solamente alcune delle vie che sfruttano il NAD come cofattore. Sebbene queste reazioni non prevedano una riduzione del *pool* di NAD, ne esistono numerose altre che ne causano il consumo (cfr. §1.2).

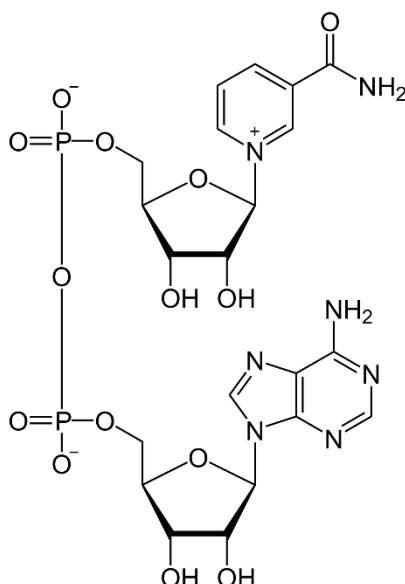


Figura 1. Formula di struttura del NAD

(fonte https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotinamide_adenine_dinucleotide)

1.1. Biosintesi del NAD

Il NAD è sintetizzato da tre differenti *pathway*; la via *de novo*, la via di Preiss-Handler e la via di recupero o *salvage pathway*, a partire dall'amminoacido triptofano, dall'acido nicotinico (NA) e nicotinammide (NAM), rispettivamente [2]. Nelle cellule di mammifero, due enzimi chiave, la nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT) e la nicotinammide mononucleotide adenililtransferasi (NMNAT), regolano il *salvage pathway*, considerato avere grande importanza nel controllo dei livelli intracellulari di NAD [3].

Nella sintesi *de novo*, il triptofano è utilizzato come precursore: esso è metabolizzato dagli enzimi triptofano 2,3-diossigenasi (TDO) o indoleammina 2,3-diossigenasi (IDO), che mediano il primo *step*, il quale rappresenta anche la tappa limitante del *pathway* [2].

Nel *pathway* di Preiss-Handler, l'enzima nicotinato fosforibosiltransferasi (NAPRT) produce il mononucleotide dell'acido nicotinico (NAMN) a partire da NA e fosforibosilpirofosfato (PRPP) [4], [5]; successivamente, il NAMN così generato è coniugato dall'enzima NMNAT a una molecola di adenosina monofosfato (AMP) - la porzione adenilata dell'adenosina trifosfato (ATP)- a formare NAD [6]. In condizioni di abbondanza energetica, e quindi di ATP, la via preferita di biosintesi del NAD è quella che passa per la formazione di NAMN a partire da precursori esogeni, quali il triptofano, l'NA o l'acido chinolinico (QA). Le nucleobasi, quali NAM e NA (a cui spesso ci si riferisce collettivamente come vitamine B o niacina) o i loro rispettivi nucleosidi, NAM riboside (NR) e NA riboside (NAR), sono convertiti nei corrispondenti mononucleotidi, NAM mononucleotide (NMN) e NAMN: NAM e NA dall'enzima NAMPT, mentre NR e NAR dall'enzima NR chinasi (NRK) [7], [8] (Fig. 2).

Nel *salvage pathway*, invece, la degradazione del NAD da parte di numerosi enzimi (cfr. §1.2.) è accoppiata al riciclo della NAM che ne deriva: questa è legata al PRPP dalla NAMPT, a formare NMN che, a sua volta, è coniugato dalla NMNAT all'AMP a formare NAD [6]. Negli esseri umani, la gran parte del NAD è sintetizzata a partire dalla NAM e coinvolge l'azione dell'enzima NAMPT; questa è la via più diretta ed economica per la cellula [7], sebbene la NAMPT richieda, al fine di completare la reazione, un secondo substrato: il PRPP, molecola richiesta anche per la biosintesi di nucleotidi essenziali per la costruzione degli acidi nucleici. È interessante notare come la NAMPT sia stata identificata come l'enzima che limita la velocità di sintesi del NAD, e pertanto, anche come l'enzima chiave

nella biosintesi [9], [10], [11] mentre lo *step* finale, ovvero la sintesi del dinucleotide da parte dell'enzima NMNAT, è condiviso da tutti i *pathway* biosintetici.

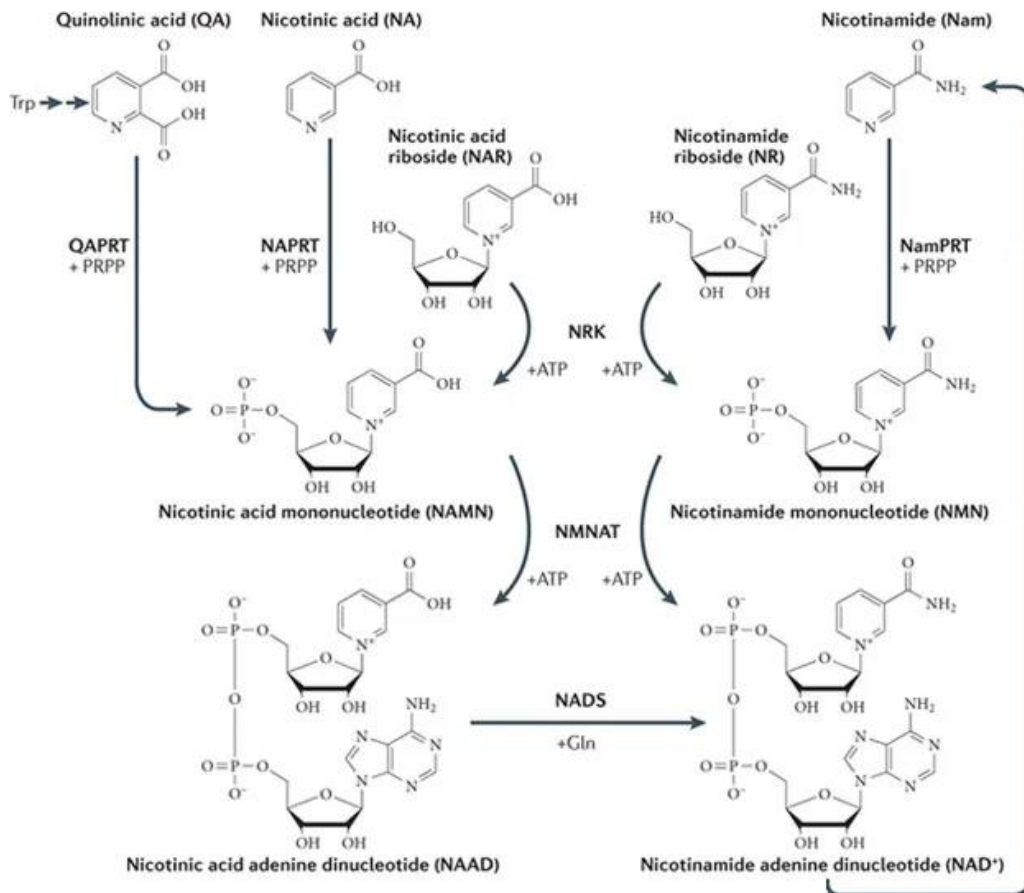


Figura 2. Metaboloma del NAD nell'uomo. Il NAD può essere sintetizzato da differenti precursori contenenti una porzione piridinica. Le basi nicotinammide (NAM) e acido nicotinico (NA) sono convertite nei loro mononucleotidi (nicotinammide mononucleotide (NAM) e mononucleotide dell'acido nicotinico (NAMN)) dalle corrispettive fosforibosiltransferasi, NAM fosforibosiltransferasi (NAMPT) e NA fosforibosiltransferasi (NAPRT), le quali usano fosforibosilpirofosfato (PRPP) come co-substrato. PRPP è co-substrato anche della fosforibosiltransferasi dell'acido chinolinico (QAPRT), che trasforma l'acido chinolinico (QA), metabolita del triptofano, in NAMN nel *pathway* di sintesi *de novo*. NMN e NAMN sono anche prodotti dalla fosforilazione dei nucleosidi, nicotinammide riboside (NR) e riboside dell'acido nicotinico (NAR), rispettivamente, dalle chinasi della nicotinammide riboside (NRKs). La formazione dei dinucleotidi, NAD o NAAD rappresenta lo *step* in comune di tutte le vie biosintetiche; è catalizzata dalle NMN adenililtransferasi (NMNATs) e consiste nel trasferimento della porzione adenilata dell'ATP sul mononucleotide accettore. NAAD è ammidato dalla NAD sintetasi (NADS) che usa la glutammina come donatore del gruppo ammidico (Adattata da Chiarugi et al., 2012 Nat Rev [7]).

1.2. *Pathway* che consumano NAD

Il coinvolgimento del NAD in reazioni di regolazione diverse da quelle redox è stato osservato per la prima volta studiando l'attività ADP-ribosiltransferasica di alcune tossine batteriche, inclusa quella del colera [12]. Sebbene esista una varietà di reazioni in cui il consumo di NAD contribuisce al *signalling* cellulare, tutte condividono il trasferimento di una molecola di ADP-ribosio (ADPR) su un accettore e il conseguente rilascio di NAM. Se la molecola di ADP-ribosio coniugata all'accettore è solamente una, allora si parlerà di monoADP-ribosilazione, fenomeno che si riscontra soprattutto sulla superficie cellulare e che sembra avere un ruolo di rilievo nell'immunità [13]; al contrario, la poliADP-ribosilazione prevede la formazione di polimeri di ADP-ribosio, spesso coniugati a proteine accettrici [7]. Dal momento che tali polimeri possono essere costituiti anche da duecento unità di ADP-ribosio legate tra loro, e dal momento che ognuna di queste singole unità deriva da una molecola di NAD, risulta ovvio che l'attivazione della poliADP-ribosilazione sia una sfida considerevole per il mantenimento dell'omeostasi cellulare del NAD. Una riduzione di NAD intracellulare causa alla cellula, a sua volta, una notevole riduzione della capacità di produrre ATP. La famiglia di enzimi più nota in questo contesto è senza dubbio quella delle poli ADP-ribosio polimerasi (PARP); dei diciassette membri a oggi noti, il più rilevante, poiché coinvolto nel mantenimento dell'integrità del DNA è PARP1 [14].

Nei mammiferi, anche la glicoproteina di membrana CD38 (*cluster* di differenziazione 38), tipica delle cellule del sistema immunitario, ha un ruolo nel consumo di NAD; essa è, infatti, un ectoenzima che funziona da glicoidrolasi e ADP-ribosio-ciclastasi e che produce ADPR, ADPR ciclico (cADPR) e NAADP [15], essenziali nella regolazione del calcio (Ca^{2+}) intracellulare [16]. È interessante notare come, nonostante l'espressione tipica dei linfociti, topi *Cd38*^{-/-} mostrino livelli di NAD più alti in numerosi tessuti, suggerendo che l'azione dell'enzima causi un consumo continuo e diffuso di NAD, e che ne sia, perciò, un importante regolatore dell'omeostasi [17]. Similmente, il NAD è consumato da altre glicoidrolasi, note come CD73 [18] e CD157 [19], anch'esse coinvolte nei meccanismi di adesione cellulare e nella regolazione del ciclo cellulare.

Un ulteriore meccanismo di modificazione proteica NAD-dipendente prevede il trasferimento, operato da sette membri di una famiglia di proteine-deacetilasi NAD-dipendenti note come sirtuine (SIRT1-7), di gruppi acetile provenienti da proteine *target* a molecole di ADPR, con la conseguente liberazione di NAM e la formazione di 2'- e 3'-O-

acetil-ADP-ribosio (OAADPR); tale molecola, così come lo stesso ADPR, è un ligando intracellulare di alcuni tipi di canali del Ca^{2+} [20].

Il meccanismo d'azione delle sirtuine è stato individuato per la prima volta nella proteina *silence information regulator 2* (SIR2) di lievito [21], [22], [23]. La scoperta della deacetilazione proteica NAD-dipendente ha fortemente influenzato la nostra comprensione di eventi biologici di grande rilevanza: le sirtuine dimostrano, infatti, l'esistenza di un legame diretto tra l'omeostasi metabolica e bioenergetica e la regolazione genica. L'attività di questi enzimi, in effetti, dipende strettamente dalla disponibilità di NAD e/o dalla *ratio* tra NAD^+ / NADH . Variazioni nell'omeostasi metabolica cellulare sono poi direttamente tradotte dalle sirtuine in modificazioni di adattamento a livello trascrizionale, ottenute attraverso la deacetilazione di istoni o di fattori di trascrizione su siti specifici [24], [25]. Inoltre, alcune sirtuine sono in grado di regolare direttamente l'attività catalitica di alcuni enzimi chiave del metabolismo, quali l'acetil-Coenzima A sintetasi [26].

2. Metabolismo del NAD nelle cellule tumorali

Le cellule tumorali mostrano un peculiare metabolismo energetico che consente loro di sostenere la rapida proliferazione e che conferisce loro la spiccata capacità di sopravvivenza che le caratterizza [27]. Una delle particolarità del metabolismo di queste cellule è la preferenza per la glicolisi anaerobica anche in normali condizioni di aerobiosi: tale fenomeno è noto come effetto Warburg, dal nome del medico e fisiologo tedesco che per primo lo descrisse [28], [29]. L'effetto Warburg prevede che le cellule cancerose aumentino la produzione di lattato in seguito a un maggiore sfruttamento della glicolisi; inoltre, anziché trasferire elettroni dal NADH alla catena di trasporto mitocondriale (*electron transport chain*, ETC), una buona parte del NAD⁺ citosolico è rigenerato attraverso la riduzione del piruvato in lattato. Tuttavia, mentre la glicolisi aerobica (ovvero accoppiata alla fosforilazione ossidativa) genera ben trentadue molecole di ATP da una singola molecola di glucosio, nelle medesime condizioni, la glicolisi anaerobica ne produce solamente due. In effetti, il virare delle cellule tumorali verso la glicolisi anaerobica in normali condizioni aerobiche potrebbe sembrare una strategia energeticamente sfavorevole e controproducente; tuttavia, la glicolisi anaerobica porta con sé alcuni vantaggi, tra cui una maggiore rapidità nella produzione di ATP e una minore produzione di radicali dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS), i quali derivano in gran parte dall'attività della ETC [30]. Un ulteriore, grande vantaggio della glicolisi anaerobica è rappresentato da una maggiore produzione di metaboliti necessari alla proliferazione tumorale: in condizioni di anaerobiosi, il glucosio 6-fosfato (G6P), primo intermedio della glicolisi prodotto dall'esochinasi, bypassa la glicolisi attraverso la via dei pentosi fosfato (*pentose phosphate pathway*, PPP) in misura maggiore rispetto a quanto accade in aerobiosi. L'intermedio PRPP, prodotto dalla PPP, è utilizzato per la sintesi di nucleotidi sia purinici, sia pirimidinici; per cui, sfruttare maggiormente la PPP, consente alle cellule cancerose di mantenere alto il *pool* nucleotidico, fondamentale per la replicazione del DNA e la trascrizione dell'RNA [31], [32]. In alcune cellule tumorali, una porzione considerevole del glucosio intracellulare è usata nel *pathway* di sintesi *de novo* della serina: il metabolismo di questo amminoacido è associato alla sintesi delle ceramidi, molecole lipidiche che compongono la membrana cellulare e implicate, tra l'altro, nella regolazione

della differenziazione e della proliferazione cellulare. Questo correla la sintesi della serina con la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali [33].

Chiaramente, le modificazioni metaboliche osservabili nell'effetto Warburg coinvolgono in larga parte anche il NAD; in effetti, livelli elevati di NAD sono necessari alla sopravvivenza e alla rapida proliferazione delle cellule cancerose, dato che aumentano la velocità della via glicolitica attraverso l'azione sugli enzimi gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e lattato deidrogenasi (LDH), i quali richiedono NAD come coenzima [34], [35]. Anche l'enzima chiave della biosintesi della serina, la D-3-fosfoglicerato deidrogenasi (PHGDH), utilizza NAD come coenzima, motivo per cui il *pool* intracellulare di NAD è un importante regolatore della sintesi di questo amminoacido [36]. Inoltre, come già discusso (cfr. §1.2), il NAD funge da substrato per le PARP e le sirtuine, mediando, rispettivamente, la poliADP-ribosilazione e la deacetilazione dei propri substrati. Il metabolismo del NAD può dirsi correlato, attraverso l'azione di questi enzimi, a numerosi e importanti processi cellulari, inclusi metabolismo energetico, mantenimento dell'integrità del DNA -e quindi sopravvivenza-, espressione genica, risposta allo stress, crescita e proliferazione. Nelle ultime decadi, numerosi studi hanno indicato che il metabolismo del NAD è coinvolto nella nascita e nella progressione del cancro e lo individuano come un promettente *target* terapeutico [2].

2.1. NAMPT regola la proliferazione e la sopravvivenza tumorale

La NAMPT catalizza la conversione di NAM in NMN, e funziona anche da enzima limitante la biosintesi del NAD. Esiste sia in forma intracellulare (iNAMPT), sia in forma extracellulare (eNAMPT); la forma intracellulare è localizzata nel nucleo e nel citoplasma, mentre la sua presenza nel mitocondrio è controversa [37]. L'over-espressione della NAMPT è osservata in numerosi tipi di cancro, inclusi quelli del colon-retto, dell'ovaio, della mammella, della tiroide, della prostata e dello stomaco, in molti gliomi e linfomi [38], [39], [40], [41], [42], [43], [44], [45]. Tale over-espressione, accompagnata a un aumento dei livelli intracellulari di NAD, promuove una rapida proliferazione cellulare e la sopravvivenza contro chemioterapici. Un noto oncogene, *c-Myc*, è un regolatore dell'espressione della NAMPT nelle cellule tumorali [46]; inoltre, il prodotto di *c-Myc* regola, dal punto di vista della trascrizione, anche il metabolismo energetico, aumentando l'*uptake* di glucosio, la glicolisi e la produzione di lattato, tutte caratteristiche ascrivibili all'effetto Warburg [47]. È altresì noto che il *signalling* NAMPT-dipendente è importante per la funzione dei neutrofili

associati al tumore (*tumor-associated neutrophils*, TAN), che hanno comprovata attività pro-angiogenica e pro-tumorale. L'inibizione di NAMPT blocca il *signalling* SIRT1-dipendente e previene la trascrizione di fattori pro-angiogenici nei TAN [48], [49]. Inoltre, risultati recenti indicano che l'espressione di NAMPT può essere up-regolata dalle proteine *high mobility group A* (HMGA), e che questa up-regolazione causi la soppressione delle MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) mediata da p53, la quale risulta in un'attivazione del *pathway* di NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) che promuove, a sua volta, il mantenimento di un fenotipo associato a senescenza e infiammazione [49].

La forma extracellulare, eNAMPT, è secreta nel siero ed è stata originariamente identificata come una citochina [9], [50] (nota come *pre-B-cell colony-enhancing factor*, PBEF o visfatina); essa viene prodotta e secreta da numerosi tipi di cellule, quali adipociti maturi, epatociti, miociti, neuroni e cellule dell'immunità [51], [52], [53], [54]; la sua secrezione è indotta da numerosi segnali di stress, inclusa la deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD). Inoltre, eNAMPT è rilasciata anche da alcuni tipi di tumore e i suoi livelli sono associati alla progressione del tumore stesso [55], [56]; ancora, eNAMPT induce la produzione di citochine proinfiammatorie in leucociti, macrofagi, cellule epiteliali intestinali ed endoteliali [57], [58], promuovendo così l'infiammazione associata al tumore. Altri studi riportano che eNAMPT favorisca la polarizzazione dei monociti verso il fenotipo macrofago M2, associato alla progressione del tumore, e che aumenti l'espressione di molecole con azione immunosoppressiva, quali IDO, *chemokine (C-C motif) ligand 18* (CCL18), interleuchina (IL) 10, come pure di citochine che promuovono la progressione tumorale, quali IL-1 β e IL-6 [57], [59]. È noto che eNAMPT possa agire anche come fattore pro-angiogenico, attraverso la via delle MAPK, aumentando l'espressione del *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [60]. Insieme, queste informazioni suggeriscono, come possibile strategia antitumorale, l'inibizione specifica della NAMPT.

2.2. Enzimi che consumano NAD: ruolo nel cancro

Lo scopo e la funzione dei *pathway* di *signalling* NAD-dipendente, come intuibile, è molto ampio e variegato, dal momento che coinvolge l'azione di classi di enzimi molto diverse tra loro. Il NAD regola, ad esempio, la poliADP-ribosilazione mediata da PARP e la deacetilazione mediata dalle sirtuine; entrambi i processi sono coinvolti nella regolazione metabolica, riparazione del danno genomico, progressione nel ciclo cellulare e transizione

epitelio-mesenchimale (EMT). Di seguito, le più importanti implicazioni nella biologia del tumore, delle tre classi di enzimi di maggior rilievo.

2.2.1. Sirtuine nel cancro

Come discusso in precedenza, la famiglia delle sirtuine comprende, nei mammiferi, sette membri noti, di cui SIRT1, SIRT6 e SIRT7 con localizzazione nucleare, SIRT2 localizzata prevalentemente nel citosol e SIRT3, SIRT4 e SIRT5 che si riscontrano perlopiù nel mitocondrio [7]. Quasi tutte le sirtuine possono comportarsi sia da promotori che da soppressori della progressione tumorale; questo ruolo duale è stato ben caratterizzato per le sirtuine 1 e 3 [61], [62]. Per esempio, livelli di espressione aumentati di SIRT1 sono stati trovati in varie tipologie di cancro [62], [43]; inoltre, SIRT1 modula alcuni tra i più noti regolatori della biologia tumorale: i fattori trascrizionali p53 e *forkhead box O* (FOXO), di cui riduce gli effetti pro-apoptotici [7]. L'identificazione di un inibitore endogeno di SIRT1 deleto nel tumore al seno (*deleted in breast cancer 1*, DBC1) suggerisce che l'aumento nell'attività di SIRT1 favorisca la progressione del tumore [63]; tuttavia, è anche noto che la crescita del tumore promossa dalle β -catenine è ridotta dall'attività deacetilasica di SIRT1 sulle stesse β -catenine [64]. Al contrario, i tumori al seno con mutazioni su *BRCA* (*breast cancer susceptibility*) mostrano livelli di espressione di SIRT1 minori rispetto a quelli con *BRCA wild-type*, e la progressione tumorale in quelli con *BRCA* mutata è soppressa se si riporta a livelli normali l'espressione di SIRT1 [65]. Anche un regime di restrizione calorica, in cui si attiva SIRT1, riduce il rischio di tumorigenesi [62]. Ancora, uno studio condotto su un modello murino ne sostiene l'azione oncosoppressiva [66]. SIRT3, al pari di SIRT1, pare avere un ruolo tanto nella promozione quanto nella soppressione del tumore. L'aumentata espressione in molte linee cellulari e tessuti tumorali ne supportano l'azione promotrice; al contrario, studi recenti supportano l'idea di una funzione di soppressione del tumore, sulla base del ruolo di rilievo ricoperto nel contesto del metabolismo cellulare e di riduzione della produzione di ROS; in particolare, SIRT3 regola la super-ossido dismutasi (SOD) sia direttamente [67], attraverso la sua deacetilazione, che indirettamente [68], attraverso regolazione trascrizionale. È peraltro notevole il fatto che l'over-espressione di SIRT3 contrasti la progressione tumorale, in un modello di xenotrapianto, perfino dopo l'inizio della tumorigenesi. È tuttavia probabile che l'effetto di soppressione nei confronti dei ROS operata da SIRT3 possa essere un vantaggio anche per le cellule cancerose sottoposte a stress ipossico. Similmente, è noto che SIRT7 sia up-regolata nel tumore al seno [69], in

quello alla tiroide e in numerose linee cellulari tumorali [70], [71]; essa attiva l'RNA-polimerasi I, e quindi, promuove la proliferazione; altre evidenze indicano, invece, che possa contrastare la metastatizzazione del tumore al seno [72].

Sappiamo che SIRT2 è down-regolata nel glioma umano [73] e che facilita il mantenimento dell'integrità genomica [74], sebbene esistano dati che ne supportino anche il ruolo nella progressione tumorale. SIRT6 sembrerebbe essere implicata nella riparazione del danno al DNA [75], che favorisce mediante monoADP-ribosilazione e conseguente attivazione di PARP1 la quale è impiegata poi nella riparazione della rottura del doppio filamento [76]; tuttavia è anche nota la sua attività di regolazione del metabolismo cellulare e di mantenimento dell'integrità del genoma durante la tumorigenesi [77]; una sua aumentata espressione in alcuni tumori è, difatti, considerata un *marker* prognostico negativo [78]; in questo caso informazioni e risultati contrastanti, rendono difficile operare una categorizzazione in senso stretto. In ogni caso, queste informazioni correlano due classi di enzimi che consumano NAD (sirtuine e PARPs) apparentemente indipendenti tra loro, suggerendo che i livelli cellulari di NAD stesso potrebbero essere determinanti per il *signalling* intracellulare. Infatti, sappiamo che l'attività di alcune sirtuine è limitata dal consumo di NAD PARP1-mediato, sia in condizioni normali che di stress [79], [80]; resta comunque ancora da capire se tale azione possa essere rilevante per la trasformazione cellulare o per la progressione del tumore.

2.2.2. PARP nel cancro

Considerato il *signalling* NAD-dipendente nell'ambito della trasformazione e progressione neoplastica, si capisce perché la poliADP-ribosilazione sia considerato il *target* terapeutico più promettente. La PARP1 è l'enzima più studiato in questo contesto e, oltre al suo ben noto ruolo nella riparazione del DNA, essa può contribuire alla nascita e alla progressione del tumore in maniere diverse; per esempio, regolando l'attività di fattori di trascrizione importanti per il controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi, quali NF- κ B e p53 [81]. Dato che l'attività di tali fattori trascrizionali è significativamente influenzata dall'ADP-ribosilazione, se ne deduce che il consumo di NAD derivante dall'attività di PARP1 giochi un ruolo di primaria importanza nella regolazione trascrizionale di eventi correlati alla trasformazione neoplastica. Inoltre, PARP1 regola positivamente l'attività di chinasi quali ERK (*extracellular signal-activated kinase*) e JUN *activated N-terminal kinases* (JNKs)

[82] dimostrando, quindi, di promuovere il *signalling* di crescita e proliferazione cellulare MAPK-dipendente.

2.2.3. CD38 nel cancro

Nei mammiferi, CD38 è la NAD glicoidrolasi e ADP-ribosio-ciclastasi maggiormente nota; è tra gli enzimi che consumano più NAD e la sua attività NAD-dipendente è importante per la crescita cellulare. La conversione del NAD operata da CD38 genera cADPR, che funziona da secondo messaggero mobilizzando il Ca^{2+} . CD38 regola molti aspetti della biologia tumorale, incluse infiammazione, morte e sopravvivenza cellulare. Recentemente è stata correlata all'insorgenza e alla progressione del tumore; è stata identificata come un *marker* prognostico negativo nella leucemia linfatica cronica (LLC) [83]. Inoltre, ha un ruolo di promozione della crescita e proliferazione delle cellule di cancro della cervice uterina, attraverso la riduzione dei livelli di ROS e l'inibizione dell'apoptosi [84]; ancora, la delezione di CD38 in cellule di adenocarcinoma polmonare ne riduce la crescita e l'invasività, in un modello di xenotrapianto in topi nudi [85]. Infine, CD38 causa immunosoppressione attraverso l'inibizione della funzione dei linfociti T CD8⁺ [86]. In sostanza, CD38 sembra avere un ruolo pro-tumorigenico in numerosi tipi di cancro e, pertanto, la sua inibizione può essere considerata nel trattamento di questi tumori.

3. Compartimentalizzazione del NAD: ruolo nel cancro

È probabile, sebbene non ancora del tutto certo, che la concentrazione di NAD nella cellula non sia uniforme, ma che sia, invece, regolata localmente e, quindi, differisca nei diversi compartimenti sub-cellulari. Questa ipotesi è supportata dalla nozione secondo cui molti degli enzimi coinvolti nella biosintesi o nel consumo di NAD siano compartimentalizzati a livello sub-cellulare. Basti pensare al fatto che, nei mammiferi, l'enzima biosintetico NMNAT esiste in tre isoforme localizzate diversamente all'interno della cellula; NMNAT1 nel nucleo, NMNAT2 nel citosol e apparato del Golgi, e NMNAT3 riportata essere nel mitocondrio [87]. Dal momento che esiste una separazione sub-cellulare nei *pathway* bioenergetici o di *signalling* NAD-dipendente, è necessario che ogni compartimento sub-cellulare possieda una sufficiente quantità di NAD pronto all'uso al fine di poter completare i suddetti processi.

Sono numerosi gli approcci tentati per la visualizzazione della distribuzione sub-cellulare dei *pool* di NAD; per esempio, l'espressione mirata di PARP1 può essere usata come sensore molecolare, dato che la presenza di NAD può essere provata mediante immuno-marcatura dei polimeri di poliADP-ribosio [88]. Inoltre, sono stati sviluppati numerosi sensori di NAD⁺ geneticamente codificati: essi contengono un dominio che lega il NAD⁺ derivato da una DNA-ligasi batterica NAD-dipendente, fuso ad una *Venus fluorescent protein* resa circolare (cpVenus) [89]. Questi biosensori del NAD possono essere espressi selettivamente nel nucleo o nel citosol e il legame al NAD ne riduce la fluorescenza intrinseca.

L'utilizzo di questi *tool* molecolari ha permesso di confermare la presenza di *pool* di NAD nel nucleo e in quasi tutti gli organelli cellulari, inclusi mitocondrio, reticolo endoplasmatico (ER), perossisomi e apparato del Golgi [88], [89].

3.1. *Pool* mitocondriale

Il mitocondrio ospita il maggiore dei *pool* di NAD, con una concentrazione che si aggira approssimativamente intorno a 250 μ M e che rappresenta, in neuroni e cardiomiociti, tra il 50 e il 70% della quantità totale di NAD nella cellula [90]. Il mantenimento di tale *pool* è fondamentale per la sopravvivenza cellulare, soprattutto quando condizioni di stress causano la deplezione di quello citosolico e nucleare [91].

Sebbene i *pool* citosolico e mitocondriale di NAD siano notoriamente interconnessi da glicolisi e fosforilazione ossidativa, non è ancora stato chiarito quale sia il preciso meccanismo con cui il mitocondrio si rifornisca di NAD. Le possibili fonti sono due: o il NAD è importato come tale dal citosol, o, in alternativa, è sintetizzato localmente nella matrice mitocondriale. Nonostante numerosi studi abbiano fornito evidenze a supporto dell'una o dell'altra fonte, il meccanismo molecolare rimane ancora poco chiaro. La domanda irrisolta di maggiore spessore riguarda il come il NAD e/o i suoi precursori, inclusi NR, NA, NAR e NMN, passino le membrane mitocondriali. Abbiamo evidenze che il NMN citosolico entri nella matrice mitocondriale e qui sia convertito a NAD dell'azione della NMNAT3 [92]; a (parziale) supporto di questa ipotesi è il fatto che, sino ad oggi, non sia stato identificato, nelle cellule di mammifero, alcun trasportatore mitocondriale del NAD [93]. Inoltre, la somministrazione di NR, aumenta la concentrazione mitocondriale di NAD sia in cellule in coltura, sia nel fegato di topo [94]. Evidenze contrastanti mostrano invece come il trattamento con precursori del NAD, quali NR, NA, NAM, NMN, non ne modifichi il *pool* mitocondriale, mentre, nonostante la mancata conferma dell'esistenza di un trasportatore del NAD di membrana mitocondriale, il trattamento con NAD esogeno lo aumenti in maniera significativa [37], [95]. Inoltre, uno studio recente, condotto mediante l'uso di NR e NAR marcati con isotopi, suggerisce che il NAD citosolico possa essere direttamente traslocato nel mitocondrio [96]. In sostanza, la questione è ancora ampiamente dibattuta e, purtroppo, non particolarmente prossima alla sua risoluzione.

È, parimenti, ancora da confermare l'eventuale esistenza, nel mitocondrio, dell'enzima chiave della biosintesi del NAD, la NAMPT: mentre uno studio [91] ne riporta la suddetta localizzazione mitocondriale, un secondo studio non ne dà conferma [97]. Poiché mancano le prove a supporto della presenza, nei mammiferi, di un trasportatore del NAD e della NAMPT a livello mitocondriale, è stato proposto che il *pool* mitocondriale derivi perlopiù dal NMN che viene traslocato dal citosol alla matrice mitocondriale per poi essere convertito dalla NMNAT3 a formare NAD [98]. Inoltre, l'espressione mediante trasfezione di NMNAT3, mostra come, sebbene il trascritto possa essere ritrovato nel mitocondrio, la presenza della proteina endogena rimanga ancora da confermare [95]. Ancora, mentre uno studio suggerisce che l'over-espressione aumenti il *pool* mitocondriale di NAD [99], altri riportano che NMNAT3 non sia essenziale per il mantenimento del medesimo *pool* [100], [101]. È plausibile che il NAD mitocondriale derivi sia dalla sintesi locale, sia dal trasporto di quello citosolico; in questo modo, ogni fonte può supportare l'altra in caso di

necessità e insieme, cooperare per mantenere la concentrazione del coenzima nei limiti fisiologici e impedire che questa possa subire brusche variazioni. Inoltre, dal momento che la sintesi locale richiede comunque la presenza, e quindi il trasporto dal citosol al mitocondrio, di precursori, le concentrazioni di NAD mitocondriale sarebbero comunque strettamente correlate alla disponibilità nel citosol di NAD e dei suoi precursori. Comunque, sia che venga sintetizzato *in loco*, sia che vi venga trasportato, il NAD mitocondriale ricopre un ruolo essenziale nella tumorigenesi. Oltre alla ben nota importanza nei processi bioenergetici che hanno luogo nel mitocondrio e che sottendono la crescita, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare (come il ciclo di Krebs, la fosforilazione ossidativa e la β -ossidazione), il NAD è un co-substrato obbligatorio per le sirtuine localizzate nel mitocondrio (SIRT3, SIRT4 e SIRT5) già correlate alla regolazione dell'omeostasi metabolica [102]. Per esempio, è dimostrato che SIRT3 interagisce fisicamente con la subunità 9 del Complesso I (*NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9*, NDUFA9); nell'interazione, SIRT3 deacetila selettivamente il Complesso I aumentandone conseguentemente l'attività e, con essa, la produzione di ATP mediata dalla fosforilazione ossidativa [103]. Sappiamo che SIRT3 è localizzata a livello mitocondriale, ma è anche noto che sia una deacetilasi presente nel nucleo e che traslochi nel mitocondrio in seguito a danno al DNA causato, per esempio, da radiazioni UV o da farmaci antitumorali come l'etoposide, presumibilmente con lo scopo di down-regolare l'espressione di geni nucleari coinvolti nelle funzioni mitocondriali [104]. SIRT4 funziona perlopiù come ADP-ribosiltransferasi; promuove la trasformazione tumorigenica in condizioni di stress quali il danno a DNA e a ER [105], e la contrasta inibendo il metabolismo della glutammina [106]: è notevole che, queste ultime e dissonanti evidenze, provengano dai medesimi autori. SIRT5, pur non essendo molto efficiente come deacetilasi, regola i propri *target* attraverso rimozione NAD-dipendente di gruppi malonilici, glutarilici o succinilici da residui di lisina [107]. Inoltre, riguardo a SIRT4 e SIRT5, sappiamo che animali *knockout* per i geni corrispondenti mostrano forti alterazioni nel metabolismo glucidico e lipidico [108], [109].

Resta comunque interessante notare che tutte le sirtuine mitocondriali hanno una potenziale duplice funzione nel cancro, in quanto possono fungere sia da soppressori, sia da promotori del tumore [110].

3.2. *Pool* nucleare

Si stima che il *pool* nucleare di NAD abbia una concentrazione di circa 70-100 μM e sia, perciò minore di quello del mitocondrio [111]. Il NAD nucleare sarebbe prodotto prevalentemente dalla NMNAT1, isoforma a localizzazione nucleare [112]. Il ruolo del NAD nel nucleo è incentrato sull'attività di ADP-ribosilazione PARP-mediata e di deacetilazione SIRT-mediata. PARP1 è stata intensamente studiata nel contesto della biologia tumorale a causa dei fondamentali e molteplici ruoli che ricopre, tra cui la ricerca e riparazione di danni al DNA, protezione dei telomeri, modificazione della cromatina, regolazione trascrizionale e morte cellulare programmata p53-dipendente [113], [114]. Si pensi che, in seguito a danno al DNA, l'attività di PARP1 può consumare fino all'80% del NAD presente nel *pool* nucleare per operare un'intensa poliADP-ribosilazione. Inoltre, PARP1 attivata possiede anche funzione di regolatore trascrizionale [115] che promuove l'induzione E2F1-mediata di fattori che riparano il DNA e che perciò aumenta la resistenza alla terapia antineoplastica [116].

Inoltre, come già accennato, il NAD nucleare regola, attraverso l'azione delle sirtuine nucleari (SIRT1, SIRT6 e SIRT7), svariati fattori anti- e pro-tumorali che influenzano numerosi processi deregolati nelle cellule tumorali, inclusi il mantenimento della cromatina, preservazione del DNA, metabolismo cellulare e risposta immune [117]. La situazione delle sirtuine nucleari è, come per le altre, ambigua e necessita di ulteriori delucidazioni. In particolare, SIRT1 può legare e deacetilare p53 in seguito a danno genomico, causando la repressione della trascrizione p53-dipendente e perciò un mancato arresto del ciclo cellulare [118]; similmente, deacetila e inattiva E2F1, promuovendo la proliferazione cellulare e la trasformazione neoplastica [119]; altri studi suggeriscono che possieda attività di oncosoppressione. Inoltre, è interessante riportare come NAMPT sia substrato diretto di SIRT6, la quale, operandone la deacetilazione, ne causa la maggiore attivazione che porta a livelli intracellulari aumentati di NAD, conferendo così alla cellula maggiore resistenza allo stress ossidativo [120]. Comunque sia, il gran numero di rapporti che il NAD nucleare, attraverso PARP e sirtuine, instaura con numerosi fattori, indica quanto profondo sia il suo impatto nelle vie di *signalling* nucleare. È pensabile di poter influenzare tali complessi *pathway*, PARP- e sirtuine-dipendenti, modificando i livelli di NAD nel nucleo. È stato dimostrato recentemente che in condizioni fisiologiche, PARP1 non ha grande accesso alle riserve di NAD e questo rende ragione della scarsa attività dell'enzima in condizioni in cui non esista danno al DNA; quando, invece, un danno esiste,

l'interazione con il filamento danneggiato modula allostericamente e positivamente l'enzima che ha così pieno accesso al *pool* nucleare di NAD [121]. Inoltre, PARP1 può reclutare e attivare indirettamente NMNAT1 che, catalizzando la sintesi di NAD, supporta l'attività di PARP1 stessa [122]. In effetti, è riportato che NMNAT1 funzioni anche in maniera dipendente da danno al DNA e che la sua inibizione causi un rallentamento nella riparazione del genoma, motivo per cui potrebbe rivelarsi un utile meccanismo di sensibilizzazione verso chemioterapici ad azione genotossica; è tuttavia anche vero che lo *knockdown* dell'enzima sembra portare ad aumentata trascrizione di fattori correlati alla trasformazione, suggerendo, anche per NMNAT1 un duplice ruolo nel cancro di ardua interpretazione [123].

3.3. *Pool* citosolico

Il *pool* presente nel citosol regola e interconnette gli altri *pool*. Il NAD citoplasmatico è perlopiù sintetizzato da NMNAT2, isoforma identificata in tempi relativamente recenti [124] riportata essere localizzata nell'apparato del Golgi [87]. Il *pool* citosolico e quello nucleare sono strettamente connessi, come confermano le concentrazioni assai simili e il fatto che il NAMPT-inibitore FK866 causa una riduzione nel *pool* di NAD tanto nel nucleo, quanto nel citoplasma [89]; è quindi probabile che i precursori NAM e NMN siano presenti in condivisione tra nucleo e citosol, e che l'ultimo *step* della via biosintetica, in cui NMN è convertito a NAD, avvenga nei due diversi compartimenti ad opera delle differenti isoforme ivi presenti. È stato recentemente dimostrato che la deplezione di NMNAT2 riduce significativamente l'entità del *pool* citosolico, intaccando solo in minima parte quello nucleare; al contempo, il NAD nucleare non può rifornire il *pool* citosolico in assenza di NMNAT2 [87]. Queste osservazioni suggeriscono una regolazione compartimentalizzata e specifica dei *pool* nucleare e citosolico, operata da NMNAT1 e NMNAT2, rispettivamente. Il NAD citosolico, così come altri cofattori e metaboliti quali NADP e FAD (flavina adenin dinucleotide), ha numerosi ruoli nel riprogrammare il metabolismo di cellule neoplastiche e immunitarie. In particolare, il NAD citoplasmatico è fondamentale nel metabolismo del glucosio, soprattutto nello *step* chiave in cui la gliceraldeide-3-fosfato è convertita a 1,3-bisfosfoglicerato dalla GAPDH e in cui il NAD è ridotto a NADH; dato che la membrana mitocondriale è impermeabile al NADH, gli elettroni trasportati in esso possono entrare nella catena respiratoria del mitocondrio solamente grazie allo *shuttle* del glicerolo-3-

fosfato, in cui il diidrossiacetone fosfato è ridotto a glicerolo-3-fosfato, oppure grazie allo *shuttle* malato-aspartato, in cui l'ossalacetato è ridotto a malato; in entrambi i casi NADH è ossidato a NAD, il quale può così entrare nel mitocondrio [125]. Il NAD del *pool* citosolico è di vitale importanza per la crescita e proliferazione delle cellule tumorali a causa dell'aumentata necessità metabolica che si riflette in un maggiore sfruttamento della via glicolitica. Come già discusso, le cellule tumorali operano uno *shift* metabolico verso la glicolisi anaerobica, la fermentazione citosolica del lattato e la riduzione della fosforilazione ossidativa [28], con tutti i vantaggi che ne derivano (cfr Cap. 2). Tuttavia, è intuibile che tale aumento nel metabolismo del glucosio, descritto come effetto Warburg, suggerisce che le cellule che lo operino debbano dare la priorità alla rigenerazione del *pool* citosolico di NAD che si troverà a essere pesantemente sfruttato; tale obiettivo può essere raggiunto mediante un adeguato bilanciamento delle attività delle diverse NMNATs. Recentemente è stato provato come NMNAT1 e 2 competano per un loro substrato comune, NMN, al fine di mantenere la regolazione compartimentalizzata dei *pool*, nucleare e citosolico; in particolare, in adipociti indifferenziati, NMN è perlopiù substrato di NMNAT1. Ciò consente all'adipocita immaturo di mantenere elevati i livelli di NAD nucleari, necessari per l'attività di PARP1 e la conseguente inibizione di fattori trascrizionali necessari per la differenziazione. Al contrario, durante l'adipogenesi, NMN è metabolizzato in maniera preferenziale da NMNAT2 che supporta il metabolismo energetico attraverso la sintesi di NAD citosolico a scapito di quello nucleare che, così, non può più inibire il differenziamento, permettendo, quindi, la maturazione dell'adipocita [126]. Coincide con questa visione il fatto che il gene *NMNAT1* sia spesso mutato o deletato in cellule e tessuti tumorali; al contrario, *NMNAT2*, nei tumori, è più frequentemente amplificata (<http://cbiportal.org>). In particolare, l'up-regolazione dell'attività di *NMNAT2* è mediata, perlomeno nelle cellule di cancro polmone non a piccole cellule, dalla deacetilazione SIRT3-dipendente [127] o dal *signalling* dipendente da p53 [128]. Queste osservazioni suggeriscono che la compartimentalizzazione e la regolazione locale della sintesi di NAD abbia un ruolo attivo nell'adattamento metabolico necessario alla tumorigenesi, per rispondere alla richiesta di rapida crescita e proliferazione cellulare.

SIRT2, l'unica con localizzazione esclusivamente citoplasmatica, è anche uno degli enzimi, in questo compartimento, responsabili del maggior consumo di NAD; esistono prove a favore di un suo ruolo nell'oncosoppressione [74], mentre altri studi la collocano tra i fattori pro-tumorali; per citarne alcuni, è stata dimostrata la sua attività nel favorire gli

effetti di una famiglia di oncoproteine note come Myc [129], già correlate all'espressione della NAMPT, e di potenziare il *signalling* NOTCH-dipendente [130]. Studi recenti hanno sottolineato il ruolo di SIRT2 nella rilevazione dello stato nutrizionale della cellula, che dirige, dipendentemente da quest'ultimo, l'attività metabolica in modo da supportare la crescita tumorale, agendo perlopiù su glicolisi e sintesi degli acidi grassi [131]. Dal momento che l'attività di SIRT2 può essere soggetta a regolazione farmacologica, mediante la modulazione della *ratio* NAD⁺/NADH[132], potrebbe essere considerata, in futuro, come possibile *target* terapeutico.

Anche la via biosintetica *de novo* del NAD dipendente dal triptofano, che procede dalla via delle chinurenine, sembra essere importante per le cellule coinvolte nel microambiente tumorale, incluse cellule associate all'immunità innata, quali i macrofagi, responsabili delle risposte antitumorali e posso correlati positivamente con una prognosi positiva del paziente. In effetti, la risposta dei macrofagi alla tumorigenesi dipende in maniera significativa dal NAD citosolico prodotto attraverso la via delle chinurenine, in quanto, una riduzione dell'efficienza di questa via – e quindi del pool citosolico di NAD- è correlata a una peggiore capacità dell'immunità innata di contrastare la cancerogenesi [133].

Il NADPH è un metabolita necessario in grandi quantità alle cellule tumorali a causa del suo ruolo come cofattore in numerose reazioni metaboliche e in virtù della sua capacità di tamponare lo stress ossidativo prodotto dai ROS liberati nelle cellule che si dividono rapidamente [32]. Studi recenti hanno posto attenzione sul ruolo pro-oncogenico delle NAD-chinasi (NADK), le quali operano la fosforilazione, citosolica e mitocondriale, di NAD⁺ a NADP⁺, il quale può poi essere ridotto a NADPH dalla glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) nella PPP [134]; in particolare, mutazioni attivanti sulla forma citosolica della NADK (cNADK) sono correlati alla trasformazione neoplastica nel pancreas [135]; trattamenti farmacologici o condizioni che riducono le riserve cellulari di NAD possono smorzare l'iper-attivazione delle NADPK, con conseguente riduzione delle quantità di NADP intracellulare, la quale compromette la sintesi di nucleotidi e la replicazione del genoma [7].

3.4. Pool extracellulare

In condizioni fisiologiche, il NAD extracellulare presente nel siero dei mammiferi è mantenuto a una concentrazione compresa tra 0.1 e 0.5 μ M [136]. Analogamente a

quanto accade per il *pool* nucleare, anche quello extracellulare è in stretta comunicazione con quello citosolico. Per esempio, il NAD extracellulare aumenta in seguito a liberazione di NAD citosolico successiva alla lisi cellulare [137]; inoltre, nel sistema nervoso enterico, il NAD⁺ può essere rilasciato per esocitosi nello spazio sinaptico in cui funziona come un neurotrasmettitore inibitorio [138]. Recentemente è stato dimostrato che le cellule del cancro alla prostata rilasciano NAD⁺ nel mezzo di coltura, suggerendo un ruolo autocrino o paracrino del dinucleotide [139]. Ancora, il NAD extracellulare può entrare nella cellula e rifornire le riserve intracellulari, contrastando la deplezione di NAD mediata dalla tossificazione di FK866 [140]. È stato proposto che i *pool* citosolico ed extracellulare siano in comunicazione grazie all'emicanale della connessina 43 [141], sebbene manchi ancora la conferma della presenza dell'emicanale della connessina 43 in condizioni fisiologiche; è interessante sottolineare gli stessi autori hanno identificato un trasportatore per NMN, codificato dal gene *Slc12a8* [142], che ha un ruolo nel mantenimento dei diversi *pool*. Alternativamente, il NAD extracellulare potrebbe essere degradato a NMN e quindi entrare come tale attraverso il canale summenzionato [142] oppure, previa catalisi operata da NRK, importato attraverso i trasportatori equilibrativi dei nucleosidi (ENTs) [92].

Il maggior consumatore extracellulare di NAD è CD38, ectoenzima transmembrana multifunzione espresso in maniera ubiquitaria [15]. L'induzione di CD38 causa, nel tumore della prostata, una riduzione dei livelli di NAD con conseguente riduzione del metabolismo e blocco del ciclo cellulare, eventi che, insieme, causano la riduzione della progressione del tumore [143]. CD38 riduce il *pool* extracellulare di NAD in più modi: per esempio convertendo il NAD in cADPR, messaggero coinvolto nel *signalling* Ca²⁺-dipendente; oppure attraverso la sua capacità di degradare il NMN extracellulare a NAM, che può permeare la membrana plasmatica e giungere nel citosol dov'è convertito a NAD dal *salvage pathway*.

Similmente, il *pool* extracellulare può essere depauperato dall'azione dell'ecto-5'-nucleotidasi CD73 che consuma NAD, restituendo NMN prima, e NR poi [18]; tale attività catalitica è importante per il mantenimento e l'arricchimento dei *pool* intracellulari, tant'è che la down-regolazione o l'inibizione farmacologica di CD73 (ottenuta mediante trattamento con α , β -methylene adenosine 5'-diphosphate, APCP) aumentano la tossicità del trattamento con FK866 [144], [145]. È notevole che CD73 funzioni anche come molecola di adesione coinvolta nella migrazione e invasione delle cellule trasformate [146].

Infine, il NAD extracellulare gioca un ruolo anche nella modulazione della risposta immune. È noto che il NAD extracellulare funziona come una citochina proinfiammatoria, che stimola, attraverso l'interazione col recettore purinergico P2Y11, i granulociti, aumentando la chemiotassi [147]. Ancora, alcune evidenze permettono di affermare il ruolo del NAD extracellulare nella risposta antitumorale dei linfociti T. È, per esempio, dimostrato che, in seguito a uno stimolo infiammatorio, il NAD intracellulare può essere rilasciato nello spazio extracellulare, dove può funzionare da regolatore dei linfociti T mediante il legame con il recettore purinergico P2X7 [148]; l'attivazione del recettore mediante ADP-ribosilazione causa l'apoptosi delle cellule T *naïve* e l'espansione di quelle citotossiche [148]. Un altro studio dimostra che le cellule T regolatorie Foxp3⁺ (Treg) siano suscettibili alla morte cellulare indotta da NAD⁺ (*NAD⁺-induced cell death*, NICD) e che la somministrazione sistemica di NAD⁺ ne causi la deplezione, promuovendo perciò la risposta immune diretta contro le cellule tumorali [149]. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che cellule T con un'espressione ridotta di CD73 sulla superficie della membrana plasmatica mostrano maggiori livelli di NAD e, con essi, una migliore risposta antitumorale [150].

Tali informazioni permettono, quindi, di stimare le interazioni tra il NAD extracellulare e gli enzimi summenzionati come possibili *target* terapeutici su cui poter intervenire al fine di controllare la crescita tumorale.

4. Il metabolismo del NAD nella terapia antitumorale

Data la centralità del ruolo ricoperto dal NAD negli eventi correlati alla crescita, alla sopravvivenza cellulare e a tutti quei processi di importanza patofisiologica nell'insorgenza e nella progressione del tumore, molti enzimi legati al metabolismo del NAD (sia alla sua biosintesi, sia al suo catabolismo) sono stati presi in considerazione come possibili *target* nella terapia antitumorale. In questo capitolo, saranno discussi i maggiori risultati ottenuti sino ad ora e i possibili sviluppi futuri, considerata l'appartenenza ai diversi *pathway* di biosintesi o di consumo.

4.1. La sintesi del NAD come *target* terapeutico

Come già accennato, tra le caratteristiche più evidenti delle cellule cancerose, si trovano l'aumentata sintesi di ATP e produzione di biomassa, ottenute attraverso i riarrangiamenti metabolici che tipici dell'effetto Warburg. Di questi riarrangiamenti, il più importante, per l'aumentata biosintesi, è forse lo *shift* verso la PPP. Per tale motivo è verosimile pensare che limitare la disponibilità di NAD potrebbe contrastare gli adattamenti metabolici delle cellule tumorali, per esempio riducendo la velocità e l'efficienza della glicolisi interferendo con l'azione della GAPDH (per cui il NAD è un cofattore essenziale); un secondo meccanismo sarebbe quello di ridurre l'attività delle NAD-chinasi e perciò la disponibilità di NADP, regolatore della PPP: ciò causerebbe una riduzione della sintesi di nucleotidi tale da compromettere la duplicazione del DNA e la trascrizione, entrambe necessarie per la progressione tumorale. Inoltre, la compromissione della PPP potrebbe ostacolare la proliferazione tumorale attraverso un ulteriore meccanismo: è possibile che le cellule tumorali esprimano preferenzialmente la piruvato-chinasi M2 (PKM2, una forma non particolarmente attiva nelle cellule normali), poiché tale enzima favorisce l'ingresso del glucosio nella PPP. In questo modo, la cellula tumorale aumenta la produzione di NADPH, il quale funziona da tampone redox e la protegge dal danno ossidativo causato dai ROS [151], [152]. Ridurre la disponibilità di NAD, renderebbe, perciò, il tumore più suscettibile al danno ossidativo, e, quindi, all'apoptosi. Oltre all'impatto negativo sul riarrangiamento metabolico che sostiene e promuove la crescita tumorale, la deplezione del NAD intracellulare potrebbe, in teoria, rallentare o addirittura arrestare la progressione, attraverso la limitazione dell'attività degli enzimi

NAD-dipendenti. Per esempio, la ridotta disponibilità di NAD non consentirebbe un'adeguata attività di PARP1, con conseguente sensibilizzazione della cellula verso il danno al DNA; tale strategia antineoplastica ricalca quella usata dai PARP-inibitori attualmente in clinica. In maniera simile, la scarsità di NAD ridurrebbe l'effetto dei segnali pro-sopravvivenza operati dalle sirtuine, predisponendo, ancora una volta, la cellula tumorale all'apoptosi. Ovviamente, un problema non indifferente nell'utilizzo di questa strategia, risiede nella verosimile tossicità sistemica, data l'importanza ubiquitaria del NAD. Tuttavia, il fatto che alcuni tumori mostrino un'over-espressione di alcuni enzimi chiave del metabolismo del NAD (quali NAMPT, NAPRT e NMNAT) porta qualche speranza di specificità terapeutica.

4.1.1. Inibizione della NAMPT come strategia antitumorale

In accordo con gli studi che dimostrano come l'over-espressione di NAMPT, enzima che, attraverso una fosforibosilazione, converte la NAM in NMN sia correlata alla patogenesi e alla progressione tumorale, sono state sviluppate diverse molecole che funzionano da inibitori specifici di NAMPT. In effetti, NAMPT è riconosciuta come *marker* prognostico tumorale, e la sua espressione correla, oltre che con la progressione, anche con l'efficacia terapeutica e con la sopravvivenza del paziente [39], [153]. Tre di queste molecole (FK866, GMX1777 e GMX1778) hanno completato la Fase 1 di un *trial* clinico.

Il primo composto a essere stato identificato come altamente specifico per NAMPT è stato FK866 (noto anche come APO866); si comporta come un inibitore non competitivo dell'attività enzimatica di NAMPT, in seguito al legame su un sito allosterico [154]. *In vitro*, riduce significativamente i livelli intracellulari di NAD, cui segue l'inibizione della glicolisi a causa del blocco della GAPDH [35]. Ancora *in vitro*, FK866 causa un aumento nella produzione di ROS [155] e, nelle cellule di tumori ematologici, morte per apoptosi e autofagia caspasi-indipendente [155]. Inoltre, FK866, ritarda la progressione tumorale e ne aumenta la sensibilità alla radioterapia, in un modello murino di tumore al seno [156]; dato in associazione all'inibitore delle proteasi bortezomib, mostra sinergia nella riduzione pressoché totale dei livelli intracellulari di NAD in cellule di mieloma multiplo, riuscendo a superare la resistenza al bortezomib nella terapia contro il mieloma stesso [157].

Altri inibitori specifici, come GMX1777 e GMX1778 (anche noto come CHS-828), mostrano efficacia simile a quella di FK866 [158]. GMX1777 è una cianoguanidina e profarmaco rapidamente convertito in GMX1778, che è un inibitore competitivo di NAMPT

[159]. La somministrazione, in associazione alla radioterapia, si è dimostrata efficace in un modello murino di tumore della testa e collo [160]. L'inibitore NAMPT e GLUT 1 (*glucose transporter 1*) noto come STF-31, riduce al contempo il *pool* cellulare di NAD, l'effetto Warburg e l'*uptake* di glucosio, e si è dimostrato efficace contro i carcinomi delle cellule renali associato a sindrome di von Hippel-Lindau [161].

Tuttavia, nonostante i NAMPT-inibitori siano certamente dei candidati promettenti nello sviluppo di nuove terapie antitumorali, la NAMPT rimane un enzima essenziale per le cellule non trasformate e, la sua inibizione un'arma a doppio taglio. Infatti, la delezione ubiquitaria dell'enzima causa morte prenatale; inoltre, la delezione specifica nel solo muscolo, causa degenerazione muscolare progressiva [51], [162]. Ancora, animali *knockout* per la NAMPT nella sola retina, mostrano una grave perdita della vista [163]. In effetti, tutti e tre i farmaci che hanno raggiunto la Fase 1, hanno visto la propria sperimentazione clinica venire interrotta proprio a causa di reazioni avverse sistemiche, incluse trombocitopenia, linfopenia, cardiotoxicità, tossicità retinica e gastrointestinale [164]. Per cui, l'utilizzo di una terapia contenente farmaci NAMPT-inibitori avrebbe, chiaramente, l'assoluta necessità di considerare queste reazioni avverse.

4.1.2. NAPRT nel metabolismo del tumore

Similmente alla NAMPT, la NAPRT (che, attraverso la sua attività enzimatica fosforibosiltransferasica, converte NA nel suo corrispettivo mononucleotide, NAMN) è localizzata nel citoplasma e nel nucleo, mentre sembra non essere presente nel mitocondrio [165]. Contrariamente a quanto accade per la NAMPT, che, come discusso in precedenza, è spesso over-espressa, un certo numero di tumori mostra, invece, una ridotta o mancata espressione dell'enzima NAPRT [166]. A causa di tale mancata espressione, le cellule di questi tipi di tumore non possono utilizzare NA per la biosintesi di NAD, dipendendo quindi totalmente dalla NAMPT. Per cui, in questi casi, l'efficacia di trattamenti con NAMPT-inibitori (quali FK866) è maggiore che in quei tumori che, invece, esprimono normalmente la NAPRT. In effetti, l'iper-metilazione della sequenza promotore del gene *Naprt* è frequentemente osservata in certe tipologie di cancro, cosa che potrebbe essere sfruttata come un efficace *marker* per il trattamento con NAMPT-inibitori [167]. Le cellule non trasformate, invece, esprimono simultaneamente NAMPT e NAPRT; per cui, un trattamento con NAMPT-inibitori, associato a NA, può, da un lato, lasciare illese le cellule normali e, dall'altro, ridurre in maniera significativa il NAD nelle cellule tumorali che non

esprimono NAPRT, causando in quest'ultime una riduzione nella sintesi di ATP e provocandone la morte selettiva [168]. In maniera analoga, l'inibizione di NAMPT operata da GMX1778 causa una deplezione dei livelli di NAD e induce morte cellulare in maniera maggiore in quei tumori che non esprimono NAPRT, mentre il co-trattamento con NA impedisce una riduzione totale dei livelli di NAD in cellule normali esprimenti NAPRT [159]. Ciò suggerisce che considerare l'espressione di NAPRT è fondamentale al fine di pianificare correttamente un trattamento con NAMPT-inibitori.

4.1.3. NMNATs: nuovi target nel metabolismo tumorale

Le tre diverse isoforme dell'enzima NMNAT (NMNAT1, 2 e 3) catalizzano l'ultimo *step* della sintesi del NAD, e rappresentano il fulcro della biosintesi del NAD, dal momento che le diverse vie confluiscono in questo punto. Come discusso in precedenza, sono responsabili della formazione dei dinucleotidi, NAD o NAAD, grazie alla loro azione adenililtransferasica mediante cui trasferiscono la porzione adenilata dell'ATP su un mononucleotide, NMN o NAMN, rispettivamente. Data la loro centralità, è quindi plausibile ritenere che la loro inibizione potrebbe causare una forte deplezione del NAD intracellulare (che contrariamente a quanto accade per l'inibizione della NAMPT non può essere bypassata) il quale, in ultima analisi, si tradurrebbe in un effetto antitumorale [169]. Questo è particolarmente probabile se si considera l'isoforma 2, dato che è la maggiore responsabile della (re)sintesi del NAD cellulare e che un aumento della sua espressione si ritrova, per esempio, nel cancro del colon-retto; inoltre è noto che la sua espressione è indotta da p53 in presenza di un danno al genoma, probabilmente per fornire il substrato necessario all'azione della PARP1 [128]. Altri studi mettono in evidenza l'esistenza di un asse SIRT3-NMNAT2-NAD: la SIRT3, deacetilando NMNAT2, ne causa l'attivazione; l'azione dell'adenililtransferasi, infine, aumenta il *pool* cellulare di NAD nelle cellule di cancro al polmone non a piccole cellule. L'asse SIRT3-NMNAT2-NAD sembra quindi dirigere il metabolismo energetico e la proliferazione cellulare, tant'è che la rottura di questo asse promuove la morte cellulare per apoptosi [127]. Ancora, è riportato che l'over-espressione di NMNAT2 riscontrabile nel cancro del colon-retto può potenziare la tossicità della tiazofurina, analoga del NAD; NMNAT2 converte enzimaticamente la tiazofurina in tiazolo-4-carbaossammide adenina dinucleotide, un potente inibitore dell'enzima inosina 5'-monofosfato deidrogenasi (IMPDH), la cui attività, necessaria per la sintesi di guanina e

quindi per la normale proliferazione cellulare, è vista con crescente interesse nei tumori colorettali [170].

Tali risultati rafforzano, dunque, l'idea che NMNAT2 possa essere un valido *target* terapeutico nel trattamento di alcune neoplasie.

4.2. Enzimi che consumano NAD come *target* terapeutico

Il ruolo (pato) fisiologico, e il significato biologico del *signalling* NAD-dipendente nelle cellule normali come in quelle trasformate, è stato ampiamente discusso nei capitoli precedenti. Qui sono prese in esame le famiglie di enzimi che consumano NAD in qualità di *target* terapeutici, già comprovati, o possibili.

4.2.1. Sirtuine

L'intricata relazione tra i numerosi processi modulati dai sette membri della famiglia delle sirtuine sottolinea quanto complicate e numerose siano le relazioni tra regolazione epigenetica, trascrizione, riparazione del DNA, ciclo cellulare e metabolismo energetico nelle cellule trasformate. Numerose evidenze supportano il potenziale terapeutico di modulatori delle sirtuine. Per esempio, è stato dimostrato che la 15-deossi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 e i suoi derivati J11-C1 e J19, inibendo la SIRT1, causano morte cellulare per apoptosi o autofagia, in cellule di cancro dell'ovaio [171]. Similmente, un potente inibitore delle sirtuine, MHY2256, pare avere una grande efficacia nell'aumentare l'apoptosi in cellule tumorali e di arrestarne così la proliferazione [172]. Ancora, numerosi altri inibitori delle sirtuine sono stati studiati, e, tutti, condividono un medesimo meccanismo d'azione: promuovono l'acetilazione e l'attivazione di p53, favorendone l'azione sul controllo del ciclo cellulare, che promuove, pertanto, la morte cellulare per autofagia o apoptosi.

4.2.2. PARP

Gli enzimi appartenenti alla famiglia delle PARPs giocano un ruolo fondamentale nella riparazione NAD-dipendente del danno al DNA e nella regolazione della trascrizione, processi, questi, profondamente importanti per lo sviluppo tumorale. Per questa ragione, composti PARP-inibitori sono stati ampiamente e approfonditamente studiati quali promettenti candidati nella terapia del tumore. Ad oggi, quattro PARP-inibitori, olaparib

[173], [174], rucaparib [175], niraparib [176] e talazoparib [177] sono stati approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento di tumori ginecologici. Nel frattempo, numerosi altri PARP-inibitori sono in fase di sperimentazione clinica al fine di essere valutati in termini di sicurezza ed efficacia sia in monoterapia, sia in combinazioni con altri chemioterapici o in associazione alla radioterapia. Questi composti sono particolarmente efficaci nel causare letalità sintetica in tumori con mutazioni *BRCA1* e/o *BRCA2*, in cui è già non funzionante il sistema di riparazione omologa (*Homologous Recombination Repair*, HRR). Qui, gli effetti dei farmaci PARP-inibitori coinvolgono diversi aspetti della biologia del tumore. Primo, inibire l'azione della PARP causa la mancata riparazione delle rotture al singolo filamento, che progrediscono perciò a rotture al doppio filamento, che provocano la morte cellulare [178]. Secondo, l'inibizione di PARP causa una deregolazione della ricombinazione non omologa (*non homologous end joining*, NHEJ), notoriamente prona all'introduzione di errori nella sequenza da ricombinare e, quindi, fonte di instabilità genomica [179]. È da sottolineare che alcuni studi hanno messo in luce il fatto che i PARP-inibitori possano indurre mutazioni nei geni coinvolti nella HRR che ne ripristinano la funzione, abrogando il principio di letalità sintetica e causando chemioresistenza [180], [181].

4.2.3. CD38

CD38 è stato identificato come *marker* di superficie nel mieloma multiplo e anticorpi anti-CD38 si sono dimostrati efficaci soprattutto nei pazienti affetti da mieloma multiplo recidivante/refrattario (RRMM) [182]. Il primo di questi a essere stato approvato dalla FDA in quanto riconosciuto efficace anche come singolo trattamento contro il RRMM è stato daratumumab [183]. Altri anticorpi anti-CD38, quali isatuximab e MOR202 stanno completando, ad oggi, dei *trial* clinici e, secondo i dati preliminari, dimostrano un'ottima tollerabilità [184], [185]. Gli anticorpi anti-CD38 contrastano lo sviluppo del cancro attraverso molteplici meccanismi. In primo luogo, questi anticorpi mostrano i classici meccanismi effettori immunitari Fc-dipendenti che causano la lisi e la rimozione delle cellule tumorali come nella tipica citotossicità anticorpo-dipendente [182]. Secondo, il *targeting* di CD38 promuove l'espansione delle cellule T, aumenta la funzione delle cellule T effettrici e riduce, al contempo, l'immunosoppressione mediata dai Treg CD38⁺ [186]. Infine, l'inibizione dell'espressione di CD38 sulle cellule Th1/17 ne regola il NAD e le attiva

promuovendo la glutamminolisi e la fosforilazione ossidativa, aumentando così l'efficacia della terapia di trasferimento adottivo di cellule T [150].

5. Scopo della tesi

Tra le maggiori peculiarità delle cellule tumorali, c'è la loro capacità di adattare il proprio metabolismo al bisogno di produrre la grande quantità di energia e biomassa necessarie alla loro proliferazione incontrollata. Per questo motivo, puntare ai *pathway* metabolici attivati in maniera selettiva nelle cellule tumorali sembra essere una strategia terapeutica quantomeno promettente. In particolare, poiché il NAD svolge un ruolo chiave in molte delle vie che caratterizzano le cellule neoplastiche, la regolazione farmacologica dei *pathway* che sintetizzano NAD (in special modo, del *salvage pathway*), hanno recentemente guadagnato interesse a livello sia preclinico, sia clinico.

Il motivo che sottende tale strategia terapeutica risiede nell'ormai ben noto ruolo che il NAD ricopre in numerosi *pathway* tipici delle cellule trasformate, dal metabolismo energetico, al *signalling* che spinge verso la proliferazione, fino alle vie che rendono conto della loro estrema capacità di resistenza verso fattori stressogeni; inoltre, è noto che le cellule tumorali consumino, proprio per far fronte a questi adattamenti metabolici, una quantità maggiore di NAD, rispetto alle cellule normali. Queste due caratteristiche rendono, quindi, le cellule trasformate più sensibili a trattamenti che riducono la biosintesi di NAD.

Il trattamento con inibitori dell'enzima chiave del *salvage pathway*, la NAMPT, ha già dato risultati promettenti in modelli preclinici, che sono stati poi, solo parzialmente, confermati in *trial* clinici da cui sono stati discontinuati soprattutto a causa di gravi eventi avversi. In linea di principio, comunque, la sola inibizione della NAMPT potrebbe essere bypassata per azione di altre fosforibosiltransferasi (dell'acido nicotinico o chinolinico), le quali potrebbero comunque catalizzare la fosforibosilazione di NA o QA, rifornendo così la cellula di NAMN, precursore mononucleotidico che può essere adenilato fino a formare NAD. Similmente, anche il *pathway* che procede da NR, può rifornire la cellula di NMN e, infine, di NAD. È quindi inevitabile che queste vie alternative, fornendo NAD alle cellule, finiscano per diminuire l'effetto e la tossicità di questi composti.

È importante ricordare, però, che sebbene sia la NAMPT l'enzima chiave della via biosintetica del NAD, tutte le vie sopracitate convergono in un passaggio metabolico, che è anche l'ultimo di tutte le vie, svolto dalle NMNATs: tali enzimi, operano una catalisi adeniltransferasica su substrati mononucleotidici (NAMN o NMN), restituendo NAD.

In teoria, dunque, l'inibizione delle NMNATs potrebbe causare una deplezione drastica dei *pool* intracellulari di NAD dovuta all'arresto di tutte le vie biosintetiche ad oggi note. Purtroppo, non conosciamo, allo stato attuale, composti potenti che funzionino come inibitori selettivi delle NMNATs: è pertanto ancora sconosciuto l'effetto sul metabolismo energetico e sull'omeostasi causata dall'inibizione completa della via biosintetica del NAD. Tale informazione apporterebbe un significativo contributo scientifico alle nostre conoscenze, riguardanti il metaboloma del NAD, che sarebbe certamente importante per lo sviluppo di nuove terapie antineoplastiche basate su un approccio metabolico di tossicità selettiva.

Nella presente tesi, è discusso l'effetto di un composto, individuato mediante uno *screening* di composti recanti un farmacoforo tipico dei NAMP-inibitori, già noto come Vacor o pirinurone, che funziona da antimetabolita del *salvage pathway* del NAD. Lo scopo del presente elaborato, è, dunque, di mostrare e spiegare in che modo il composto in esame causi un crollo nell'omeostasi e nel metabolismo NAD-correlato nelle cellule tumorali. A sostegno della tesi, sono mostrati risultati sperimentali ottenuti *in vitro* e *in vivo*, i quali provano i meccanismi molecolari con cui il Vacor viene convertito in un antimetabolita analogo del NAD, capace di sconvolgere l'omeostasi e il metabolismo energetico cellulari, e di causare, in ultima analisi, morte delle linee cellulari e dei tumori che esprimono NMNAT2.

6. Modelli sperimentali

6.1. Colture cellulari

Le linee cellulari SH-SY5Y, HeLa, INS-1, SK-Hep-1, C6, NCI-H295R, CAPAN-1, JURKAT, MeWo e A375 sono state ottenute da ATCC (Manassas, USA). Le cellule di melanoma SK-Mel-2, SK-Mel-5 e SK-Mel-28 sono state gentilmente fornite da Laura Polisenò (CRL-ITT, Italia). Le cellule di melanoma, derivate da paziente, M26c e M33x sono state ottenute da melanoma umano mediante l'uso di protocolli approvati dal Comitato Etico [187]. Tutte le linee cellulari sono state coltivate in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contenente glucosio 25 mM, sodio piruvato 1 mM e integrato con glutammina 2 mM, siero bovino fetale al 10% (FBS), penicillina 100 U/ml e streptomina 100 µg/ml. L'assenza di micoplasma è stata periodicamente confermata mediante test con 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI) e PCR. Le colture sono state portate al 50-70% di confluenza ed esposte a concentrazioni pari a 100 µM per i diversi composti. Composti contenenti la parte piridinilmetil-ureidica sono stati acquistati da *Specs Company* (Bleiswijkseweg 55, 2712 PB Zoetermeer, Paesi Bassi) e disciolti in acqua con il 4% di 1N HCl. I composti FK866 e GMX1778 sono stati sciolti in DMSO. I precursori del NAD sono stati sciolti nel mezzo di coltura. La vitalità cellulare è stata valutata mediante test 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e microscopia a contrasto di fase. Per le analisi di citometria, le cellule sono state staccate con tripsina ed EDTA, lavate, risospese in DMEM contenente 3 mg/ml di ioduro di propidio (PI) e incubate a 37 °C per 10 min e poi analizzate mediante citofluorimetro a flusso Coulter EPICS XL (Beckman Coulter, Inc, USA) dotato del *software* EXPO32 Flow Cytometry ADC (Beckman Coulter, Inc, USA).

6.2. Xenotrapianto del tumore *in vivo*

Tutte le procedure effettuate sugli animali sono state eseguite secondo le linee guida della Comunità Europea in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali (DL 116/92, applicazione della direttiva 86/609 / CEE del Consiglio delle Comunità Europee). Sono state utilizzate femmine di topi nudi atimici (Foxn1 nu/nu) di 6 settimane (Envigo, Italia); gli animali sono stati stabulati in una struttura priva di agenti patogeni, in conformità con le linee guida del Centro Stabulazione Animali da Laboratorio (CeSAL) dell'Università degli Studi di Firenze per il trattamento e la cura degli animali da

laboratorio, almeno 1 settimana prima di ogni esperimento. Agli animali sono state impiantate, al giorno 0 e sul fianco destro, 1×10^6 cellule SH-SY5Y (12 animali per gruppo) oppure $1,5 \times 10^3$ cellule M26c (14 animali per gruppo) in 100 μl di DMEM senza siero e Matrigel® Matrix (Corning Inc., USA) 50:50. I tumori sono stati misurati quotidianamente con un calibro e il volume (V) calcolato secondo la formula $V = a^2 \times b / 2$, dove a è la larghezza in mm e b la lunghezza in mm. I trattamenti, randomizzati e in cieco, sono stati iniziati solo quando i tumori diventavano palpabili.

7. Metodi

Tutti i reagenti utilizzati in questo studio, a meno che non sia diversamente specificato, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Merk, Germania).

7.1. Determinazione di NAD, NADH e ATP

Il contenuto di NAD è stato quantificato usando una procedura enzimatica ciclica come descritto in [97] e [188]. Le cellule, fatte crescere in piastre multipozzetto da 48, sono state lisate con 50 μ l di 1N HClO₄ poi neutralizzato con uno stesso volume di 1N KOH. Dopo l'aggiunta di 100 μ l di bicina (100 mM) pH 8.0, 50 μ l dell'estratto cellulare è stato mixato con un egual volume di tampone bicina contenente 23 μ l/ml di etanolo, 0.17 mg/ml di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, 0.57 mg/ml di fenazina etosolfato e 10 μ g di alcool deidrogenasi. La mix risultante è stata poi mantenuta a temperatura ambiente per 10 min e l'assorbanza a 550 nm è stata misurata mediante uno spettrofotometro (VICTOR3, Perkin-Elmer, USA).

Il contenuto di NADH intracellulare è stato quantificato misurando l'autofluorescenza cellulare come descritto in [97]; l'autofluorescenza è stata quantificata con un microscopio (Nikon 2000-TU, Nikon Corp., Giappone) equipaggiato con un filtro UV e una camera CCD. Cinque immagini sono state acquisite in maniera casuale per ogni campione e poi processate per la quantificazione della fluorescenza (Metamorf/Metafluor software).

Il contenuto di ATP nelle cellule è stato misurato per mezzo del kit ATPlite (Perkin-Elmer, USA) seguendo le istruzioni del fornitore. In breve, e cellule, fatte crescere in piastre multipozzetto da 48, sono state lisate con 70 μ l di tampone luciferasi a cui sono stati immediatamente aggiunti 20 μ l di D-luciferina. La produzione di luce causata dalla reazione tra luciferina e luciferasi in presenza di ATP, è stata misurata dopo 5 min utilizzando un luminometro (Top Count NTX, Packard Inc., USA)

7.2. Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale

Il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) è stato valutato utilizzando la citometria a flusso. Le cellule, fatte crescere in piastre multipozzetto da 48, sono state incubate con 2.5 nM TMRE in DMEM, esposte o meno a 100 μ M Vacor e analizzate. Le cellule esposte a 100 nM FCCP per 15 min sono state usate come controllo positivo. Le

cellule sono state staccate con tripsina ed EDTA e poi risospese in DMEM. Successivamente, 200 µl della sospensione ottenuta sono stati diluiti con PBS e analizzati mediante un citofluorimetro Coulter EPICS XL (Beckman Coulter Inc., USA) equipaggiato con il *software* EXPO32 Flow Cytometry ADC (Beckman Coulter Inc., USA). TMRE 2.5 nM è stato aggiunto in tutte le soluzioni per la preparazione e l'analisi dei campioni.

7.3. Frazionamento cellulare

I mitocondri e i nuclei sono stati isolati dalle cellule (1.5×10^6) usando un omogeneizzatore vetro/vetro in 500 µl di tampone di estrazione (TRIS/MOPS 10 mM, EGTA/TRIS 1 mM, saccarosio 200 mM, pH 7.4). I supernatanti sono stati prima centrifugati per 10 min a 600 g per ottenere la frazione nucleare, e poi per 15 min a 7000 g per ottenere il *pellet* mitocondriale [97]. La formazione di NAD è stata valutata usando la procedura enzimatica descritta al § 7.1.

7.4. Analisi del consumo di ossigeno

La quantificazione del consumo di ossigeno è stata effettuata mediante l'uso di un ossigrafo (Oxygraph - Hansatech Instruments, UK). Le cellule (2.5×10^5), esposte oppure no a 100 µM Vacor a tempi diversi, sono state staccate con tripsina ed EDTA, poste nella camera contenente 350 µl di DMEM e mantenute a 37 °C. La concentrazione di O₂ è stata monitorata per 8 min.

7.5. Dosaggio del lattato

I livelli di lattato sono stati misurati utilizzando un kit per il dosaggio dello stesso (BioVision Inc., USA) seguendo le istruzioni del produttore. Le cellule sono state coltivate in piastre multipozzetto da 48 ed esposte, o meno, a 100 µM Vacor per diversi tempi. Esse sono poi state omogenizzate in 100 µl del relativo tampone e successivamente centrifugate al fine di rimuovere i frammenti insolubili. La frazione solubile, invece, è stata mixata con 50 µl di Reaction Mix, e la mix risultante è stata incubata al buio per 30 min a temperatura ambiente, per favorirne la reazione, e infine misurata la fluorescenza (Ex/Em=535/590 nm). Tutti i dati sono stati normalizzati sulla relativa quantità di proteine.

7.6. Dosaggio metabolico mediante radioattività

Per la misurazione della CO₂ rilasciata dal metabolismo di substrati radioattivi, le cellule sono state incubate con 0.5 µCi/ml [U-¹⁴C]-glucosio per 15 min in piastre da 35 mm. Su ogni piastra, è stata attaccata, rivolto verso l'interno della piastra stessa, un disco di carta Whatman bagnata con 100 µl di fenil-etilamina-metanolo (1:1:1) per trattenere la CO₂. Successivamente, le cellule sono state lisate con 200 µl di 4M H₂SO₄. Infine, ogni disco di carta Whatman è stato trasferito in una *vial* di scintillazione per la conta effettuata con un contatore di scintillazione Tri-Carb2800TR (Perkin-Elmer, USA).

7.7. Preparazione degli enzimi ricombinanti umani NAMPT e NMNATs

La sequenza codificante del gene *Nampt* umano è stata amplificata dal cDNA di monociti della linea U937, e successivamente clonata nel vettore pET15b sul sito NdeI. Cellule di *E. coli* BL21 (DE3), trasformate per mezzo del plasmide ricombinante, sono state fatte crescere a 37 °C fino al raggiungimento di una densità ottica (OD), misurata a 600 nm, pari a 0.6. Dopo un tempo di 20 min alla temperatura di 25 °C, l'espressione di proteine è stata indotta usando IPTG 0.8 mM. Le cellule sono state poi raccolte dopo un'induzione *overnight* a 25 °C. I *pellet* sono stati risospesi in 1/50 del volume iniziale di coltura in tampone HEPES/NaOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP (tampone di lisi), contenente 10 mM imidazolo, 1 mM PMSF e 0.05 ml/g *pellet* cellulare di cocktail di inibitori di proteasi. La sospensione è stata sonicata per tre volte per 1 min a 50 W, con intervalli di 1 min, e poi centrifugata a 20000 g per 30 min a 4 °C. Il supernatante derivato da 50 ml di coltura è stato caricato su una colonna HisTrap HP equilibrata con 10 mM imidazolo in tampone di lisi. Dopo un lavaggio con 40 mM imidazolo in tampone di lisi, l'eluizione è stata portata avanti con un aumento lineare e progressivo della concentrazione di imidazolo fino alla concentrazione finale di 350 mM. Le frazioni attive sono state fatte passare attraverso una colonna PD-10 equilibrata ed eluita con 50 mM tampone HEPES/NaOH, pH 7.5, 300 mM NaCl e 20 % glicerolo.

Per l'espressione dei tre isoenzimi umani NMNATs, i costrutti NMNAT1-pTrcHisA e NMNAT3-pTrcHis A sono stati trasformati in cellule di *E. coli* TOP10F mentre il costrutto NMNAT2-pET28c è stato trasformato in cellule di *E. coli* BLD21(DE3). Le cellule sono state fatte crescere in terreno Luria-Bertani a 37 °C, contenente 100 µg/ml di ampicillina (per NMNAT1 e NMNAT3) o 50 µg/ml di kanamicina (per NMNAT2). Raggiunta una OD a 600 nm pari a 0.6, l'espressione proteica è stata indotta con 1 mM IPTG. Le cellule esprimenti

NMNAT1 e NMNAT3 sono state raccolte dopo un'induzione *overnight* a 37 °C, mentre le cellule esprimenti NMNAT2 sono state raccolte dopo un'induzione di 5 h a 28 °C. I *pellet* cellulari sono stati poi risospesi in 1/20 del volume di coltura iniziale nel seguente tampone di lisi: 50 mM sodio fosfato, pH 7.0, 300 mM NaCl, 5 mM CHAPSO (per NMNAT2), 1 mM PMSF, 1 mM TCEP, 0.05 ml/g di *pellet* cellulare del cocktail di inibitori di proteasi. Le sospensioni sono state lisate mediante French Press (18000 psi) e successivamente centrifugate a 20000 g per 20 min a 4 °C. I supernatanti, derivanti da 500 ml della coltura, sono stati caricati su colonne HisTrap HP equilibrate con il tampone di lisi. In seguito al lavaggio con 40 mM imidazolo (per NMNAT1 e NMNAT3) e 20 mM imidazolo (per NMNAT2) nel tampone di lisi, l'eluizione è stata portata avanti con un aumento lineare e progressivo di imidazolo fino alla concentrazione finale pari a 350 mM. Le frazioni attive e omogenee sono state raggruppate e fatte passare attraverso colonne PD-10 equilibrate ed eluite con 50 mM tampone HEPES/NaOH, pH 7.5, 1 mM TCEP e 20 % glicerolo.

7.8. Preparazione di VMN e VAD

Una mix di reazione contenente 0.4 mM Vacor, 1.4 mM PRPP, 1 mM ATP, 4.4 mU hNAMPT, 100 mU hNMNAT2 in 50 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml BSA, 1 mM TCEP, e avente un volume finale di 350 µl, è stata incubata *overnight* a 37 °C. La reazione è stata stoppata con l'aggiunta di 175 µl di 1.2 N di HClO₄ e, dopo 10 min in ghiaccio, la mix contenente l'acido è stata centrifugata a 16000 g per 3 min. 500 µl del supernatante sono stati neutralizzati con 107 µl di 1 M K₂CO₃ e centrifugati come sopra. Aliquote da 100 µl del supernatante sono state iniettate in colonne Kinetex C18 LC (2.6 µm, 150 x 4.6 mm) equilibrate con 92% di tampone A (100 mM ammonio acetato, pH 6.0), 8% di tampone B (tampone A, contenente 80% acetonitrile). Le condizioni di eluizione sono state le seguenti: 5 min 8% tampone B, fino al 50% tampone B in 10 min, mantenimento in 50% tampone B per 5 min, di nuovo 8% di tampone B in 2 min e mantenimento in 8% di tampone B per 8 min. Il flusso è stato mantenuto a 0.75 ml/min e la temperatura fissata a 50 °C. VAD, VMN e Vacor sono stati eluiti, rispettivamente a 11, 14 e 17 min. Nelle condizioni del nostro dosaggio, il Vacor è stato totalmente consumato e due frazioni pari all'84% e al 16% sono state trovate come VMN e VAD, rispettivamente. Le frazioni contenenti VMN e VAD sono state collezionate e liofilizzate e la loro purezza è stata verificata mediante analisi HPLC (cromatografia liquida ad alte prestazioni) in seguito alla risospensione in 40 mM HCl. La quantificazione è stata effettuata

spettrofotometricamente, utilizzando un coefficiente di estinzione a 340 nm pari a $17.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, che rappresenta il valore calcolato per il Vacor.

7.9. Cinetica e studi di inibizione di NAMPT e NMNATs

7.9.1. Analisi in HPLC

A meno che non diversamente specificato, la mix per il dosaggio di NAMPT e NMNATs era composta da 50 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 20 mM MgCl_2 , 0.5 mg/ml BSA, 1 mM TCEP, il substrato appropriato e l'enzima. Dopo un'incubazione a 37 °C, le reazioni sono state stoppate mediante acidificazione e neutralizzazione. Per la quantificazione del NMN formatosi, i supernatanti sono stati iniettati in colonne Kinetex HILIC LC (2.6 μm , 150 x 4.6 mm) o Supelcosil LC-18-S (5 μm , 250 x 4.6 mm). La prima colonna è stata equilibrata ed eluita con 100 mM di ammonio acetato, pH 6.0, 4% acetonitrile, con un flusso fissato a 0.75 ml/min e alla temperatura di 35 °C; la seconda colonna è stata equilibrata ed eluita con 100 mM di potassio fosfato, pH 6.0, 8 mM tetrabutylammonio solfato, 20% metanolo, con un flusso impostato a 2 ml/min e alla temperatura fissata a 50 °C. Questa stessa colonna è stata usata per la quantificazione del VAD.

Per la quantificazione del NAD, i campioni sono stati iniettati in una colonna Supelcosil LC-18-S (5 μm , 250 x 4.6 mm), equilibrata con 100 mM di potassio fosfato, pH 6.0, 8 mM tetrabutylammonio idrogeno solfato (tampone A). Il NAD è stato eluito mediante flusso costante pari a 1 ml/min secondo le seguenti condizioni: 4 min in 100% tampone A, fino al 15% di tampone B (tampone A contenente il 30% di metanolo) in 12.5 min, fino al 90% di tampone in 23.5 min, mantenimento in 90% di tampone B per 7 min, seguiti da riequilibrio in tampone A, alla temperatura fissa di 8 °C.

7.9.2. Sintesi di VMN mediata dalla NAMPT

Per gli studi sulle cinetiche, le mix per l'analisi relativa alla NAMPT, contenenti 0.12 mU/ml di NAMPT umana, 1 mM di PRPP, 1 mM di ATP e Vacor a concentrazioni comprese tra 10 e 50 μM , sono state incubate a 37 °C per 30 o 60 min. Il VMN risultante dalla reazione è stato quantificato mediante HPLC su colonna HILIC.

7.9.3. Sintesi di VAD mediata dalle NMNATs

Per saggiare la capacità delle tre isoforme umane di NMNAT di sintetizzare VAD, le mix contenenti 0.8 mU/ml di ogni enzima, 1 mM di ATP e 50 μ M di VMN, sono state incubate *overnight* a 37 °C. Il NAD formatosi è stato quantificato mediante HPLC su colonna Supelcosil LC-18-S, come descritto sopra.

Per la comparazione dell'attività di sintesi del NAD, le analisi sono state condotte in condizione di velocità iniziale. La sintesi del VAD è stata misurata in diverse mix contenenti 0.4 mU/ml di ogni isoforma enzimatica, 0.15 mM di VMN e 1 mM di ATP. La sintesi di NAD è stata misurata in mix contenenti 0.15 mM di NMN, 1 mM di ATP e 1 mU/ml di ogni isoenzima. Dopo 15 e 30 min di incubazione a 37 °C, NAD e VAD sono stati quantificati in HPLC su colonna Supelcosil LC-18-S, come descritto in precedenza.

Per le analisi di cinetica della formazione NMNAT2-dipendente di VAD, le mix contenenti 0.5 mU/ml di NMNAT2 umana, 1 mM di ATP e concentrazioni di VMN comprese tra 10 e 200 μ M, sono state incubate a 37 °C per 15 o 30 min. Il VAD prodotto dalla reazione è stato quantificato in HPLC su colonna Supelcosil LC-18-S, come sopra. Per la comparazione con l'attività adenililtransferasica, le mix contenenti NMN anziché VMN e 0.5 mU/ml di NMNAT2 umana sono state incubate in parallelo.

7.9.4. Effetto del Vacor, VMN e VAD sull'attività delle NMNATs

L'effetto del Vacor sulle tre isoforme di NMNAT è stato analizzato in mix di reazione contenenti 1 mM ATP, 20 μ M NMN e 0.8 mU/ml di ciascuna isoforma di NMNAT, in assenza o in presenza di 0.1 e 0.4 mM Vacor. L'effetto di VAD è stato analizzato in mix contenenti 1 mM ATP, 20 μ M NMN e 0,8 mU / ml di ciascuna isoforma NMNAT, in assenza o in presenza di concentrazioni di VAD comprese tra 5 e 100 μ M. La formazione di NAD è stata analizzata mediante HPLC dopo 10 e 20 minuti di incubazione a 37 °C. L'effetto di VMN sull'attività di NMNAT2 è stato testato variando le concentrazioni di NMN da 8 a 20 μ M, con VMN compreso tra 150 e 400 μ M e 1 mM ATP. Le velocità iniziali ottenute sperimentalmente sono state adattate all'equazione

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M \left(1 + \left(\frac{[I]}{K_i}\right)^n\right) + [S] \left(1 + \left(\frac{[I]}{\alpha K_i}\right)^n\right)}$$

dove K_i e αK_i sono le costanti di dissociazione dei complessi EIn ed $ESIn$, e n è il numero di molecole di inibitore che legano l'enzima. Il *fitting* è stato effettuato per mezzo di una procedura iterativa non-lineare dei minimi quadrati usando il *software* Microsoft Excel.

7.9.5. Effetto del Vacor sull'attività della NAMPT

L'effetto del Vacor sull'attività di NAMPT è stato analizzato mediante saggio ciclico fluorometrico come descritto in [189]. Per determinare il valore della IC_{50} per NAM, mix di reazione costituite da 70 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 0.4 mM PRPP, 2.5 mM ATP, 0.2 μ M NAM, 0.002 mU/ml di NAMPT umana e concentrazioni di Vacor comprese tra 0 e 2.5 μ M, in un volume finale di 60 μ l, sono state incubate a 37 °C, in presenza degli enzimi ausiliari PncC (1 mU) e NadD (30 mU). A 5 e 10 min di incubazione, le reazioni sono state stoppate scaldando le mix a 95 °C per 1 min; 40 μ l dei campioni sono stati trasferiti nei pozzetti di una piastra nera a 96 pozzetti a fondo piatto. Il NAAD formato è stato convertito in NAD in un tampone costituito da 50 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 150 mM KCl, 1.4 mM ATP, 50 mM NH_4Cl , 11 mM $MgCl_2$, a cui sono stati aggiunti 9 mU di enzima ausiliario NadE (volume finale di 145 μ l). Dopo un'incubazione per 30 min a 37 °C, il NAD formatosi è stato ciclato aggiungendo 96 μ l di un reagente costituito da sodio fosfato 100 mM, pH 8.0, etanolo al 2%, resazurina 32 μ M, 10 U/ml di alcol deidrogenasi, 0.1 mg/ml di BSA, 10 μ M di flavin mononucleotide (FMN) e 0.1 mg/ml di diaforasi precedentemente purificati attraverso una colonna PD MiniTrap G-25 equilibrata ed eluita con tampone sodio fosfato 10 mM, pH 8.0. La fluorescenza di resorufina è stata misurata in modo continuo utilizzando un lettore di micropiastre Synergy HT (Bio-Tek, Winooski VT, USA) impostato alle lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione pari a 544 e 590 nm, rispettivamente. I tassi di aumento della fluorescenza nei singoli pozzetti sono stati registrati e tracciati rispetto al tempo di incubazione. La pendenza della linea di regressione è stata utilizzata per calcolare l'attività NAMPT facendo riferimento a una curva standard di NAAD [189]. Mix di controllo adatte sono state elaborate in parallelo per escludere l'effetto di Vacor sul sistema ancillare. Lo stesso test è stato utilizzato per determinare la K_i rispetto al PRPP. Nelle mix di reazione, NAM è stato fissato a 1 μ M e il PRPP variato da 0.25 a 5 μ M. Le concentrazioni di Vacor erano comprese tra 10 a 50 μ M e le reazioni sono state interrotte dopo 5 e 10 min di incubazione. Il valore della K_i è stato calcolato sostituendo le *slope* dei diagrammi reciproci rispetto alla concentrazione dell'inibitore.

7.10. Effetti del VAD sull'attività delle deidrogenasi

L'attività della GAPDH è stata dosata in 50 mM di tampone sodio fosfato, pH 8.0, 13 mM gliceraldeide 3-fosfato, 30 μ M NAD e 0.14 mU/ml di enzima derivato da muscolo di pollo, in assenza o in presenza di Vacor alle diverse concentrazioni. L'attività della IMPDH è stata dosata in 100 mM TRIS-HCl, pH 8, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM IMP, 30 μ M NAD e 0.12 mU/ml dell'enzima umano ricombinante, in assenza o in presenza di Vacor alle diverse concentrazioni. Dopo incubazioni di 5 e 10 min a 37 °C, le reazioni sono state bloccate mediante riscaldamento a 100 °C per 1 min. Il NADH prodotto è stato misurato per mezzo di analisi HPLC in colonna Supelcosil LC-18-T (5 μ m, 250 x 4.6 mm) equilibrata con 100 mM di potassio fosfato, pH 6.0 (tampone A). Le condizioni di eluizione sono state le seguenti: 9 min in 100% tampone A, 6 min fino al 12% di tampone B (tampone A, contenente il 20% di metanolo), 2.5 min fino al 45% di tampone B, 2.5 min fino al 100% di tampone B e mantenimento in 100% tampone B per 5.5 min; infine, ritorno a gradiente in 5 min al 100% di tampone A. La colonna è stata lavata con tampone A per 4.5 min prima della corsa successiva. Il flusso è stato fissato a 1.3 ml/min e la temperatura fissata a 18 °C [190].

Per caratterizzare l'interazione tra GAPDH e VAD, l'attività dell'enzima è stata misurata in presenza di concentrazioni di NAD comprese tra 10 e 40 μ M, e in presenza di concentrazioni di VAD comprese tra 50 e 100 μ M, alla concentrazione fissa di 13 mM gliceraldeide 3-fosfato. I parametri delle cinetiche e le costanti per gli inibitori sono state determinate usando il *plot* Lineweaver-Burk e le intercette plottate come descritto in [191].

7.11. Determinazione dei nucleotidi e metaboliti del Vacor in lisati cellulari

I nucleotidi sono stati estratti da cellule delle linee SH-SY5Y, M26c ed HeLa risospesando il *pellet* cellulare in 0.4 M HClO₄. Dopo 5 min in ghiaccio, i campioni sono stati centrifugati a 16000 g per 3 min. I *pellet* risultanti sono stati risospesi in acido formico per la determinazione delle proteine secondo il metodo di Bradford, e i supernatanti neutralizzati con 1 M K₂CO₃ e centrifugati come sopra. Per la determinazione di Vacor, VMN e VAD, i supernatanti neutralizzati, contenenti circa 0.4 mg di proteine per cellule SH-SY5Y e M26c e 1.4 mg di proteine per cellule HeLa, sono stati iniettati in una colonna Supelcosil LC-18-S equilibrata con 33% tampone A (100 mM tampone potassio fosfato, pH 6.0, 8 mM tetrabuttilammonio solfato) e 67% tampone B (tampone A contenente 30%

metanolo). Le condizioni di eluizione sono state le seguenti: 16 min 67% tampone B, fino al 100% tampone B in 1 min, mantenimento in 100% tampone B per 18 min, fino al 67% di tampone B in 5 min, mantenimento in 67% tampone B per 5 min. Il flusso è stato mantenuto a 2.0 ml/min e la temperatura fissata a 50 °C.

Per la determinazione del NAD, i campioni neutralizzati, corrispondenti a circa 0.2 mg di proteine, sono stati iniettati nella stessa colonna eluita come sopra. NMN è stato misurato mediante derivatizzazione con acetofenone e analisi spettrofluorometrica in HPLC [192]. La derivatizzazione è stata effettuata mixando 50 µl di campioni neutralizzati, corrispondenti a circa 0.1 mg di proteine, con 100 µl di 1N KOH e 50 µl di acetofenone. Dopo un'incubazione di 15 min a 4 °C, 100 µl di acido formico è stato aggiunto e i campioni scaldati per 5 min a 100 °C. Aliquote da 195 µl sono state iniettate in una colonna Tracer Extrasil ODS2 (5 µm, 250 x 4.0 mm), collegata ad uno spettrofluorometro Perkin -Elmer LS-45(Ex/Em 380/440 nm). La colonna è stata equilibrata con 100 mM di potassio fosfato, pH 2.1, contenete 10% acetonitrile (tampone A). Le condizioni di eluizione sono state le seguenti: 6 min al 100% tampone A, fino al 100% di tampone B (tampone A contenente 40% di acetonitrile) in 5 min, mantenimento per 6 min in 100% tampone B, seguito dalla riequilibrio in tampone A. Il flusso è stato mantenuto a 1.5 ml/min e la temperatura fissata a 25 °C. Le misurazioni sono state effettuate usando campioni in duplicato analizzati in parallelo e contenenti quantità note di NMN.

7.12. *Modeling* molecolare

Il file NAMPT 4L4L.pdb [193] è stato recuperato dal database pdb [www.rcsb.org] direttamente dal server MolProbity [<http://molprobity.biochem.duke.edu>] in cui è stato verificato il file e successivamente aggiunti gli atomi di idrogeno. Il file risultante pdb è stato sottoposto ad ulteriori elaborazioni tramite il software VegaZZ (ver. 3.1.0) [194]. Il pacchetto VegaZZ è stato impiegato come *front-end* per preparare, lanciare e analizzare i calcoli di AutoDock Vina [195]: le coordinate 3D sono state normalizzate, le molecole d'acqua e degli altri ligandi sono state rimosse dal file pdb; tutti i ligandi sono stati creati utilizzando lo *sketcher*, e le loro coordinate poi convertite in 3D. Gli *script* inclusi in VegaZZ come Receptor.c e Ligand.c sono stati utilizzati per la preparazione di proteine e ligandi. La regione di interesse utilizzata da AutoDock Vina per il *docking* è stata centrata a 10 Å attorno al ligando cocristallizzato su 4L4L.pdb. Sono stati utilizzati i seguenti parametri:

center_x = 13.63, center_y = 8.30, center_z = 4.44; size_x = 25, size_y = 20, size_z = 30; esaustività = 64; num_modes = 10, mentre gli altri parametri erano di default.

Le strutture 3D di NMNAT2 sono state create mediante modellazione comparativa utilizzando il server I-TASSER [196] utilizzando la sequenza dell'NMNAT2 umana (UniProtcode Q9BZQ4.1). Cinque modelli 3D sono stati generati e passati allo strumento online Verify_3D [197] per la valutazione della qualità del modello. Le coordinate del modello numero 4 selezionato sono state normalizzate da VegaZZ e sottoposte alle simulazioni di *docking* con AutoDockVina: l'intera proteina è stata utilizzata per il *docking* utilizzando un box di 60 Å per ciascun lato, posto al centro della proteina, mentre gli altri metodi e parametri AutoDockVina sono stati mantenuti come sopra. Infine, le posizioni di *binding* con la più bassa energia di *docking* appartengono alle prime dieci modalità classificate di ciascun ligando, e nelle proteine corrispondenti sono state selezionate e analizzate mediante ispezione visiva. I *software* LigPlot + (ver. 1.4.5) [198] e Chimera (ver. 1.10) [199] sono stati ulteriormente impiegati per la visualizzazione, l'analisi e il *rendering* dei complessi proteina-ligando.

7.13. Estrazione dell'RNA, RT-PCR e qPCR

L'RNA totale è stato estratto da cellule, tessuti o biopsie non incluse in paraffina utilizzando Trizol Reagent (Life Technologies, USA) e 1 µg di RNA è stato retrotrascritto utilizzando il kit iScript (Bio-Rad, Italia), secondo le istruzioni dei fornitori. La qPCR è stata eseguita usando un termociclatore Rotor-Gene 3000 (Qiagen, Italia) e la Rotor-Gene TM SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Usa); le reazioni sono state portate avanti come segue: *hold* a 95 °C per 30 s, seguita da 45 cicli a 95 °C per 5 s e 60 °C per 5 s. I *primer* usati, capaci di amplificare frammenti di lunghezza compresa tra le 185 e le 200 bp, sono descritti di seguito. Per i campioni umani: 18S 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' (*sense*), 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3' (*antisense*); NAMPT 5'-AACAAATATCCACCCAACACAA-3' (*sense*), 5'-TAGACATCTTTGGCTTCCTGG-3' (*antisense*), NMNAT1 5'-TCCCATCACCAACATGCACC -3' (*sense*), 5'-TGATGACCCGGTGATAGGCAG -3' (*antisense*); NMNAT2 5'-GATTGGATCAGGGTGGACC -3' (*sense*), 5'- TCCGATCACAGGTGTCATGG -3' (*antisense*); per i campioni di ratto 18S 5'-AAAACCAACCCGGTGAGCTCCCTC -3' (*sense*), 5'-CTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCG -3' (*antisense*); NMNAT1 5'-CAGCCCACCACCGAATCATC -3' (*sense*), 5'- TTTCCAGCACAGGTGAGCTTT -3' (*antisense*); NMNAT2 5'-

GCAGGCTGGCCCTGCAGCAT-3' (*sense*), 5'- GAGGCAGGAGAGAAACCGGGG -3' (*antisense*) (IDT Tema Ricerca, Italia).

Per le biopsie umane fissate in formalina e incluse in paraffina (FFPE) l'RNA totale è stato estratto, in seguito alla sparaffinatura, mediante l'uso del kit RNeasy FFPE (Qiagen, USA), seguendo le istruzioni del fornitore; successivamente, 500 ng di RNA totale sono stati retrotrascritti e analizzati in qPCR come sopra. Per analizzare l'espressione di NMNAT2, sono state usate due diverse coppie di *primer* (*a* e *b*) capaci di amplificare due diversi frammenti lunghi 50 bp. I *primer* usati sono i seguenti: NMNAT2*a* 5'-GAACACCACCGGGACCTCATGAAG-3' (*sense*), 5'-CATTGGAGAGGATGCAGCCAGTCAC-3' (*antisense*), NMNAT2*b* 5'-TCCTGCTGCTGTGTGGTAGTGACC-3' (*sense*), 5'-CTGGGATGCAGAAGGACTCCAGC-3' (*antisense*) (IDT Tema Ricerca, Italia). Le quantificazioni ottenute dalle due diverse coppie di *primer* sono state mediate tra loro.

7.14. *Imaging* in spettrometria di massa

I campioni di tumore sono stati congelati in vapori di azoto liquido e poi conservati a -80 °C. Il tessuto è stato poi sezionato mediante un criostato CM1850-1 (Leica, Germania) in fettine da 10 µm poste su vetrini portaoggetto (Superfrost Plus – Menzel, Germania). Per ricoprire i vetrini in maniera uniforme con circa 10 mg di matrice, è stato usato un dispositivo ImagePrep (Bruker Daltonik, GmbH, USA). Le analisi di *imaging* sono state condotte su un MALDI-LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA) equipaggiato con un laser ad azoto a 60 Hz. La matrice MALDI usata per il Vacor è stato HCCA (acido α-ciano-idrossicinnamico) alla concentrazione di 10 g/l in una soluzione composta da 50:50:0.2 H₂O:AcCN:TFA con un'aggiunta di anilina in una quantità equimolare all'HCCA. La matrice usata per ATP e AMP è stata 9-amminoacridina alla concentrazione di 1 g/l in 50:50 H₂O:AcCN.

7.15. Elettrospray-spettrometria di massa ad alta risoluzione

La frazione rimanente dall'analisi HPLC è stata risospesa in 100 µl di una mix 1:1 di H₂O e acetonitrile contenente 0.1% di acido formico. La soluzione è stata analizzata per infusione, al flusso costante di 3 µl/min, nell'interfaccia ESI di un LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Germania), uno spettrometro di massa ad alta risoluzione. Gli spettri sono stati acquisiti in modalità ioni positivi, scannerizzando nel *range* 50-1000 m/z, e operando

alla risoluzione pari a 100000, con m/z pari a 400. I parametri ESI usati sono stati i seguenti: voltaggio dello spray 5 kV, voltaggio dei capillari 48 V, temperatura dei capillari 275 °C, voltaggio delle lenti a tubo 160 V; l'azoto è stato usato come gas ausiliario e per le nebulizzazioni, a valori pari a 3 e 8 UA, rispettivamente. Per le analisi su NMN e VMN nel mezzo di coltura, i campioni derivati da cellule HeLa esposte a NAD o VAD 1 mM/h sono stati estratti con metanolo e centrifugati a 12000 g per 30 min a 4 °C. I supernatanti sono stati liofilizzati, risospesi in H₂O e acetonitrile 1:1 contenente lo 0.1% di acido formico e analizzati come sopra.

7.16. Quantificazioni e analisi statistiche

Tutti i dati rappresentano la media \pm SEM di almeno due diversi esperimenti, a meno che non diversamente specificato. Le differenze sono state valutate statisticamente paragonando le condizioni trattate con le non trattate, utilizzando l'ANOVA più *Tukey's post hoc test*. I livelli di significatività usati sono stati $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**). Le analisi statistiche sono state condotte mediante il *software* GraphPad Prism (ver. 7). La fluorescenza del NADH è stata quantificata e analizzata usando il *software* Metamorph/Metafluor. I dati per la spettrometria di massa ad alta risoluzione sono stati acquisiti e analizzati mediante il *software* Xcalibur (ver. 3.0).

8. Risultati

8.1. Il Vacor compromette il metabolismo del NAD e la vitalità cellulare

È noto dalla letteratura che alcuni composti possano funzionare come NAMPT-inibitori in seguito alla loro metabolizzazione in derivati fosforibosilici. In particolare, composti contenenti un anello 3-piridinico legato a un gruppo ureidico o ammidico possono diventare substrati della NAMPT ed essere fosforibosilati per condensazione con una molecola di PRPP [164], [193]. Al fine di identificare derivati piridinici capaci di interferire con il metaboloma del NAD, abbiamo per prima cosa effettuato uno *screening* su una serie di composti recanti una porzione piridinilmetil-ureidica, e quindi con una struttura simile a quella dei farmacofori dei più noti NAMPT-inibitori, FK866 e GMX1778 (Fig. 3A). Come parametri per lo *screening* di ogni composto sono stati adottati la deplezione del contenuto intracellulare di NAD e la morte di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y. Di tutti i composti testati, nonostante le analogie strutturali, solamente il composto numero 6 (3-(4-nitrofenil)-1-(piridin-3-ilmetil)urea) è riuscito a ridurre in maniera significativa il *pool* intracellulare di NAD e a provocare la morte cellulare (Fig. 3B, C). Curiosamente, il composto in questione si è rivelato essere una molecola nota come Vacor (anche chiamata Pirinurone) utilizzato fino al 1979, anno in cui fu poi ritirato dal commercio, come rodenticida. È anche noto che, nell'uomo, un'iniezione e.v. di NAM, precursore del NAD, è in grado di contrastare un'intossicazione da Vacor [200], sebbene il meccanismo d'azione con cui questo avvenga, non era stato ancora indagato. Abbiamo poi testato il Vacor contro altre linee cellulari tumorali e trovato che, come accade alle cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, il composto causa una rapida morte cellulare nelle cellule INS-1 (insulinoma), NCI-H295R (carcinoma corticosurrenale) e SK-HEP (epatocarcinoma); al contrario, le linee cellulari Capan-1 (adenocarcinoma pancreatico), C6 (glioma), HeLa (adenocarcinoma della cervice) e Jurkat (leucemia delle cellule T) si sono dimostrate insensibili al Vacor (Fig. 4A, B). Inoltre, spinti dalla nozione che spesso, nei melanomi, è over-espressa la NAMPT [201], abbiamo testato il Vacor contro sette linee di melanoma e trovato che solamente tre di queste mostravano una caduta nei livelli di NAD e conseguente morte cellulare (Fig. 4C, D). Abbiamo poi comparato, in un *time course*, i livelli intracellulari di Vacor tra SH-SY5Y, una linea sensibile, e HeLa, una insensibile; abbiamo trovato che, forse in un modo un po' controintuitivo, i livelli di Vacor aumentano più

rapidamente nelle HeLa che nelle SH-SY5Y (Fig. 4E). Questo ci permette di escludere che la tossicità sia legata a fattori meramente farmacocinetici. Inoltre, in accordo a quanto riportato dalla clinica, nel nostro modello la NAM ha un effetto protettivo dose-dipendente sulla tossicità mediata da Vacor (Fig. 4F), anche se altri precursori metabolici (eccezion fatta per la chinurerina) e lo stesso NAD mostrano effetto protettivo nelle cellule di melanoma, ma non in quelle di neuroblastoma (Fig. 4G). Alla luce dell'informazione per cui un'iper-attivazione della PARP1 causa la deplezione delle riserve di NAD, e volendo investigare se la deplezione del NAD Vacor-dipendente fosse mediata da un'iper-attivazione di PARP1, abbiamo testato tre diversi composti PARP-inibitori e trovato che non possiedono effetti sulla caduta del NAD (Fig. 4H).

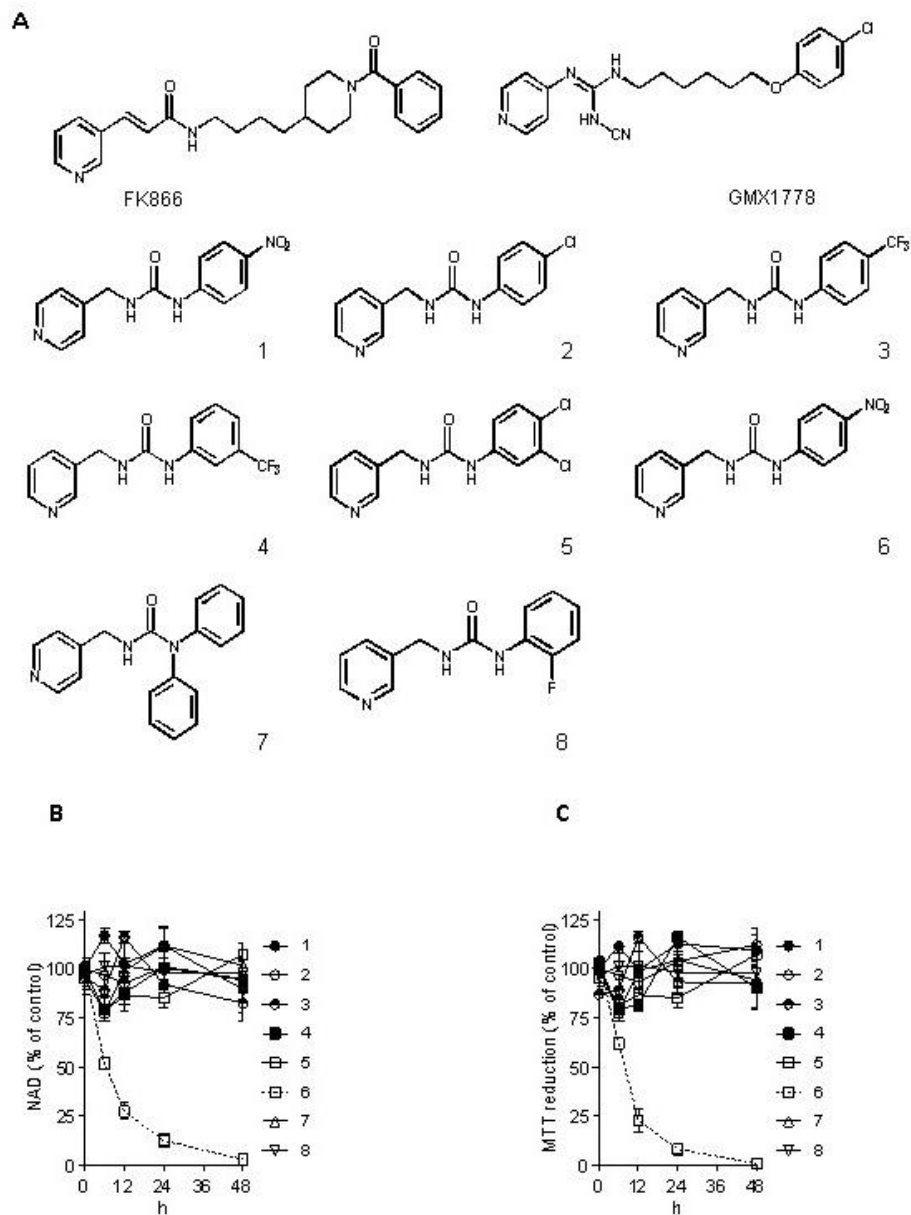


Figura 3. Effetto di differenti composti contenenti una porzione piridinilmetil-ureidica sul contenuto di NAD e sulla sopravvivenza di cellule SH-SY5Y. (A) Formule di struttura dei NAMPT-inibitori prototipici, FK866 e GMX1778, comparate a quelle di altri composti dalla struttura analoga. Il composto 6 è il Vacor. Effetti dei diversi composti (100 μ M) sul contenuto di NAD (B) e sulla sopravvivenza (C) di cellule SH-SY5Y.

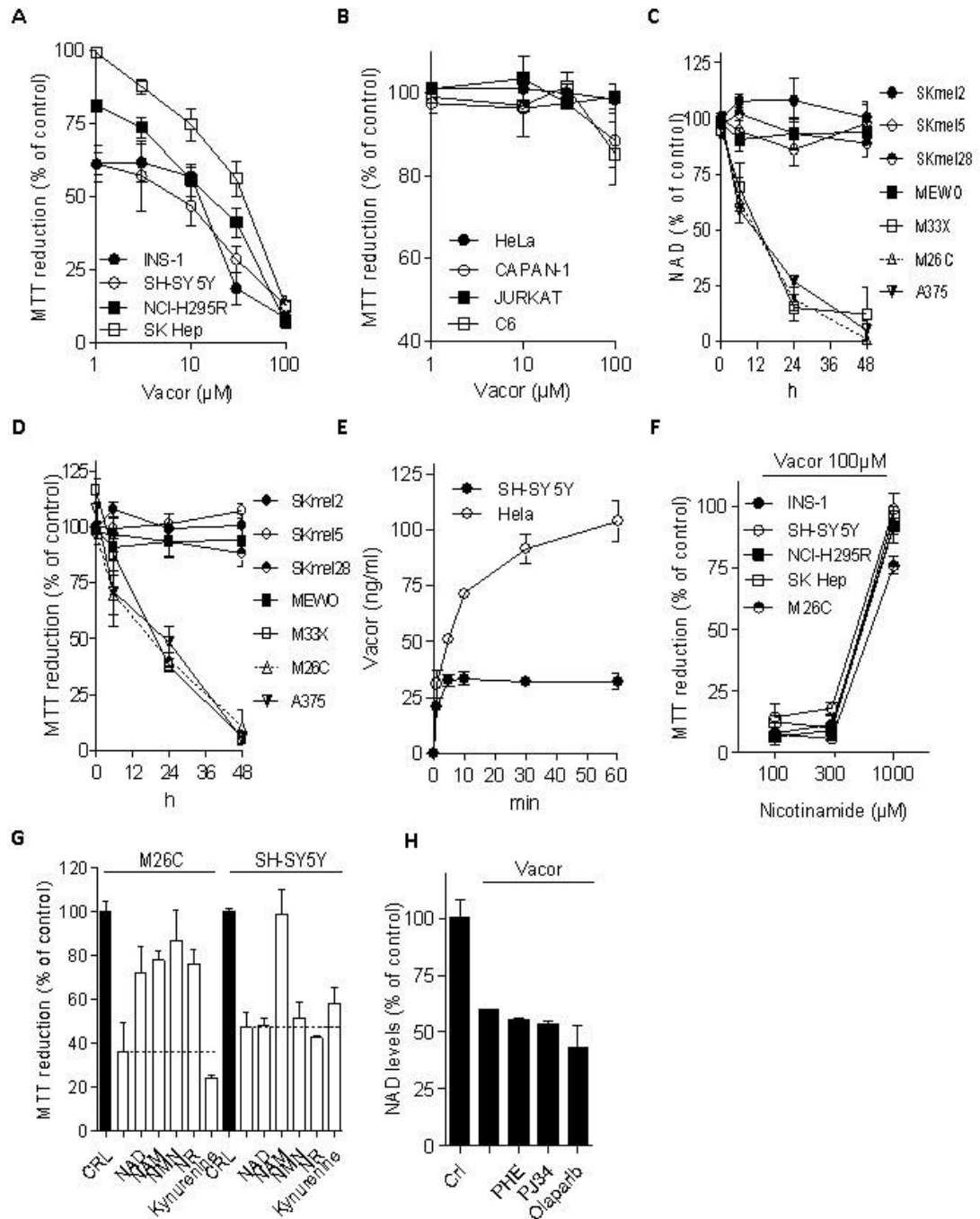


Figura 4. Effetto del Vacor sul contenuto di NAD e sulla sopravvivenza di diverse linee cellulari.

(A-D) Dose-effetto del Vacor su linee cellulari sensibili (A) e insensibili (B) in seguito all'incubazione di 24 h; effetto di 100 μM Vacor nel tempo, sul contenuto di NAD in diverse linee di melanoma (C) e vitalità (D). (E) Concentrazioni intracellulari di Vacor, usato 100 μM, in cellule SH-SY5Y e HeLa. (F) Effetto della NAM sulla citotossicità da Vacor 100 μM/24 h. (G) Effetto di diversi precursori del NAD (1 mM) sulla citotossicità da Vacor 100 μM/24h. (H) Effetto di diversi PARP1-inibitori (PHE 30 μM, PJ34 20 μM and Olaparib 1 μM) sulla deplezione di NAD indotta da Vacor (100 μM/1h) in cellule SH-SY5Y.

Ogni punto/barra rappresenta la media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti.

8.2. Il Vacor non funziona come un classico NAMPT-inibitore

Abbiamo successivamente cercato di caratterizzare la relazione temporale tra la deplezione delle scorte di NAD e la morte cellulare causate dal Vacor, in cellule di neuroblastoma. Come mostrato (Fig. 5A), la caduta del NAD precede la morte cellulare, misurata mediante marcatura con ioduro di propidio (PI), di qualche ora; inoltre, esperimenti condotti con frazionamento cellulare, dimostrano come, in seguito all'esposizione al Vacor e già dopo 1 h, il *pool* citoplasmatico subisca una forte riduzione, mentre quello mitocondriale rimanga pressoché invariato (Fig. 5B). In linea con questo risultato, abbiamo trovato che il potenziale di membrana mitocondriale rimane inalterato nelle SH-SY5Y esposte a Vacor per 1 h (Fig. 5C, D), tempo sufficiente a causare una deplezione di tutto il NAD intracellulare, pari a circa il 50% del totale. Similmente, dopo un'esposizione al Vacor di questa durata, rimane inalterato anche il consumo di ossigeno, che però cambia in maniera significativa in seguito a un'esposizione di 3 h (Fig. 5E, F). Anche la caduta di NADH, il quale si ritrova prevalentemente concentrato nei mitocondri piuttosto che nel citosol, è ritardata rispetto a quella del NAD, dando ulteriore conferma del fatto che l'omeostasi mitocondriale non sia alterata nelle fasi più iniziali dell'esposizione al Vacor (Fig. 5G).

Nonostante l'analogia strutturale esistente tra Vacor e i due classici NAMPT-inibitori, FK866 e GMX1778 (Fig. 1A), suggerisse che la tossicità causata dal Vacor coinvolgesse l'inibizione della NAMPT, il fatto che, tanto la deplezione di NAD, quanto la morte cellulare mostrassero cinetiche più rapide rispetto a quelle di FK866 e GMX1778 (Fig. 5H), ci ha fatto presupporre che la tossicità del Vacor non potesse essere spiegata da una mera inibizione della NAMPT. Tale presupposizione è stata poi confermata dal fatto che NMN, prodotto di reazione della NAMPT, è in grado di prevenire completamente la caduta di NAD causata dai NAMPT-inibitori classici, ma non quella causata dal Vacor (Fig. 5I). Presi insieme, tutti questi risultati, indicano che il trattamento con Vacor ha un impatto sul metaboloma del NAD diverso da quello causato dai classici NAMPT-inibitori, nonostante l'analogia strutturale esistente tra le tre molecole. Inoltre, abbiamo trovato che entrambi, FK866 e GMX1778, sono in grado di prevenire totalmente la deplezione dei *pool* intracellulari di NAD Vacor-indotta (Fig. 5L), risultato che ci ha spinto a meglio indagare la relazione tra il Vacor e i due enzimi del *salvage pathway* del NAD: NAMPT e NMNATs.

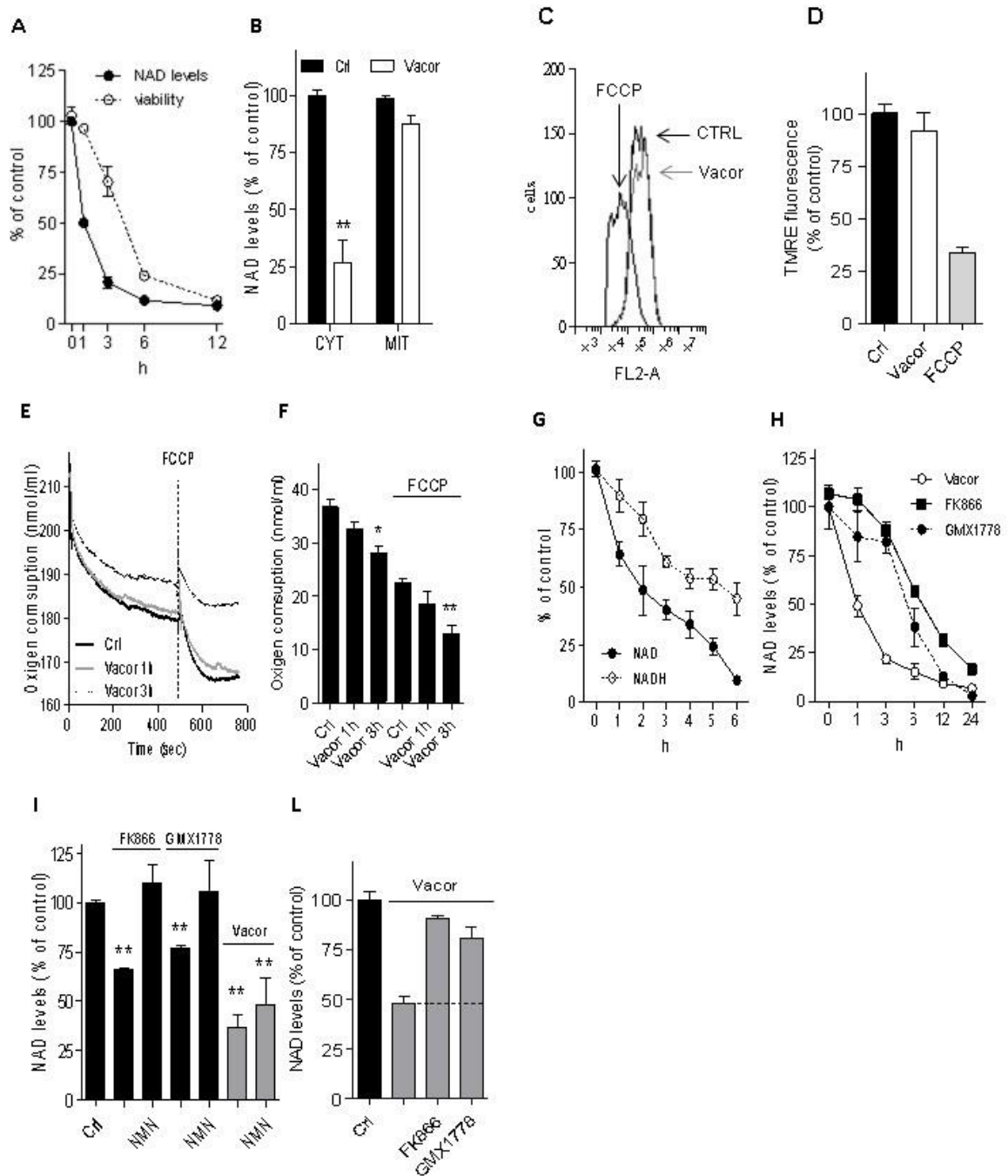


Figura 5. Effetti del Vacor su diversi parametri biochimici e funzionali in cellule SH-SY5Y.

(A) Comparazione delle cinetiche temporali di deplezione del NAD e morte cellulare indotta da Vacor 100 μ M in cellule SH-SY5Y. (B) Contenuto citosolico e mitocondriale di NAD in cellule SH-SY5Y esposte a Vacor 100 μ M/1 h. (C, D) Effetti del Vacor sul potenziale di membrana mitocondriale in cellule SH-SY5Y: analisi citofluorimetrica rappresentativa (C) o quantitativa (D) del potenziale di membrana mitocondriale in cellule di controllo oppure esposte a Vacor (100 μ M/1 h) o FCCP (1 μ M/5 min). (E, F) Analisi del consumo di ossigeno rappresentativa (E) o quantitativa (F) in cellule SH-SY5Y esposte per 1 o 3 h a Vacor 100 μ M. (G) Cinetiche temporali della deplezione di NAD e NADH in cellule SH-SY5Y esposte a Vacor 100 μ M. (H) Comparazione delle cinetiche di deplezione

di NAD in cellule SH-SY5Y esposte a Vacor, FK866 o GMX1778, tutti a 100 μ M. **(I)** Effetto protettivo di NMN 1 mM aggiunto al mezzo di coltura di cellule SH-SY5Y esposte a Vacor, FK866 o GMX1778, tutti a 100 μ M/6 h. **(L)** Effetti di FK866 eGMX1778 (entrambi a 100 μ M) sui contenuti di NAD di cellule SH-SY5Y esposte a Vacor 100 μ M/1 h.

Ogni punto/barra rappresenta la media \pm SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. * p <0.05, ** p <0.01 vs controllo (CRL), ANOVA e *Tukey's post hoc test*.

8.3. Il Vacor è un substrato della NAMPT, che lo metabolizza in VMN

Nonostante le diverse cinetiche con cui il Vacor e i due NAMPT-inibitori classici causino la deplezione del NAD intracellulare, il risultato apparentemente paradossale per cui FK866 e GMX1778 contrastano la caduta di NAD Vacor-dipendente, ci ha comunque suggerito che l'azione di tossificazione del Vacor passi per la NAMPT. In effetti, valutando l'effetto del Vacor sulla NAMPT umana ricombinante, abbiamo trovato che è capace di inibirla con una IC_{50} pari a 400 ± 28 nM (Fig. 6A). Questo risultato, unito alla nozione per cui composti che possono andare incontro a fosforibosilazione possono funzionare da NAMPT-inibitori [164], ci ha indotto a verificare se il Vacor potesse essere substrato della NAMPT. A tale scopo, abbiamo incubato la proteina umana ricombinante, in presenza di Vacor, PRPP e ATP, e trovato, mediante HPLC, la formazione tempo-dipendente di un prodotto di reazione (Fig. 6B); la formazione del prodotto dipende dalla presenza di PRPP, suggerendo che si potesse trattare del mononucleotide del Vacor (VMN). Tale supposizione è stata confermata dall'analisi in LC-MS della mix contenente enzima e substrati, con cui si è confermata la presenza di una molecola con peso molecolare pari a 485.10 Da, (Fig. 6C) corrispondente a quello della forma fosforibosilata del Vacor. Inoltre, nonostante la sintesi di NMN dipendente dalla NAMPT sia accoppiata in modo non obbligatorio all'idrolisi di ATP, che ne aumenta la K_{cat} di sei volte [202], i nostri risultati indicano che la formazione di VMN operata dalla NAMPT avviene con la stessa efficacia catalitica in presenza o in assenza di ATP (Fig. 6Bc). In ogni caso, la V_{max} della formazione di VMN si è dimostrata paragonabile a quella per la formazione di NMN (28 ± 3 nmol/min/mg vs 30 ± 2 nmol/min/mg). Tuttavia, la K_M per il Vacor è al di sotto della soglia di sensibilità nella nostra analisi di HPLC (ovvero minore di $2 \mu M$), motivo per il quale non siamo stati in grado di compararla con la K_M per la NAM, che è nel range del nanomolare [202]. In ogni caso, il fatto che l' IC_{50} del Vacor per la NAMPT sia nell'ordine del nanomolare in presenza di NAM 200 nM, una concentrazione prossima al valore della sua K_M , ci ha suggerito che la NAMPT possa utilizzare NAM e Vacor con simile efficienza catalitica. Sebbene il valore della K_M della NAMPT per NAM sia troppo basso per poterci consentire un'ulteriore e più dettagliata analisi dei meccanismi d'inibizione operati dal Vacor, abbiamo potuto analizzare l'inibizione in confronto al PRPP; in linea con uno studio precedente [202], abbiamo trovato una K_M per PRPP pari a $5 \pm 2 \mu M$. In queste condizioni, Vacor si è comportato come un inibitore competitivo con una K_i di $1.56 \pm 0.8 \mu M$ (Fig. 6D).

Abbiamo successivamente condotto uno studio di *docking* atto a indagare l'interazione, a livello molecolare, tra NAMPT e Vacor; a tal fine, abbiamo utilizzato le coordinate 3D per la NAMPT umana (PDB: 4L4L, risoluzione di 2.12 Å), co-cristallizzata con l'inibitore fosforibosilato GNE-643 [193]. Il risultato ottenuto mostra che, sia per il Vacor che per VMN, la più probabile delle possibili posizioni analizzate nel sito catalitico della NAMPT, è molto simile a quella di FK866 (Fig. 6E); in particolare, i dati suggeriscono che l'anello piridinico del Vacor stabilisca due interazioni π - π con gli anelli aromatici degli amminoacidi Tyr18 e Phe193, mentre sono possibili legami idrogeno tra il gruppo ureidico del Vacor e Asp219 (Fig. 6F). Inoltre, abbiamo trovato che la porzione piridinica del Vacor può assumere una posizione simile a quella dell'anello imidazolico dell'inibitore fosforibosilato GNE-643 (Fig. 6G), dando ulteriore conferma della fosforibosilazione del Vacor trovata con LC-MS.

Questi risultati, insieme, indicano con forza che il Vacor possa funzionare da substrato per la NAMPT e che venga, da questa, fosforibosilato a formare VMN.

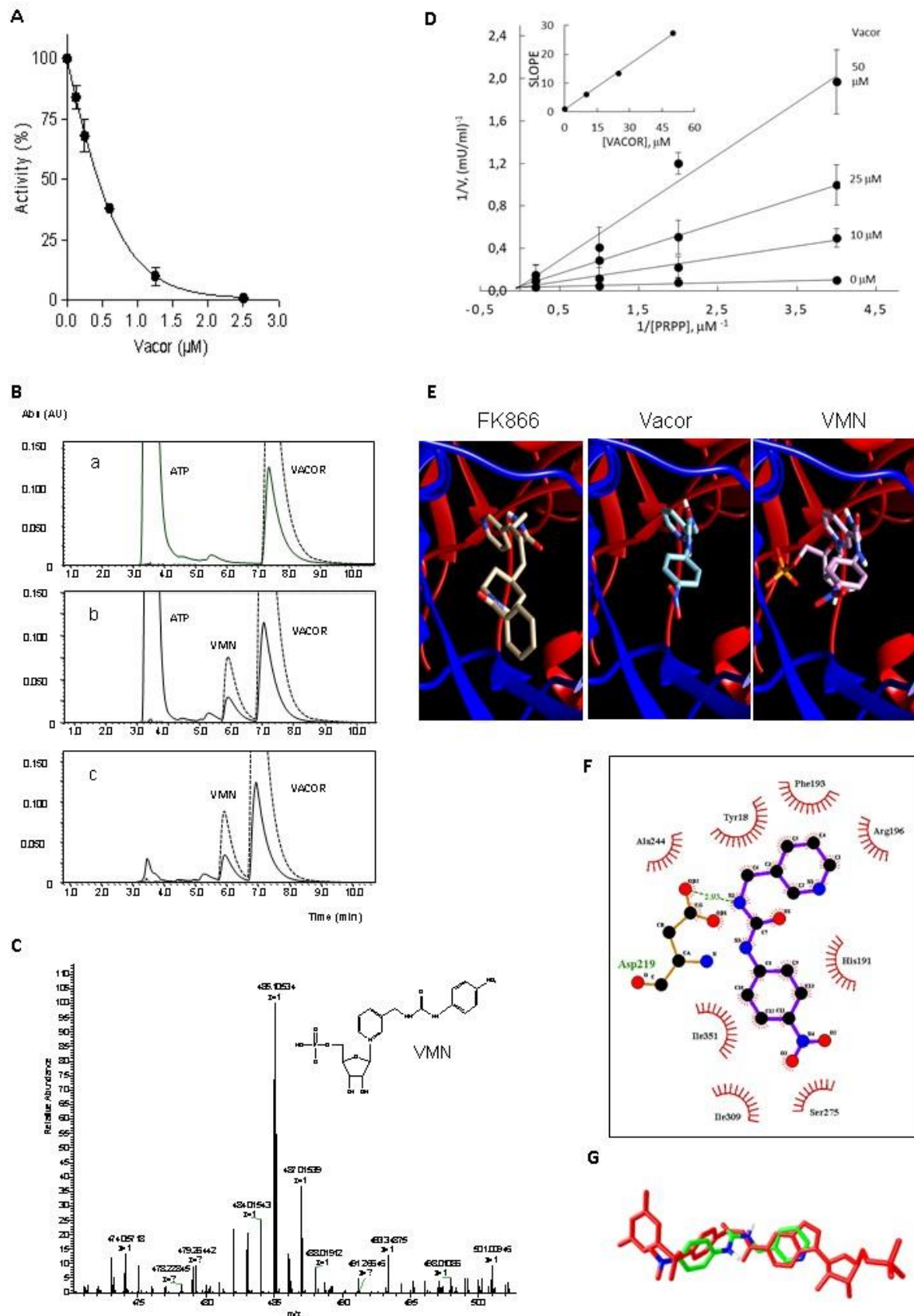


Figura 6. Il Vacor è metabolizzato in VMN dalla NAMPT. (A) Effetto del Vacor sull'attività della NAMPT ricombinante umana. Ogni punto rappresenta la media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato. (B) Profilo HPLC a 260 nm (linea intera) e 340 (linea tratteggiata) della mix di reazione preparata come descritta nei metodi, dopo 0 (a) e 60 (b) min a 37 °C in

presenza (b) e in assenza (c) di 1 mM ATP. **(C)** Spettro di massa di VMN. **(D)** *Plot* di Lineweaver-Burk e *slope replot* (inserto) dell'inibizione causata da Vacor a differenti concentrazioni di PRPP; ogni punto rappresenta la media \pm SEM di due esperimenti. **(E)** Posizioni di *docking* per FK866, Vacor e VMN nel sito catalitico della NAMPT umana. **(F)** Diagramma schematico LigPlot del possibile modello di legame del Vacor nel sito catalitico della NAMPT umana; sono evidenziati tutti gli amminoacidi che interagiscono con il ligando. **(G)** *Docking* del Vacor in confronto alla posizione dell'inibitore cocristallizzato GNE-643 (in rosso) nel sito catalitico della NAMPT umana.

8.4. L'adenilazione di VMN porta alla sintesi di VAD, analogo del NAD

Abbiamo successivamente ritenuto che la sola conversione a VMN non potesse spiegare del tutto la rapida deplezione del NAD intracellulare e morte cellulare causata dall'esposizione al Vacor. In effetti, anche il NAMPT-inibitore classico GMX1778 è fosforibosilato dall'enzima, ma nonostante la sua comprovata efficacia nel causare una deplezione del NAD, tale azione sembra avvenire comunque con cinetiche più lente rispetto a quanto succede con il Vacor (Fig. 5H). Inoltre, il fatto che la tossicità di GMX1778 e FK866 sia completamente prevenuta da NMN, mentre la tossicità da Vacor non lo sia, sono stati per noi ulteriori indizi del fatto che l'inibizione della NAMPT non potesse essere l'unico meccanismo alla base della tossificazione indotta da Vacor. Abbiamo, pertanto, ipotizzato che Vacor e/o VMN fossero in grado di interferire con lo *step* successivo della risintesi del NAD nel *salvage pathway*, vale a dire l'adenilazione catalizzata dalle NMNATs; abbiamo quindi incubato VMN con ognuna delle tre isoforme dell'enzima, in presenza di ATP e trovato che, solamente in presenza di NMNAT2 o NMNAT3, si forma un prodotto di reazione che abbiamo visualizzato in HPLC (Fig. 7A). L'analisi in LC-MS del picco ha confermato che si tratta della forma adenilata del VMN, e quindi di Vacor adenina dinucleotide, VAD (Fig. 7B). Se paragonata alla reazione di adenilazione avente NMN come substrato, l'adenilazione di VMN operata da NMNAT2 e NMNAT3 corrisponde allo $0.6 \pm 0.08\%$ e $0.04 \pm 0.006\%$, rispettivamente. Inoltre, le cinetiche delle reazioni catalizzate da NMNAT2 mostrano che l'affinità per VMN è 10 volte minore rispetto a quella per NMN, mentre l'efficienza catalitica della formazione del VAD è circa 2000 volte inferiore a quella del NAD (Fig. 7C). Successivamente, testando la capacità del VAD di inibire le tre isoforme umane ricombinanti di NMNAT, abbiamo trovato che esso è in grado di inibire NMNAT2 e NMNAT3 con una IC_{50} di $20 \pm 2 \mu M$ e $463 \pm 99 \mu M$, rispettivamente, mentre risulta non avere effetto sulla NMNAT1 (Fig. 7D).

Sulla base di questi risultati, e al fine di poter determinare il sito di *binding* del VAD sulla NMNAT2 umana, ci siamo avvalsi del *comparative modeling*, dal momento che non sono disponibili strutture cristallizzate; l'analisi del *docking*, mostra come il VAD possa alloggiare in un possibile sito di legame (Fig. 7E) in maniera simile a quanto riportato per il NAD co-cristallizzato con NMNAT1 [203], in seguito alla formazione di legami idrogeno con i gruppi R degli amminoacidi His24 (già noto per essere essenziale per l'attività catalitica [204], Tyr50 e Ser265, oltre che con la catena principale di Ile9, Leu207 e Asn209 (Fig. 7F). Inoltre, il confronto tra le strutture di questo nuovo modello di NMNAT2 umana e quelle

dei cristalli di NMNAT1 umana [203] e NMNAT3 [205], ottenuto per sovrapposizione in 3D, sottolinea l'esistenza sul dominio carbossi-terminale di una sequenza in NMNAT1, che si ripiega sul sito di legame al substrato, non allineata con quella di NMNAT2 e NMNAT3; questa sequenza di 16 amminoacidi può interagire con il sito catalitico, regolandone l'accesso al substrato o l'attività catalitica. Infine, gli ultimi sette amminoacidi di questa sequenza possono interagire direttamente con il VAD; in questo modo possiamo, almeno in parte, spiegare l'inibizione selettiva del VAD per NMNAT2 e NMNAT3, e non per NMNAT1.

Abbiamo successivamente investigato gli effetti del VAD sull'attività catalitica di sintesi del NAD di NMNAT2 a varie concentrazioni di NMN e a concentrazione fissa e saturante di ATP. Il *plot* di Lineweaver-Burk ottenuto suggerisce un'inibizione di tipo mista (Fig. 7G). Re-plottando le *slope* e le intercette contro diverse concentrazioni dell'inibitore, abbiamo ottenuto curve concave (Fig. 7G, inserto) che indicano un'inibizione di VMN su più siti, caratterizzata dal legame contemporaneo di più molecole di inibitore [191]. Analizzando i dati ottenuti, e ricercando un *fitting* per le velocità di reazione, abbiamo trovato, per NMN una K_M di $14 \pm 6 \mu\text{M}$, per VMN una K_i per l'enzima libero pari a $203 \pm 25 \mu\text{M}$ e per il complesso enzima-substrato (ES) una K_i leggermente più alta (αK_i $244 \pm 30 \mu\text{M}$).

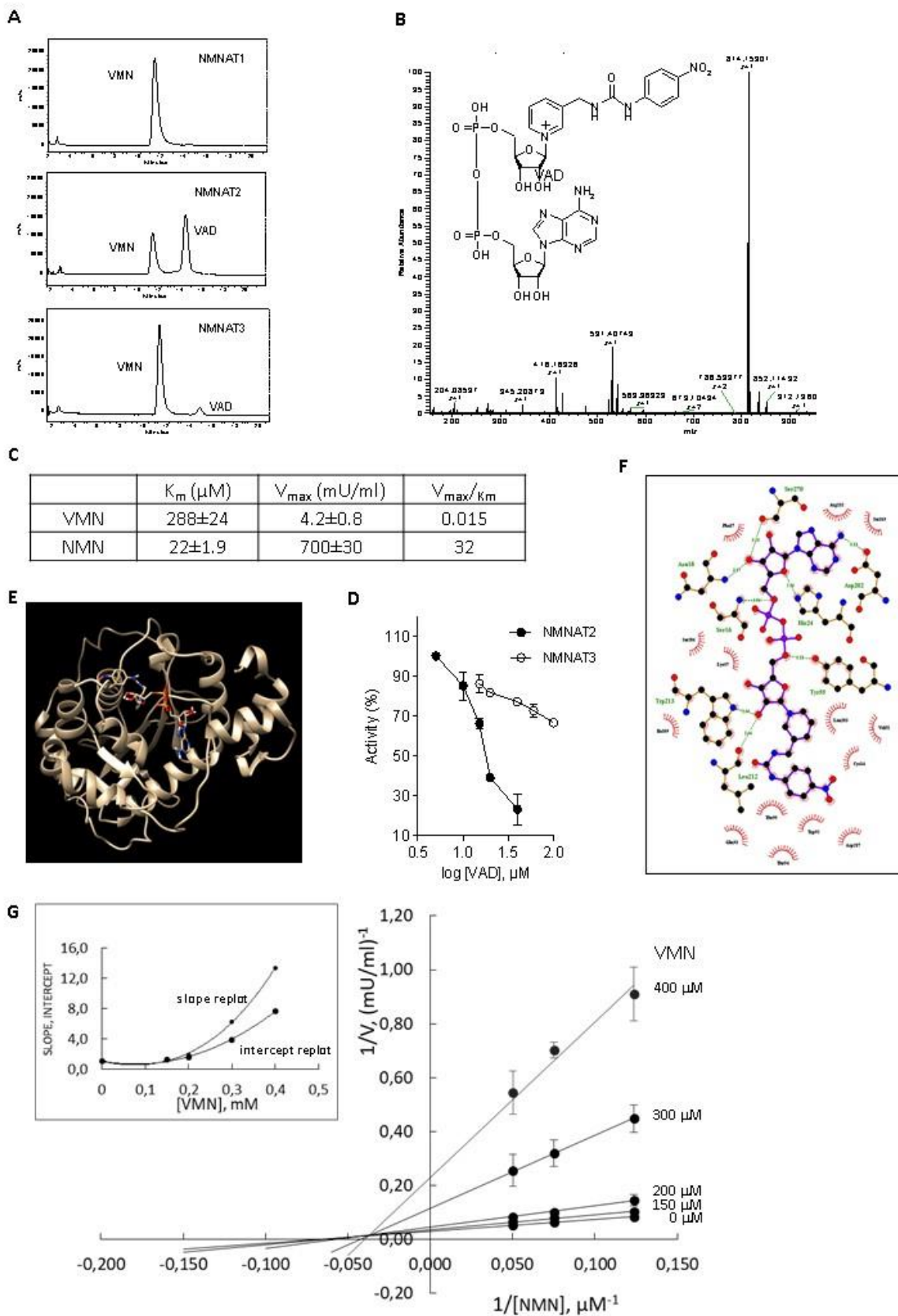


Figura 7. VMN è convertito in VAD da NMNAT2. (A) Profili HPLC a 340 nm della mix di reazione preparata come descritta nei metodi. (B) Spettro di massa del VAD. (C) Analisi cinetiche dell'attività di sintesi di NAD e VAD dell'enzima NMNAT2. (D) Effetto del VAD sulle isoforme ricombinanti

umane di NMNAT2 e NMNAT3. **(E)** *Docking* della probabile posizione di Vacor nel modello di NMNAT2. **(F)** Diagramma schematico LigPlot del possibile modello di legame del VAD nel sito catalitico della NMNAT2 umana; sono evidenziati tutti gli amminoacidi che interagiscono con il ligando. **(G)** *Plot* di Lineweaver-Burk e *slope replot* (inserto) dell'inibizione causata da VMN a differenti concentrazioni di NMN; ogni punto rappresenta la media \pm SEM di due esperimenti.

In teoria, essendo bassa l'efficienza catalitica di NMNAT2 con VMN come substrato, in condizioni omeostatiche, l'adenilazione di NMN dovrebbe prevalere su quella di VMN. Abbiamo così esposto diverse linee cellulari al Vacor, al fine di cercare l'eventuale formazione di metaboliti del Vacor. Abbiamo trovato un aumento nelle concentrazioni di VMN e VAD, tempo-dipendente, nelle cellule sensibili SH-SY5Y; mentre, nelle cellule HeLa, insensibili al Vacor, abbiamo trovato solamente bassissime concentrazioni di VMN e praticamente nessuna traccia di VAD (Fig. 8A). Inoltre, nelle SH-SY5Y, il Vacor causa una rapida caduta delle concentrazioni di NMN la quale precede quella del NAD; ancora, questo effetto non è stato osservato nelle HeLa (Fig. 8B). Quanto trovato, quindi, suggerisce che, nelle cellule sensibili esposte al Vacor, l'inibizione della NAMPT, causata da VMN, provochi una rapida caduta di NMN, permetta l'adenilazione di VMN e la conseguente formazione di VAD, nonostante la minore efficienza catalitica di NMNAT2 con VMN anziché NMN come substrato.

Insieme, questi risultati rafforzano l'ipotesi secondo cui l'efficacia nella tossificazione provocata dal Vacor dipenda dalla sua conversione nei due *step* consecutivi del *salvage pathway*, a VMN prima, per azione della NAMPT, e a VAD poi, grazie alla catalisi NMNAT2-dipendente. Al fine di ulteriormente corroborare tale assunzione, abbiamo dimostrato come la sensibilità al Vacor sia associata a maggiori livelli di espressione dell'mRNA di NMNAT2, ma non di NMNAT1 (Fig. 8C, D); inoltre, il VAD mostra gli stessi effetti citotossici quando aggiunto al mezzo di coltura delle SH-SY5Y o delle HeLa (Fig. 8E), suggerendo la capacità di VAD di entrare nella cellula e, insieme, che la non-sensibilità al Vacor dipenda soltanto dalla incapacità della cellula di metabolizzarlo a VAD.

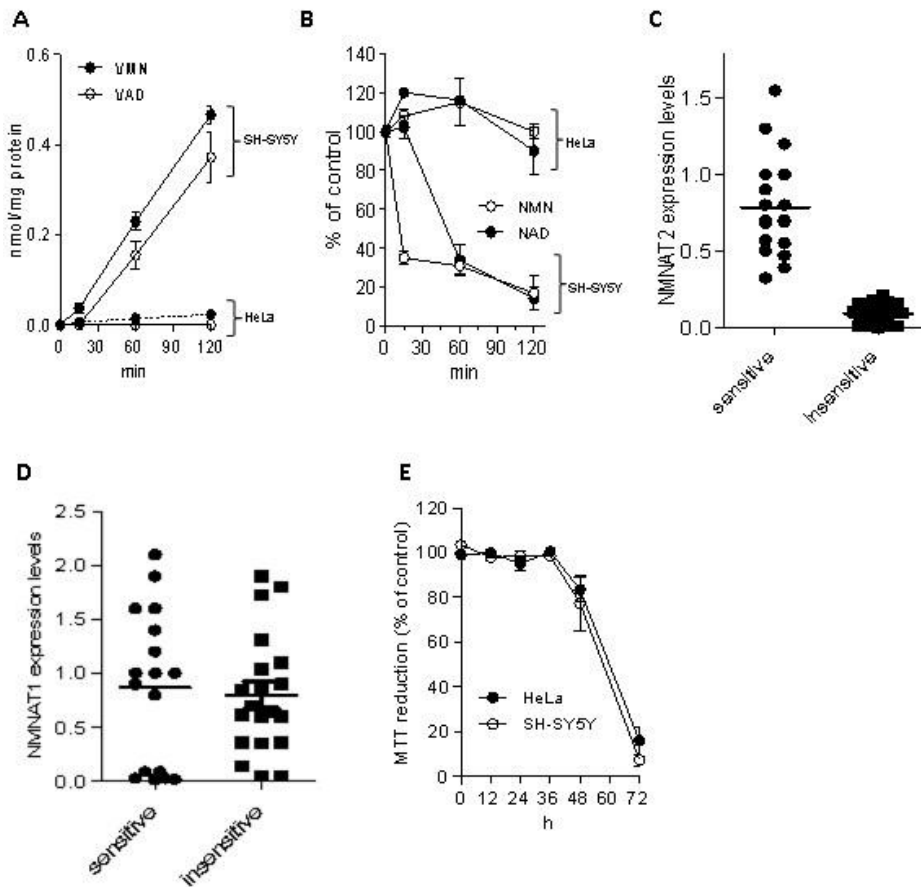


Figura 8. Effetti del VAD sulla sopravvivenza cellulare. (A) Contenuti intracellulari di VMN e VAD in cellule SH-SY5Y o HeLa esposte a Vacor 100 μ M. (B) Contenuti intracellulari di NMN e NAD in cellule SH-SY5Y e HeLa esposte a Vacor 100 μ M. (C, D) livelli di espressione di NMNAT1 (C) e NMNAT2 (D) in linee cellulari sensibili e insensibili al VAcor. I valori mostrati rappresentano i risultati di un'unica quantificazione in qPCR. (E) Effetti di VAD 100 μ M aggiunto al terreno di coltura sulla vitalità cellulare di cellule SH-SY5Y e HeLa. Ogni punto rappresenta la media \pm SEM di almeno tre esperimenti.

8.5. Il VAD compromette il metabolismo energetico e causa la necrosi

Data la simile struttura di VAD e NAD, abbiamo supposto che il primo potesse compromettere l'attività di enzimi NAD-dipendenti, comportandosi come un falso cofattore enzimatico, in maniera simile a quanto accade alla tiazofurina [206]. Per corroborare questa ipotesi, abbiamo testato gli effetti del Vacor su due enzimi coinvolti nella proliferazione e nel metabolismo energetico, rispettivamente IMPDH e GAPDH. È notevole che VAD sia in grado di inibire entrambi gli enzimi in maniera dose-dipendente (Fig. 9B) con una IC_{50} pari a $52.2 \pm 6 \mu\text{M}$ per IMPDH e $120 \pm 21 \mu\text{M}$ per GAPDH; andando poi ad indagare il tipo di inibizione causata dal VAD sulla GAPDH, anche in questo caso, abbiamo trovato un *plot* di Lineweaver-Burk, *slope* e intercette corrispondenti a quelle di un'inibizione di tipo misto (Fig. 9A). Il valore della K_i del VAD per l'enzima libero che abbiamo trovato è di $85 \pm 7 \mu\text{M}$, un valore solo 3 volte più alto della K_M dell'enzima per il NAD ($28 \pm 8 \mu\text{M}$); la K_i del VAD per il complesso ES, ovvero la αK_i , è invece pari a $29 \pm 10 \mu\text{M}$, un valore praticamente uguale alla K_M per il NAD e che indica che l'inibitore mostra un'affinità 3 volte maggiore per il complesso ES che per l'enzima libero. Queste evidenze, indicanti l'inibizione della GAPDH dipendente dal VAD, unite alla deplezione concomitante del NAD, suo cofattore, suggeriscono che la glicolisi sia gravemente rallentata e/o compromessa nelle cellule esposte a Vacor. A supporto di tale ipotesi, abbiamo trovato una riduzione lineare e tempo-dipendente dei prodotti di reazione ATP, lattato -per la glicolisi- e CO_2 - per il ciclo di Krebs- (Fig. 9C). Infine, abbiamo cercato di capire che tipo di morte cellulare sia causata dal Vacor, data la sua unica capacità di bersagliare contemporaneamente NAMPT e NMNAT2, di causare una rapida deplezione di NAD e ATP, di inibire le deidrogenasi NAD-dipendenti e, almeno teoricamente, altri enzimi NAD-dipendenti. I risultati mostrano che la cinetica con cui le cellule esposte al Vacor vanno incontro a morte, è assai simile a quella rapida mostrata dalle cellule trattate con Na-azide, tipico induttore di necrosi, mentre la cinetica della morte dipendete da staurosporina, tipico induttore dell'apoptosi, è più lenta (Fig. 9D). Inoltre, a conferma di ciò, la marcatura con l'Hoechst *staining* (Thermo Fisher Scientific, USA) dimostra che i nuclei delle cellule esposte al Vacor vanno incontro a picnosi in maniera simile a quanto accade a quelle esposte a Na-azide, senza mostrare la frammentazione indotta invece dalla staurosporina e caratteristica dei fenomeni apoptotici (Fig. 9E).

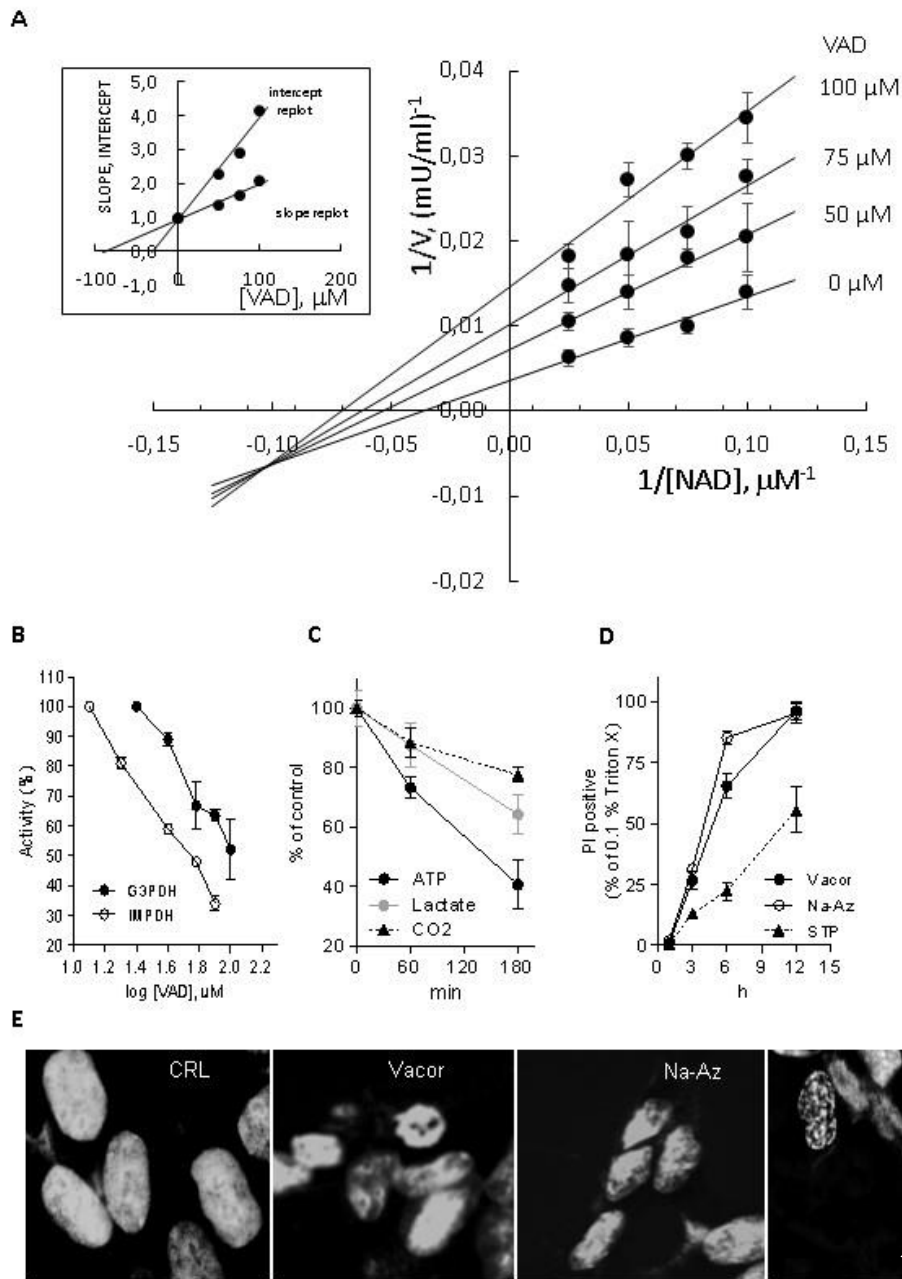


Figura 9. Effetti del Vacor sull'attività delle deidrogenasi e sulla morte cellulare. (A) Plot di Lineweaver-Burk e *slope replot* (inserto) dell'inibizione causata da VAD a differenti concentrazioni di NAD; ogni punto rappresenta la media \pm SEM di due esperimenti. **(B)** Effetti di VAD sull'attività di GAPDH e IMPDH ricombinanti umane. **(C)** Cinetiche temporali degli effetti di Vacor 100 μM in cellule SH-SY5Y sui contenuti intracellulari di ATP e lattato e sulla produzione di CO₂. **(D)** *Time-course* della morte in cellule esposte a Vacor (100 μM), NaAz (1 mM) e staurosporina (300 nM). **(E)** *Hoechst staining* di cellule in cellule esposte per 3 h a Vacor (100 μM), NaAz (1 mM) e staurosporina (300 nM). Barra di calibrazione, 10 μm .

8.6. Il metabolismo del Vacor ha effetti antineoplastici *in vivo*

Incoraggiati dagli effetti citotossici che il Vacor ha mostrato *in vitro*, abbiamo testato il suo potenziale antineoplastico *in vivo*. Abbiamo trovato che il Vacor, iniettato per via intraperitoneale (i.p.) alla dose di 40 mg/kg ogni 4 giorni, a partire da quando il tumore fosse diventato palpabile (i.e. intorno a 0.1 cm³), riduce in maniera significativa la crescita dello xenotrapianto di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, in topi nudi (Fig. 10A). Abbiamo successivamente testato la capacità di un trattamento ritardato di Vacor di contrastare la crescita del tumore; a tale scopo, abbiamo trattato topi nudi, sottoposti a xenotrapianto di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, mediante iniezioni i.p. giornaliere di Vacor alla dose di 20 mg/kg, solo quando il volume del tumore avesse raggiunto un volume pari a 0.5 cm³. Il risultato indica che anche questo tipo di trattamento riduce la crescita del tumore (Fig. 10B). Ancora, un trattamento equivalente al primo (i.e. iniezioni i.p., 40 mg/kg ogni 4 giorni da quando il tumore fosse stato palpabile), riduce in maniera significativa anche la crescita dello xenotrapianto di melanoma (Fig. 10C). A questi dosaggi, il Vacor non causa alterazioni né nel peso del topo, né nella glicemia, indicando una buona tollerabilità e l'assenza di tossicità sistemica (Fig. 10D, E). È interessante che, sia nel neuroblastoma che nel melanoma, i livelli di espressione della NMNAT2 sono aumentati *in vivo*, per poi tornare a livelli originariamente trovati *in vitro* 10 giorni dopo la rimessa in coltura (Fig. 10F); sebbene i meccanismi alla base di tale aumentata espressione non siano noti, un'ipotesi plausibile sarebbe quella per cui l'aumento è, almeno in parte, correlato a una maggiore attivazione del promotore del gene causata dal microambiente del tumore.

Successivamente, per indagare il metabolismo del Vacor *in vivo*, ne abbiamo quantificato i livelli - come pure quelli del VAD-, negli xenotrapianti di neuroblastoma, in topi trattati per 5 giorni con Vacor (20 mg/kg, i.p.). Abbiamo trovato sia Vacor che VAD nelle masse tumorali degli xenotrapianti, con delle concentrazioni pari 278 ± 35 e 2.83 ± 0.11 pmol/mg, rispettivamente. Per avere ulteriore conferma di questi risultati, abbiamo utilizzato l'*imaging* in spettrometria di massa per Vacor e metaboliti adenilati, e trovato che Vacor e AMP (*marker* tipico del tessuto necrotico) co-localizzano all'interno della regione della massa tumorale andata incontro a necrosi, mentre ATP si trova invece nella regione vitale della massa dello xenotrapianto (Fig. 10G); non siamo invece riusciti a ottenere segnale per VMN e VAD, probabilmente a causa della loro concentrazione al di sotto della sensibilità del nostro *assay*.

Insieme, questi risultati dimostrano l'efficacia antineoplastica del Vacor, sia nel neuroblastoma che nel melanoma, nel ridurre la crescita del tumore; inoltre, tali risultati indicano che il Vacor si localizza all'interno della massa tumorale, in cui viene metabolizzato a VAD e il quale può poi esercitare i suoi effetti antineoplastici.

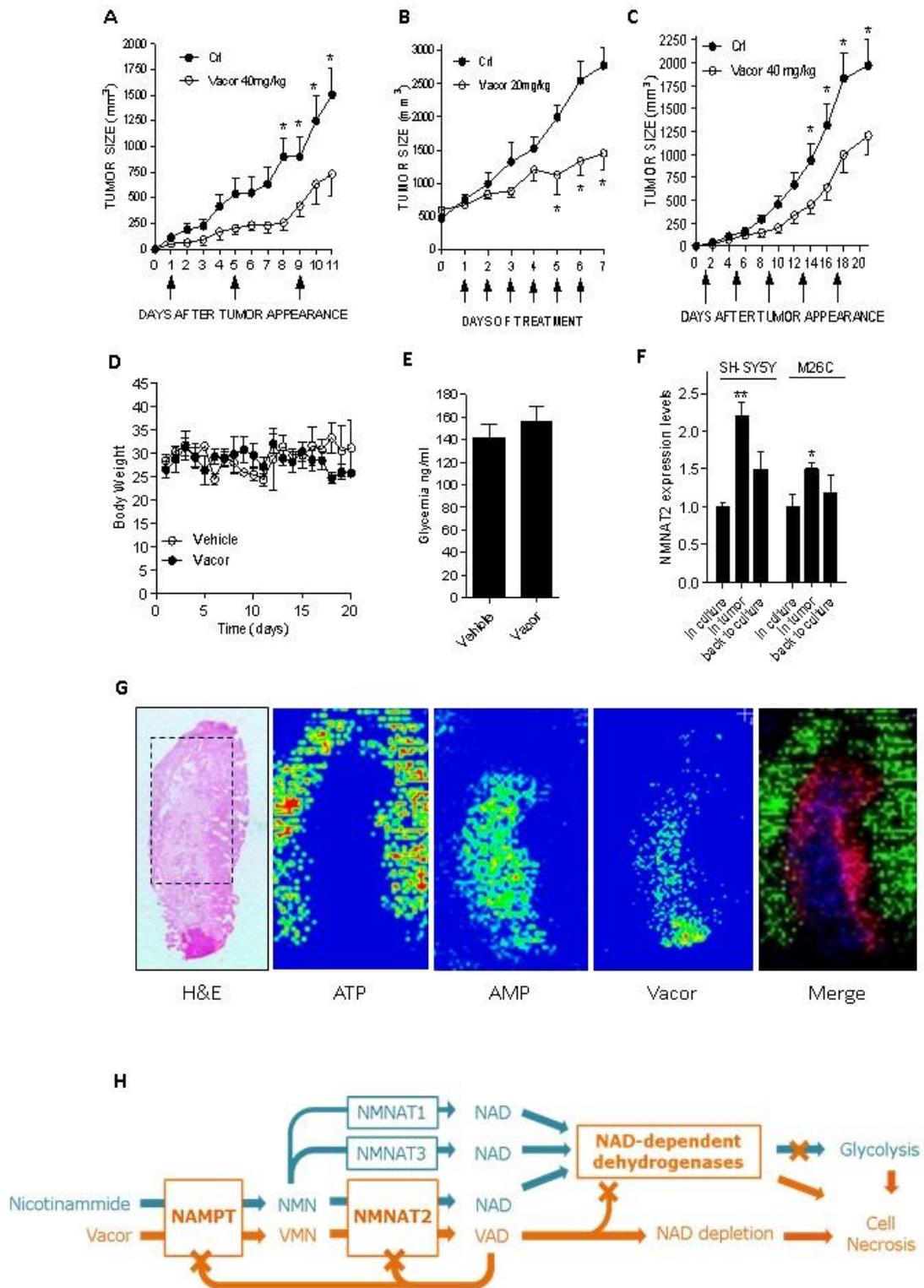


Figura 10. Il Vacor riduce la crescita di xenotrapianti di melanoma e neuroblastoma. (A) Cinetiche temporali relative alla crescita di xenotrapianti di cellule SH-SY5Y in topi nudi (12 topi femmina per gruppo), trattate con veicolo (DMSO) o Vacor (40 mg/kg) ogni 4 giorni, a partire dal giorno in cui il tumore diventava palpabile. (B) Cinetiche temporali relative alla crescita di xenotrapianti di cellule

SH-SY5Y in topi nudi (5 topi femmina per gruppo), trattate giornalmente con veicolo (DMSO) o Vacor (20 mg/kg), a partire dal giorno in cui il tumore raggiungeva un volume pari a 0.5 cm³. **(C)** Cinetiche temporali relative alla crescita di xenotrapianti di cellule M26c in topi nudi (14 topi femmina per gruppo), trattate con veicolo (DMSO) o Vacor (40 mg/kg) ogni 4 giorni, a partire dal giorno in cui il tumore diventava palpabile. **(D-E)** Effetti della somministrazione di 3 settimane di Vacor (40 mg/kg/4 giorni) sul peso corporeo e sulla glicemia in topi nudi (n= 5 per gruppo). **(F)** Livelli di espressione di NMNAT2 in cellule SH-SY5Y e M26c in coltura, negli xenotrapianti, e rimesse in coltura per 7 giorni. **(G)** Colorazione con ematossilina-eosina di uno xenotrapianto di cellule di neuroblastoma che mostra la regione esterna, vitale, e il *core* necrotico. L'inserto è relativo alla regione analizzata mediante *MS-imaging* per la distribuzione di ATP, AMP e Vacor. **(H)** Schematizzazione del *pathway* metabolico coinvolto nella tossificazione operata da Vacor.

8.7. NMNAT2 è over-espressa in melanomi umani

Sapendo che NAMPT e NMNAT2 sono espresse a livelli più alti in alcune linee di cellule tumorali e supponendo che questa caratteristica potesse essere sfruttata come *marker* positivo di sensibilità al Vacor, abbiamo voluto indagare i livelli di espressione dei due enzimi nel tessuto umano tumorale. A tal fine, ci siamo avvalsi di biopsie di melanoma umano, gentilmente forniteci da Gianni Gerlini (Medlight, Firenze), derivanti da tre diversi pazienti. L'analisi del trascritto in PCR ha rivelato che, in maniera analoga a quanto accade per le linee cellulari di melanoma testate *in vitro*, i melanomi umani, se paragonati a melanociti umani non trasformati usati come controllo, esprimono livelli di mRNA pari a 370 ± 24 vs 3.83 ± 1.46 , per NAMPT e pari a 249 ± 43 vs 1.42 ± 0.23 per NMNAT2, rispettivamente (Fig. 11A).

In maniera analoga, abbiamo effettuato l'analisi su quattro campioni di biopsie umane fissate in paraffina, gentilmente forniteci da Vincenza Maio (AOU-Careggi, Firenze). Anche in questo caso abbiamo trovato un aumento, sebbene più modesto, dell'espressione dell'enzima NMNAT2, rispetto ai melanociti usati come controllo, pari a 10.3 ± 3.4 vs 1.00 ± 0.35 (Fig. 11B).

Questi risultati suggeriscono l'effettiva possibilità che, nell'uomo, l'aumento dell'espressione degli enzimi del *salvage pathway* del NAD possa essere usato come *marker* e, insieme a ulteriori esperimenti ancora in corso, potrebbero fornire un ulteriore razionale nell'utilizzo della via di recupero del NAD come nuova via di tossificazione nei melanomi umani.

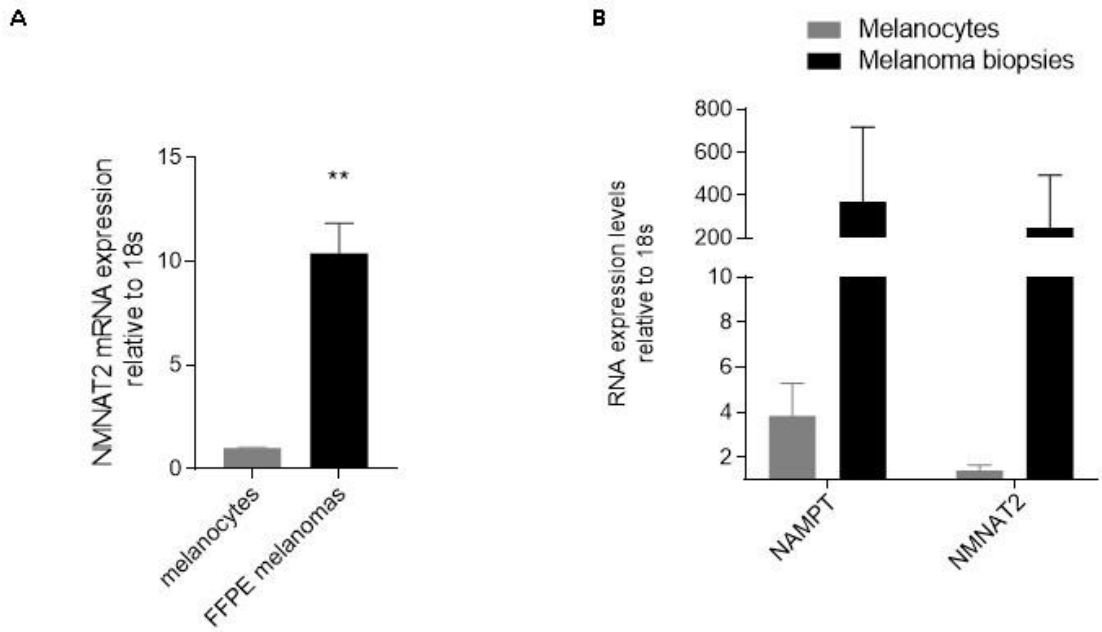


Figura 11. Livelli di espressione degli enzimi del *salvage pathway* in biopsie umane di melanoma.

(A) Livelli di espressione di NMNAT2, in biopsie FFPE di melanomi umani, comparati a melanociti di controllo (n= 3 per ogni gruppo). **(B)** Livelli di espressione di NAMPT e NMNAT2 in biopsie umane di melanoma, non fissate, comparate a melanociti di controllo (n=3 per ogni gruppo). I valori mostrati rappresentano i risultati di un'unica quantificazione in qPCR.

** $p < 0.01$ Tukey's post hoc test.

8.8. UPF2616 e UPF2619 sono potenti analoghi del Vacor

Infine, incoraggiati dai risultati positivi ottenuti nei trattamenti con Vacor, abbiamo cercato di capire se potessimo trovare molecole la cui struttura fosse analoga a quella del Vacor, e che si potessero dimostrare più potenti o selettive del Vacor stesso. Da uno *screening* comprendente un totale di quattordici composti ureidici (Fig. 12A), di cui otto trovati in commercio e sei (UPF) forniti da Emidio Camaioni (Università degli Studi di Perugia), abbiamo individuato due molecole (entrambe sintetizzate nel laboratorio del Prof. Camaioni), UPF2616 e UPF2619 che hanno dimostrato di possedere azione tumoricida maggiore rispetto al Vacor stesso. Nello specifico, il composto UPF2619 ha mostrato di possedere già alla concentrazione di 10 μM e in seguito a un'esposizione di 24 h in cellule SH-SY5Y, la stessa tossicità che il Vacor possiede alla concentrazione di 100 μM (Fig. 12B); similmente, il composto UPF2616 in seguito a un'esposizione di 48 h nelle medesime cellule, mostra alla concentrazione di 10 μM la stessa tossicità che il Vacor possiede alla concentrazione di 30 μM (Fig. 12C).

Sebbene questi risultati possano essere promettenti e suggerire l'esistenza di possibili analoghi del Vacor più potenti, è pur vero che questi sono risultati preliminari e che l'esatto meccanismo d'azione di queste molecole, sebbene teoricamente medesimo a quello del Vacor, non è ancora stato indagato.

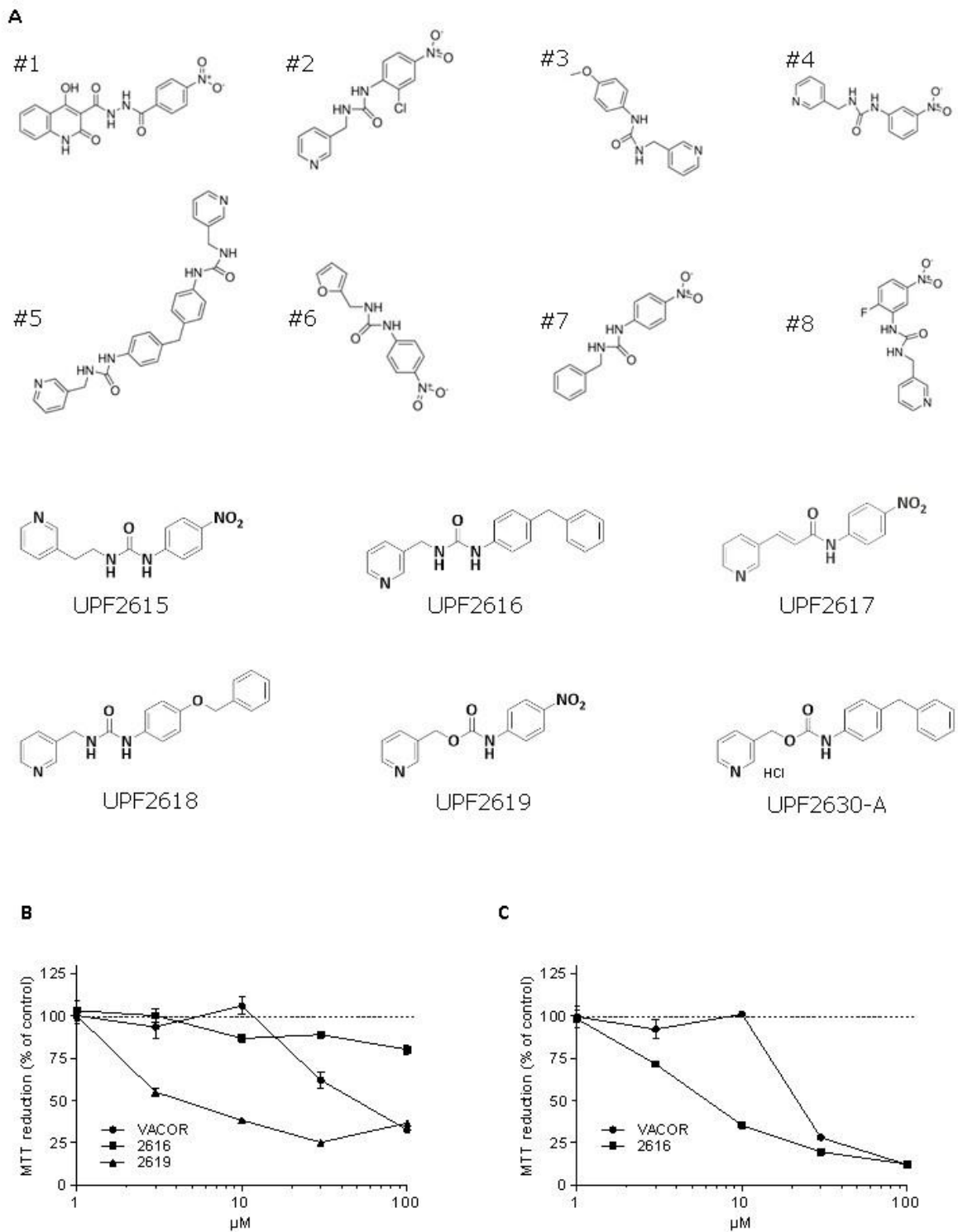


Figura 12. Identificazione di potenti analoghi del Vacor.

(A) Formule di struttura di alcuni composti contenenti gruppi ureidici disponibili in commercio (#1-8) e sintetizzati in laboratorio (UPFs). **(B)** Comparazione degli effetti di un'esposizione di 24 h sulla vitalità cellulare, in cellule SH-SY5Y trattate con Vacor, UPF2616 o UPF2619, (tutti a 100 µM).

(C) Comparazione degli effetti di un'esposizione di 48 h sulla vitalità cellulare, in cellule SH-SY5Y trattate con Vacor o UPF2616 (entrambi a 100 µM). Ogni punto rappresenta la media ± SEM di 3 esperimenti condotti in duplicato.

9. Discussione

Il presente studio dimostra in maniera originale che l'intero *salvage pathway* con cui la NAM è riconvertita in NAD, può essere utilizzato come nuova via di tossificazione per la sintesi di nuovi antimetaboliti, con molteplici effetti sul metabolismo cellulare. In particolare, le evidenze qui riportate mostrano come l'azione coordinata e consequenziale degli enzimi del *salvage pathway*, NAMPT e NMNAT2, trasformi il Vacor in VMN e quindi in VAD, molecole che mimano i metaboliti del NAD, causando così il rapido sconvolgimento del metaboloma del NAD; questa nuova via di tossificazione (Fig. 10H) causa la necrosi in numerose linee cellulari esprimenti NMNAT2 ed esercita un'attività tumoricida anche *in vivo*. I farmaci NAMPT-inibitori che hanno raggiunto la clinica causano una caduta dei livelli di NAD abbastanza lenta se paragonata a quella causata dal Vecor, e non è ancora chiarito, ad oggi, se queste cinetiche siano dovute ad un più lento consumo del *pool* intracellulare oppure alla capacità di altri *pathway* biosintetici (i.e. *de novo* o Preiss-Handler) di bypassare l'inibizione e rifornire la cellula di altro NAD. I nostri dati mostrano che il Vacor sia l'unico composto finora noto che, attraverso la sua trasformazione nei propri metaboliti mono- e dinucleotidici, causi l'inibizione contemporanea della NAMPT e della NMNAT2; inoltre, i nostri risultati suggeriscono che, almeno in alcuni tipi di cellule, il *turnover* del NAD è straordinariamente rapido. Ancora, il fatto che il *pool* mitocondriale sia, nelle prime fasi, risparmiato dalla tossificazione Vacor-indotta che causa nelle stesse cellule una successiva e profonda deplezione di NAD, conferma il risultato di un precedente studio [97] secondo cui il metabolismo mitocondriale del NAD sia, funzionalmente, in parte indipendente da quello citoplasmatico. Inoltre, i risultati circa la trasformazione di VMN in VAD operata dalla NMNAT2, e circa la sua successiva inibizione, aggiungono dettagli nella conoscenza dell'enzimologia del NAD; ancora, la selettività del VAD per NMNAT2 dà informazioni rilevanti per una migliore comprensione della struttura dell'enzima e della sua attività catalitica; informazioni, queste, eventualmente utilizzabili per la ricerca e/o la sintesi di nuovi farmaci NMNAT-inibitori con potenziale attività antineoplastica.

Ad oggi, non ci è noto quanto sia rilevante la possibile inibizione di ogni enzima NAD-dipendente ai fini degli sconvolgimenti metabolici causati dalla tossificazione del Vacor; sarebbe, quindi, opportuno caratterizzare la sensibilità delle NAD-deidrogenasi e degli enzimi che consumano NAD ad antimetaboliti simili al VAD. In ogni caso, la grande importanza della glicolisi aerobica nella biologia del tumore e la capacità del VAD di inibire

l'enzima glicolitico chiave GAPDH, sottolineano la rilevanza del Vacor e di eventuali analoghi come possibili antimetaboliti. In questo contesto, però, bisogna ancora valutare due aspetti cruciali per ogni terapia antineoplastica, vale a dire selettività per il tumore e tollerabilità. Riguardo al primo aspetto, ovvero alla selettività, sebbene eventuali farmaci analoghi del Vacor si supponga che siano selettivi per i tumori esprimenti NMNAT2 (che potrebbe, pertanto, essere sfruttato come *marker* di sensibilità), composti disegnati per essere metabolizzati da NMNAT1 e NMNAT3 potrebbero avere un diverso spettro di attività. Per quanto riguarda, invece, l'aspetto della tollerabilità di questi composti, alla luce dei diversi e specifici ruoli che l'omeostasi del NAD gioca in tessuti differenti, sarà importante capire se l'utilizzo di strategie farmacologiche capaci di minimizzare la tossicità sistemica dei farmaci NAMPT-inibitori, come vie di somministrazione specifiche, paradigmi di trattamento e/o antidoti, possano essere usate anche per contrastare gli effetti *off-target* di analoghi del Vacor. Inoltre, è plausibile che un effetto anche parziale sul metabolismo, dato da dosi sub-tossiche di Vacor o analoghi, potrebbe presentare sinergismo con una o più classi di farmaci antineoplastici, sensibilizzare il tumore rendendolo più suscettibile agli effetti della chemioterapia in uso.

Infine, le gravi intossicazioni di pazienti dovute all'ingestione volontaria, e quindi a scopi suicidi, di alte dosi di Vacor, sono accompagnate dall'insorgenza di neuropatia periferica e diabete mellito insulino-dipendente. Sebbene l'esatto meccanismo per cui questi sintomi compaiano sia a oggi non chiarito [200], [207], i nostri risultati suggeriscono, per la prima volta, che alla base di entrambi i disordini, vi sia la deplezione tessuto-specifica del NAD. In linea con questa ipotesi, NMNAT2 presenta alti livelli di espressione nei neuroni [208] e nelle cellule β -pancreatiche [204]. È inoltre interessante notare come sia già stata dimostrata la correlazione tra un'alterata biosintesi del NAD e la patogenesi sia del diabete mellito [51] sia della degenerazione assonale [208]. Queste associazioni aprono le porte a nuove possibili speculazioni sull'eventuale ruolo del *salvage pathway* del NAD in patologie la cui patogenesi ci è ancora sconosciuta o poco chiara. Ad esempio, la deplezione del NAD e il conseguente sconvolgimento del metabolismo energetico potrebbero essere coinvolti nella patogenesi di neuropatie spesso riscontrabili in pazienti sottoposti al trattamento cronico con composti contenenti anelli piridinici, quali isoniazide e bortezomib.

In conclusione, il nostro studio fornisce elementi che giustificano il rationale per lo sfruttamento dei due enzimi della via di recupero del NAD come nuova via di tossificazione

per la produzione di antimetaboliti piridinici e il cui utilizzo potrebbe essere applicato nella terapia antineoplastica, anche in virtù delle evidenze che dimostrano come gli enzimi del *salvage pathway* del NAD siano maggiormente espressi in alcuni neoplasmi umani. Inoltre, caratterizzando i potenti analoghi del Vacor, si potrebbe, auspicabilmente, rivelare una maggiore potenza farmacologica e una maggiore specificità verso enzimi e/o particolari neoplasie, consentendoci, eventualmente, di ridurre le dosi del chemioterapico in modo anche da abbassare le probabilità d'insorgenza di possibili effetti avversi. Al contempo, l'utilizzo di questi antimetaboliti come *tool* farmacologici potrebbe essere sfruttato al fine di meglio comprendere la complessa serie di meccanismi che concorrono all'omeostasi del NAD nei diversi distretti dell'organismo e loro sua rilevanza clinica nella patogenesi e nel trattamento di patologie umane.

Referenze

- [1] Gossmann, Ziegler, Puntervoll, de Figueiredo, Schuster, and Heiland, "NAD + biosynthesis and salvage - a phylogenetic perspective," *FEBS J.*, 2012.
- [2] Yaku, Okabe, Hikosaka, and Nakagawa, "NAD metabolism in cancer therapeutics," *Frontiers in Oncology*. 2018.
- [3] Yaku, Okabe, and Nakagawa, "NAD metabolism: Implications in aging and longevity," *Ageing Res. Rev.*, 2018.
- [4] PREISS and HANDLER, "Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates.," *J. Biol. Chem.*, 1958.
- [5] PREISS and HANDLER, "Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects.," *J. Biol. Chem.*, 1958.
- [6] Hara, Yamada, Shibata, Osago, Hashimoto, and Tsuchiya, "Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells," *J. Biol. Chem.*, 2007.
- [7] Chiarugi, Dölle, Felici, and Ziegler, "The NAD metabolome - A key determinant of cancer cell biology," *Nature Reviews Cancer*. 2012.
- [8] Bieganowski and Brenner, "Discoveries of Nicotinamide Riboside as a Nutrient and Conserved NRK Genes Establish a Preiss-Handler Independent Route to NAD+ in Fungi and Humans," *Cell*, 2004.
- [9] Samal, Sun, Stearns, Xie, Suggs, and McNiece, "Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor.," *Mol. Cell. Biol.*, 1994.
- [10] Rongvaux, Shea, Mulks, Gigot, Urbain, Leo, and Andris, "Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis," *Eur. J. Immunol.*, 2002.
- [11] Revollo, Grimm, and Imai, "The NAD Biosynthesis Pathway Mediated by Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Regulates Sir2 Activity in Mammalian Cells," *J. Biol. Chem.*, 2004.
- [12] Honjo, Nishizuka, and Hayaishi, "Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis.," *J. Biol.*

- Chem.*, 1968.
- [13] Koch-Nolte, Kernstock, Mueller-Dieckmann, Weiss, and Haag, "Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases," *Front. Biosci.*, 2008.
- [14] Tong, Cortes, and Wang, "Poly(ADP-ribose) polymerase: A guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis," *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2001.
- [15] CHINI, CHINI, KATO, TAKASAWA, and OKAMOTO, "CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues," *Biochem. J.*, 2002.
- [16] Malavasi, Deaglio, Funaro, Ferrero, Horenstein, Ortolan, Vaisitti, and Aydin, "Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology," *Physiol. Rev.*, 2008.
- [17] Young, Choleris, Lund, and Kirkland, "Decreased cADPR and increased NAD⁺ in the Cd38^{-/-} mouse," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006.
- [18] Garavaglia, Bruzzone, Cassani, Canella, Allegrone, Sturla, Mannino, Millo, De Flora, and Rizzi, "The high-resolution crystal structure of periplasmic Haemophilus influenzae NAD nucleotidase reveals a novel enzymatic function of human CD73 related to NAD metabolism," *Biochem. J.*, 2012.
- [19] Quarona, Zaccarello, Chillemi, Brunetti, Singh, Ferrero, Funaro, Horenstein, and Malavasi, "CD38 and CD157: A long journey from activation markers to multifunctional molecules," *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*. 2013.
- [20] Tong and Denu, "Function and metabolism of sirtuin metabolite O-acetyl-ADP-ribose," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 2010.
- [21] Imai, Armstrong, Kaeberlein, and Guarente, "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase," *Nature*, 2000.
- [22] Landry, Sutton, Tafrov, Heller, Stebbins, Pillus, and Sternglanz, "The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000.
- [23] Smith, Brachmann, Celic, Kenna, Muhammad, Starai, Avalos, Escalante-Semerena, Grubmeyer, Wolberger, and Boeke, "A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000.
- [24] Chalkiadaki and Guarente, "Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability," *Nature Reviews Endocrinology*. 2012.

- [25] Sauve, Wolberger, Schramm, and Boeke, "The Biochemistry of Sirtuins," *Annu. Rev. Biochem.*, 2006.
- [26] Hallows, Lee, and Denu, "Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006.
- [27] Pavlova and Thompson, "The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism," *Cell Metabolism*. 2016.
- [28] Warburg, "On the Origin of Cancer Cells," *Science (80-.)*, 1956.
- [29] "Ueber den Stoffwechsel der Tumoren: Arbeiten aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.," *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, 1926.
- [30] Lu, Tan, and Cai, "The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism," *Cancer Letters*. 2015.
- [31] Chen, Qian, and Wu, "The Warburg effect: Evolving interpretations of an established concept," *Free Radical Biology and Medicine*. 2015.
- [32] Patra and Hay, "The pentose phosphate pathway and cancer," *Trends in Biochemical Sciences*. 2014.
- [33] Hwang, Gustafsson, O'Sullivan, Bisceglia, Huang, Klose, Schevchenko, Dickson, Cavaliere, Dephoure, and Torres, "Serine-Dependent Sphingolipid Synthesis Is a Metabolic Liability of Aneuploid Cells," *Cell Rep.*, 2017.
- [34] Yamamoto, Inohara, and Nakagawa, "Targeting metabolic pathways for head and neck cancers therapeutics," *Cancer Metastasis Rev.*, 2017.
- [35] Tan, Young, Lu, Wang, Meier, Shepard, Roth, Zhai, Huss, Kuo, Gillig, Parthasarathy, Burkholder, Smith, Geeganage, and Zhao, "Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), an enzyme essential for NAD⁺ biosynthesis, in human cancer cells: Metabolic basis and potential clinical implications," *J. Biol. Chem.*, 2013.
- [36] Murphy, Giacomantonio, Paulo, Everley, Kennedy, Pathak, Clements, Kim, Dai, Sharif, Gygi, and Gujar, "The NAD⁺ Salvage Pathway Supports PHGDH-Driven Serine Biosynthesis," *Cell Rep.*, 2018.
- [37] Pittelli, Felici, Pitozzi, Giovannelli, Bigagli, Cialdai, Romano, Moroni, and Chiarugi, "Pharmacological effects of exogenous NAD on mitochondrial bioenergetics, DNA repair, and apoptosis," *Mol. Pharmacol.*, 2011.
- [38] Lucena-Cacace, Otero-Albiol, Jiménez-García, Peinado-Serrano, and Carnero, "NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor

- signature for glioma prognosis," *Oncotarget*, 2017.
- [39] Lucena-Cacace, Otero-Albiol, Jiménez-García, Muñoz-Galvan, and Carnero, "NAMPT Is a Potent Oncogene in Colon Cancer Progression that Modulates Cancer Stem Cell Properties and Resistance to Therapy through Sirt1 and PARP," *Clin. Cancer Res.*, 2018.
- [40] Sawicka-Gutaj, Waligórska-Stachura, Andrusiewicz, Biczysko, Sowiński, Skrobisz, and Ruchała, "Nicotinamide phosphorybosiltransferase overexpression in thyroid malignancies and its correlation with tumor stage and with survivin/survivin DEx3 expression," *Tumor Biol.*, 2015.
- [41] Shackelford, Bui, Coppola, and Hakam, "Over-expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase in ovarian cancers," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2010.
- [42] Zhu, Guo, Zhang, Xu, Wang, and Xu, "Biomarker triplet NAMPT/VEGF/HER2 as a de novo detection panel for the diagnosis and prognosis of human breast cancer," *Oncol. Rep.*, 2016.
- [43] Wang, Hasan, Alvarado, Yuan, Wu, and Chen, "NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response," *Oncogene*, 2011.
- [44] Bi, Che, Liao, Zhang, Long, Li, and Zhao, "Overexpression of Nampt in gastric cancer and chemopotentiating effects of the Nampt inhibitor FK866 in combination with fluorouracil," *Oncol. Rep.*, 2011.
- [45] Olesen, Hastrup, and Sehested, "Expression patterns of nicotinamide phosphoribosyltransferase and nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human malignant lymphomas," *APMIS*, 2011.
- [46] Menssen, Hydbring, Kapelle, Vervoorts, Diebold, Lüscher, Larsson, and Hermeking, "The c-MYC oncoprotein, the NAMPT enzyme, the SIRT1-inhibitor DBC1, and the SIRT1 deacetylase form a positive feedback loop," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012.
- [47] Tarrado-Castellarnau, de Atauri, and Cascante, "Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming," *Oncotarget*. 2016.
- [48] Pylaeva, Harati, Spyra, Bordbari, Strachan, Thakur, Höing, Franklin, Skokowa, Welte, Schadendorf, Bankfalvi, Brandau, Lang, and Jablonska, "NAMPT signaling is critical for the proangiogenic activity of tumor-associated neutrophils," *Int. J. Cancer*, 2019.
- [49] Nacarelli, Lau, Fukumoto, Zundell, Fatkhutdinov, Wu, Aird, Iwasaki, Kossenkov,

- Schultz, Noma, Baur, Schug, Tang, Speicher, David, and Zhang, "NAD⁺ metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome," *Nat. Cell Biol.*, 2019.
- [50] Fukuhara, "Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat That Mimics the Effects of Insulin," *Science (80-.)*, 2005.
- [51] Revollo, Körner, Mills, Satoh, Wang, Garten, Dasgupta, Sasaki, Wolberger, Townsend, Milbrandt, Kiess, and Imai, "Nampt/PBEF/Visfatin Regulates Insulin Secretion in β Cells as a Systemic NAD Biosynthetic Enzyme," *Cell Metab.*, 2007.
- [52] Garten, Petzold, Barnikol-Oettler, Körner, Thasler, Kratzsch, Kiess, and Gebhardt, "Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is constitutively released from human hepatocytes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010.
- [53] Yoon, Yoshida, Johnson, Takikawa, Usui, Tobe, Nakagawa, Yoshino, and Imai, "SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD⁺ and Function in Mice," *Cell Metab.*, 2015.
- [54] Jing, Xing, Chen, Stetler, Weng, Gan, Zhang, Gao, Chen, Leak, and Cao, "Neuronal NAMPT is released after cerebral ischemia and protects against white matter injury," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2014.
- [55] Sun, Zhu, Wu, Huang, Liu, Tang, and Wei, "Elevated serum visfatin levels are associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma," *Oncotarget*, 2017.
- [56] Audrito, Managò, Zamporlini, Rulli, Gaudino, Madonna, D'Atri, Cappellini, Ascierio, Massi, Raffaelli, Mandalà, and Deaglio, "Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) is a novel marker for patients with BRAF-mutated metastatic melanoma," *Oncotarget*, 2018.
- [57] Moschen, Kaser, Enrich, Mosheimer, Theurl, Niederegger, and Tilg, "Visfatin, an Adipocytokine with Proinflammatory and Immunomodulating Properties," *J. Immunol.*, 2007.
- [58] Gerner, Klepsch, Macheiner, Arnhard, Adolph, Grander, Wieser, Pfister, Moser, Hermann-Kleiter, Baier, Oberacher, Tilg, and Moschen, "NAD metabolism fuels human and mouse intestinal inflammation," *Gut*, 2018.
- [59] Audrito, Serra, Brusa, Mazzola, Arruga, Vaisitti, Coscia, Maffei, Rossi, Wang, Inghirami, Rizzi, Gaidano, Garcia, Wolberger, Raffaelli, and Deaglio, "Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia," *Blood*, 2015.

- [60] Adya, Tan, Pun, Chen, and Rande, "Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: Novel insights into visfatin-induced angiogenesis," *Cardiovasc. Res.*, 2008.
- [61] Alhazzazi, Kamarajan, Verdin, and Kapila, "SIRT3 and cancer: Tumor promoter or suppressor?," *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2011.
- [62] Deng, "SIRT1, Is It a Tumor Promoter or Tumor Suppressor?," *Int. J. Biol. Sci.*, 2009.
- [63] Kim, Chen, and Lou, "DBC1 is a negative regulator of SIRT1," *Nature*, 2008.
- [64] Firestein, Blander, Michan, Oberdoerffer, Ogino, Campbell, Bhimavarapu, Luikenhuis, de Cabo, Fuchs, Hahn, Guarente, and Sinclair, "The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth," *PLoS One*, 2008.
- [65] Wang, Zheng, Kim, Xu, Cao, Lahusen, Lee, Xiao, Vassilopoulos, Chen, Gardner, Man, Hung, Finkel, and Deng, "Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-Associated Tumorigenesis," *Mol. Cell*, 2008.
- [66] Herranz and Serrano, "SIRT1: recent lessons from mouse models," *Nat. Rev. Cancer*, 2010.
- [67] Tao, Coleman, Pennington, Ozden, Park, Jiang, Kim, Flynn, Hill, Hayes McDonald, Olivier, Spitz, and Gius, "Sirt3-Mediated Deacetylation of Evolutionarily Conserved Lysine 122 Regulates MnSOD Activity in Response to Stress," *Mol. Cell*, 2010.
- [68] Sundaresan, Gupta, Kim, Rajamohan, Isbatan, and Gupta, "Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice," *J. Clin. Invest.*, 2009.
- [69] Ashraf, Zino, MacIntyre, Kingsmore, Payne, George, and Shiels, "Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer," *Br. J. Cancer*, 2006.
- [70] De Nigris, Cerutti, Morelli, Califano, Chiariotti, Viglietto, Fusco, Santelli, and Fusco, "Isolation of a SIR-like gene, SIR-T8, that is overexpressed in thyroid carcinoma cell lines and tissues," *Br. J. Cancer*, 2002.
- [71] Frye, "'SIRT8' expressed in thyroid cancer is actually SIRT7," *Br. J. Cancer*, 2002.
- [72] Tang, Shi, Xie, Liu, Qian, Meng, Xu, Zhou, Cao, Zhu, and Liu, "SIRT7 antagonizes TGF- β signaling and inhibits breast cancer metastasis," *Nat. Commun.*, 2017.
- [73] Hiratsuka, Inoue, Toda, Kimura, Shirayoshi, Kamitani, Watanabe, Ohama, Tahimic, Kurimasa, and Oshimura, "Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: Down-regulation of SIRT2 gene," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003.

- [74] Kim, Vassilopoulos, Wang, Lahusen, Xiao, Xu, Li, Veenstra, Li, Yu, Ji, Wang, Park, Cha, Gius, and Deng, "SIRT2 Maintains Genome Integrity and Suppresses Tumorigenesis through Regulating APC/C Activity," *Cancer Cell*, 2011.
- [75] Tennen and Chua, "Chromatin regulation and genome maintenance by mammalian SIRT6," *Trends in Biochemical Sciences*. 2011.
- [76] Mao, Hine, Tian, Van Meter, Au, Vaidya, Seluanov, and Gorbunova, "SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1," *Science (80-.)*, 2011.
- [77] Desantis, Lamanuzzi, and Vacca, "The role of SIRT6 in tumors," *Haematologica*, 2018.
- [78] Geng, Zhang, Zhang, Gao, He, and Li, "Overexpression of Sirt6 is a novel biomarker of malignant human colon carcinoma," *J. Cell. Biochem.*, 2018.
- [79] Bai, Cantó, Oudart, Brunyánszki, Cen, Thomas, Yamamoto, Huber, Kiss, Houtkooper, Schoonjans, Schreiber, Sauve, Menissier-De Murcia, and Auwerx, "PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation," *Cell Metab.*, 2011.
- [80] Zhang, "Are poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 and deacetylation by Sir2 linked?," *BioEssays*, 2003.
- [81] Krishnakumar and Kraus, "The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets," *Mol. Cell*, 2010.
- [82] Alano and Swanson, "Players in the PARP-1 cell-death pathway: JNK1 joins the cast," *Trends Biochem. Sci.*, 2006.
- [83] Malavasi, Deaglio, Damle, Cutrona, Ferrarini, and Chiorazzi, "CD38 and chronic lymphocytic leukemia: A decade later," *Blood*. 2011.
- [84] Liao, Xiao, Chen, Zhang, Chen, Long, Gao, Zhu, He, Peng, Xiong, Zeng, Li, Zhou, Li, Ma, Wu, Xiang, Li, and Zhou, "CD38 enhances the proliferation and inhibits the apoptosis of cervical cancer cells by affecting the mitochondria functions," *Mol. Carcinog.*, 2017.
- [85] Bu, Kato, Hong, Merino, Schrupp, Lund, and Moss, "CD38 knockout suppresses tumorigenesis in mice and clonogenic growth of human lung cancer cells," *Carcinogenesis*, 2018.
- [86] Chen, Diao, Yang, Yi, Rodriguez, Li, Villalobos, Cascone, Liu, Tan, Lorenzi, Huang, Zhao, Peng, Fradette, Peng, Ungewiss, Roybal, Tong, Oba, Skoulidis, Peng, Carter, Gay, Fan, Class, Zhu, Rodriguez-Canales, Kawakami, Byers, Woodman, Papadimitrakopoulou, Dmitrovsky, Wang, Ullrich, Wistuba, Heymach, Qin, and

- Gibbons, "CD38-mediated immunosuppression as a mechanism of tumor cell escape from PD-1/PD-L1 blockade," *Cancer Discov.*, 2018.
- [87] Berger, Lau, Dahlmann, and Ziegler, "Subcellular Compartmentation and Differential Catalytic Properties of the Three Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase Isoforms," *J. Biol. Chem.*, 2005.
- [88] Dölle, Niere, Lohndal, and Ziegler, "Visualization of subcellular NAD pools and intra-organellar protein localization by poly-ADP-ribose formation," *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010.
- [89] Cambronne, Stewart, Kim, Jones-Brunette, Morgan, Farrens, Cohen, and Goodman, "Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD⁺," *Science (80-.)*, 2016.
- [90] Alano, Tran, Tao, Ying, Karliner, and Swanson, "Differences among cell types in NAD⁺ compartmentalization: A comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes," *J. Neurosci. Res.*, 2007.
- [91] Yang, Yang, Baur, Perez, Matsui, Carmona, Lamming, Souza-Pinto, Bohr, Rosenzweig, de Cabo, Sauve, and Sinclair, "Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival.," *Cell*, 2007.
- [92] Nikiforov, Dölle, Niere, and Ziegler, "Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: From entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation," *J. Biol. Chem.*, 2011.
- [93] Barile, Passarella, Danese, and Quagliariello, "Rat liver mitochondria can synthesize nicotinamide adenine dinucleotide from nicotinamide mononucleotide and ATP via a putative matrix nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase," *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1996.
- [94] Cantó, Houtkooper, Pirinen, Youn, Oosterveer, Cen, Fernandez-Marcos, Yamamoto, Andreux, Cettour-Rose, Gademann, Rinsch, Schoonjans, Sauve, and Auwerx, "The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity," *Cell Metab.*, 2012.
- [95] Felici, Lapucci, Ramazzotti, and Chiarugi, "Insight into Molecular and Functional Properties of NMNAT3 Reveals New Hints of NAD Homeostasis within Human Mitochondria," *PLoS One*, 2013.
- [96] Davila, Liu, Chellappa, Redpath, Nakamaru-Ogiso, Paoletta, Zhang, Migaud, Rabinowitz, and Baur, "Nicotinamide adenine dinucleotide is transported into mammalian mitochondria," *Elife*, 2018.

- [97] Pittelli, Formentini, Faraco, Lapucci, Rapizzi, Cialdai, Romano, Moneti, Moroni, and Chiarugi, "Inhibition of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase," *J. Biol. Chem.*, 2010.
- [98] Sharif, Martell, Dai, Ghassemi-Rad, Kennedy, Lee, and Gujar, "Regulation of cancer and cancer-related genes via NAD +," *Antioxidants and Redox Signaling*. 2019.
- [99] Son, Kwon, Son, and Cho, "Restoration of Mitochondrial NAD+ Levels Delays Stem Cell Senescence and Facilitates Reprogramming of Aged Somatic Cells," *Stem Cells*, 2016.
- [100] Hikosaka, Ikutani, Shito, Kazuma, Gulshan, Nagai, Takatsu, Konno, Tobe, Kanno, and Nakagawa, "Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes," *J. Biol. Chem.*, 2014.
- [101] Yamamoto, Hikosaka, Mahmood, Tobe, Shojaku, Inohara, and Nakagawa, "Nmnat3 is dispensable in mitochondrial NAD level maintenance in vivo," *PLoS One*, 2016.
- [102] George and Ahmad, "Mitochondrial sirtuins in cancer: Emerging roles and therapeutic potential," *Cancer Research*. 2016.
- [103] Ahn, Kim, Song, Lee, Liu, Vassilopoulos, Deng, and Finkel, "A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008.
- [104] Scher, Vaquero, and Reinberg, "SirT3 is a nuclear NAD+-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress," *Genes Dev.*, 2007.
- [105] Jeong, Hwang, and Seong, "SIRT4 regulates cancer cell survival and growth after stress," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016.
- [106] Jeong, Xiao, Finley, Lahusen, Souza, Pierce, Li, Wang, Laurent, German, Xu, Li, Wang, Lee, Csibi, Cerione, Blenis, Clish, Kimmelman, Deng, and Haigis, "SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to dna damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism," *Cancer Cell*, 2013.
- [107] Du, Zhou, Su, Yu, Khan, Jiang, Kim, Woo, Kim, Choi, He, Chen, Zhang, Cerione, Auwerx, Hao, and Lin, "Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase," *Science (80-.)*, 2011.
- [108] Du, Hu, Qu, Wang, Hua, Zhang, Wei, He, Hao, Liu, Yang, Li, and Wei, "SIRT5 deacylates metabolism-related proteins and attenuates hepatic steatosis in ob/ob

- mice," *EBioMedicine*, 2018.
- [109] Wood, Schwer, Wickremesinghe, Hartnett, Burhenn, Garcia, Li, Verdin, and Helfand, "Sirt4 is a mitochondrial regulator of metabolism and lifespan in *Drosophila melanogaster*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2018.
- [110] Demarest, Babbar, Okur, Dan, Croteau, Fakouri, Mattson, and Bohr, "NAD + Metabolism in Aging and Cancer," *Annu. Rev. Cancer Biol.*, 2019.
- [111] Fjeld, Birdsong, and Goodman, "Differential binding of NAD⁺ and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003.
- [112] Lau, "The NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) protein family," *Front. Biosci.*, 2009.
- [113] Kim, "Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal," *Genes Dev.*, 2005.
- [114] Gomez, Wu, Schreiber, Dunlap, Dantzer, Wang, and Liu, "PARP1 Is a TRF2-associated Poly(ADP-Ribose)Polymerase and Protects Eroded Telomeres," *Mol. Biol. Cell*, 2006.
- [115] Schiewer and Knudsen, "Transcriptional roles of PARP1 in cancer," *Molecular Cancer Research*. 2014.
- [116] Schiewer, Mandigo, Gordon, Huang, Gaur, de Leeuw, Zhao, Evans, Han, Parsons, Birbe, McCue, McNair, Chand, Cendon-Florez, Gallagher, McCann, Poudel Neupane, Shafi, Dylgjeri, Brand, Visakorpi, Raj, Lallas, Trabulsi, Gomella, Dicker, Kelly, Leiby, Knudsen, Feng, and Knudsen, "PARP-1 regulates DNA repair factor availability," *EMBO Mol. Med.*, 2018.
- [117] Chalkiadaki and Guarente, "The multifaceted functions of sirtuins in cancer," *Nature Reviews Cancer*. 2015.
- [118] Vaziri, Dessain, Eaton, Imai, Frye, Pandita, Guarente, and Weinberg, "hSIR2/SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase," *Cell*, 2001.
- [119] Wang, Chen, Hou, Li, Kabra, Ma, Nemoto, Finkel, Gu, Cress, and Chen, "Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage," *Nat. Cell Biol.*, 2006.
- [120] Sociali, Grozio, Caffa, Schuster, Becherini, Damonte, Sturla, Fresia, Passalacqua, Mazzola, Raffaelli, Garten, Kiess, Cea, Nencioni, and Bruzzone, "SIRT6 deacetylase activity regulates NAMPT activity and NAD(P)(H) pools in cancer cells," *FASEB J.*, 2019.

- [121] Langelier, Zandarashvili, Aguiar, Black, and Pascal, "NAD⁺ analog reveals PARP-1 substrate-blocking mechanism and allosteric communication from catalytic center to DNA-binding domains," *Nat. Commun.*, 2018.
- [122] Zhang, Berrocal, Yao, DuMond, Krishnakumar, Ruhl, Ryu, Gamble, and Kraus, "Regulation of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1-dependent Gene Expression through Promoter-directed Recruitment of a Nuclear NAD⁺ Synthase," *J. Biol. Chem.*, 2012.
- [123] Song, Yang, Kabra, Chen, Koomen, Haura, and Chen, "The NAD⁺ synthesis enzyme nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT1) regulates ribosomal RNA transcription," *J. Biol. Chem.*, 2013.
- [124] Raffaelli, Sorci, Amici, Emanuelli, Mazzola, and Magni, "Identification of a novel human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002.
- [125] MacDonald, "High content of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in pancreatic islets and its inhibition by diazoxide.," *J. Biol. Chem.*, 1981.
- [126] Ryu, Nandu, Kim, Challa, DeBerardinis, and Lee Kraus, "Metabolic regulation of transcription through compartmentalized NAD⁺ biosynthesis," *Science (80-.)*, 2018.
- [127] Li, Feng, Wu, Li, Zhang, and Xia, "SIRT3 regulates cell proliferation and apoptosis related to energy metabolism in non-small cell lung cancer cells through deacetylation of NMNAT2," *Int. J. Oncol.*, 2013.
- [128] Pan, Ahn, Sharif, Clements, Gujar, and Lee, "The NAD⁺ synthesizing enzyme nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 2 (NMNAT-2) is a p53 downstream target," *Cell Cycle*, 2014.
- [129] Liu, Xu, Malyukova, Scarlett, Sun, Zhang, Ling, Su, Nelson, Chang, Koach, Tee, Haber, Norris, Toon, Rooman, Xue, Cheung, Kumar, Marshall, Biankin, and Liu, "The histone deacetylase SIRT2 stabilizes Myc oncoproteins," *Cell Death Differ.*, 2013.
- [130] Zhao, Mo, Li, Zou, Cheng, Sun, Xiong, Guan, and Lei, "NOTCH-induced aldehyde dehydrogenase 1A1 deacetylation promotes breast cancer stem cells," *J. Clin. Invest.*, 2014.
- [131] Park, Ozden, Liu, Song, Zhu, Yan, Zou, Kang, Jiang, Principe, Cha, Roh, Vassilopoulos, and Gius, "SIRT2-mediated deacetylation and tetramerization of pyruvate kinase directs glycolysis and tumor growth," *Cancer Res.*, 2016.
- [132] Seo, Park, Heo, Jing, Han, Min, Kim, Koh, Lim, Kang, Uee Lee, Yim, Shong, Kwak, and

- Kweon, "SIRT2 regulates tumour hypoxia response by promoting HIF-1 α hydroxylation," *Oncogene*, 2015.
- [133] Minhas, Liu, Moon, Joshi, Dove, Mhatre, Contrepolis, Wang, Lee, Coronado, Bernstein, Snyder, Migaud, Majeti, Mochly-Rosen, Rabinowitz, and Andreasson, "Macrophage de novo NAD⁺ synthesis specifies immune function in aging and inflammation," *Nat. Immunol.*, 2019.
- [134] Tedeschi, Bansal, Kerrigan, Abali, Scotto, and Bertino, "NAD⁺ kinase as a therapeutic target in cancer," *Clinical Cancer Research*. 2016.
- [135] Tsang, Dogruluk, Tedeschi, Wardwell-Ozgo, Lu, Espitia, Nair, Minelli, Chong, Chen, Chang, Dennison, Dogruluk, Li, Ying, Bertino, Gingras, Ittmann, Kerrigan, Chen, Creighton, Eterovic, Mills, and Scott, "Functional annotation of rare gene aberration drivers of pancreatic cancer," *Nat. Commun.*, 2016.
- [136] Davies, Perrett, Zhang, Nielsen, Blake, and Winyard, "Simultaneous analysis of nitrite, nitrate and the nicotinamide nucleotides by capillary electrophoresis: Application to biochemical studies and human extracellular fluids," *Electrophoresis*, 1999.
- [137] Haag, Adriouch, Braß, Jung, Möller, Scheuplein, Bannas, Seman, and Koch-Nolte, "Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation," *Purinergic Signal.*, 2007.
- [138] Hwang, Durnin, Dwyer, Rhee, Ward, Koh, Sanders, and Mutafova-Yambolieva, " β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Is an Enteric Inhibitory Neurotransmitter in Human and Nonhuman Primate Colons," *Gastroenterology*, 2011.
- [139] Mottahedeh, Haffner, Grogan, Hashimoto, Crowell, Beltran, Sboner, Bareja, Esopi, Isaacs, Yegnasubramanian, Rettig, Elashoff, Platz, De Marzo, Teitell, and Goldstein, "CD38 is methylated in prostate cancer and regulates extracellular NAD⁺," *Cancer Metab.*, 2018.
- [140] Billington, Travelli, Ercolano, Galli, Roman, Grolla, Canonico, Condorelli, and Genazzani, "Characterization of NAD Uptake in Mammalian Cells," *J. Biol. Chem.*, 2008.
- [141] Bruzzone, Guida, Zocchi, Franco, and De Flora A, "Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells.," *FASEB J.*, 2001.
- [142] Grozio, Mills, Yoshino, Bruzzone, Sociali, Tokizane, Lei, Cunningham, Sasaki, Migaud,

- and Imai, "Slc12a8 is a nicotinamide mononucleotide transporter," *Nat. Metab.*, 2019.
- [143] Chmielewski, Bowlby, Wheeler, Shi, Sui, Davis, Howard, D'Agostino, Miller, Sirintrapun, Cramer, and Kridel, "CD38 inhibits prostate cancer metabolism and proliferation by reducing cellular NAD⁺ pools," *Mol. Cancer Res.*, 2018.
- [144] Grozio, Sociali, Sturla, Caffa, Soncini, Salis, Raffaelli, De Flora, Nencioni, and Bruzzone, "CD73 Protein as a Source of Extracellular Precursors for Sustained NAD⁺ Biosynthesis in FK866-treated Tumor Cells," *J. Biol. Chem.*, 2013.
- [145] Sociali, Raffaghello, Magnone, Zamporlini, Emionite, Sturla, Bianchi, Vigliarolo, Nahimana, Nencioni, Raffaelli, and Bruzzone, "Antitumor effect of combined NAMPT and CD73 inhibition in an ovarian cancer model," *Oncotarget*, 2016.
- [146] Sadej and Skladanowski, "Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (en, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells," *Acta Biochim. Pol.*, 2012.
- [147] Moreschi, Bruzzone, Nicholas, Fruscione, Sturla, Benvenuto, Usai, Meis, Kassack, Zocchi, and De Flora, "Extracellular NAD⁺ Is an Agonist of the Human P2Y₁₁ Purinergic Receptor in Human Granulocytes," *J. Biol. Chem.*, 2006.
- [148] Adriouch, Hubert, Pechberty, Koch-Nolte, Haag, and Seman, "NAD⁺ Released during Inflammation Participates in T Cell Homeostasis by Inducing ART2-Mediated Death of Naive T Cells In Vivo," *J. Immunol.*, 2007.
- [149] Hubert, Rissiek, Klages, Huehn, Sparwasser, Haag, Koch-Nolte, Boyer, Seman, and Adriouch, "Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2–P2X7 pathway," *J. Exp. Med.*, 2010.
- [150] Chatterjee, Daenthanasanmak, Chakraborty, Wyatt, Dhar, Selvam, Fu, Zhang, Nguyen, Kang, Toth, Al-Homrani, Husain, Beeson, Ball, Helke, Husain, Garrett-Mayer, Hardiman, Mehrotra, Nishimura, Beeson, Bupp, Wu, Ogretmen, Paulos, Rathmell, Yu, and Mehrotra, "CD38-NAD⁺ Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response," *Cell Metab.*, 2018.
- [151] Hamanaka and Chandel, "Warburg Effect and Redox Balance," *Science (80-.)*, 2011.
- [152] Anastasiou, Poulogiannis, Asara, Boxer, Jiang, Shen, Bellinger, Sasaki, Locasale, Auld, Thomas, Vander Heiden, and Cantley, "Inhibition of Pyruvate Kinase M2 by Reactive Oxygen Species Contributes to Cellular Antioxidant Responses," *Science (80-.)*, 2011.

- [153] Gujar, Le, Mao, Dadey, Turski, Sasaki, Aum, Luo, Dahiya, Yuan, Rich, Milbrandt, Hallahan, Yano, Tran, and Kim, "An NAD⁺-dependent transcriptional program governs self-renewal and radiation resistance in glioblastoma," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016.
- [154] Hasmann and Schemainda, "FK866, a Highly Specific Noncompetitive Inhibitor of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, Represents a Novel Mechanism for Induction of Tumor Cell Apoptosis," *Cancer Res.*, 2003.
- [155] Gehrke, Bouchard, Beiggi, Poepl, Johnston, Gibson, and Banerji, "On-target effect of FK866, a nicotinamide phosphoribosyl transferase inhibitor, by apoptosis-mediated death in chronic lymphocytic leukemia cells," *Clin. Cancer Res.*, 2014.
- [156] Muruganandham, "Metabolic Signatures Associated with a NAD Synthesis Inhibitor-Induced Tumor Apoptosis Identified by 1H-Decoupled-31P Magnetic Resonance Spectroscopy," *Clin. Cancer Res.*, 2005.
- [157] Cagnetta, Cea, Calimeri, Acharya, Fulciniti, Tai, Hideshima, Chauhan, Zhong, Patrone, Nencioni, Gobbi, Richardson, Munshi, and Anderson, "Intracellular NAD⁺ depletion enhances bortezomib-induced anti-myeloma activity," *Blood*, 2013.
- [158] Olesen, Christensen, Björkling, Jäätelä, Jensen, Sehested, and Nielsen, "Anticancer agent CHS-828 inhibits cellular synthesis of NAD," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008.
- [159] Watson, Roulston, Belec, Billot, Marcellus, Bedard, Bernier, Branchaud, Chan, Dairi, Gilbert, Goulet, Gratton, Isakau, Jang, Khadir, Koch, Lavoie, Lawless, Nguyen, Paquette, Turcotte, Berger, Mitchell, Shore, and Beauparlant, "The Small Molecule GMX1778 Is a Potent Inhibitor of NAD⁺ Biosynthesis: Strategy for Enhanced Therapy in Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase 1-Deficient Tumors," *Mol. Cell. Biol.*, 2009.
- [160] Kato, Ito, Shi, Alajez, Yue, Lee, Chan, Bhogal, Coackley, Vines, Green, Waldron, Gullane, Bristow, and Liu, "Efficacy of Combining GMX1777 with Radiation Therapy for Human Head and Neck Carcinoma," *Clin. Cancer Res.*, 2010.
- [161] Chan, Sutphin, Nguyen, Turcotte, Lai, Banh, Reynolds, Chi, Wu, Solow-Cordero, Bonnet, Flanagan, Bouley, Graves, Denny, Hay, and Giaccia, "Targeting GLUT1 and the Warburg Effect in Renal Cell Carcinoma by Chemical Synthetic Lethality," *Sci. Transl. Med.*, 2011.
- [162] Frederick, Loro, Liu, Davila, Chellappa, Silverman, Quinn, Gosai, Tichy, Davis,

- Mourkioti, Gregory, Dellinger, Redpath, Migaud, Nakamaru-Ogiso, Rabinowitz, Khurana, and Baur, "Loss of NAD Homeostasis Leads to Progressive and Reversible Degeneration of Skeletal Muscle," *Cell Metab.*, 2016.
- [163] Lin, Kubota, Ban, Yoshida, Santeford, Sene, Nakamura, Zapata, Kubota, Tsubota, Yoshino, Imai, and Apte, "NAMPT-Mediated NAD⁺ Biosynthesis Is Essential for Vision In Mice," *Cell Rep.*, 2016.
- [164] Sampath, Zabka, Misner, O'Brien, and Dragovich, "Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer," *Pharmacology and Therapeutics*. 2015.
- [165] Piacente, Caffa, Ravera, Sociali, Passalacqua, Vellone, Becherini, Reverberi, Monacelli, Ballestrero, Odetti, Cagnetta, Cea, Nahimana, Duchosal, Bruzzone, and Nencioni, "Nicotinic acid phosphoribosyltransferase regulates cancer cell metabolism, susceptibility to NAMPT inhibitors, and DNA repair," *Cancer Res.*, 2017.
- [166] Duarte-Pereira, Pereira-Castro, Silva, Correia, Neto, da Costa, Amorim, and Silva, "Extensive regulation of nicotinate phosphoribosyltransferase (NAPRT) expression in human tissues and tumors," *Oncotarget*, 2016.
- [167] Shames, Elkins, Walter, Holcomb, Du, Mohl, Xiao, Pham, Haverty, Liederer, Liang, Yauch, O'Brien, Bourgon, Koeppen, and Belmont, "Loss of NAPRT1 expression by tumor-specific promoter methylation provides a novel predictive biomarker for NAMPT inhibitors," *Clin. Cancer Res.*, 2013.
- [168] Cole, Guiot, Gravel, Bernier, Shore, and Roulston, "Novel NAPRT specific antibody identifies small cell lung cancer and neuronal cancers as promising clinical indications for a NAMPT inhibitor/niacin co-administration strategy," *Oncotarget*, 2017.
- [169] Cui, Qi, Deng, Chen, Zhai, and Yu, "Nicotinamide Mononucleotide Adenylyl Transferase 2: A Promising Diagnostic and Therapeutic Target for Colorectal Cancer," *Biomed Res. Int.*, 2016.
- [170] Kusumanchi, Zhang, Jani, Jayaram, Khan, Tang, Antony, and Jayaram, "Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase2 overexpression enhances colorectal cancer cell-kill by Tiazofurin," *Cancer Gene Ther.*, 2013.
- [171] Tae, Park, Dey, Son, Lee, Jung, Saloni, Kim, and Kim, "Novel SIRT1 inhibitor 15-deoxy- Δ 12,14 -prostaglandin J2 and its derivatives exhibit anticancer activity through apoptotic or autophagic cell death pathways in SKOV3 cells," *Int. J. Oncol.*, 2018.

- [172] Park, Woo, Kim, Kim, Lee, De, Kim, Lee, Jung, Ha, Choi, Kim, Lee, Yoon, Moon, and Kim, "Anticancer effects of a new SIRT inhibitor, MHY2256, against human breast cancer MCF-7 cells via regulation of MDM2-p53 binding," *Int. J. Biol. Sci.*, 2016.
- [173] Audeh, Carmichael, Penson, Friedlander, Powell, Bell-McGuinn, Scott, Weitzel, Oaknin, Loman, Lu, Schmutzler, Matulonis, Wickens, and Tutt, "Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial," *Lancet*, 2010.
- [174] Robson, Im, Senkus, Xu, Domchek, Masuda, Delalage, Li, Tung, Armstrong, Wu, Goessl, Runswick, and Conte, "Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation," *N. Engl. J. Med.*, 2017.
- [175] Coleman, Oza, Lorusso, Aghajanian, Oaknin, Dean, Colombo, Weberpals, Vulfovich, *et al.*, "Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial," *Lancet*, 2017.
- [176] Mirza, Monk, Herrstedt, Oza, Mahner, Redondo, Fabbro, Ledermann, Lorusso, Vergote, Ben-Baruch, Marth, Madry, Christensen, Berek, Dørum, Tinker, Du Bois, González-Martín, Follana, Benigno, Rosenberg, Gilbert, Rimel, Buscema, Balsler, Agarwal, and Matulonis, "Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer," *N. Engl. J. Med.*, 2016.
- [177] Litton, Rugo, Ettl, Hurvitz, Gonçalves, Lee, Fehrenbacher, Yerushalmi, Mina, Martin, Roché, Im, Quek, Markova, Tudor, Hannah, Eiermann, and Blum, "Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation," *N. Engl. J. Med.*, 2018.
- [178] Dziadkowiec, Gasiorowska, Nowak-Markwitz, and Jankowska, "PARP inhibitors: Review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting," *Przegląd Menopauzalny*. 2016.
- [179] Patel, Sarkaria, and Kaufmann, "Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011.
- [180] Edwards, Brough, Lord, Natrajan, Vatcheva, Levine, Boyd, Reis-Filho, and Ashworth, "Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2," *Nature*, 2008.
- [181] Lin, Harrell, Oza, Oaknin, Ray-Coquard, Tinker, Helman, Radke, Say, Vo, Mann, Isaacson, Maloney, O'Malley, Chambers, Kaufmann, Scott, Konecny, Coleman, Sun,

- Giordano, Brenton, Harding, McNeish, and Swisher, "BRCA Reversion Mutations in Circulating Tumor DNA Predict Primary and Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma," *Cancer Discov.*, 2019.
- [182] Frerichs, Nagy, Lindenbergh, Bosman, Marin Soto, Broekmans, Groen, Themeli, Nieuwenhuis, Stege, Nijhof, Mutis, Zweegman, Lokhorst, and van de Donk, "CD38-targeting antibodies in multiple myeloma: mechanisms of action and clinical experience," *Expert Review of Clinical Immunology*. 2018.
- [183] Lokhorst, Plesner, Laubach, Nahi, Gimsing, Hansson, Minnema, Lassen, Krejcik, Palumbo, Van De Donk, Ahmadi, Khan, Uhlar, Wang, Sasser, Losic, Lisby, Basse, Brun, and Richardson, "Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma," *N. Engl. J. Med.*, 2015.
- [184] Martin, Baz, Benson, Lendvai, Wolf, Munster, Lesokhin, Wack, Charpentier, Campana, and Vij, "A phase 1b study of isatuximab plus lenalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma," *Blood*, 2017.
- [185] Chatterjee, Raab, Goldschmidt, Agis, Blau, Einsele, Engelhardt, Ferstl, Günther, Röllig, Weisel, Jarutat, Weinelt, Winderlich, Boxhammer, and Peschel, "A phase I/IIa Study of the CD38 Antibody MOR202 in Combination With Pomalidomide or Lenalidomide in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma," *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, 2017.
- [186] Krejcik, Casneuf, Nijhof, Verbist, Bald, Plesner, Syed, Liu, Van De Donk, Weiss, Ahmadi, Lokhorst, Mutis, and Sasser, "Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma," *Blood*, 2016.
- [187] Santini, Pandolfi, Montagnani, Pietrobono, Pimpinelli, Borgognoni, and Stecca, "Regulation of melanoma initiating cells by Hedgehog signaling and SOX2," *J. Transl. Med.*, 2014.
- [188] Cipriani, Rapizzi, Vannacci, Rizzuto, Moroni, and Chiarugi, "Nuclear Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Rapidly Triggers Mitochondrial Dysfunction," *J. Biol. Chem.*, 2005.
- [189] Zamporlini, Ruggieri, Mazzola, Amici, Orsomando, and Raffaelli, "Novel assay for simultaneous measurement of pyridine mononucleotides synthesizing activities allows dissection of the NAD + biosynthetic machinery in mammalian cells," *FEBS J.*, 2014.
- [190] Balducci, Emanuelli, Raffaelli, Ruggieri, Amici, Magni, Orsomando, Polzonetti, and

- Natalini, "Assay Methods for Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase of Wide Applicability," *Anal. Biochem.*, 1995.
- [191] Segel, *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State*. 1993.
- [192] Mori, Amici, Mazzola, Di Stefano, Conforti, Magni, Ruggieri, Raffaelli, and Orsomando, "Metabolic Profiling of Alternative NAD Biosynthetic Routes in Mouse Tissues," *PLoS One*, 2014.
- [193] Oh, Ho, Zak, Liu, Chen, Yuen, Zheng, Liu, Dragovich, and Wang, "Structural and biochemical analyses of the catalysis and potency impact of inhibitor phosphoribosylation by human nicotinamide phosphoribosyltransferase," *ChemBioChem*, 2014.
- [194] Pedretti, Villa, and Vistoli, "VEGA – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming," *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, 2004.
- [195] Trott and Olson, "Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking," *J. Comput. Chem.*, 2010.
- [196] Roy, Kucukural, and Zhang, "I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction," *Nat. Protoc.*, 2010.
- [197] Lüthy, Bowie, and Eisenberg, "Assessment of protein models with three-dimensional profiles," *Nature*, 1992.
- [198] Laskowski and Swindells, "LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery," *J. Chem. Inf. Model.*, 2011.
- [199] Pettersen, Goddard, Huang, Couch, Greenblatt, Meng, and Ferrin, "UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis," *J. Comput. Chem.*, 2004.
- [200] LeWitt, "The Neurotoxicity of the Rat Poison Vacor," *N. Engl. J. Med.*, 1980.
- [201] Maldì, Travelli, Caldarelli, Agazzone, Cintura, Galli, Scatolini, Ostano, Miglino, Chiorino, Boldorini, and Genazzani, "Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) is over-expressed in melanoma lesions," *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2013.
- [202] Burgos and Schramm, "Weak Coupling of ATP Hydrolysis to the Chemical Equilibrium of Human Nicotinamide Phosphoribosyltransferase †," *Biochemistry*, 2008.

- [203] Zhou, Kurnasov, Tomchick, Binns, Grishin, Marquez, Osterman, and Zhang, "Structure of Human Nicotinamide/Nicotinic Acid Mononucleotide Adenylyltransferase," *J. Biol. Chem.*, 2002.
- [204] YALOWITZ, XIAO, BIJU, ANTONY, CUMMINGS, DEEG, and JAYARAM, "Characterization of human brain nicotinamide 5'-mononucleotide adenylyltransferase-2 and expression in human pancreas," *Biochem. J.*, 2004.
- [205] Zhang, Kurnasov, Karthikeyan, Grishin, Osterman, and Zhang, "Structural Characterization of a Human Cytosolic NMN/NaMN Adenylyltransferase and Implication in Human NAD Biosynthesis," *J. Biol. Chem.*, 2003.
- [206] Chen and Pankiewicz, "Recent development of IMP dehydrogenase inhibitors for the treatment of cancer," *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2007.
- [207] Vogel, "Poisoning with vacor rodenticide," *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 1982.
- [208] Conforti, Gilley, and Coleman, "Wallerian degeneration: An emerging axon death pathway linking injury and disease," *Nature Reviews Neuroscience*. 2014.

Ringraziamenti

Un lavoro così complesso e tre anni di dottorato, è facile da capire, non si portano fino alla fine se si è da soli. E, per fortuna, solo non sono mai rimasto.

Non in laboratorio, non a casa.

Il primo grazie non può che andare a Daniela: molto più di una collega e molto più di una maestra, a tratti una sorellona. Gran parte di quello che ho imparato lo devo a te.

A Mirko e Sara: che sia stato per lungo, o per poco tempo, imparare da voi è stato un vero piacere: mi avete insegnato più di quanto crediate e fatto ridere più di quanto io stesso non ricordi.

A Matteo, per essere cresciuti insieme, per aver varcato insieme numerosi confini e aver combattuto fianco a fianco, giorno dopo giorno.

Ad Elisa ed Elisabetta, a Francesco, ad Alessio, a Carmen, Alice e Danielina: in un modo o nell'altro, tutti mi avete insegnato qualcosa e avete reso le giornate e le pause pranzo alla trattoria "Da Beppe" più leggere e divertenti.

Ai ragazzi dello SMU, vecchi e nuovi. Nominarvi tutti sarebbe troppo lungo. Voi siete cambiati, e io con voi. Tuttavia, se gli anni a Firenze sono stati così ricchi di calcetto, cinema, birre e chitarre, è soprattutto per merito vostro.

Alla mia famiglia, tutta.

A mamma e papà, per quanto hanno fatto, per essersi sempre dimostrati il tipo di persona che vorrei essere.

A Francesco, Andrea e Donatella, per avermi dato le prove che si può diventare persone eccezionali come i nostri genitori, e, in qualcosa, persino superarli. Per aver sempre avuto una buona parola o una mano d'aiuto. Per non aver mai smesso di dire "vai, ché ce la fai."

A Rosanna, Silvia e Paolo, per avermi sempre trattato come un fratello, per avermi incoraggiato in ogni istante. Per aver creduto in me anche quando io non ci credevo più.

A Luigi, Sofia, Alessia ed Elena: perché sono i miei nipotini, e tanto basta.

A zia Mimì e zio Umberto, perché essere una coppia di genitori extra non è da tutti.

Infine, a Jenny, per aver sopportato, quando la stanchezza e la frustrazione del lavoro la tiravano fuori, anche la peggiore parte di me. Per essere la migliore delle amiche e delle compagne possibili. Per spingermi a essere, ogni giorno, una persona migliore.

Spero di farcela.

A tutti voi, grazie di cuore.