

# INDICE

<b>Capitolo 1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
1.1 L'ANATOMIA DELLA PELLE.....	4
1.1.1 L'Epidermide.....	5
1.2 I TUMORI DELLA PELLE NON MELANOMA.....	8
1.2.1 Il Carcinoma basocellulare.....	8
1.2.2 Il Carcinoma a cellule squamose.....	10
1.3 IL CARCINOMA A CELLULE DI MERKEL.....	12
1.3.1 Caratterizzazione e Patogenesi.....	12
1.3.2 Fattori di rischio ed Epidemiologia.....	14
1.3.3 Diagnosi e Terapia.....	17
1.4 L'ENZIMA NICOTINAMIDE N-METILTRASFERASI .....	24
1.4.1 Il metabolismo dei farmaci.....	24
1.4.2 Omeostasi della Nicotinamide.....	25
1.4.3 Caratterizzazione dell'NNMT umana.....	27
1.4.4 Ruolo dell'NNMT nelle patologie neoplastiche.....	34
1.5 SCOPO DEL LAVORO .....	46

<b>Capitolo 2 MATERIALI E METODI</b> .....	47
2.1 CELLULE IN COLTURA.....	47
2.1.1 Colture cellulari.....	47
2.1.2 Silenziamento dell'NNMT.....	47
2.1.3 Estrazione, quantificazione e retrotrascrizione dell'RNA totale.....	51
2.1.4 Real-Time PCR.....	52
2.1.5 Western blot.....	54
2.1.6 Saggio MTT .....	56
2.1.7 Test di esclusione del colorante Trypan Blue.....	58
2.1.8 Wound healing assay.....	59
2.1.9 Trattamento chemioterapico.....	60
2.1.10 Analisi statistiche.....	60
<b>Capitolo 3 RISULTATI</b> .....	61
3.1 ANALISI CELLULARI.....	61
3.1.1 Real-Time PCR.....	61
3.1.2 Western blot.....	62
3.1.3 Effetto del silenziamento dell'NNMT sulla proliferazione, vitalità e migrazione cellulare.....	64

3.1.4	Impatto del silenziamento dell'NNMT sulla chemiosensibilità delle cellule di Merkeloma.....	68
<b>Capitolo 4</b>	<b>DISCUSSIONE e CONCLUSIONI.....</b>	<b>69</b>
<b>Capitolo 5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA. ....</b>	<b>74</b>

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 ANATOMIA DELLA PELLE

La pelle rappresenta l'organo di senso più esteso del corpo umano, grazie alla presenza di numerosi recettori e nocicettori tattili e termici. Copre una superficie di circa 2 m<sup>2</sup> e rappresenta circa il 20% del peso corporeo totale di un organismo adulto. È costituita da tre strati di diversa origine embrionale: l'epidermide, che con le sue appendici si sviluppa dall'ectoderma, il derma e l'ipoderma che sono invece di origine mesodermica. L'apparato tegumentario rappresenta l'interfaccia tra il corpo umano e l'ambiente esterno e per tale motivo funge da barriera protettiva dai raggi ultravioletti e dai danni derivanti da agenti chimici, fisici e microbici (1). Il tegumento presenta differenze localizzate in termini di spessore (che varia da 1 a 4 mm), distribuzione degli annessi epidermici e densità dei melanociti (2, 3). Per quanto riguarda la sua funzione metabolica, questa è svolta da adipociti sottocutanei contenenti grandi riserve di trigliceridi, che forniscono il fabbisogno energetico all'organismo. La pelle svolge un ruolo importante anche nella termoregolazione: il tessuto adiposo e i peli prevengono la perdita di calore, mentre la produzione di sudore da parte delle ghiandole e il flusso sanguigno dermico ne consentono la dispersione.

### 1.1.1 L'Epidermide

Lo strato più esterno della pelle è l'epidermide, un epitelio squamoso cheratinizzato e stratificato che si rinnova continuamente e che risulta composto da più strati (4). È costituito da diversi tipi di cellule, tra le quali i cheratinociti sono i più abbondanti, rappresentando il 90-95% di tutte le cellule epidermiche, mentre il restante 5-10% è rappresentato dalle cellule di Merkel, le cellule di Langerhans e i melanociti. I cheratinociti sono cellule di derivazione ectodermica che si differenziano in corneociti, cellule anucleate e appiattite interconnesse con i desmosomi ed organizzate in 4 o 5 strati, a seconda della regione cutanea. In particolare, dal basso verso l'alto, gli strati epidermici si distinguono in: basale, spinoso, granulare, chiaro/traslucido e strato cornificato (5). L'epidermide è infatti un epitelio stratificato, la cui formazione è dovuta alla proliferazione delle cellule staminali che risiedono nello strato basale e alla loro differenziazione progressiva per formare gli strati cornificati spinosi, granulari e differenziati nella parte terminale (6). Lo strato basale è un monostrato di cellule cuboidali o colonnari collegate tra loro, dalle cellule spinose alla membrana basale, tramite desmosomi ed emidesmosomi. Il loro nucleo grande ed ovoidale occupa la maggior parte della cellula e il loro citoplasma è basofilo. I cheratinociti basali contengono melanosomi e gruppi di tonofilamenti, che contribuiscono inoltre alla struttura citoscheletrica e si inseriscono nelle placche desmosomiali. Questo strato rappresenta il compartimento germinativo, responsabile della rigenerazione dell'epidermide attraverso le divisioni mitotiche dei cheratinociti basali. Questi ultimi generano una miscela di progenie, comprese le cellule figlie che rimangono indifferenziate così come altre cellule che migrano verso gli strati superiori mentre si differenziano. Questo processo richiede circa trenta giorni. A differenza delle cellule basali, i cheratinociti spinosi sono grandi e poligonali.

Il loro nucleo è vescicolare e hanno un citoplasma eosinofilo, ricco di tonofilamenti di cheratina. La cheratinizzazione inizia nello strato spinoso e continua in quello granuloso, che rappresenta lo strato più superficiale dell'epidermide contenente cellule vive. Questo strato è composto da cheratinociti appiattiti migrati dallo strato spinoso. Il loro citoplasma è caratterizzato dalla presenza di numerosi granuli basofili di cheratoialina, costituiti da un insieme di proteine coinvolte nell'aggregazione dei filamenti di cheratina (7, 8). I cheratinociti dello strato spinoso superiore e dello strato granuloso sono ricchi di corpi lamellari contenenti lipidi e proteine, che vengono consegnati agli spazi extracellulari, e sono coinvolti nel processo di desquamazione e nella formazione di uno strato di tessuto lipidico pericellulare. I cheratinociti iniziano a perdere i loro nuclei e organuli diventando corneociti non vitali nello strato corneo, lo strato più esterno dell'epidermide, composto da 15-20 strati di cellule appiattite, non vitali, ricche di filamenti di cheratina e circondate da una matrice extracellulare lipidica, che contribuisce alla funzione di barriera della pelle. Durante il processo di corneificazione, la membrana cellulare viene sostituita da uno strato di ceramidi che si legano covalentemente ad un involucro delle proteine strutturali (l'involucro cornificato). I corneodesmosomi (desmosomi modificati) facilitano l'adesione cellulare. Questi complessi vengono degradati dalle proteasi, permettendo alle cellule di liberarsi in superficie. Per quanto riguarda lo strato lucido, è sottile ed è uno strato chiaro di cheratinociti morti appiattiti, situato tra gli strati granulari e corneificati della pelle spessa (8). A differenza dei cheratinociti, i melanociti sono cellule derivate dalla cresta neurale (4), localizzate principalmente nella zona epidermica nello strato basale, ma anche nello strato intermedio dell'occhio (l'uvea), nell'orecchio interno, nell'epitelio vaginale, nelle meningi, nelle ossa e nel cuore (9, 10). Queste cellule dendritiche producono melanina, un pigmento che protegge dai danni provocati dai raggi solari (4). Il 5-8% delle cellule epidermiche è

rappresentato da cellule di Langerhans, cellule mieloidi originate dai monociti e situate nello strato squamoso. Si trovano anche nel derma papillare, principalmente nei vasi sanguigni, nonché nella mucosa orale, nel prepuzio e nell'epitelio vaginale. Inoltre, tali cellule possono essere osservate in altri tessuti e organi, come i linfonodi, in particolare in associazione con l'istiocitosi delle cellule di Langerhans (11, 12). La loro particolarità risiede nella presenza di organuli citoplasmatici, a forma di bastoncino o "a racchetta da tennis", con densità lineare centrale e aspetto striato, detti granuli di Birbeck (13). Le cellule di Merkel si trovano nello strato basale e nelle creste cutanee e sono considerate cheratinociti modificati di origine epiteliale. Queste cellule di forma ovale funzionano come meccanocettori e sono essenziali per la sensazione del tocco leggero. Per questo motivo sono abbondanti nella pelle altamente sensibile e stabiliscono contatti sinaptici con le fibre nervose afferenti somatosensoriali (14, 15).

## **1.2 I TUMORI DELLA PELLE NON MELANOMA**

Ciascun tipo di cellula epidermica può subire una trasformazione neoplastica con successivo sviluppo di tumori della pelle. I diversi tipi di tumore della pelle corrispondono infatti ai differenti tipi di cellule di cui è formata la pelle e da cui possono avere origine. Dalla trasformazione neoplastica dei melanociti origina il melanoma, mentre dalla proliferazione incontrollata dei cheratinociti presenti nello strato più esterno dell'epidermide origina il carcinoma a cellule squamose e dai cheratinociti dello strato basale il carcinoma basocellulare. Esistono anche altri rari tipi di tumore cutaneo come il sarcoma di Kaposi, il linfoma cutaneo e il carcinoma a cellule di Merkel (MCC), un tumore raro e aggressivo che ha origine dalle cellule di Merkel. Le forme più comuni di tumori della pelle non melanoma (NMSC) sono: il carcinoma basocellulare (BCC) e il carcinoma a cellule squamose (SCC) (16).

### **1.2.1 Il carcinoma basocellulare**

Il BCC deriva dai cheratinociti basali e si presenta come un'area cutanea in rilievo e lucida, indolore circondata da piccoli vasi sanguigni (17). Nonostante la sua bassa mortalità, legata alla crescita lenta e al basso potenziale metastatico, il BCC può causare una significativa morbidità a causa della sua capacità di invadere e danneggiare i tessuti circostanti. Questo tumore è il più comune tra la popolazione bianca e l'incidenza negli uomini è superiore del 30% rispetto alle donne. La percentuale di rischio di sviluppare un BCC nel corso della vita è del 30%. Si può inoltre affermare che esiste una



correlazione diretta tra l'incidenza del BCC e la vicinanza all'equatore. Uno studio eseguito negli Stati Uniti su un gruppo di persone suddivise per sesso tra il 1986 e il 2016, ha dimostrato che il tasso di incidenza del BCC è aumentato da 519 a 1019 casi su 100000 persone di sesso femminile e da 606 a 1488 casi su 100000 persone di sesso maschile. Gli stessi risultati sono stati osservati anche in Europa, Canada, Asia e Australia. Questo tumore può svilupparsi nei primi anni di vita, ma il tasso di incidenza raddoppia dai 40 ai 70 anni di età. Inoltre, dopo i 40 anni, non incidono le differenze di genere (18, 19) Studi recenti hanno dimostrato che il BCC mostra il maggior numero di mutazioni nell'essere umano, a causa dell'esposizione alla luce UV che rappresenta la fonte primaria di mutagenesi. L'esposizione solare intermittente è un fattore di rischio ambientale predominante che predispone allo sviluppo del BCC. Tuttavia, altri studi hanno dimostrato un aumento del rischio nei soggetti con segni di esposizione cronica e cumulativa. Inoltre, è stata osservata una correlazione tra uso di lettini abbronzanti e rischio di cancro della pelle, soprattutto tra i giovani (20). Anche il fenotipo della pelle gioca un ruolo importante. In particolare, a causa del ruolo protettivo della pigmentazione cutanea, circa il 30% della popolazione corre il rischio di sviluppare un carcinoma basocellulare se presenta pelle chiara, lentiggini, difficoltà ad abbronzarsi, capelli rossi o biondi e colore chiaro degli occhi. Altri fattori di rischio sono riscontrabili nei casi di scottature solari infantili, oppure nei fattori familiari ereditari di cancro della pelle, in caso di immunosoppressione cronica, nell'utilizzo di farmaci fotosensibilizzanti, nella esposizione a sostanze chimiche cancerogene (soprattutto arsenico) e nell'uso di contraccettivi orali (21, 22). Per quanto riguarda il trattamento, l'escissione chirurgica o la chirurgia laser risultano risolutive nella maggior parte dei casi. In alcuni casi, invece, si opta per trattamenti topici in crema e nei casi più rari di carcinoma basocellulare localmente avanzato si ricorre

alla radioterapia soprattutto se la posizione e la dimensione del tumore non consentono l'asportazione chirurgica radicale.

### **1.2.2 Il carcinoma a cellule squamose**

L'SCC è il secondo tipo di tumore cutaneo più frequente ed origina dalle cellule squamose appartenenti a strati più superficiali della pelle. Il decorso clinico del carcinoma squamocellulare è più incerto e variabile rispetto al basalioma, poiché può rimanere circoscritto, ma può anche avere un comportamento molto aggressivo e dare luogo a metastasi. Spesso si presenta come lesione rossa dalla superficie rugosa con tendenza al sanguinamento, che con il passare del tempo tende ad ulcerarsi. L'aspetto, tuttavia, può essere estremamente variabile ed è importante non sottovalutare qualsiasi lesione cutanea che non guarisca spontaneamente. È stato riscontrato che la maggior parte degli SCC derivano dalla pelle danneggiata dal sole o da lesioni preesistenti. Si stima che il 40-60% dei carcinomi a cellule squamose esordisca con una cheratosi attinica (AK) non trattata. L'AK rappresenta una lesione precoce che può accumulare mutazioni e, in alcuni casi, può progredire verso il carcinoma a cellule squamose in situ (SCCIS) e successivamente verso uno SCC invasivo. Istologicamente, AK consiste in una proliferazione di cheratinociti atipici confinati negli strati inferiori dell'epidermide. Lo SCCIS rappresenta il passaggio intermedio nella progressione dall'AK all'SCC invasivo. Le cellule SCCIS sono caratterizzate da un nucleo pleomorfo e ipercromatico e mostrano frequenti mitosi (23). Nel SCC invasivo le cellule squamose epiteliali neoplastiche invadono il derma. Può derivare da danni cutanei provocati dal sole o de novo e la componente

invasiva può assumere la forma di cordoni o lamine infiltranti, gruppi di singole cellule, noduli circoscritti, isole squamose o strutture cistiche (24, 25). L'insorgenza del carcinoma a cellule squamose non è legata esclusivamente all'esposizione ai raggi UV ma può essere causata, in una piccola percentuale di casi, da uno stato di immunodepressione o da una predisposizione genetica. Questo è il motivo per cui lo si riscontra anche in aree del corpo che normalmente non sono fotoesposte (incluse mucose e genitali). Gli SCC sono più comuni negli uomini che nelle donne e la loro incidenza aumenta con l'età, e sono anch'essi più frequenti nelle persone con la pelle chiara (26, 27). Un altro importante fattore di rischio è rappresentato dall'immunosoppressione. I destinatari di trapianto di organo solido (SOTR) hanno infatti un'alta probabilità di sviluppare SCC e il tasso di formazione delle lesioni è proporzionale al numero e alla quantità di agenti immunosoppressori loro somministrati (28, 29). Lo sviluppo di SCC è anche associato all'infezione del papillomavirus umano oncogenico (HPV). Gli HPV di tipo 16 e 18, in particolare, possiedono le proteine E6 ed E7, che inibiscono il processo apoptotico, e quindi stimolano una replicazione continua del DNA virale regolando p53. Inoltre, i SOTR con SCC mostrano comunemente infezione da HPV di tipo 8, 9 e 15. Tuttavia, l'HPV nelle lesioni SCC non è trascrizionalmente attivo, suggerendo così l'ipotesi che questi virus siano coinvolti nell'induzione del tumore, ma non nella sua progressione e mantenimento (30). L'esposizione alle radiazioni ionizzanti è associata agli SCC più aggressivi e le esposizioni ambientali che ne aumentano l'incidenza includono arsenico, idrocarburi policiclici aromatici, nitrosammine e agenti alchilanti. La predisposizione individuale a SCC multipli in giovane età è dovuta alla presenza di rare sindromi familiari, come xeroderma pigmentoso, albinismo, epidermolisi bollosa, epidermolisi verruciforme, epitelioma di Ferguson-Smith, sindromi di Rothmund-Thomson e Bloom (31). Anche se la maggior parte dei SCC vengono trattati con un'escissione chirurgica completa, un sottogruppo

di pazienti affetto da SCC in alcuni casi, corre il rischio di recidiva e metastasi, con conseguente prognosi sfavorevole (32).

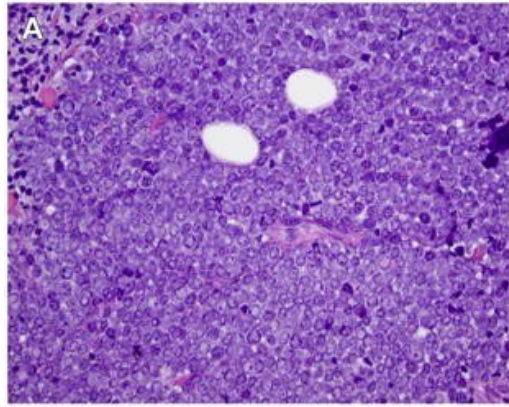
## **1.3 IL CARCINOMA A CELLULE DI MERKEL**

### **1.3.1 Caratterizzazione e Patogenesi**

Il carcinoma a cellule di Merkel è un raro ed aggressivo tumori della pelle, ad alto rischio di recidive e metastasi. Si tratta di una neoplasia neuroendocrina cutanea che si distingue dall'SCC e dal BCC in termini di origine, aspetto microscopico, comportamento e prognosi. Il suo nome deriva dalla somiglianza di queste cellule tumorali alle normali cellule di Merkel presenti nella pelle, associate alla sensazione del tatto. Le cellule di Merkel, note anche come cellule neuroendocrine della pelle, sono cellule tattili specializzate che si trovano nello strato basale dell'epidermide, di forma ovale e dotate di prolungamenti che si connettono con le terminazioni nervose. Tali cellule fungono da meccanoettori per le stimolazioni sensitive finì in quanto associate a nervi afferenti sensitivi, e presentano anche caratteristiche neuroendocrine inquanto esprimono marker tipici quali la cromogenina-A, sinaptofisina e citokeratina 20 (CK20), espressi anche dalle cellule del Merkeloma. L'MCC è stato descritto per la prima volta come "carcinoma trabecolare della cute" nel 1972 da Cyril Toker. Successivamente, con la scoperta di granuli neurosecretori (contenenti neurotrasmettitori, come la serotonina e l'adrenalina, e altre sostanze chimiche implicate nella comunicazione tra le cellule) all'interno del carcinoma, i quali sono una caratteristica distintiva delle cellule di Merkel, è

stata modificata la sua definizione in carcinoma a cellule di Merkel (33). Anche se il carcinoma a cellule di Merkel, condivide alcune caratteristiche con le cellule di Merkel, dati emergenti suggeriscono che le cellule di Merkel potrebbero non esserne le cellule di origine, ma che potrebbero invece derivare da progenitori cutanei di natura epiteliale, linfoide o fibroblastica (34, 35).

Le cellule di Merkel si trovano nell'epidermide mentre si è riscontrato che nel MCC sono invece dermiche o sottocuticolari. In secondo luogo, la citocheratina 20, presente nel 95% dei casi (36) nelle cellule di Merkel, è diffusa nel citoplasma mentre nel MCC si evidenzia una disposizione a spirale o a placca, con un risultato di una colorazione puntiforme. Nel MCC vengono inoltre espressi marcatori come: C-KIT, CD171, CD24, i quali non sono espressi nelle normali cellule di Merkel. A livello microscopico, le cellule di MCC si presentano come cellule di colorazione blu, (gruppo di tumori che originano dalle cellule neuroendocrine). Per la maggior parte dei casi, le cellule tumorali sono uniformi con nuclei ovali o rotondi, con cromatina finemente dispersa, con un aspetto "sale e pepe"; i nucleoli risultano poco appariscenti e le membrane nucleari sono distinte con citoplasma scarso e numerose mitosi, con frammentazione nucleare (Figura 1).



**Figura 1:** Citomorfologia dell'MCC che mostra nuclei rotondi, citoplasma scarso, cromatina, nucleoli indistinti (Ematossilina-eosina, ingrandimento originale  $\times 200$ )

### 1.3.2 Fattori di rischio ed Epidemiologia

L'eziologia dell'MCC è sconosciuta, ma epidemiologicamente è stato dimostrato un forte legame con l'esposizione ai raggi ultravioletti, gli stati immunodepressivi e la presenza di un peculiare polyomavirus umano (MCPyV) integrato nel DNA delle cellule tumorali. Si tratta di un piccolo virus a DNA a doppio filamento con genoma di  $\sim 5,0-5,4$  kb, la cui sequenza risulta presente nell'80% dei MCC tanto da essere stato chiamato *Merkel cell polyomavirus* (MCPyV) (37). Tecniche di sequenziamento ad alta sensibilità hanno dimostrato che il MCPyV risulta presente in quasi tutti i casi di MCC anche se con cariche virali estremamente variabili ed è stata osservata una forte correlazione tra la presenza del virus e stati di alterata risposta immunitaria cellulo-mediata, motivando quindi la relativa maggiore incidenza di MCC in pazienti trapiantati, portatori di patologie

onco-ematologiche o in trattamento immunosoppressivo. Un'ampia esposizione a questo virus ubiquitario si verifica all'inizio della vita, ma livelli di anticorpi più elevati negli individui più anziani suggeriscono una riattivazione virale con l'aumentare dell'età. L'80% dei tumori MCC è associato al Poliomavirus a cellule di Merkel (MCPyV), mentre il restante 20% degli MCC è negativo al virus. La presenza o meno del virus va a delineare due sottotipi particolari di Merkeloma: MCPyV + MCC e MCPyV – MCC che condividono le stesse alterazione genetiche, ma innescate da meccanismi differenti. Nei MCC MCPyV-positivi, a differenza di altri tipi cellulari, il virus MCPyV è integrato nel genoma ospite. Questi MCC MCPyV-positivi esprimono in modo duraturo le oncoproteine virali che normalmente sono espresse, in modo transitorio nel ciclo di vita del virus (35). Il genoma di MCPyV si è differenziato da quello di altri poliomavirus umani, ma entrambi i genomi codificano ancora per gli antigeni oncoproteine Large T (LT) e Small T (ST) (38). L'antigene LT dei poliomavirus si lega e reprime sia RB che p53, mentre LT del MCPyV inibisce in maniera specifica la funzione di RB, ma a differenza del poliomavirus non può legarsi a p53 (39). Inoltre, l'antigene ST MCPyV non richiede, a differenza del poliomavirus l'unione con la proteina fosfatasi 2a per promuovere la carcinogenesi. La sua attività oncogenica deriva da un dominio proteico che si lega e inibisce molteplici proteine di ligazione E3 tra cui FBW7 (proteine che hanno un ruolo cruciale nella regolazione della crescita e proliferazione cellulare e risposta allo stress ossidativo e genotossico) (40). Date le proprietà oncogeniche degli antigeni MCPyV ST e LT, la downregolazione dell'espressione di LT o ST compromette la vitalità e la crescita del MCC MCPyV-positivo. I tumori guidati da virus possono ospitare meno mutazioni rispetto a quelli non guidati da virus, perché l'espressione di oncogeni virali elimina la necessità di ulteriori mutazioni che promuovono il cancro. Inoltre, si è riscontrato che il MCPyV+ MCC presenta diverse mutazioni rispetto al MCPyV– MCC;

nell'MCPyV+ MCC le mutazioni sono tipiche delle mutazioni legate all'invecchiamento mentre nell'MCPyV- MCC le mutazioni sono derivate dall'esposizione della luce ultravioletta (35). L'esposizione al sole è un importante fattore di rischio, supportato dalla maggiore incidenza di MCC nelle regioni con tassi più elevati di radiazioni UV. L'MCC è più frequente nei pazienti caucasici rispetto ad altri gruppi etnici (individui neri, asiatici e ispanici) in quanto la pigmentazione della pelle sembrerebbe proteggere dall'MCC. Ulteriori studi hanno mostrato anche una maggiore incidenza di MCC in pazienti con una storia di uso di psoraleni, con pelle esposta al sole cronicamente o trattati con fotochemioterapia UVA o in soggetti con storie di tumori della pelle. Anche l'immunosoppressione è un fattore di rischio importante, infatti l'MCC è più frequente nei soggetti trapiantati, nei pazienti con diagnosi di tumori linfoproliferativi (come la leucemia linfocitica cronica) o nei pazienti con HIV.

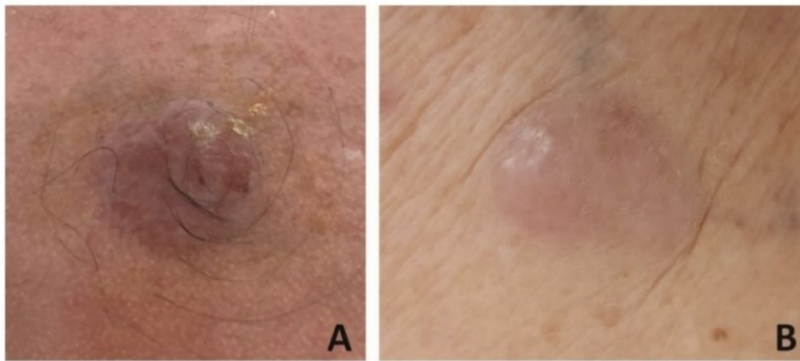
In Europa l'MCC rappresenta circa l'1% di tutte le neoplasie cutanee, tuttavia l'elevata aggressività fa sì che risulti la terza causa più frequente di morte per cancro della pelle dopo il melanoma e il carcinoma a cellule squamose. Sebbene rara, l'incidenza globale del MCC è aumentata notevolmente negli ultimi anni. Negli Stati Uniti il numero di casi di MCC è aumentato del 95% tra il 2000 e il 2013, rispetto a un aumento del 57% per il melanoma e del 15% per tutti gli altri tumori solidi. Aumenti analoghi si sono registrati anche in Europa ed in Australia (41). Nell'Unione Europea, tra il 1995 e il 2002, il tasso di incidenza annuale è stato di 0,13 per 100000 abitanti, risultando più elevato nei soggetti di età pari o superiore a 65 anni. Negli Stati Uniti, il tasso di incidenza è stato di 0,79 per 100000 abitanti nel 2011. Nel 2013, il numero assoluto di casi di MCC negli Stati Uniti è stato di 2488 casi, che corrisponde a un tasso di incidenza pari a 0,7 per 100000 persone all'anno. Questo



aumento complessivo è dovuto da un lato dall'aumentata esposizione ai fattori di rischio (esposizione ai raggi UV, all'invecchiamento generale della popolazione e all'aumento complessivo degli stati di immunocompromissione) dall'altro ad un miglioramento delle tecniche diagnostiche sia cliniche (dermatoscopia) che immunoistochimiche. L'incidenza di MCC è più alta negli uomini che nelle donne, come riportato negli Stati Uniti, in Germania, Australia e Nuova Zelanda. È prevalente nei soggetti bianchi rispetto a soggetti con pelle più scura con un tasso di incidenza otto volte superiore nelle popolazioni bianche rispetto alle popolazioni di colore. Colpisce generalmente persone di età avanzata, con un picco tra la settima e l'ottava decade, con un'età media alla diagnosi di 75 anni mentre solo il 5% dei pazienti ha meno di 50 anni: in questi casi il tumore è solitamente associato a qualche forma di immunosoppressione (33).

### **1.3.3 Diagnosi e Terapia**

L'MCC si manifesta tipicamente nei pazienti più anziani con fototipi chiari, prevalentemente come una lesione nodulare cutanea solida a forma di cupola, indolore, a crescita rapida, di colorazione rosso-violacea e superficie liscia e lucida. L'ulcerazione è poco frequente e la formazione di lesioni crostose si riscontra solo in fase avanzata (Figura 2). Le sedi preferenziali di insorgenza risultano le aree esposte al sole, come la regione testa-collo (48%) seguita dagli arti superiori e spalle (24%), arti inferiori (15%), tronco (11%) e altre regioni corporee (9%). Oltre la cute circa il 5% dei casi di MCC insorge a livello delle mucose, come la bocca, cavità nasali e gola, zone di difficile osservazione e spesso causa di diagnosi tardiva (33).



**Figura 2.** Carcinoma a cellule di Merkel che si manifesta come un nodulo cutaneo di  $3 \times 3$  cm, indolore, a crescita rapida, rosso-violaceo, a forma di cupola, localizzato sul cuoio capelluto in un paziente di 75 anni sottoposto a trapianto d'organo (A). L'MCC si presenta come una lesione del nodulo eritematoso di  $4 \times 2$  cm, indolore, sulla gamba in una donna immunocompetente di 82 anni (B).

In generale, a causa delle sue caratteristiche aspecifiche la diagnosi clinica di MCC non è immediata, in quanto viene spesso interpretato erroneamente come lesione benigna (cisti, brufoli, dermatofibromi, lipomi, gonfiore da follicoli piliferi infiammati) o come una differente neoplasia cutanea (carcinoma squamocellulare, carcinoma basocellulare, melanoma, linfoma, carcinoma sebaceo e tumori annessiali). Clinicamente, l'MCC deve essere pertanto differenziato il più precocemente possibile dalle numerose lesioni benigne e maligne che insorgono sulla cute cronicamente fotoesposta. Le caratteristiche cliniche che suggeriscono una diagnosi specifica di MCC possono essere facilmente identificate con l'acronimo "AEIOU". Tale acronimo viene utilizzato dai

medici per riassumere la combinazione di fattori di rischio e caratteristiche della neoplasia che richiedono un attento esame e forniscono un aiuto nella diagnosi precoce:

**A - Asintomatico:** la maggior parte dei tumori del MCC è asintomatico e per questo motivo può rallentare la diagnosi.

**E - Espansione rapida:** crescita rapida locale, fino a metastasi frequenti ai linfonodi e agli organi distali, tra cui fegato, ossa, pancreas, polmone e cervello.

**I - Immunodepressione:** aumento di incidenza del carcinoma nei pazienti immunocompromessi, con HIV/AIDS, leucemia linfatica cronica, pazienti sottoposti a trattamento medico per malattie autoimmuni, e trapiantati.

**O - Older age:** incidenza aumenta significativamente dopo i 50 anni.

**U- UV exposure:** esposizione a raggi ultravioletti in soggetti con carnagione chiara.

Il carcinoma a cellule di Merkel pur rappresentando meno dell'1% di tutti i tumori della pelle non melanoma, risulta essere un tumore estremamente aggressivo e di crescita rapida, pertanto la diagnosi precoce e l'asportazione tempestiva sono estremamente importanti (34). La biopsia della lesione e l'esame istologico sono necessari per una diagnosi corretta. L'MCC solitamente diffonde prima ai linfonodi, pertanto la biopsia del linfonodo sentinella (SLNB) rappresenta un'importante procedura di stadiazione per verificare lo stato più o meno avanzato della neoplasia e indirizzare al corretto trattamento.

Nel più recente sistema di stadiazione AJCC, adottato nel 2018, diverse fasi cliniche del MCC sono riconosciute in base alle caratteristiche al momento della presentazione:

- stadio 0 (*in situ*)
- stadio I (malattia localizzata, lesione primaria < 2 cm)
- stadio II (malattia localizzata, lesione primaria > 2 cm)
- stadio III (diffusione linfonodale)
- stadio IV (malattia metastatica)

Ognuna di queste fasi, inoltre, è suddivisa più precisamente in base al rischio più o meno alto a seconda delle diverse caratteristiche del tumore primario, metastasi linfonodali e/o metastasi a distanza. La sopravvivenza dipende dallo stadio alla diagnosi. Le recidive locali o a distanza di solito si verificano entro i primi 2-3 anni dalla diagnosi iniziale quindi, i pazienti il cui cancro non si è ripresentato entro 3 anni hanno un rischio di recidiva sostanzialmente ridotto. Dopo aver stabilito una diagnosi di MCC, saranno necessari ulteriori esami fisici, d'imaging per stabilire il corretto percorso terapeutico (42). Il trattamento del carcinoma a cellule di Merkel si basa principalmente sulla fase della malattia, così come la salute generale del paziente. L'escissione chirurgica è il trattamento primario, con escissioni marginali più ampie in caso di presenza di fattori di rischio basali. Il trattamento non chirurgico del MCC comprende la radioterapia, l'immunoterapia e la chemioterapia.

In tutte le fasi di MCC, i medici raccomandano la completa asportazione del tumore originario confermato dall'esame istologico. Dal momento che in letteratura non esiste una valutazione formale dei margini di escissione appropriati e del rischio di recidiva, spesso si eseguono escissioni ampie che possono comportare implicazioni funzionali o estetiche inaccettabili. Allo stesso modo, alcuni pazienti possono non essere idonei per un intervento chirurgico esteso se questo richiede anestesia generale ad alto rischio o complicanze postoperatorie. Dopo l'intervento chirurgico, si associa un ciclo di radioterapia adiuvante ad ampio campo al sito del tumore primario e, in alcuni casi, al bacino linfonodale drenante per prevenire così recidive o la diffusione del tumore ai linfonodi locali. L'MCC spesso si diffonde ai linfonodi vicini, anche se essi non sono rilevabili all'esame clinico. Anche se di piccole dimensioni l'MCC ha una probabilità di diffusione ai linfonodi di circa il 30% già al momento della diagnosi. Quindi è utile fare una biopsia al linfonodo sentinella, per valutare la presenza di micrometastasi, per poi indirizzare il paziente verso un trattamento diverso: se il test è negativo, non è necessario nessun ulteriore trattamento, e il test è positivo, i chirurghi asportano il resto dei linfonodi nella zona interessata e spesso fanno eseguire un ciclo di radioterapia, dopo che tutti i linfonodi sono stati rimossi. La radioterapia per tumori e/o linfonodi positivi può controllare la malattia nel 75-85% dei casi. L'MCC è molto sensibile alla radioterapia, tanto che la radioterapia esclusiva può essere presa in considerazione nei pazienti ritenuti inoperabili, sebbene il tutto debba essere bilanciato con il potenziale di effetti avversi a lungo termine. I medici di solito raccomandano la chemioterapia solo ai pazienti in cui il tumore si è ormai diffuso in altri organi, per diminuire le dimensioni del tumore e aumentare il tempo di sopravvivenza. Sebbene una varietà di chemioterapici a base di platino, etoposide, taxani e antracicline, da soli o in varie combinazioni sono stati utilizzati per il trattamento dell'MCC in stadio avanzato, tuttavia le risposte non sono prolungate e sono presenti diversi effetti

collaterali importanti (43). Recenti studi indicano che il nostro sistema immunitario può essere un alleato importante nella lotta contro il cancro. La risposta immunitaria dell'organismo, attraverso l'attivazione dei linfociti T e altri meccanismi, è in grado di rilevare e distruggere le cellule tumorali limitando la diffusione di metastasi. PD-1 è stato identificato come un "checkpoint immunitario", una via che le cellule tumorali usano per eludere la sorveglianza del sistema immunitario. Le cellule tumorali possono infatti bloccare le risposte immunitarie attraverso il sistema PD-1 esprimendo i ligandi di PD-1 (PD-L1 e PD-L2) che legano il recettore PD-1 sui linfociti T per inattivarli e consentire così alle cellule tumorali di eludere la risposta immunitaria. Numerosi studi indicano come il pathway del checkpoint immunitario PD1-PDL1 possa rappresentare un trattamento terapeutico chiave per riattivare le risposte immunitarie contro il MCC, identificato come cancro fortemente immunogenico. L'immunogenicità del MCC è dovuta all'espressione costitutiva delle proteine virali negli MCPyV +MCC e all'altissima frequenza di mutazioni del DNA associate al danno UV negli MCPyV – MCC. L'immunoterapia si avvale dell'impiego di farmaci in grado di bloccare alcuni recettori o ligandi che inibiscono o "controllano" la produzione delle cellule T per prevenire reazioni infiammatorie e autoimmuni eccessive e potenzialmente pericolose. L'iperespressione di PD-L1 è una delle caratteristiche predominanti del MCC, sia virus-correlato che non, riscontrabile a carico non solo delle cellule neoplastiche. Ad oggi, diversi inibitori dei checkpoint immunitari si sono dimostrati efficaci nel trattamento del MCC avanzato in prima linea ed in ulteriori linee di terapia. Si tratta di anticorpi terapeutici contro PD-1 o PD-L1 che hanno dimostrato tassi di risposta elevati e decisamente più duraturi rispetto a quelli riportati nei pazienti trattati con chemioterapia. Una di queste terapie in fase di studio, già approvata dalla FDA per il melanoma avanzato, riguarda l'anticorpo anti PD-1 pembrolizumab (KeytrudaR),

che blocca un recettore immuno-inibitore chiamato morte programmata-1 (PD-1). Bloccando PD-1, Pembrolizumab può rilasciare numerose cellule T che attaccano le cellule tumorali. Sono stati ottenuti risultati promettenti anche in alcuni casi di MCC avanzato. In un piccolo studio iniziale di 26 pazienti con MCC avanzato, 14 (56%) hanno risposto al trattamento con pembrolizumab, mentre 4 pazienti hanno avuto remissione completa. La maggior parte dei pazienti che hanno risposto positivamente mostrava il poliomavirus delle cellule di Merkel, il che suggerisce che gli antigeni del virus potrebbero aver migliorato la risposta terapeutica. Un'altra terapia attualmente oggetto di studio riguarda l'anticorpo anti PD-L1 avelumab (Bavencio), che blocca il ligando-morte programmata 1 (PD-L1), la molecola che si lega a PD-1 sulle cellule tumorali, formando il complesso che inibisce l'attivazione delle cellule T. Così come pembrolizumab rilascia cellule T, bloccando PD-1, avelumab rilascia cellule T, bloccando PD-L1. Questi studi dimostrano che l'immunoterapia può apportare benefici ai pazienti con malattia in stadio avanzato, risultando superiore a qualsiasi forma di terapia finora utilizzata. Tuttavia, sono ancora in corso ulteriori studi clinici sugli inibitori del checkpoint immunitario per il MCC, comprese combinazioni con inibitori citotossici o altri nuovi agenti terapeutici. Sebbene l'immunoterapia stia mostrando risultati promettenti, una parte sostanziale degli MCC in stadio avanzato non risponde agli inibitori PD-1 e PD-L1 (resistenza primaria). I tassi di risposta variano a seconda di diversi fattori, tra cui lo stadio del tumore. Inoltre, ci sono effetti collaterali dovuti alla risposta immunitaria contro i tessuti sani (44).

## 1.4 L'ENZIMA NICOTINAMIDE N-METILTRASFERASI

### 1.4.1 Il metabolismo dei farmaci

Molecole estranee al metabolismo dell'organismo, si definiscono come xenobiotici e si riferiscono a composti chimici sintetici o naturali utilizzati per scopi terapeutici o diagnostici che non fanno parte della normale biochimica dell'organismo. I farmaci che rientrano tra i composti xenobiotici sono quindi espulsi dall'organismo, dopo la loro assunzione. Questi possono essere secreti in maniera tale e quale, o modificati dall'organismo per facilitarne l'espulsione. La sede principale del metabolismo dei farmaci è rappresentata dal fegato. Tale complesso di reazioni è suddiviso in due distinti pathways: fase I e fase II. Nella fase I (funzionalizzazione) avvengono reazioni di idrolisi e ossidoriduzione, catalizzate da colinesterasi, arilesterasi, epossido idrolasi, alcool deidrogenasi, aldeide deidrogenasi, citocromo P450 monossigenasi, flavina monossigenasi e monoamina ossidasi, per rendere la molecola più polare e facilitarne l'eliminazione dall'organismo. Durante la fase II (coniugazione) il metabolita viene coniugato ad una molecola altamente polare attraverso reazioni catalizzate da enzimi citosolici come il glutatione S-trasferasi, le N-acetiltrasferasi, le sulfotrasferasi, le UDP-glucoroniltrasferasi e le metiltrasferasi. Nel metabolismo dei farmaci, e in generale dei composti xenobiotici, un ruolo importante è svolto dalle metiltrasferasi. In particolare, le tiolo metiltrasferasi (TMT) e la tiopurina metiltrasferasi (TPMT) catalizzano la S-metilazione di composti ad azione farmacologica come la 6-mercaptopurina, la D-penicillamina e il captopril, mentre la catecol-O-metiltrasferasi (COMT) e la fenol O-metiltrasferasi (POMT) catalizzano le reazioni di O-metilazione dei gruppi fenolici delle catecolamine e di alcuni neurotrasmettitori. Enzimi come l'istamina N-



metiltrasferasi (HNMT) e la nicotinamide N-metiltrasferasi (NNMT) catalizzano le reazioni di trasferimento di un gruppo metile all'azoto (45).

#### **1.4.2 Omeostasi della Nicotinamide**

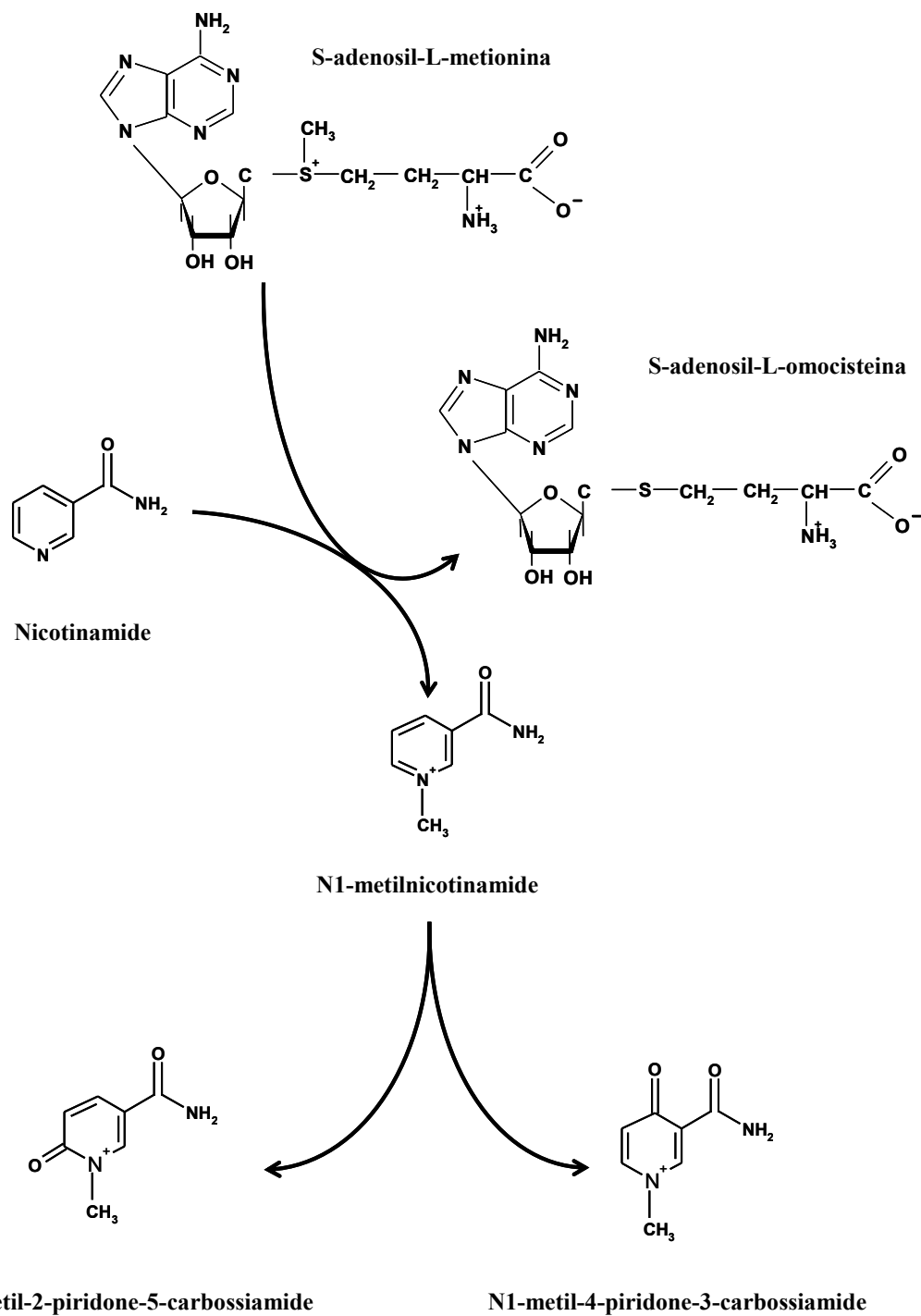
Studi sulla vitamina B3, denominata anche come nicotinamide, niacinamide, niacina o vitamina PP, hanno stabilito che sia il predecessore dei composti piridinici come il NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide Adenin Dinucleotide) e il NADP<sup>+</sup> (Nicotinamide Adenin Dinucleotide Fosfato). Queste due molecole svolgono una importanza significativa nella cellula perché implicate nella maggioranza delle reazioni di ossidoriduzione, dove svolgono il compito di trasportatori di ioni idrogeno ed elettroni. Tali composti prendono parte ad altri processi che originano la rottura del legame  $\beta$ -N-glicosidico, con successiva liberazione di nicotinamide. Tali processi includono:

- la deacetilazione degli istoni e di fattori trascrizionali, realizzata da enzimi NAD-dipendenti come le sirtuine (o istone-deacetilasi) (46,47).
- la produzione di cADPR e NaADP che raffigurano molecole effettrici e derivano dalla catalisi della molecola CD38, capaci di stimolare la mobilitazione delle riserve intracellulari di calcio (46),
- l'ADP-ribosilazione di proteine da parte delle mono-ADP-ribosiltrasferasi (ARTs) e delle poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARPs) (47).

Si ritiene che la nicotinamide presente nell'organismo derivi da più fonti, tanto che può essere immessa con la dieta e successivamente assorbita a livello gastro-intestinale, tramite un procedimento di trasporto transmembranario dose-dipendente (48). Altrimenti può essere sintetizzata attraverso il pathway della chinurenina, una via metabolica che porta alla conversione di L-triptofano in acido chinolinico e NAD<sup>+</sup> (49). Tuttavia, la quantità di nicotinamide così ottenuta è piuttosto ridotta (50). Un'ultima fonte sono le riserve di NAD<sup>+</sup> che si trovano nel fegato (storage NAD<sup>+</sup>) dove la catalisi espletata dalle NAD-glicoidrolasi porta al rilascio della nicotinamide nel circolo ematico direttamente. È evidente che la funzione del fegato svolga un ruolo indispensabile nel costante mantenimento dei livelli di nicotinamide, poiché è la sede principale dove avviene il processo che caratterizza il destino catabolico della nicotinamide, tramite la reazione di metilazione dell'azoto piridinico. Successivamente a tale catalisi, la nicotinamide metilata viene concentrata a livello renale e poi eliminata per via urinaria. La nicotinamide metilata può inoltre subire una reazione di ossidazione, con successiva formazione di composti piridonici, anch'essi espulsi con le urine (51).

### 1.4.3 Caratterizzazione dell'NNMT umana

L'enzima nicotinamide N-metiltrasferasi agisce a livello della fase II del metabolismo dei farmaci. Tale proteina si trova localizzata nel citosol ed è in grado di metilare l'azoto piridinico della nicotinamide e altri di analoghi strutturali della piridina, utilizzando l'S-adenosil-L-metionina come donatore di gruppo metilico. La nicotinamide metilata può essere ossidata da parte dell'aldeide ossidasi, con formazione di composti quali l'N1-metil-2-piridone-5-carbossiamide e l'N1-metil-4-piridone-3-carbossiamide o essere direttamente espulsa attraverso la via urinaria (52). In seguito alla donazione del gruppo metile alla nicotinamide, la S-adenosil-L-metionina viene convertita in S-adenosil-L-omocisteina che successivamente viene scissa in omocisteina ed adenosina (Figura 3).



**Figura 3.** Reazione di metilazione della nicotinamide e di ossidazione dell’N1-metilnicotinamide, catalizzate rispettivamente dall’NNMT e dall’aldeide ossidasi.

La caratterizzazione dell'NNMT umana è stata inizialmente condotta su estratti di tessuto epatico, mediante un saggio che prevede:

- la preparazione di una miscela contenente [<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>] S-adenosil-L-metionina,
- l'estrazione dell'N1-metilnicotinamide mediante alcol isoamilico al 60% in toluene, con acido 1-eptansolfonico in qualità di modificatore di fase,
- la separazione e l'identificazione dell'N1-metilnicotinamide tramite cromatografia a fase inversa in HPLC,
- il dosaggio della radioattività, grazie all'ausilio di uno scintillatore liquido.

L'NNMT presenta una localizzazione citoplasmatica e riesce a lavorare in condizioni ottimali ad un valore di pH intorno a 7,4. I valori di Km calcolati per la nicotinamide e per l'S-adenosil-L-metionina sono rispettivamente 347 μM e 1,76 μM. L'attività specifica dell'NNMT negli estratti da tessuto epatico era pari a 51,5 ± 32,5 U/mg. A carico dei campioni tissutali analizzati è stata identificata una notevole variabilità dei valori di attività; tuttavia, tali evidenze sono state riscontrate a livello di altre metiltrasferasi e sono state attribuite a fenomeni di polimorfismo genetico. La popolazione analizzata in questo studio è caratterizzata da una distribuzione di frequenza che presenta un andamento bimodale ed il 25% dei campioni ha mostrato elevati valori di attività specifica. Tali risultati comprovano l'ipotesi secondo la quale la regolazione dell'attività dell'NNMT può essere condizionata dalla presenza di mutazioni puntiformi a livello del gene codificante l'enzima. Tuttavia, esaminando la sequenza nucleotidica del gene per l'NNMT, relativa alla 3'- e 5'-UTR, alle regioni esoniche, introniche e del promotore, si è visto che le diversità nei livelli di attività dell'enzima

in precedenza rivelate non sono riconducibili alla presenza di polimorfismi. Inoltre, l'analisi degli effetti generati dai prodotti di reazione, dagli inibitori di altre metiltrasferasi o ioni metallici, ha dimostrato che l'N1-metilnicotinamide e l'S-adenosil-L-omocisteina esercitano il potere inibitorio maggiore (53). La purificazione parziale della proteina nativa da tessuto epatico, è stata ottenuta tramite cromatografia a scambio ionico, seguita da gel filtrazione. Il campione ottenuto è stato sottoposto ad elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) e, in seguito a "photoaffinity labeling", individuando una massa molecolare relativa all'NNMT pari a 29,6 kDa. Il cDNA per l'NNMT è costituito da una regione di 792 bp codificante per una proteina di 264 aminoacidi (Figura 4). La proteina umana ricombinante è stata ottenuta attraverso il clonaggio e conseguente espressione in cellule COS-1 e successivamente confrontata con l'enzima nativo parzialmente purificato da tessuto epatico. Da questo esame comparativo è emerso che i valori dei parametri cinetici determinati non presentano differenze significative.

- le  $K_m$  per la nicotinamide pari a 0,43 mM e 0,38 mM,
- le  $K_m$  per l'S-adenosil-L-metionina pari a 1,8  $\mu$ M e 2,2  $\mu$ M,
- le  $IC_{50}$  per l'N1-metilnicotinamide pari a 60  $\mu$ M e 30  $\mu$ M.

Analisi ulteriori hanno individuato il gene codificante l'NNMT umana sul cromosoma 11, nella regione q23.1. La sua sequenza nucleotidica è formata da 3 esoni e 2 introni con una lunghezza totale di 16,5 Kb. È stato individuato il sito d'inizio della trascrizione in posizione -108, rispetto alla prima tripletta codificante, 30 nucleotidi a valle di una atipica sequenza TATA box (TCTAA) (54). Il gene è

sotto controllo di un promotore forte, posizionato 700 nucleotidi a monte del sito d'inizio della trascrizione (55).

```

1  atggaatcaggcttcacctccaaggacacctatctaagccattttaac  48
1  M E S G F T S K D T Y L S H F N  16
49 cctcgggattacctagaaaaatattacaagtttggttctagggactct  96
17 P R D Y L E K Y Y K F G S R H S  32
97 gcagaaagccagattcttaagcaccttctgaaaaatcttttcaagata 144
33 A E S Q I L K H L L K N L F K I  48
145ttctgcctagacgggtgtgaaggagacctgctgattgacatcggtct 192
49 F C L D G V K G D L L I D I G S  64
193ggccccactatctatcagctcctctctgcttgtgaatcctttaaggag 240
65 G P T I Y Q L L S A C E S F K E  80
241atcgtcgtcactgactactcagaccagaacctgcaggagctggagaag 288
81 I V V T D Y S D Q N L Q E L E K  96
289tggctgaagaaagagccagaggcctttgactgggtcccagtggtgacc 336
97 W L K K E P E A F D W S P V V T 112
337tatgtgtgtgatcttgaagggaacagagtgcaaggggtccagagaaggag 384
113 Y V C D L E G N R V K G P E K E 128
385gagaagttgagacaggcgggtcaagcaggtgctgaagtgtgatgtgact 432
129 E K L R Q A V K Q V L K C D V T 144
433cagagccagccactgggggcccctcccccggtgactgctgctg 480
145 Q S Q P L G A V P L P P A D C V 160
481ctcagcacactgtgtctggatgccgcctgccagacctccccacctac 528
161 L S T L C L D A A C P D L P T Y 176
529tgcagggcgctcaggaacctcggcagcctactgaagccagggggcttc 576
177 C R A L R N L G S L L K P G G F 192
577ctggtgatcatggatgcgctcaagagcagctactacatgattggtgag 624
193 L V I M D A L K S S Y Y M I G E 208
625cagaagttctccagcctccccctgggcccgggagggcagtagaggctgct 672
209 Q K F S S L P L G R E A V E A A 224
673gtgaaagaggctggctacacaatcgaatggtttgaggtgatctcgcaa 720
225 V K E A G Y T I E W F E V I S Q 240
721agttattcttccaccatggccaacaacgaaggacttttctccctgggtg 768
241 S Y S S T M A N N E G L F S L V 256
769gcgaggaagctgagcagaccctgtga 792
257 A R K L S R P L - 264

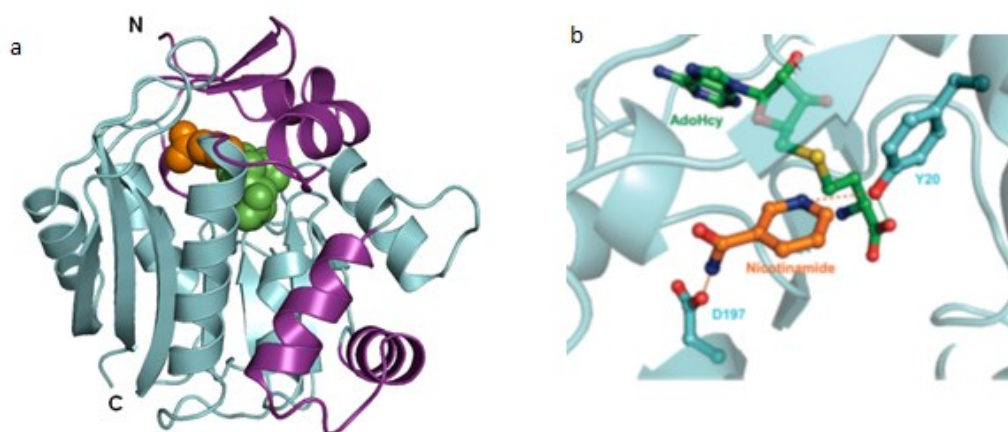
```

**Figura 4.** Sequenza codificante dell'NNMT umana. I colori differenti rappresentano i diversi esoni. È indicata anche la sequenza amminoacidica della proteina tradotta.

Ulteriori studi hanno dimostrato che i fattori HNF-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, STAT3 e IL-6 sono in grado di condizionare l'attività trascrizionale del gene per l'NNMT. Studi eseguiti su cellule embrionali renali hanno indicato un aumento dell'attività del promotore dell'NNMT in seguito ad attivazione (mediante fosforilazione) di STAT3, che è infatti un fattore trascrizionale attivo in forma fosforilata, indotta da LIF (Leukemia Inhibitory Factor) ed interleuchina 6 (IL-6). Studi su cellule di carcinoma mammario, epatico e coloretale hanno rilevato elevati livelli di NNMT in seguito a trattamento con IL-6. L'associazione tra l'overespressione di HNF-1 $\beta$  e quella dell'NNMT è stata riscontrata in linee cellulari di carcinoma tiroideo di tipo papillare dove, in seguito all'introduzione di mutazioni puntiformi nella regione del promotore dell'NNMT ospitante il sito di legame per HNF-1 $\beta$ , è stata osservata una diminuzione dell'attivazione del promotore che ha consentito di dimostrare il ruolo chiave svolto da HNF-1 $\beta$  nell'attività trascrizionale dell'NNMT (56). Alti livelli di RNA messaggero per l'NNMT sono stati individuati nel fegato, ma anche in altri organi e tessuti come placenta, rene, polmone, muscolo scheletrico, cuore, milza, prostata, timo, testicolo, intestino, ovaio, stomaco, tiroide, midollo spinale, linfonodi, trachea, ghiandola surrenale, midollo osseo (57, 58) e in particolari aree del sistema nervoso.

Analisi di diffrazione a raggi X condotte su cristalli ricavati dalla proteina ricombinante umana purificata ad omogeneità, hanno permesso di ottenere la risoluzione della struttura tridimensionale dell'NNMT. Inoltre, esperimenti di mutagenesi sito-diretta hanno evidenziato l'importanza dei residui aminoacidici tirosina 20 (Y20) e acido aspartico 197 (D197) nell'espletamento della catalisi enzimatica (Figura 5) (59).





**Figura 5.** Struttura tridimensionale dell'NNMT umana ricombinante in complesso con nicotinamide e S-adenosil-L-omocisteina (a). Sito attivo e principali residui aminoacidici (Y20 e D197) i quali partecipano alla catalisi enzimatica (b).

Sebbene, la nicotinamide sia il substrato d'elezione dell'NNMT, i risultati ottenuti da uno studio sulla proteina suina nativa, purificata ad omogeneità, dimostrano che l'enzima agisce cataliticamente su composti piridino-simili (60). Ulteriori studi evidenziano che l'attività metilante dell'NNMT umana ricombinante può essere anche esercitata a carico del norharman (NH), un composto piridino-derivato, capace di produrre un effetto inibitorio molto significativo nei confronti del complesso I della catena respiratoria. Un eccessivo accumulo di questa molecola a livello del sistema nervoso rappresenta un elemento eziopatogenico del morbo di Parkinson (PD). Inoltre, l'NNMT è in grado di metilare la 4-fenilpiridina, con formazione dello ione N-metil-4 fenil piridinio (MPP<sup>+</sup>), una neurotossina il cui accumulo, a livello dei neuroni dopaminergici, rappresenta un ulteriore tratto istopatologico caratterizzante il PD (61). Di recente è stato messo a punto un rapido saggio per

determinare l'attività dell'NNMT al fine di individuare substrati alternativi e inibitori dell'enzima. Tale saggio, eseguito tramite l'accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa (UHP-HILIC-MS), ha permesso sia di valutare un ampio spettro di composti piridino-simili come potenziali substrati dell'enzima ma anche di identificare l'efficacia di molecole in grado di esercitare azione inibitoria nei confronti dell'NNMT (62, 63).

#### **1.4.4 Ruolo dell'NNMT nelle patologie neoplastiche**

Studi condotti a carico dell'enzima NNMT hanno evidenziato un suo coinvolgimento nelle patologie tumorali ed in particolare una sua overespressione, sia a livello genico che di proteina cataliticamente attiva, in un'ampia gamma di tumori solidi. In particolare l'espressione dell'NNMT risulta significativamente aumentata nel carcinoma orale squamocellulare (OSCC); inoltre i suoi livelli sono inversamente correlati allo stadio, al pT, al grado istologico e alla presenza di metastasi linfonodali (64, 65). L'analisi dell'espressione proteica, effettuata a carico di campioni salivari, ha evidenziato un aumento dei livelli dell'enzima in soggetti affetti da OSCC, rispetto a quelli rilevati in individui sani. Tale risultato ha posto le basi per lo sviluppo di un test per la diagnosi precoce e non-invasiva di questo tumore (66). Per comprendere il ruolo svolto dall'enzima nel metabolismo della cellula tumorale relativa a tale neoplasia, sono stati eseguiti esperimenti di silenziamento dell'enzima, nelle linee cellulari KB e PE/CA PJ-15 attraverso l'induzione del meccanismo dell'RNA interference (RNAi). La riduzione del livello di espressione dell'NNMT ha determinato una diminuzione della crescita cellulare e del potenziale tumorigenico *in vivo*, evidenziando un possibile coinvolgimento

dell'enzima nella proliferazione e nei meccanismi di tumorigenicità della cellula neoplastica (67, 68). L'induzione dell'overespressione dell'NNMT nella linea cellulare HSC-2 è in grado invece di conferire alla cellula di OSCC una maggiore capacità proliferativa *in vitro* (69). Per comprendere l'associazione tra NNMT e le cellule staminali tumorali (cancer stem cells o CSCs) è stata valutata l'espressione dell'enzima nelle cellule tumorali staminali ottenute a partire dalla linea cellulare di carcinoma della laringe Hep-2. I dati ottenuti indicano un'overespressione dell'NNMT nelle popolazioni arricchite in CSCs rispetto alle cellule parentali e conferiscono all'enzima un ruolo rilevante nel metabolismo della cellula tumorale, considerando che le CSCs vengono ritenute le principali responsabili dei fenomeni di chemioresistenza e radioresistenza e sono inoltre coinvolte nella possibile recidiva del tumore (70). Ulteriori studi hanno evidenziato questa possibile correlazione dell'enzima con le cellule staminali tumorali. È stato allestito un sistema di coltura per arricchire in CSC linee cellulari di carcinoma della vescica (T24), del polmone (A549), del colon-retto (CaCo-2) e dell'osteosarcoma (MG63) attraverso la formazione di sfere. Successivamente, è stata effettuata la caratterizzazione molecolare delle linee cellulari arricchite di CSCs e delle cellule parentali, valutando i livelli di espressione dei marcatori di staminalità e dell'enzima NNMT. I risultati hanno mostrato una significativa overespressione dei marcatori di staminalità e dell'NNMT in tutte le linee cellulari tumorali arricchite in CSCs, rispetto alle controparti parentali di controllo. Considerando il ruolo fondamentale svolto dalle CSC nella carcinogenesi tali risultati hanno evidenziato come l'NNMT svolga un ruolo centrale nella crescita e nelle metastasi del cancro (71). Studi recenti sull'espressione dell'NNMT nelle lesioni odontogene, hanno evidenziato un'espressione differenziale dell'enzima tra l'ameloblastoma (AM) e cheratocisti odontogene (OKC) primarie e ricorrenti, indicandolo come potenziale marcatore prognostico di tali lesioni (72).

Sebbene l'overespressione dell'NNMT è stata ormai identificata in diverse neoplasie, tuttavia il suo ruolo nel metabolismo della cellula neoplastica risulta ancora sconosciuto. Un'indagine a carattere metabolomico ha mostrato che nelle cellule cancerose caratterizzate da un'attività elevata dell'NNMT, si riscontra una significativa riduzione dei livelli di S-adenosil-L-metionina con conseguente alterazione dello stato di metilazione globale della cellula. Si ritiene che questo fenomeno modifichi il quadro epigenetico della cellula neoplastica, causando uno stato di ipometilazione degli istoni potenzialmente associato all'induzione dell'espressione di fattori protumorigenici (73, 74). Studi di espressione genica, condotti in campioni di glioblastoma multiforme (GBM), hanno rilevato elevati livelli di RNA messaggero per l'NNMT rispetto a quei controlli che erano costituiti da campioni di tessuto cerebrale rimossi chirurgicamente da pazienti affetti da forme epilettiche particolarmente severe (75). Inoltre, sono stati rilevati elevati livelli di attività dell'enzima e del suo prodotto di reazione in linee cellulari di glioma umano trattate con interferone gamma (76). L'espressione dell'enzima e del suo potenziale ruolo è stata inoltre valutata in cellule di carcinoma mammario. In particolare, sono state condotte analisi che hanno evidenziato la presenza dell'NNMT in linee cellulari adriamicina-resistenti (MCF-7/ADR), mentre l'espressione dell'enzima non è stata rilevata a livello delle cellule progenitrici (MCF-7), sensibili al trattamento con questo farmaco ad azione chemioterapica (77, 78). Un ulteriore studio condotto su linee cellulari di carcinoma mammario ha consentito di rilevare le seguenti evidenze:

- La downregolazione dell'NNMT nelle linee cellulari Bcap-37 e MDA-MB-2 causa una notevole riduzione della crescita cellulare, della capacità di formare colonie in vitro, e della tumorigenicità *in vivo*,

- tali linee sono inoltre caratterizzate da una maggiore percentuale di cellule che vanno incontro ad apoptosi e da un significativo aumento della produzione di ROS, rispetto alle cellule di controllo,
- l'overespressione dell'NNMT nelle linee cellulari MCF-7 e SK-BR-3 è associata ad un' aumentata proliferazione cellulare, ad una maggiore capacità di formare colonie ed una riduzione dell'apoptosi.

I risultati, sopra elencati, indicano che il silenziamento genico dell'NNMT può rappresentare una strategia molecolare per il trattamento del carcinoma mammario (79). Ulteriori studi si sono focalizzati sulla comprensione dei meccanismi molecolari relativi alla patogenesi del cancro della tiroide, mediante analisi dei profili di espressione genica di linee cellulari di carcinoma tiroideo di tipo papillare, anaplastico, follicolare e midollare. I risultati hanno evidenziato un'overespressione del gene per l'NNMT nell'istotipo papillare. Sono inoltre stati rilevati elevati valori di attività enzimatica rispetto a quelli relativi ad altre tipologie cellulari, al tessuto sano e alle colture primarie di cellule tiroidee. Analisi immunohistochemiche hanno permesso di ottenere risultati analoghi a quelli dell'attività catalitica: a livello tissutale la proteina è abbondante nel carcinoma papillare e follicolare, ma non viene rilevata nel tessuto sano e nell'adenoma follicolare. Inoltre, le indagini immunohistochemiche hanno confermato la localizzazione citoplasmatica dell'NNMT (80). L'analisi dei profili di espressione genica è stata eseguita anche in pazienti affetti da carcinoma del pancreas e tale analisi, eseguita a partire dall'RNA isolato dal succo pancreatico, ha evidenziato un'elevata espressione del gene per l'NNMT rispetto ai soggetti affetti da patologie non neoplastiche relative al tratto gastrointestinale superiore (81). Successivamente, è stato condotto uno studio su tessuti

provenienti da pazienti affetti da carcinoma pancreatico e da soggetti affetti da pancreatite, al fine di valutare i livelli di espressione dell'enzima, nonché di esaminare la sua valenza prognostica. Dai risultati è stata evidenziata un'upregolazione dell'NNMT nel tessuto canceroso rispetto al tessuto di controllo. Inoltre, i livelli di espressione dell'enzima nel tessuto canceroso sono significativamente correlati ai principali parametri clinico-patologici come lo stadio, la taglia e il grado di differenziamento del tumore (82). Infine, uno studio condotto sulla linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico PANC-1, sottoposta a deprivazione di glucosio, ha dimostrato che il silenziamento dell'NNMT comporta una riduzione della proliferazione delle cellule tumorali, mentre la sua overespressione ne promuove la crescita e l'invasività. Queste evidenze sottolineano il ruolo chiave dell'enzima nella proliferazione cellulare e nel potenziale metastatico delle cellule cancerose pancreatiche sottoposte a stress metabolico (83). L'analisi del metaboloma della linea cellulare PANC-1 mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LS-MS) ha riscontrato elevati livelli di MNA. Questo aumento è significativamente associato ad elevati livelli di mRNA per l'NNMT (84). Sono state svolti studi su campioni tissutali provenienti da soggetti affetti da carcinoma coloretale che hanno evidenziato elevati livelli proteici di NNMT nel tessuto canceroso rispetto a quello sano. Al fine di esplorare il potenziale ruolo dell'enzima come marker periferico di questo tipo di carcinoma è stato eseguito uno screening a livello serico a carico di un elevato numero di campioni provenienti da soggetti sani e da pazienti affetti da carcinoma coloretale. I risultati hanno mostrato la presenza di elevati livelli di NNMT nel siero dei soggetti patologici. Considerando che l'NNMT è una proteina citosolica, non soggetta a secrezione, il fatto che sia stata rilevata nel siero fa supporre che, nei soggetti affetti da carcinoma coloretale, la lesione neoplastica intestinale possa determinare un rilascio dell'enzima a livello periferico o che la presenza di condizioni patologiche a livello epatico

non ancora manifeste (micrometastasi associata a necrosi degli epatociti) induca la traslocazione di parte della proteina nel siero. Di conseguenza, la determinazione dei livelli plasmatici dell'NNMT potrebbe avere un'importante significato nella diagnosi precoce del carcinoma coloretale (85). Sulle linee cellulari di carcinoma coloretale HT-29 e SW480, è stata valutata la funzione biologica dell'NNMT mediante rispettivamente esperimenti di silenziamento genico e di overespressione. I risultati hanno dimostrato che l'upregolazione dell'enzima, non solo promuove la proliferazione cellulare e aumenta la capacità di formare colonie *in vitro* e la tumorigenesi *in vivo*, ma induce anche una riduzione dell'apoptosi e dei livelli intracellulari di ROS, contestualmente ad un aumento dei livelli di ATP. Inoltre, in seguito a trattamento con MNA, si osservano effetti analoghi. Per questo motivo tali risultati suggeriscono un potenziale coinvolgimento dell'NNMT nel bilancio energetico della cellula e nella sintesi di ROS (86).

Studi condotti su linee cellulari dell'adenocarcinoma coloretale hanno avuto l'obiettivo di valutare l'effetto dell'NNMT sulla sensibilità del 5-fluorouracile (5-FU), un farmaco, utilizzato nei protocolli di chemioterapia, per curare questa neoplasia. I risultati indicano che l'espressione dell'enzima esalta la refrattarietà di queste linee cellulari al trattamento con 5-FU. Ciò è principalmente dovuto al fatto che l'NNMT è in grado di determinare un abbassamento dei livelli di ROS, la cui produzione, in tale contesto, è indotta dal trattamento con 5-FU. Per tale motivo si verifica un'inattivazione del pathway ASK1-p38MAPK che conduce ad una riduzione del tasso di apoptosi 5-FU-associata (87). Studi di natura proteomica eseguiti su campioni di carcinoma gastrico hanno permesso di rilevare elevati livelli di NNMT nel tessuto canceroso rispetto a quello sano (88). Tale overespressione è stata confermata da studi successivi che hanno inoltre indagato anche il potenziale prognostico

dell'NNMT. Sulla base dei risultati ottenuti è stata dimostrata l'esistenza di una correlazione tra i livelli di espressione dell'enzima ed i parametri strettamente associati alla sopravvivenza, tra cui la dimensioni del tumore, la presenza di metastasi linfonodali e lo stadio. Inoltre, la downregolazione dell'enzima nelle linee cellulari di carcinoma gastrico comporta una riduzione della proliferazione, della migrazione e dell'invasione cellulare (89). Le neoplasie gastrointestinali (tumori esofagei, gastrici, coloretali, epatici e pancreatici) sono caratterizzate da un comportamento asintomatico, responsabile di un ritardo diagnostico. La sostanziale refrattarietà alla chemioterapia e alla radioterapia, mostrata da questi tumori in fase avanzata, contribuisce inoltre a determinare un esito sfavorevole per i pazienti, tale da rendere necessario identificare nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di strategie terapeutiche efficaci. Negli studi appena descritti è stato quindi valutato il coinvolgimento del NNMT in questi tumori ed è stato riscontrato come l'NNMT influenzi positivamente la vitalità, la proliferazione, la migrazione e l'invasività delle cellule, contribuendo a sostenere la crescita tumorale *in vitro* e *in vivo* così come la diffusione metastatica. Inoltre, l'overespressione dell'enzima nelle cellule tumorali è stata associata ad un aumento della resistenza al trattamento con farmaci chemioterapici. L'insieme di questi risultati suggerisce un possibile ruolo dell'NNMT quale target molecolare per il trattamento dei tumori gastrointestinali (90).

Analisi condotte su linee cellulari di carcinoma a cellule squamose dell'esofago (ESCC) hanno mostrato come la sensibilità al 5-FU delle cellule TE1 era inferiore a quella delle cellule EC1 e Eca109 e che il metabolismo della nicotinamide e il ciclo dell'acido tricarbossilico erano significativamente diversi in queste tre linee cellulari. Poiché l'NNMT risultava più espresso nelle cellule TE1 rispetto a EC1 ed Eca109, è stato valutato il ruolo dell'enzima sulla sensibilità al 5-FU *in vitro* e *in vivo*. Il silenziamento dell'NNMT ha aumentato significativamente la sensibilità al 5-FU delle cellule TE1,



mentre la sua overespressione nelle cellule EC1 e Eca109 ha causato effetti opposti. Nel complesso, questi risultati dimostrano come NNMT diminuisce la sensibilità al 5-FU nelle cellule ESCC umane attraverso la promozione dell'effetto Warburg, suggerendo che l'enzima può contribuire a prevedere gli effetti del trattamento della chemioterapia clinica nell'ESCC (91). Esperimenti di silenziamento genico dell'NNMT in linee cellulari di osteosarcoma umano e successivi saggi cellulari hanno evidenziato come l'NNMT influenzi positivamente la vitalità, la proliferazione, la migrazione cellulare e favorisca la resistenza al trattamento chemioterapico (92). Elevati livelli sierici dell'NNMT sono stati rilevati tramite il test ELISA, in pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) rispetto a soggetti sani e a pazienti affetti da COPD. Analisi statistiche hanno evidenziato l'importanza della valutazione combinata dei livelli sierici dell'NNMT e dell'antigene carcino-embrionario (CEA) per aumentare la sensibilità diagnostica del NSCLC (93). L'analisi dei livelli di espressione dell'enzima NNMT (Real-Time PCR, Western blot e saggio d'attività catalitica) è stata successivamente condotta in campioni di tessuto tumorale e peritumorale prelevato vicino (1-2 cm) e lontano (> 5 cm) rispetto al margine della neoplasia, ottenuti da soggetti affetti da NSCLC. Dai risultati ottenuti si è potuto rilevare un aumento statisticamente significativo dell'espressione dell'NNMT nel tessuto tumorale rispetto a quello peritumorale a livello di messaggero, di proteina e di attività specifica (94). Esperimenti di silenziamento genico, dell'enzima nella linea cellulare A549 relativa a tale carcinoma hanno consentito di valutare l'effetto indotto dalla riduzione dei livelli di espressione dell'enzima sul fenotipo della cellula neoplastica. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il knockdown dell'NNMT comporta una sensibile riduzione della tumorigenicità *in vitro* (95). Diversamente a quanto riportato finora, in campioni di carcinoma epatocellulare sono riscontrati ridotti livelli di messaggero per l'NNMT rispetto al tessuto sano adiacente. I livelli di espressione

dell'enzima risultano direttamente correlati con lo stadio tumorale e inversamente con la sopravvivenza. Tali osservazioni designano l'NNMT come possibile marcatore prognostico (96).

Per quanto riguarda le neoplasie a carattere urologico, analisi sull'enzima sono state eseguite a carico del tumore della vescica, del rene e della prostata. Nella linea di carcinoma vescicale radioresistente (MGH-UI) sono stati riscontrati elevati livelli di messaggero per l'NNMT rispetto a quanto evidenziato nel suo subclone radiosensibile (S40b). Ciò ha sottolineato che l'enzima riveste un ruolo nella responsività cellulare al trattamento radioterapico e il possibile coinvolgimento dell'NNMT nel determinare questa radioresistenza potrebbe essere dovuto alla sua attività catalitica. Infatti, gli elevati livelli di espressione dell'enzima potrebbero determinare una riduzione intracellulare dei livelli di nicotinamide, noto radiosensibilizzante in grado di amplificare il danno prodotto dalle radiazioni a livello cellulare (97). In tale ambito, studi successivi sono stati condotti su CSCs. Cloni di CSCs, di origine mesenchimale, che overesprimono l'NNMT, hanno mostrato una spiccata resistenza al trattamento radioterapico, permettendo di formulare l'ipotesi che gli elevati livelli di enzima possano essere responsabili di radioresistenza. Infatti, l'attività del NNMT, poiché abbassa i livelli intracellulari di nicotinamide, determina la rimozione dell'inibizione che questo composto esercita verso le PARPs, e consentendo così la riparazione del DNA danneggiato. Nei cloni radioresistenti sono stati inoltre rilevati elevati livelli di espressione di NAMPT, enzima coinvolto nella sintesi del NAD<sup>+</sup> a partire dalla nicotinamide. Elevati livelli di NAMPT si tradurrebbero in una maggiore disponibilità di NAD<sup>+</sup>, substrato della PARP nei processi di ADP-ribosilazione (98). In linee cellulari di carcinoma della vescica sono stati eseguiti esperimenti di silenziamento dell'NNMT che hanno mostrato una riduzione della migrazione e della proliferazione cellulare, suggerendo un possibile ruolo dell'enzima nella progressione tumorale (99). In campioni di tessuto canceroso di pazienti affetti

da carcinoma uroteliale della vescica, uno studio recente ha mostrato alti livelli di espressione e di attività enzimatica dell'NNMT. Successive analisi, effettuate su cellule di sfaldamento dell'urotelio provenienti da campioni urinari di pazienti affetti da neoplasia vescicale e da soggetti sani, hanno previsto la valutazione dell'espressione dell'enzima a livello sia di messaggero sia di proteina. I risultati hanno indicato un aumento dei livelli di espressione dell'NNMT nei campioni tumorali rispetto ai controlli. In base a tali scoperte, la determinazione dei livelli di espressione urinaria dell'enzima può essere usata nella diagnosi precoce e non-invasiva del carcinoma uroteliale della vescica (100, 101). L'overespressione dell'NNMT evidenziata anche nei fluidi biologici come saliva ed urine, derivanti da soggetti affetti da carcinoma del cavo orale o uroteliale, consente di candidare l'enzima come promettente biomarcatore per la diagnosi precoce e non invasiva di questi tumori. Inoltre, risultati esaminati hanno dimostrato la capacità dell'NNMT di promuovere la proliferazione, la migrazione e l'invasività delle cellule, nonché la sua potenziale partecipazione ad eventi fondamentali che evidenziano la progressione del cancro, le metastasi e la resistenza alla chemioterapia e alla radioterapia (102).

In pazienti affetti da carcinoma renale a cellule chiare sono stati rilevati elevati livelli di messaggero per l'NNMT nel tessuto renale canceroso rispetto a quello sano (103, 104). Analisi immunostochimiche condotte su campioni di carcinoma renale hanno mostrato una correlazione inversa tra i livelli di espressione dell'enzima e la sopravvivenza dei pazienti (105). Attraverso 2D-PAGE ed all'analisi immunostochimica, è stata confermata la presenza di elevati livelli dell'NNMT nei campioni di carcinoma renale a cellule chiare rispetto ai campioni di controllo, nonché una correlazione inversa tra l'espressione dell'enzima e il grado del tumore. Successivamente sul plasma di pazienti affetti da carcinoma renale e di soggetti sani sono stati eseguiti test ELISA che hanno

confermato la presenza di maggiori livelli di enzima nei campioni tumorali (106). Un ulteriore studio effettuato su linee cellulari di carcinoma renale a cellule chiare ha messo chiaramente in evidenza che l'espressione dell'NNMT è in grado di promuovere la capacità invasiva della cellula. Al contrario, in seguito al silenziamento del NNMT, si assiste ad una diminuzione della crescita tumorale e del potenziale metastatico *in vivo* della cellula tumorale (107). Analisi sul carcinoma renale hanno mostrato elevati livelli serici dell'NNMT nei soggetti patologici rispetto ai controlli, proponendo l'NNMT, come promettente biomarker per la diagnosi precoce dei tumori renali, sia in termini di specificità sia di sensibilità (108). Analisi immunohistochimiche hanno evidenziato un'overespressione dell'enzima nel carcinoma prostatico rispetto all'iperplasia prostatica benigna. Indagini successive hanno dimostrato che l'espressione dell'enzima è inversamente correlata al grado di differenziamento (Gleason score), suggerendo un potenziale coinvolgimento dell'NNMT nelle fasi precoci della trasformazione maligna del tessuto prostatico. Di recente, sono state svolte analisi nei confronti di soggetti affetti da forme più avanzate di carcinoma prostatico che hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione diretta tra i livelli di espressione dell'NNMT e la sopravvivenza. Questi ultimi risultati suggeriscono che l'analisi dell'espressione dell'enzima potrebbe essere utilizzata nella formulazione della prognosi dei pazienti affetti da tale neoplasia (109). Analisi immunohistochimiche hanno inoltre mostrato una marcata overespressione dell'NNMT in campioni di melanoma cutaneo rispetto a campioni di nevi e l'esistenza di una relazione inversa statisticamente significativa con importanti parametri isto-patologici (spessore di Breslow, Livello di Clark, presenza/numero di mitosi e di ulcere) evidenziando il potenziale prognostico dell'enzima in tale patologia (110). Esperimenti di silenziamento dell'enzima in linee cellulari di melanoma A375 e WM-115 hanno portato ad una riduzione della proliferazione e migrazione cellulare delle cellule e ad un

aumento della sensibilità delle cellule di melanoma al trattamento con dacarbazina, evidenziando un possibile coinvolgimento dell'NNMT nella proliferazione e nei meccanismi di tumorigenicità della cellula neoplastica così come nella resistenza della cellula tumorale al trattamento chemioterapico (111).

## 1.5 SCOPO DEL LAVORO

Alla luce degli studi riportati in letteratura, che descrivono un'aumentata espressione dell'NNMT in numerose neoplasie, è stato interessante intraprendere un lavoro di ricerca volto ad esplorare il potenziale coinvolgimento di questo enzima nel carcinoma a cellule di Merkel, una neoplasia neuroendocrina cutanea rara ma estremamente aggressiva, caratterizzata da una tendenza alla recidiva locale e/o alla metastatizzazione linfonodale e a distanza. Al fine di comprendere il ruolo svolto dall'enzima nel metabolismo della cellula tumorale, sono stati effettuati esperimenti di silenziamento dell'NNMT in linee cellulari di Merkeloma umano, MCC-13 e MCC-26. Per raggiungere tale scopo, le cellule sono state trasfettate con plasmidi codificanti shRNAs aventi come bersaglio la sequenza dell'RNA messaggero per l'NNMT. Dopo aver verificato l'efficienza del silenziamento dell'enzima, le cellule sono state sottoposte a saggi cellulari per valutare aspetti strettamente correlati alla tumorigenicità, vitalità e proliferazione cellulare (saggi MTT e Trypan blue), alla migrazione (wound healing assay) e alla sensibilità delle cellule tumorali al trattamento chemioterapico. Tali analisi sono state condotte per esplorare se la riduzione dell'espressione dell'NNMT fosse in grado di alterare il fenotipo della cellula neoplastica, al fine di valutare la possibilità di utilizzare l'enzima come target molecolare nella terapia dell'MCC.

## **2 MATERIALI E METODI**

### **2.1 CELLULE IN CULTURA**

Per indagare il coinvolgimento dell'enzima NNMT nei processi metabolici della cellula tumorale, sono stati effettuati esperimenti *in vitro* utilizzando come modello due linee cellulari di Merkeloma umano, MCC-13 e MCC-26.

#### **2.1.1 Colture cellulari**

Le linee cellulari MCC-13 e MCC-26 sono state ottenute dall'Istituto di Virologia dell'Università di Colonia, Germania. Le cellule sono state fatte crescere in adesione in DMEM High Glucose (Euroclone), addizionato di siero fetale bovino al 10% (FBS) e gentamicina 50 µg/ml. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37°C in incubatore con atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>.

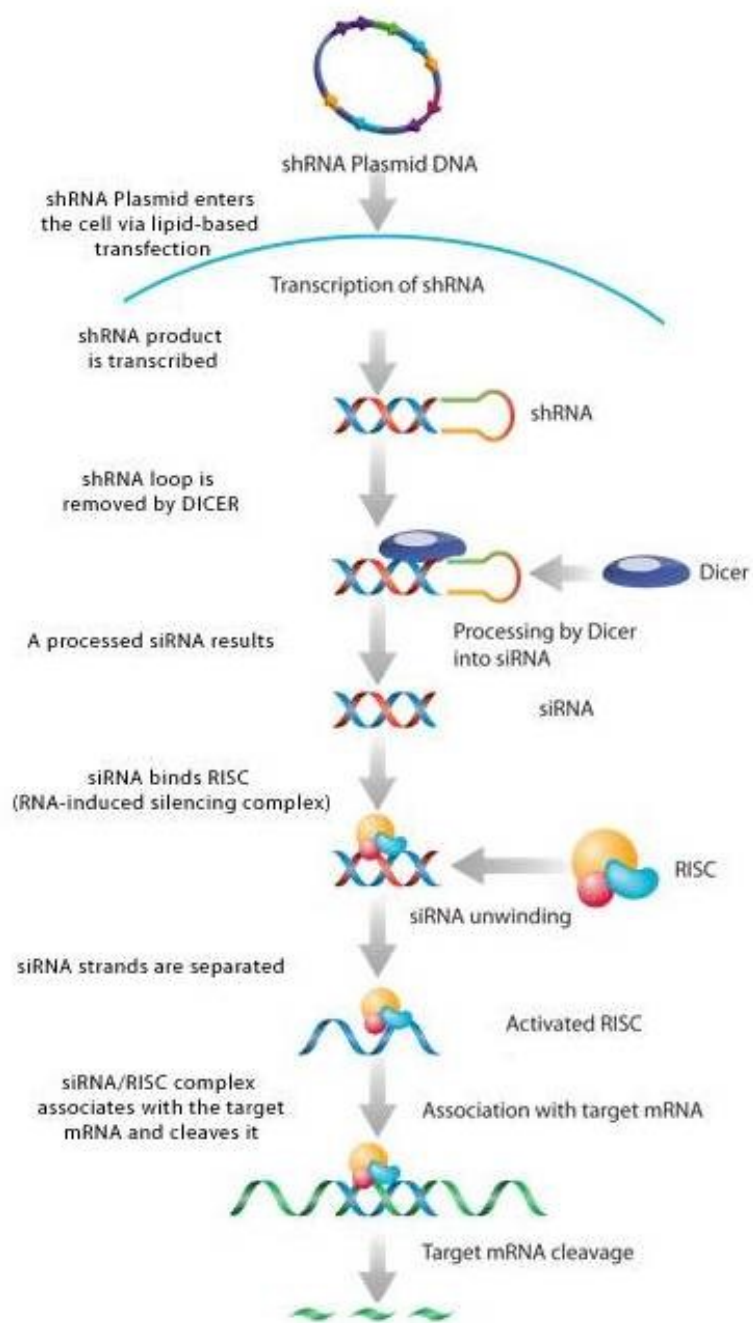
#### **2.1.2 Silenziamento dell'NNMT**

Per silenziare il gene NNMT nelle linee cellulari MCC-13 e MCC-26, è stata utilizzata la tecnologia dell'RNA interference (RNAi). Questo meccanismo sfrutta piccole molecole di RNA a doppia elica (siRNA o shRNA) che, una volta introdotte nella cellula, si legano specificamente all'RNA messaggero d'interesse, innescandone la degradazione e inibendo così la produzione della proteina

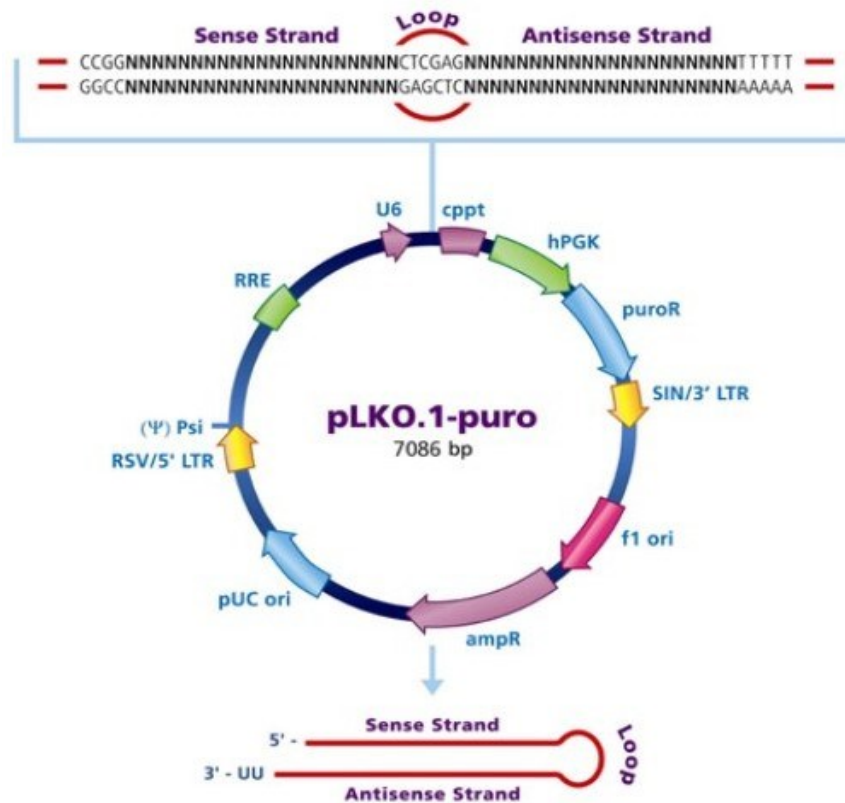
corrispondente. In particolare, i siRNAs sono oligo a doppio filamento che una volta acquisiti dalla cellula mediante trasfezione determinano la degradazione sequenza-specifica dell'mRNA relativo al gene target, mentre gli shRNAs sono molecole di RNA più lunghe che vengono espresse all'interno della cellula a partire da plasmidi utilizzati per la trasfezione (112). Nella cellula eucariotica, tali plasmidi vengono riconosciuti dall'RNA Polimerasi III, che è in grado di condurre alla trascrizione delle sequenze relative agli shRNAs. Tali molecole sono formate da un filamento senso, uno spacer (ansa o loop) ed un filamento antisenso. La struttura a forcina, generata dall'appaiamento intramolecolare delle regioni complementari del trascritto, viene riconosciuta da nucleasi specifiche (Dicer) che ne catalizzano l'idrolisi, portando alla separazione dei due filamenti complementari. Il filamento antisenso andrà quindi a legarsi alla sequenza complementare presente nell'RNA messaggero del gene target, inducendone la successiva degradazione (Figura 6) (113). Le cellule MCC-13 e MCC-26 sono state seminate in piastre 24-well ( $7 \times 10^4$  cellule/pozzetto). Il giorno successivo alla semina, raggiunta una confluenza del 80%, valore ottimale per eseguire la trasfezione, le cellule sono state trasfettate mediante l'utilizzo dell'agente di trasfezione liposomiale FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA). Per ogni campione è stata preparata una miscela pari a 25  $\mu$ l contenente 0,5  $\mu$ g di DNA plasmidico, 1,5  $\mu$ l di FuGENE e terreno DMEM privo di siero e di antibiotico. In seguito, la miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 10 minuti ed aggiunta a ciascun pozzetto, contenente 500  $\mu$ l di terreno. I plasmidi utilizzati per il silenziamento dell'NNMT sono: pLKO.1-164, pLKO.1-330 e pLKO.1-448 (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO) (Figura 7). Tali vettori si differenziano poiché ognuno di essi ospita la sequenza nucleotidica relativa ad un shRNA contenente un filamento antisenso complementare ad una specifica regione del messaggero dell'NNMT. Le cellule sono state trasfettate separatamente con una miscela contenente uno dei tre



plasmidi (0,5 ug/pozzetto, ogni pozzetto un plasmide diverso), mantenendo invariati i rapporti tra DNA e FuGENE (1:3). Infine, per valutare l'eventuale interferenza sull'espressione genica data dal solo plasmide, in un ulteriore pozzetto le cellule sono state trasfettate con la miscela di reazione contenente il plasmide pLKO.1-puro (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO) privo dell'insero codificante per l'shRNA. Le cellule utilizzate come controllo della trasfezione (mock), invece, sono state trattate con il solo reagente di trasfezione. Dopo 48 ore dall'inizio della trasfezione, il terreno contenente la miscela di trasfezione è stato rimosso dai pozzetti contenenti le cellule in coltura ed è stato aggiunto terreno completo addizionato di una quantità specifica di puromicina (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO). I plasmidi della serie pLKO.1-puro portano con sé la sequenza nucleotidica codificante per una proteina che conferisce alle cellule un fenotipo di resistenza all'antibiotico usato per la selezione. L'introduzione di puromicina nel mezzo di coltura ha innescato un processo di selezione positiva, volto a isolare i cloni cellulari puromicina-resistenti, che si è protratto per circa 2-3 settimane. Durante questo lasso di tempo, all'interno dei pozzetti relativi al trattamento con il solo reagente di trasfezione, le cellule sono morte, mentre nei campioni trasfettati con i plasmidi per il silenziamento dell'NNMT o con il vettore vuoto, dopo un'iniziale fase di morte cellulare generalizzata, i cloni ospitanti i vettori hanno iniziato a replicarsi. Al completamento del processo di selezione, i cloni cellulari sono stati espansi e valutati al fine di verificare l'avvenuto silenziamento dell'NNMT. Le cellule selezionate sono state mantenute in terreno completo contenente puromicina 1 µg/ml ed utilizzate per lo svolgimento delle successive analisi cellulari. L'efficienza del silenziamento genico dell'NNMT è stata valutata a livello di mRNA mediante Real-Time PCR e a livello proteico mediante Western blot.



**Figura 6.** Silenziamento genico mediante plasmidi codificanti shRNAs.



**Figura 7.** Il plasmide pLKO.1-puro contiene una regione, posizionata a valle del promotore U6, in cui viene inserito l'shRNA per silenziare il gene desiderato.

### 2.1.3 Estrazione, quantificazione e retrotrascrizione dell'RNA totale

Le cellule sono state staccate usando tripsina-EDTA e contate con la camera di Burkner, utilizzando il Trypan blue per escludere dalla conta le cellule non vitali. Le cellule sono state quindi centrifugate a 300 x g per 5 minuti a 4°C e i pellet cellulari (1x10<sup>6</sup>) derivanti dai diversi pozzetti, sono stati sottoposti a lisi per l'estrazione dell'RNA totale mediante il kit d'estrazione SV Total RNA Isolation

System (Promega). La purificazione dell'RNA è avvenuta mediante: lisi cellulare, denaturazione dei complessi nucleoproteici, inattivazione delle ribonucleasi e rimozione di DNA genomico e contaminanti proteici. Per determinare la concentrazione e la purezza del campione, l'RNA isolato è stato sottoposto ad analisi spettrofotometrica tramite l'utilizzo dello strumento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), valutando i valori di assorbanza a 3 diverse lunghezze d'onda: 230 nm, 260 nm e 280 nm. Sono stati verificati i rapporti tra i valori di assorbanza misurati alle differenti lunghezze d'onda (260/280 nm; 260/230 nm) per poter valutare la purezza ed eventuali contaminazioni dei campioni da parte rispettivamente di proteine o di guanidina tiocianato. Sono stati retrotrascritti 2 µg di RNA totale utilizzando il kit commerciale M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), e random primers. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato quale template per le analisi di Real-Time PCR.

#### **2.1.4 Real-Time PCR**

L'efficienza del silenziamento dell'NNMT è stata valutata mediante Real-Time PCR, metodica che consente l'amplificazione e contemporaneamente la quantizzazione del cDNA utilizzato come stampo. Il DNA presente nel campione viene amplificato mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e l'avanzamento della reazione viene monitorato (in tempo reale) grazie all'emissione di fluorescenza da parte di specifici marcatori fluorescenti, il cui accumulo a livello del prodotto di reazione segue la stessa cinetica della reazione di amplificazione (114). Pertanto, all'aumentare dell'accumulo del prodotto di reazione aumenta il segnale fluorescente che viene acquisito da un

lettore ottico accoppiato al termociclatore e successivamente rielaborato da uno specifico software. La chimica adottata per la rilevazione dei prodotti di amplificazione ha previsto l'impiego dell'EvaGreen, quale molecola fluorescente in grado di intercalarsi al doppio filamento di DNA. In una reazione di amplificazione la quantità di prodotto che si forma dopo un ciclo termico raddoppia al ciclo successivo. Di conseguenza misurando l'incremento di fluorescenza, dovuto alla formazione di nuovo prodotto all'avanzare dei cicli, è possibile ricavare la curva di amplificazione del template di interesse, avente un andamento sigmoidale. Nella fase esponenziale crescente di tale curva è possibile individuare un ciclo di amplificazione a cui corrisponde un valore di fluorescenza che è misura della quantità di prodotto che si è formato: il ciclo soglia (Ct). Graficamente il Ct è determinato dalla proiezione sull'asse delle ascisse del punto in cui la curva interseca la linea di base, al di sopra della quale qualsiasi incremento di fluorescenza diventa significativo. Per l'analisi dell'espressione dell'enzima NNMT è stato impiegato il metodo di quantizzazione relativa che permette di valutare le differenze nei livelli di espressione di un gene tra un campione ed il relativo controllo, mediante il confronto dei cicli soglia. Per poter effettuare tale confronto è necessario scegliere un gene di riferimento diverso dal gene di interesse (GOI) che possa fungere da standard interno sia per il campione sia per il controllo: il gene housekeeping (HKG), rappresentato in questo caso dalla  $\beta$ -actina. Calcolati i valori di Ct relativi al GOI e all'HKG si procede alla determinazione del  $\Delta$ Ct ( $\Delta$ Ct = Ct GOI – Ct HKG). Il parametro che quantifica l'espressione relativa del GOI nel campione (S) rispetto al controllo (C) è pari a  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}, dove  $\Delta\Delta$ Ct = (S $\Delta$ Ct – C $\Delta$ Ct). Nello specifico l'espressione relativa dell'NNMT è pari a  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}, dove  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct (pLKO.1-164 o pLKO.1-330 o pLKO.1-448) –  $\Delta$ Ct (pLKO.1-puro). L'analisi d'espressione del gene d'interesse nei campioni è stata svolta utilizzando il CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Relativamente a ciascun

campione sono state allestite miscele di reazione di 20  $\mu$ l (in triplicato) contenenti 1  $\mu$ l di cDNA, 10  $\mu$ l di EvaGreen Supermix (Bio-Rad) e i primer specifici ad una concentrazione finale di 500 nM. Il protocollo prevede lo svolgimento di 40 cicli di amplificazione, ciascuno dei quali costituito da una fase di denaturazione a 95°C per 30 secondi e da una fase di annealing ed elongazione a 58°C per 30 secondi. Le sequenze nucleotidiche relative alle coppie di primers impiegati per l'amplificazione del gene di interesse e per il gene housekeeping ( $\beta$ -actina), sono le seguenti:

- NNMT (forward)  $\rightarrow$  5'-GAATCAGGCTTCACCTCCAA-3'
- NNMT (reverse)  $\rightarrow$  5'-TCACACCGTCTAGGCAGAAT-3'
- $\beta$ -actina (forward)  $\rightarrow$  5'-TCCTTCCTGGGCATGGAGT-3'
- $\beta$ -actina (reverse)  $\rightarrow$  5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

### 2.1.5 Western blot

L'efficienza del silenziamento dell'NNMT è stata verificata anche a livello proteico mediante Western blot, la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è stata utilizzata come standard di caricamento. Le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA, contate e successivamente centrifugate a 300 x g per 5 minuti a 4°C. I pellet cellulari ( $2 \times 10^6$ ) sono stati risospesi in 100  $\mu$ l di un tampone di lisi (PBS contenente Nonidet-P40 10 mg/ml, desossicolato di sodio 5 mg/ml, SDS 1 mg/ml, ortovanadato di sodio 1 mM, PMSF 1 mM e aprotinina 2  $\mu$ g/ml) e sottoposti ad omogeneizzazione utilizzando una siringa da insulina. In seguito, i campioni sono stati centrifugati a 16000 x g per 10 minuti a 4°C ed è stato prelevato il surnatante (estratto proteico).

La concentrazione proteica è stata misurata con il metodo di Bradford, utilizzando come standard la sieralbumina bovina (BSA). Un quantitativo di estratto proteico pari a 50 µg ottenuto da ciascun campione è stato sottoposto ad elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) secondo il metodo di Laemmli (115) impiegando un running gel ad una concentrazione di poliacrilamide al 15%. Terminata l'elettroforesi, le proteine sono state trasferite dal gel ad una membrana di polivinildenfluoruro (PVDF). Per ottimizzare il trasferimento, il gel è stato inizialmente equilibrato per 10 minuti nel tampone di trasferimento (CAPS 10mM a pH 11, metanolo al 10%) e la membrana di PVDF, caratterizzata da una forte idrofobicità, è stata inizialmente immersa in metanolo per alcuni secondi, poi in acqua per 2-3 minuti e infine mantenuta nel tampone di trasferimento per almeno 30 minuti. Il sistema di trasferimento è stato quindi allestito utilizzando un supporto composto da due lastre di plastica, su cui sono stati posti in successione uno sopra l'altro una spugnetta, due fogli di carta da filtro da 9x5cm, il gel di poliacrilammide contenente le proteine separate, la membrana di PVDF (delle stesse dimensioni del gel), due ulteriori fogli di carta da filtro ed infine una seconda spugnetta. Per assicurare un buon trasferimento, tutti i fogli di carta da filtro e le spugne sono stati precedentemente imbevuti nel tampone di trasferimento. Il supporto, contenente i vari componenti ravvicinati tra loro, è stato messo tra due elettrodi paralleli all'interno di una vasca elettroforetica riempita con il tampone di trasferimento, rivolgendo il lato relativo alla membrana verso il polo positivo (anodo). Le proteine aventi carica negativa, si muoveranno verso il polo positivo, passando dal gel alla membrana di PVDF. IL trasferimento è stato protratto 30 minuti a 250 mA, a 4°C. Le membrane PVDF sulle quali erano state precedentemente trasferite le proteine sono state incubate a 4°C overnight con una soluzione di bloccaggio costituita da PBS 1X, siero di latte al 5% e Tween-20 allo 0,05% (soluzione A). Il giorno seguente le membrane sono state sottoposte a 3 lavaggi da 5 minuti

ciascuno con una soluzione costituita da PBS 1X con aggiunta di Tween 20 allo 0,5% (soluzione B). Successivamente sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi policlonali di coniglio anti-NNMT (Sigma), diluiti 1:1000 nella soluzione A. Per il GAPDH sono stati utilizzati anticorpi monoclonali di topo anti-GAPDH (Sigma), diluiti 1:250 nella soluzione A. Terminata l'incubazione con gli anticorpi primari sono stati eseguiti 5 lavaggi da 5 minuti ciascuno con la soluzione B ed è seguita un'incubazione da 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari anti-rabbit coniugati con perossidasi (Sigma), diluiti 1:150000 nella soluzione A o con anticorpi secondari anti-mouse coniugati con perossidasi (Bio-rad) diluiti 1:5000 nella soluzione A. Sono stati infine eseguiti altri 5 lavaggi da 5 minuti ciascuno con la soluzione B e si è quindi proceduto alla rivelazione del segnale chemiluminescente relativo all'NNMT e GAPDH mediante un'incubazione di 5 minuti con SuperSignal West Femto Maximum Sensivity Substrate (ThermoFisher). L'acquisizione del segnale chemiluminescente relativo alle proteine d'interesse è avvenuta mediante l'impiego del rilevatore di immagini ChemiDoc XRS+ System (BIO-RAD). Successivamente le immagini digitali sono state assoggettate ad analisi densitometrica mediante il software Image Lab (Bio-Rad).

### **2.1.6 Saggio MTT**

Per valutare l'influenza del silenziamento dell'NNMT sulla vitalità cellulare è stato allestito il saggio colorimetrico MTT, dove viene sfruttata la capacità della deidrogenasi mitocondriale di scindere l'anello tetrazolico del composto MTT [bromuro di 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio],



aggiunto al terreno di coltura, in modo da generare un sale di formazano dal colore blu scuro-violetto che si accumula all'interno della cellula vitale. Ai campioni viene poi aggiunto un solvente per dissolvere i sali di formazano insolubili in un composto colorato la cui intensità è proporzionale alla quantità di formazano prodotta e, di conseguenza, al numero delle cellule vitali presenti nel pozzetto. Le cellule sono state seminate in 96-well ( $8 \times 10^3$  cellule/pozzetto). Dopo 24 ore dalla semina è stato eseguito il primo test dell'MTT, corrispondente al punto zero della curva di crescita (0 h). La soluzione di MTT (5 mg/ml in PBS) è stata diluita (1:12) in terreno di coltura e 100  $\mu$ l sono stati successivamente aggiunti alle cellule presenti in ciascun pozzetto. Le cellule sono state incubate per 2 ore a 37°C in ambiente umido con il 5% di CO<sub>2</sub>. In seguito all'incubazione, il terreno è stato rimosso e sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di isopropanolo a ciascun pozzetto. La lettura dei valori di assorbanza è stata effettuata ad una lunghezza d'onda di 540 nm utilizzando un lettore automatico per piastre. La procedura è stata ripetuta a 24, 48 e 72 ore dal primo test (punto zero). I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo, dove il controllo corrisponde al 100% ed è pari al valore di assorbanza letta per ogni campione al tempo zero. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato e ripetuto per tre volte.

### **2.1.7 Test di esclusione del colorante Trypan Blue**

Il test di esclusione del colorante Trypan Blue è stato utilizzato per valutare la proliferazione cellulare in seguito al silenziamento dell'NNMT, mediante l'impiego del colorante Trypan Blue 0,4% (GIBCO, Massachusetts). Tale colorante permette di verificare la funzionalità e la permeabilità della membrana plasmatica in quanto non è in grado di attraversare la membrane integre delle cellule vitali, ma solamente quella delle cellule danneggiate colorando il loro citoplasma di blu. Grazie a tale colorazione è possibile quindi discriminare le cellule morte da quelle vitali, che al microscopio appaiono traslucide. La conta cellulare, dopo la colorazione con Trypan Blue, viene eseguita al microscopio ed i risultati espressi come percentuale di cellule vive. Le cellule sono state seminate in 6-well ( $1 \times 10^5$  cellule/pozzetto) in un terreno privo di siero. Il giorno successivo, corrispondente al punto zero della curva di crescita, il terreno è stato sostituito con del terreno completo, le cellule sono state staccate con 500  $\mu$ l di tripsina e centrifugate a 300 x g per 3 minuti. Dopo la risospensione del pellet in 500  $\mu$ l di terreno completo, è stato aggiunto il colorante e le cellule vive sono state contate al microscopio utilizzando la camera di Burker. La procedura è stata ripetuta a 24, 48 e 72 ore dalla prima conta (punto zero). Il numero di cellule vitali (negative al Trypan Blue) è stato espresso come percentuale rispetto al controllo, dove il controllo corrisponde al 100% ed è pari al numero di cellule vitali contate per ciascun campione al tempo zero. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato e ripetuto per tre volte.

### 2.1.8 Wound Healing Assay

Per valutare la capacità migratoria ed invasiva delle cellule di Merkeloma, le cellule trasfettate con i plasmidi più efficienti sono state utilizzate per il Wound Healing Assay. Questa tecnica simula *in vitro* la capacità migratoria delle cellule durante la rimarginazione delle ferite. La velocità e l'efficienza con cui le cellule migrano e riparano il danno tissutale sono indicativi del loro potenziale metastatico (116). Il test prevede di effettuare un taglio su un monostrato di cellule, catturarne l'immagine e infine monitorare a intervalli temporali regolari e ben definiti la capacità di chiusura del taglio effettuato. A tale scopo, le cellule trasfettate sono state seminate in 6-well ( $3 \times 10^5$  cellule/pozzetto) e al raggiungimento di una confluenza del 100% sono state sottoposte al saggio. Il taglio è stato effettuato verticalmente al centro di ciascun pozzetto mediante un puntale sterile da 200  $\mu$ l. Successivamente, i detriti cellulari sono stati rimossi delicatamente mediante lavaggio con una soluzione sterile di PBS 1X ed è stato aggiunto nuovo terreno di coltura con una concentrazione di FBS allo 0,5%. L'acquisizione delle immagini è stata eseguita al momento del taglio (tempo zero) e a intervalli di tempo regolari di 2, 4, 8 e 24 ore dal taglio, mediante una fotocamera digitale collegata al microscopio ottico. Le immagini sono state analizzate con il programma Image J.

### **2.1.9 Trattamento Chemioterapico**

Per valutare l'impatto del silenziamento dell'NNMT sulla risposta della cellula tumorale al trattamento chemioterapico, le cellule MCC-26 silenziate con il plasmide pLKO.1-164 e con il plasmide pLKO.1-puro di controllo, sono state trattate con due diverse concentrazioni di cisplatino (0,1 e 1  $\mu$ M), un agente chemioterapico comunemente utilizzato nel trattamento dell'MCC. Le cellule silenziate e di controllo, sono state seminate in piastre a 96-well alla densità di  $5 \times 10^3$  cellule/pozzetto. Dopo 24 ore dalla semina, il terreno di coltura è stato sostituito con quello previsto per ogni trattamento, ed è stata valutata la proliferazione cellulare tramite saggio MTT, effettuando la lettura prima dell'aggiunta del chemioterapico e a 24, 48 e 72 ore dall'inizio del trattamento. Lo svolgimento del saggio MTT è stato condotto nelle stesse modalità descritte in precedenza.

### **2.1.10 Analisi Statistiche**

I dati ottenuti sono stati utilizzati tramite il software GraphPad Prism versione 8.00 per Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Per valutare le differenze tra i gruppi è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis. Un valore  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## **3 RISULTATI**

### **3.1 ANALISI CELLULARI**

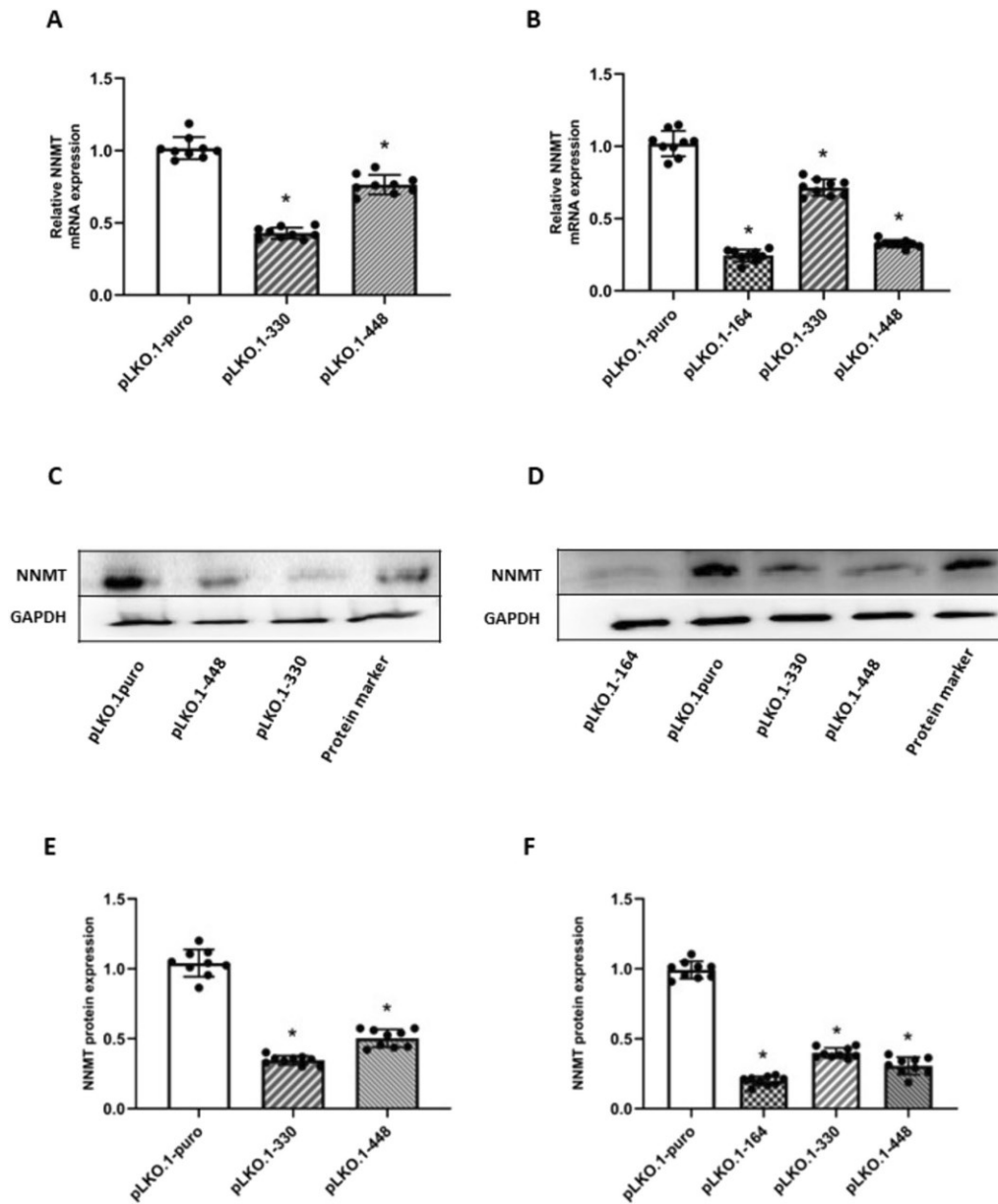
L'efficienza del silenziamento dell'NNMT è stata valutata sia a livello dell'RNA messaggero sia a livello proteico, mediante Real-Time PCR e Western blot, rispettivamente.

#### **3.1.1 Real-Time PCR**

Le analisi mediante Real-Time PCR hanno evidenziato una riduzione dell'espressione dell'enzima nelle cellule trasfettate con i plasmidi shRNA anti-NNMT rispetto alle cellule di controllo trasfettate con il plasmide vuoto. In particolare, le cellule MCC-13 trasfettate con i plasmidi pLKO.1-330 ( $0,43 \pm 0,039$ ) e pLKO.1-448 ( $0,75 \pm 0,067$ ) hanno mostrato una riduzione significativa ( $p < 0,05$ ) dell'espressione dell'enzima rispetto al controllo ( $1,00 \pm 0,078$ ; pLKO.1-puro) (Figura 8A), così come le cellule MCC-26 trattate con i vettori pLKO.1-164 ( $0,24 \pm 0,036$ ), pLKO.1-330 ( $0,69 \pm 0,052$ ) e pLKO.1-448 ( $0,31 \pm 0,029$ ) rispetto alle cellule MCC-26 di controllo ( $1,00 \pm 0,085$ ; pLKO.1-puro) (Figura 8B).

### 3.1.2 Western Blot

Il Western blot e l'analisi densitometrica hanno confermato l'efficienza del silenziamento dell'NNMT anche a livello proteico, evidenziando una ridotta espressione dell'enzima nelle cellule MCC-13 trasfettate con pLKO.1-330 ( $0,36 \pm 0,038$ ) e pLKO.1-448 ( $0,48 \pm 0,058$ ) rispetto a quelle trattate con il vettore vuoto ( $1,00 \pm 0,089$ ; pLKO.1-puro) (Figure 8C ed E). Analogamente le cellule MCC-26 trasfettate con pLKO.1-164 ( $0,21 \pm 0,032$ ), pLKO.1-330 ( $0,38 \pm 0,042$ ) e pLKO.1-448, ( $0,30 \pm 0,047$ ) hanno mostrato una ridotta espressione proteica dell'enzima rispetto alle cellule di controllo ( $1,00 \pm 0,076$ ; pLKO.1-puro) (Figure 8D e F).

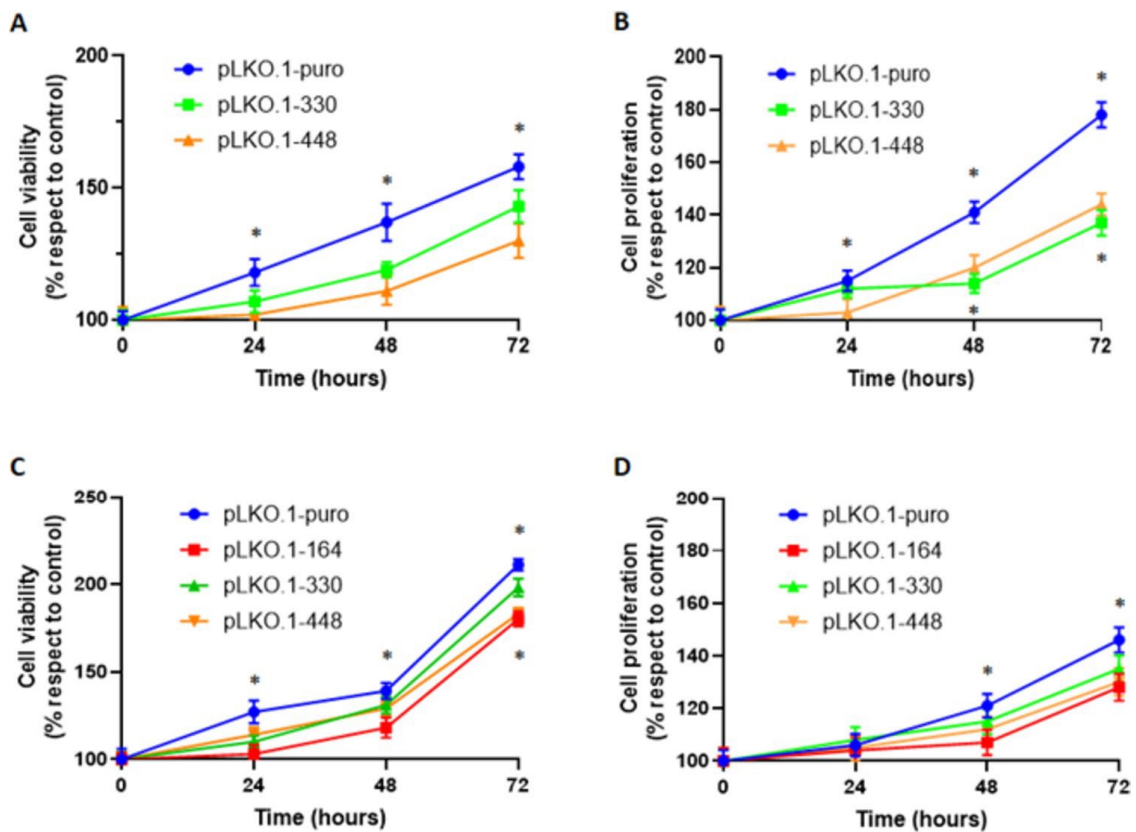


**Figura 8. Valutazione dell'efficienza del silenziamento dell'NNMT nelle linee cellulari di MCC.** Le cellule MCC-13 (A, C, E) e MCC-26 (B, D, F) sono state trasfettate con plasmidi per il silenziamento dell'enzima e con un vettore vuoto utilizzato come controllo (pLKO.1-puro). L'espressione dell'enzima è stata valutata a livello di mRNA e proteina, mediante Real-Time PCR (A, B) e Western blot (C, D), seguito da analisi densitometrica (E, F). L'NNMT ricombinante umano e il GAPDH umano sono stati utilizzati come standard proteici (PM 29,6 kDa e 36 kDa, rispettivamente). I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (\* $p < 0,05$ ).

### **3.1.3 Effetto del silenziamento dell'NNMT sulla proliferazione, vitalità e migrazione cellulare**

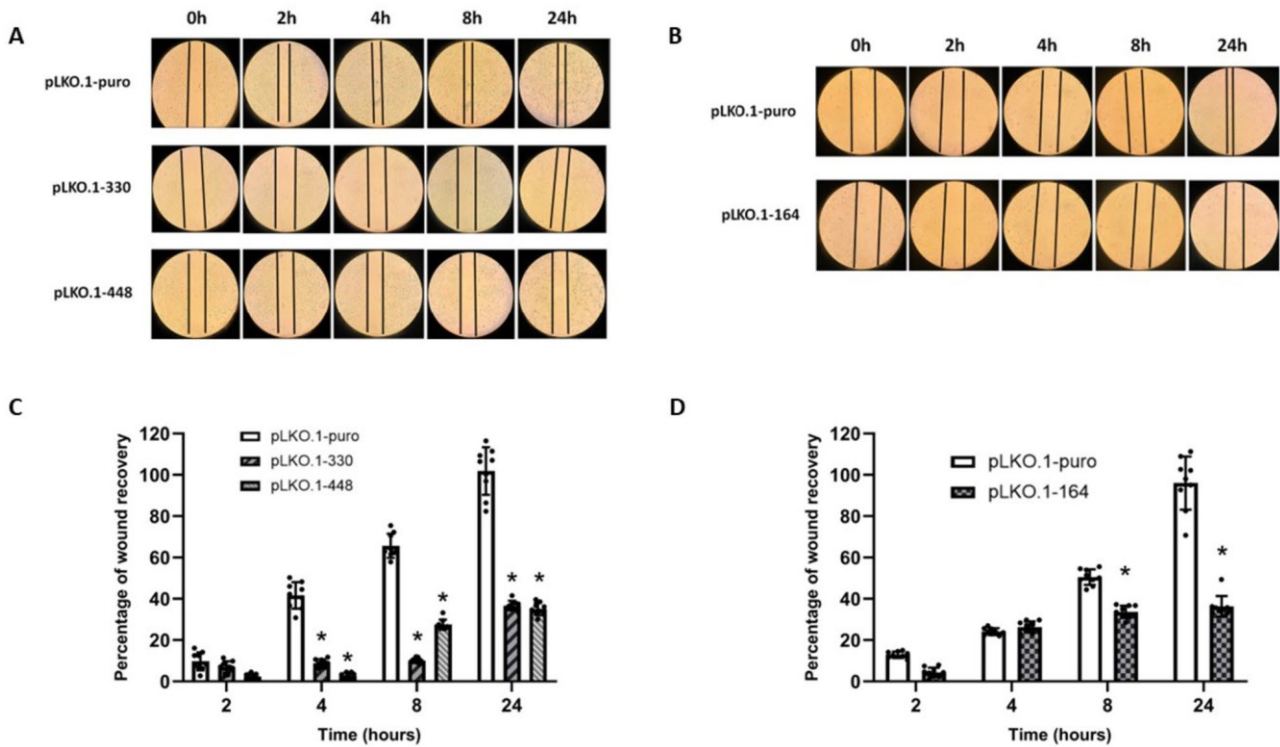
L'effetto del silenziamento dell'enzima sulla vitalità della cellula di MCC umano è stato valutato mediante saggio dell'MTT. Le cellule sono state seminate in 6-well e a 24 ore dalla semina è stata effettuata la prima determinazione corrispondente al tempo zero. Le analisi sono state ripetute a 24, 48 e a 72 ore dal primo test. Nelle cellule MCC-13 silenziate con i plasmidi pLKO.1-330 e pLKO.1-448, i dati ottenuti hanno evidenziato una marcata riduzione ( $p < 0,05$ ) della vitalità cellulare dopo 24, 48 e 72 ore rispetto alle cellule di controllo (pLKO.1-puro) (Figura 9A). Anche nelle cellule MCC-26 il silenziamento dell'enzima ha comportato una riduzione significativa ( $p < 0,05$ ) della crescita cellulare dopo 24, 48 e 72 ore nelle cellule trattate con pLKO.1-164 e solo dopo 72 ore nelle cellule trasfettate con pLKO.1-330 e pLKO.1-448 (Figura 9C). I risultati sono stati confermati dal saggio di esclusione del Trypan Blue che ha mostrato anch'esso una riduzione significativa ( $p < 0,05$ ) della proliferazione cellulare di entrambe le linee silenziate MCC-13 (Figura 9B) e MCC-26 (Figura 9D), rispetto al controllo, a 48 e 72 ore.





**Figura 9. Effetto *in vitro* del silenziamento di NNMT sulla vitalità e proliferazione cellulare.** La vitalità e la proliferazione cellulare è stata misurata, rispettivamente, mediante saggio MTT (A, C) e di esclusione del Trypan Blue (B, D), in entrambe le linee cellulari MCC-13 (A, B) e MCC-26 (C, D). Ogni esperimento, in triplicato, è stato ripetuto 3 volte. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (\* $p < 0,05$ ).

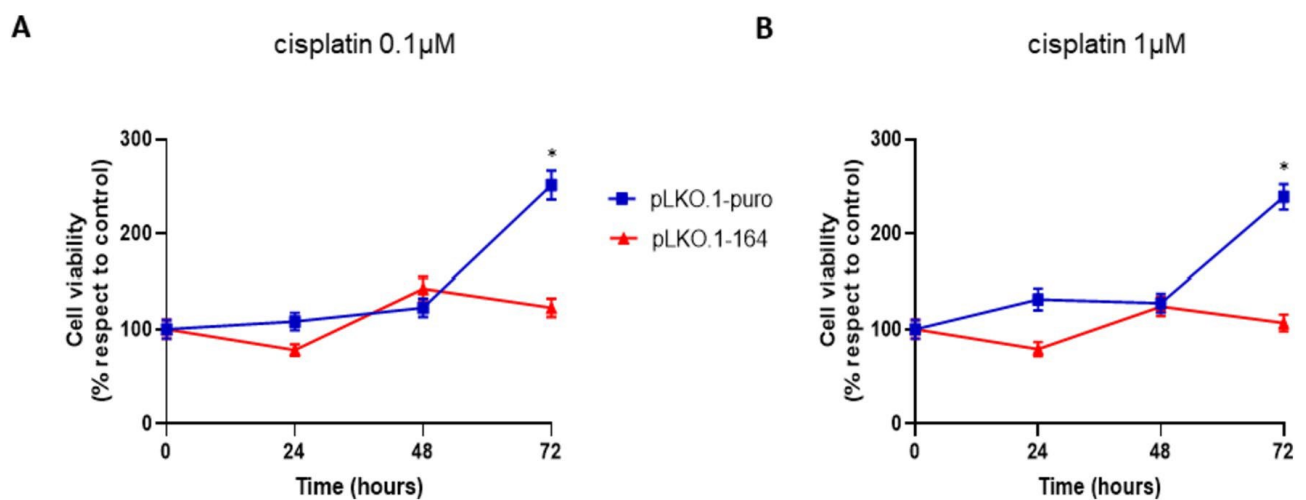
Per valutare il coinvolgimento dell'NNMT nella migrazione cellulare, le cellule trasfettate con i plasmidi ritenuti più efficienti per il silenziamento dell'enzima e le cellule di controllo sono state sottoposte a Wound Healing Assay, saggio che valuta la capacità di migrazione cellulare volta a colmare una lacuna generata sul fondo del pozzetto di coltura in seguito ad un taglio inferto con un puntale (tempo zero). L'immagine relativa tempo zero è stata acquisita mediante l'utilizzo di una fotocamera digitale collegata al microscopio. L'acquisizione delle immagini è stata poi ripetuta dopo 2, 4, 8 e 24 ore dal taglio, sia nelle cellule MCC-13 (Figura 10A) che nelle MCC-26 (Figura 10B), in modo tale da poter monitorare nel tempo il processo di migrazione cellulare. Per ogni campione, i dati sono stati espressi come percentuale di guarigione della ferita rispetto allo stato iniziale (tempo zero). Rispetto alle cellule di controllo, entrambe le linee cellulari hanno mostrato una marcata riduzione del tasso di migrazione ( $p < 0,05$ ) dopo il silenziamento dell'NNMT a 4, 8 e 24 ore per le cellule MCC-13 (Figura 10C) e dopo 8 e 24 ore per le cellule MCC-26 (Figura 10D).



**Figura 10. Effetto *in vitro* del silenziamento dell'NNMT sulla migrazione cellulare.** Le cellule MCC-13 trasfettate con i plasmidi pLKO.1-330, pLKO.1-448 o pLKO.1-puro (A) e le cellule MCC-26 trasfettate con i plasmidi pLKO.1-164 o pLKO.1-puro (B) sono state fotografate subito dopo il taglio (tempo zero) e dopo 2, 4, 8, e 24 ore. I risultati ottenuti, relativamente alle cellule MCC-13 (C) e MCC-26 (D), sono stati espressi per ciascun campione come percentuale di chiusura del taglio rispetto al tempo zero. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (\* $p < 0,05$ ).

### 3.1.4 Impatto del silenziamento dell'NNMT sulla chemiosensibilità delle cellule di Merkeloma

Al fine di valutare il ruolo della NNMT sulla chemiosensibilità delle cellule di Merkeloma, le cellule MCC-26 trasfettate con il plasmide pLKO.1-164 e le relative cellule di controllo sono state trattate con cisplatino alle concentrazioni di 0,1  $\mu\text{M}$  (Figura 11A) e 1  $\mu\text{M}$  (Figura 11B) e la vitalità cellulare prima e dopo trattamento chemioterapico è stata valutata mediante saggio dell'MTT. I risultati ottenuti hanno mostrato diminuzione significativa ( $p < 0,05$ ) della vitalità cellulare nelle cellule silenziate rispetto alle cellule di controllo dopo 72 ore dal trattamento, per entrambe le concentrazioni di cisplatino utilizzate.



**Figura 11. Influenza del silenziamento dell'NNMT sulla chemiosensibilità delle cellule MCC-26.** L'effetto del trattamento con cisplatino alle concentrazioni di 0,1  $\mu\text{M}$  (A) e 1  $\mu\text{M}$  (B) sulla vitalità delle cellule MCC-26 è stato valutato con il saggio MTT. Le misurazioni sono state eseguite a 24, 48 e 72 ore dall'inizio del trattamento. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (\* $p < 0,05$ ).

## 4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'MCC è un tumore cutaneo raro, ma estremamente aggressivo, caratterizzato da un'elevata mortalità. (117). Si tratta di una neoplasia che interessa la cute con predilizione per le zone maggiormente fotoesposte, ma che può svilupparsi anche a livello delle mucose rimanendo spesso poco visibile. La manifestazione clinica è eterogenea, ma generalmente si manifesta come un nodulo cutaneo o sottocutaneo di consistenza dura e crescita rapida, con colorazione rosso-violacea, spesso erroneamente scambiata per neoplasia benigna o per un altro tipo di tumore della pelle. Questo è in genere causa di diagnosi tardiva associata a scarso successo nel trattamento, e di prognosi infausta a causa dell'elevato potenziale metastatico e dell'età avanzata dei pazienti (118). Alla luce di tali considerazioni, è di notevole importanza l'individuazione di nuovi biomarcatori diagnostici e target molecolari che consentano un trattamento tempestivo ed efficace di tale neoplasia. Sebbene in letteratura venga evidenziato il ruolo dell'NNMT in numerose neoplasie, al momento non sono disponibili dati sul carcinoma a cellule di Merkel. Per questo motivo lo scopo del presente lavoro di ricerca è stato quello di valutare il ruolo dell'enzima nella suddetta lesione neoplastica. L'NNMT è un enzima citosolico che catalizza la reazione di N-metilazione della nicotinamide, dei composti piridinici o analoghi strutturali, svolgendo un ruolo importante sia nei processi di biotrasformazione e detossificazione di composti xenobiotici (58, 59). Nonostante l'enzima sia principalmente espresso a livello epatico, dati presenti in letteratura riportano che la sua espressione è rilevabile anche nel polmone, nel muscolo scheletrico, nella vescica e in altri tessuti. Numerosi studi evidenziano un'overespressione dell'NNMT in molte patologie neoplastiche quali: il glioblastoma multiforme (75, 76) l'adenocarcinoma gastrico (83, 84) il tumore del colon-retto (85), il carcinoma tiroideo di

tipo papillare (119) il carcinoma renale (103, 120) il tumore del pancreas (81) il carcinoma della vescica (121), l'OSCC (122, 123), l'NSCLC (94), l'osteosarcoma (92) e alcuni tumori della pelle (124, 125).

Nel presente lavoro di ricerca è stato indagato il ruolo svolto dall'NNMT nel metabolismo della cellula tumorale di Merkeloma umano. Nello specifico è stato effettuato il silenziamento genico dell'enzima mediante l'utilizzo di plasmidi codificanti shRNAs, utilizzati per trasfettare le linee cellulari di Merkeloma umano, MCC-13 e MCC-26. L'avvenuto silenziamento è stato verificato a livello di messaggero e di proteina, rispettivamente tramite Real-Time PCR e Western blot. In seguito, è stata valutata la capacità proliferativa e migratoria delle cellule, mediante l'utilizzo del saggio MTT, Trypan Blue e Wound healing assay. I dati ottenuti mostrano che la riduzione dell'espressione dell'NNMT si associa ad una diminuzione sia della vitalità e proliferazione cellulare, sia della capacità migratoria delle cellule, suggerendo un potenziale coinvolgimento dell'enzima nel processo di proliferazione cellulare e nei meccanismi di tumorigenicità della cellula neoplastica. In seguito a trattamento chemioterapico delle cellule MCC-26 con il cisplatino a due differenti concentrazioni, si è andati a valutare l'effetto indotto dal silenziamento dell'NNMT sulla sensibilità della linea cellulare tumorale a tale farmaco antineoplastico, dimostrando come la downregolazione dell'enzima si associ ad una significativa riduzione della proliferazione cellulare delle cellule silenziate rispetto alle cellule di controllo, in seguito a trattamento chemioterapico. Tali risultati nel loro complesso sono in accordo con quelli ottenuti a carico di linee cellulari relative ad altre tipologie di tumore, come precedentemente descritto.

Nelle linee cellulari di carcinoma della vescica, il silenziamento dell'enzima ha portato infatti ad una significativa riduzione della migrazione cellulare, evidenziando un possibile ruolo dell'NNMT nell'invasione tumorale (99). Analisi condotte su cellule di ccRCC trattate con shRNAs contro l'mRNA dell'NNMT hanno dimostrato come l'enzima può promuovere l'invasività cellulare sia *in vitro* che *in vivo*, mediante l'attivazione della via PI3K/Akt/SP1/MMP-2 (107). Inoltre, nella linea cellulare di cancro del pancreas PANC-1, il silenziamento dell'enzima è stato significativamente correlato con la riduzione della proliferazione e della migrazione cellulare, nonché con capacità invasiva, suggerendo il coinvolgimento dell'enzima nella proliferazione cellulare e nel potenziale metastatico della cellula tumorale (83). Esperimenti *in vitro* e *in vivo* di silenziamento di NNMT in linee cellulari di carcinoma mammario umano Bcap-37 e MDA-MB-231 hanno mostrato come alti livelli dell'enzima portano all'induzione dell'apoptosi e alla riduzione della crescita cellulare e della tumorigenicità. Risultati opposti sono stati ottenuti in seguito all'overespressione dell'NNMT in linee cellulari di tumore al seno MCF-7 e SK-BR-3, prive di espressione costitutiva di NNMT (79). Il silenziamento dell'NNMT eseguito in cellule HT-29 con un'elevata espressione costitutiva dell'enzima, ha dimostrato come NNMT aumenta la proliferazione cellulare e la formazione di colonie, inibisce la via apoptotica, promuove il ciclo cellulare ed aumenta i livelli di ATP (87). Anche nelle cellule NSCLC H1993, che presentano alti livelli endogeni dell'enzima, il knockdown dell'NNMT sopprime significativamente la capacità di formazione di colonie (126). In linea con questi risultati, nelle cellule di carcinoma prostatico PC3, l'induzione della sovraespressione di NNMT promuove la proliferazione cellulare, la capacità invasiva e la capacità di migrazione, aumentando i livelli di mRNA dell'istone deacetilasi SIRT1 (109). Analogamente, il trattamento di cellule di carcinoma squamoso esofageo EC9706 e TE1 con shRNA mirati all'mRNA di NNMT

rallenta la migrazione e la vitalità cellulare mentre promuove l'apoptosi e il ciclo cellulare (127). Ulteriori studi hanno dimostrato come il silenziamento dell'NNMT in linee cellulari umane di OSCC e NSCLC inibisca significativamente la crescita cellulare e la tumorigenicità (95, 68) Al contrario, l'induzione dell'overespressione dell'enzima nella linea cellulare di OSCC HSC-2 risulta significativamente associata a una maggiore proliferazione cellulare (69), suggerendo come l'enzima possa svolgere un ruolo fondamentale nella capacità tumorigenica e nella proliferazione delle cellule tumorali rappresentando un possibile bersaglio terapeutico per il trattamento di diverse neoplasie. Diversi studi riportati in letteratura hanno evidenziato inoltre un possibile coinvolgimento dell'NNMT nella resistenza alla chemioterapia. La downregolazione dell'enzima diminuisce la resistenza al 5-fluorouracile (5-FU) della linea cellulare umana del colon-retto HT-29, mentre la sua sovraespressione genera un effetto opposto nella linea cellulare del colon-retto SW480 (87). Inoltre, un recente lavoro ha dimostrato come il silenziamento dell'NNMT aumenta la sensibilità al 5-FU della linea cellulare di carcinoma squamoso esofageo TE1 attraverso la soppressione dell'effetto Warburg, mentre la sovraespressione dell'enzima nelle cellule EC1 ed Eca109 ne aumenta la sensibilità, suggerendo così come NNMT possa rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico per potenziare l'attività terapeutica del 5-FU (91). Ulteriori studi hanno evidenziato come il silenziamento dell'NNMT porta ad una significativa riduzione della proliferazione e della migrazione delle linee cellulari di osteosarcoma e melanoma umano e ad una maggiore sensibilità al trattamento chemioterapico, confermando un coinvolgimento dell'NNMT nei meccanismi che promuovono la resistenza di tali cellule neoplastiche alla chemioterapia (125, 92).

I risultati ottenuti e riportati nel presente lavoro di ricerca dimostrano per la prima volta un coinvolgimento dell'NNMT nel Merkeloma umano, evidenziando le notevoli potenzialità



dell'enzima in qualità di marcatore diagnostico e potenziale target terapeutico per il trattamento mirato di tale neoplasia. Saranno necessari ulteriori studi, sia *in vitro* che *in vivo*, per chiarire ulteriormente i meccanismi molecolari attraverso cui l'NNMT possa contribuire alla progressione di tale neoplasia ed essere validato come target terapeutico.

## 5 BIBLIOGRAFIA

1. Bragazzi NL, Sellami M, Damiani G et al. *Fasting and Its Impact on Skin Anatomy, Physiology and Physiopathology: A Comprehensive Review of the Literature*. *Nutrients* 11, 249. 2019.
2. McKee P. *Pathology of the Skin (2nd edition)*. London: Mosby-Wolfe, 1996.
3. Cribier B, Grosshans E. *Histologie de la peau normale et lésions histopathologiques élémentaires*. In : *Encycl Méd Chir (Dermatologie)*, Éditions Techniques (Paris), 98-085 A10, 16 p. 2002
4. Morroni M. *Anatomia microscopica funzionale dei visceri umani*. Edi Ermes 2008
5. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin.
6. Fujiwara H, Tsutsui K, Morita R. *Multi-tasking epidermal stem cells: Beyond epidermal maintenance*. *Develop Growth Differ*. 60:531–541. 2018.
7. Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. *Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders*. *Exp Dermatol*;7: 1-10. 1998.
8. Ovaere P; Lippens S; Vandenabeele P; Declercq W. *The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis*. *Trends in Biochemical Sciences*. 34 (9): 453–463. 2009.
9. Barden H, Levine S. *Histochemical observations on rodent brain melanin*. *Brain Research Bulletin*. 10 (6): 847–51.
10. Theriault LL, Hurley LS. *Ultrastructure of developing melanosomes in C57 black and pallid mice*. *Developmental Biology*. 23 (2): 261–75.
11. Young, Barbara; Heath, John W. *Wheater's Functional Histology (4th ed.)*. Churchill Livingstone. p. 162. ISBN 0-443-05612-9.2000.
12. Hussain LA, Lehner T. *Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia*. *Immunology*. 1995;85(3):475-484.
13. Collin M, Milne P. *Langerhans cell origin and regulation*. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(1):28-35.

14. Morrison, Kristin; George R. Miesegeaes; Ellen A. Lumpkin; Stephen M. et al. *Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage*. *Developmental Biology*. 336 (1): 76–83.2009.
15. Halata, Z; Grim, M; Bauman, K. *Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results*. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 271 (1): 225–39. 2003.
16. Dennis P. Kim, MDa, Kylee J.B. Kus, et al. *Basal Cell Carcinoma Review*. *Hematol Oncol Clin N Am* 33 13–24. 2019.
17. Gandhi SA, Kampp J. *Skin Cancer Epidemiology, Detection, and Management*. *The Medical Clinics of North America*. 99 (6): 1323 35.2015.
18. Cameron M, Lee E, Hibler BP et al. *Basal cell carcinoma-Epidemiology, pathophysiology, clinical and histological subtypes, and disease associations*. *J AM ACAD DERMATOL* 2018.
19. Betti R, Inselvini E, Carducci M, et al. *Age and site prevalence of histologic subtypes of basal cell carcinomas*. *Int J Dermatol*. 1995;34:174-176.
20. Kaskel P, Lange U, Sander S, et al. *Ultraviolet exposure and risk of melanoma and basal cell carcinoma in Ulm and Dresden, Germany*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29:134-142.
21. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, et al. *Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer*. *Arch Dermatol* 1995;131(2):157.
22. Karagas MR, McDonald JA, Greendberg ER, et al. *Risk of basal cell and squamous cell skin cancers after ionizing radiation therapy*. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(24):1848–53.
23. Que K S T, Zwald S O, Shmults C D. *Cutaneous squamous cell carcinoma- Incidence, risk factors, diagnosis, and staging*. *J AM ACAD DERMATOL* 2017.
24. Cassarino DS, Derienzo DP, Barr RJ. *Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification–part two*. *J Cutan Pathol* 2006; 33(4):261–79.

25. Quaedvlieg PJ, Creytens DH, Epping GG, et al. *Histopathological characteristics of metastasizing squamous cell carcinoma of the skin and lips*. *Histopathology* 2006;49(3):256–64.
26. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL. *Prognostic factors for local recurrence, metastasis and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear and lip*. *J Am Acad Dermatol*. 1992.
27. . Mora RG, Perniciaro C. *Cancer of the skin in blacks. I. A review of 163 black patients with cutaneous squamous cell carcinoma*. *J Am Acad Dermatol*.1981;5:535-543.
28. Lindelöf B, Sigurgeirsson B, Stern RS, et al. *Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation*. *Br J Dermatol*.2000;143:513-519.
29. Jensen P, Moller B, Hansen S. *Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens*. *J Am Acad Dermatol*.1999;40: 177-186.
30. Aldabagh B, Angeles JG, Arron ST, et al. *Cutaneous squamous cell carcinoma and human papillomavirus: is there an association?* *Dermatol Surg*. 2013;39(1 pt 1):1-23.
31. Jaju PD, Ransohoff KJ, Tang JY, et al. *Familial skin cancer syndromes: increased risk of nonmelanotic skin cancers and extracutaneous tumors*. *J Am Acad Dermatol* 2016;74(3):437–51 [quiz: 452–4].
32. Ahmed MM, Moore BA, Schmalbach CE. *Utility of head and neck cutaneous squamous cell carcinoma sentinel node biopsy: a systematic review*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;150(2):180–7.
33. Dellambra, E., Carbone, M. L., Ricci, F., Ricci, F., Di Pietro et al. *Merkel cell Carcinoma* *Biomedicines*, 2021;9(7), 718.
34. Angeles, C. V., & Sabel, M. S. *Immunotherapy for Merkel cell carcinoma*. *Journal of surgical oncology*, 2021;123(3), 775–781.
35. Sunshine JC, Jahchan NS, Sage J, Choi J. *Are there Multiple Cells of Origin of Merkel Cell Carcinoma?* *Oncogene*. 2018; 37(11): 1409–1416.
36. Pulitzer Melissa. *Merkel cell Carcinoma Surgical Pathology Clinics*, 2017; Volume 10, Issue 2, 399 – 408.

37. Chang Y, Moore PS. *Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer*. *Annu Rev Pathol*.2012;7:123-144.
38. Wendzicki JA, Moore PS, Chang Y. *Large T and small T antigens of Merkel cell polyomavirus*. *Curr Opin Virol*.2015;11:38-43.
39. Houben R, Dreher C, Angermeyer S, et al. *Mechanisms of p53 restriction in Merkel cell carcinoma cells are independent of the Merkel cell polyoma virus T antigens*. *J Invest Dermatol*. 2013;133(10):2453-2460.
40. Verhaegen ME, Mangelberger D, Harms PW, et al. *Merkel cell polyomavirus small T antigen is oncogenic in transgenic mice*. *J Invest Dermatol*. 2015;135(5):1415-1424.
41. Santos ALS, Martins C, de Melo AC. *Merkel cell carcinoma: epidemiology, clinical features, diagnosis and treatment of a rare disease*. *An Bras Dermatol*. 2023;98(3):277-286.
42. Becker JC, Stang A, DeCaprio JA, et al. *Merkel cell carcinoma*. *Nat Rev Dis Primers*.2017;3:17077.
43. Brady M, Spiker AM. *Merkel Cell Carcinoma of the Skin*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 17, 2023.
44. McEvoy AM, Lachance K, Hippe DS, et al. *Recurrence and Mortality Risk of Merkel Cell Carcinoma by Cancer Stage and Time From Diagnosis*. *JAMA Dermatol*. 2022;158(4):382-389.
45. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. *Phase II drug metabolizing enzymes*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010 Jun;154(2):103-16.
46. Cantó C, Menzies KJ, Auwerx J. *NAD (+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus*. *Cell Metab*. 2015 Jul 7;22(1):31-53.
47. Pissios P. *Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme*. *Trends Endocrinol Metab*. 2017 May;28(5):340-353. Epub 2017 Mar 11.
48. Kumar JS, Subramanian VS, Kapadia R, Kashyap ML, Said HM. *Mammalian colonocytes possess a carrier-mediated mechanism for uptake of vitamin B3 (niacin): studies utilizing human and mouse colonic preparations*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013 Aug 1;305(3): G207-13. Epub 2013 Jun 6.

49. Booth ES, Basran J, Lee M, Handa S, Raven EL. *Substrate Oxidation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase: EVIDENCE FOR A COMMON REACTION MECHANISM*. J Biol Chem. 2015 Dec 25;290(52):30924-30. Epub 2015 Oct 28.
50. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. *L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications*. Int J Tryptophan Res. 2009 Mar 23; 2:45-60.
51. Nikiforov A, Dölle C, Niere M, Ziegler M. *Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation*. J Biol Chem. 2011 Jun 17;286(24):21767-78.
52. Hiratsuka C, Sano M, Fukuwatari T, Shibata K. *Time-dependent effects of L-tryptophan administration on urinary excretion of L-tryptophan metabolites*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2014;60(4):255-60.
53. Okamoto H, Ishikawa A, Yoshitake Y, Kodama N, Nishimuta M, Fukuwatari T et al. *Diurnal variations in human urinary excretion of nicotinamide catabolites: effects of stress on the metabolism of nicotinamide*. Am J Clin Nutr. 2003 Feb;77(2):406-10.
54. Aksoy S, Brandriff BF, Ward A, Little PF, Weinshilboum RM. *Human nicotinamide N-methyltransferase gene: molecular cloning, structural characterization and chromosomal localization*. Genomics. 1995 Oct 10;29(3):555-61.
55. Yan L, Otterness DM, Weinshilboum RM. *Human nicotinamide N-methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence analysis and promoter characterization*. Pharmacogenetics. 1999 Jun;9(3):307-16.
56. Tomida M, Ohtake H, Yokota T, Kobayashi Y, Kurosumi M. *Stat3 up-regulates expression of nicotinamide N-methyltransferase in human cancer cells*. J Cancer Res Clin Oncol. 2008 May;134(5):551-9.
57. Pissios P. *Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme*. Trends Endocrinol Metab. 2017 May;28(5):340-353.

58. Aksoy S, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. *Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization.* J Biol Chem. 1994 May 20;269(20):14835-40.
59. Peng Y, Sartini D, Pozzi V, Wilk D, Emanuelli M, Yee VC. *Structural basis of substrate recognition in human nicotinamide N-methyltransferase.* Biochemistry. 2011 Sep 13;50(36):7800-8.
60. Alston TA, Abeles RH. *Substrate specificity of nicotinamide methyltransferase isolated from porcine liver.* Arch Biochem Biophys. 1988 Feb 1;260(2):601-8.
61. van Haren MJ, Thomas MG, Sartini D, Barlow DJ, Ramsden DB, Emanuelli M, et al. *The kinetic analysis of the N-methylation of 4-phenylpyridine by nicotinamide N-methyltransferase: Evidence for a novel mechanism of substrate inhibition.* Int J Biochem Cell Biol. 2018 May; 98:127-136.
62. van Haren MJ, Sastre Toraño J, Sartini D, Emanuelli M, Parsons RB, Martin NI. *A Rapid and Efficient Assay for the Characterization of Substrates and Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase.* Biochemistry. 2016 Sep 20;55(37):5307-15. Epub 2016 Sep 9
63. van Haren MJ, Taig R, Kuppens J, Sastre Toraño J, Moret EE, Parsons RB et al. *Inhibitors of nicotinamide N-methyltransferase designed to mimic the methylation reaction transition state.* Org Biomol Chem. 2017 Aug 9;
64. Sartini D, Santarelli A, Rossi V, Goteri G, Rubini C, Ciavarella D et al. *Nicotinamide N-methyltransferase upregulation inversely correlates with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma.* Mol Med. 2007 Jul-Aug;13(7-8):415-21
65. Emanuelli M, Santarelli A, Sartini D, Ciavarella D, Rossi V, Pozzi V et al. *Nicotinamide N-Methyltransferase upregulation correlates with tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma.* Histol Histopathol. 2010 Jan;25(1):15-20.
66. Sartini D, Pozzi V, Renzi E, Morganti S, Rocchetti R, Rubini C, et al. *Analysis of tissue and salivary nicotinamide N-methyltransferase in oral squamous cell carcinoma: basis for the development of a noninvasive diagnostic test for early-stage disease.* Biol Chem. 2012 May;

67. Pozzi V, Mazzotta M, Lo Muzio L, et al. *Inhibiting proliferation in KB cancer cells by RNA interference-mediated knockdown of nicotinamide N-methyltransferase expression*. Int J Immunopathol Pharmacol. 24:69–77. 2011.
68. Pozzi V, Sartini D, Morganti S, Giuliante R, Di Ruscio G, Santarelli A, et al. *RNA-mediated gene silencing of nicotinamide N-methyltransferase is associated with decreased tumorigenicity in human oral carcinoma cells*. PLoS One. 2013 Aug 21;8(8): e71272.
69. Seta R, Mascitti M, Campagna R, Sartini D, Fumarola S, Santarelli A, et al. *Overexpression of nicotinamide N-methyltransferase in HSC-2 OSCC cell line: effect on apoptosis and cell proliferation*. Clin Oral Investig. 2019 Feb;23(2):829-838.
70. Pozzi V, Sartini D, Rocchetti R, Santarelli A, Rubini C, Morganti S, et al. *Identification and characterization of cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma cell lines*. Cell Physiol Biochem. 2015;36(2):784-98
71. Pozzi V, Salvolini E, Lucarini G, et al. *Cancer stem cell enrichment is associated with enhancement of nicotinamide N-methyltransferase expression*. IUBMB Life. 2020;72(7):1415-1425.
72. Mascitti M, Sartini D, Togni L, et al. *Differential expression of nicotinamide N-methyltransferase in primary and recurrent ameloblastomas and odontogenic keratocysts*. Eur J Clin Invest. 2020;50(4): e13220.
73. Ulanovskaya OA, Zuhl AM, Cravatt BF. *NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink*. Nat Chem Biol. 2013 May;9(5):300-6.
74. Shlomi T, Rabinowitz JD. *Metabolism: Cancer mistunes methylation*. Nat Chem Biol. 2013 May;9(5):293-4.
75. Markert JM, Fuller CM, Gillespie GY, Bubien JK, McLean LA, Hong RL, et al. *Differential gene expression profiling in human brain tumors*. Physiol Genomics. 2001 Feb 7;5(1):21-33.



76. Yamada K, Miyazaki T, Hara N, Tsuchiya M. *Interferon-gamma elevates nicotinamide N-methyltransferase activity and nicotinamide level in human glioma cells*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2010;56(2):83-6.
77. Gehrman ML, Fenselau C, Hathout Y. *Highly altered protein expression profile in the adriamycin resistant MCF-7 cell line*. J Proteome Res. 2004 May-Jun;3(3):403-9.
78. Peng H, Yang HW, Song LW, Zhou Z. *Screening the differential expression of adriamycin-resistance related genes of breast cancer by cDNA microarray*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2009 Jul 7;89(25):1745-8.
79. Zhang J., Wang Y., Li G., Yu H., Xie X. *Down-Regulation of Nicotinamide N-methyltransferase Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells via the Mitochondria-Mediated Pathway*. PLoS One. 2014 Feb 18;9(2):e89202.
80. Xu J, Capezzone M, Xu X, Hershman JM. *Activation of nicotinamide N-methyltransferase gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1beta in human papillary thyroid cancer cells*. Mol Endocrinol. 2005 Feb;19(2):527-39.
81. Rogers CD, Fukushima N, Sato N, Shi C, Prasad N, Hustinx SR, et al. *Differentiating pancreatic lesions by microarray and QPCR analysis of pancreatic juice RNAs*. Cancer Biol Ther. 2006 Oct;5(10):1383-9.
82. Xu Y, Liu P, Zheng DH, Wu N, Zhu L, Xing C, et al. *Expression profile and prognostic value of NNMT in patients with pancreatic cancer*. Oncotarget. 2016 Apr 12;7(15):19975-81.
83. Yu T, Wang YT, Chen P, Li YH, Chen YX, Zeng H, et al. *Effects of nicotinamide N-methyltransferase on PANC-1 cells proliferation, metastatic potential and survival under metabolic stress*. Cell Physiol Biochem. 2015;35(2):710-21.
84. Bi HC, Pan YZ, Qiu JX, Krausz KW, Li F, Johnson CH, et al. *N-methylnicotinamide and nicotinamide N-methyltransferase are associated with microRNA-1291-altered pancreatic carcinoma cell metabolome and suppressed tumorigenesis*. Carcinogenesis. 2014 Oct;35(10):2264-72.

85. Roessler M, Rollinger W, Palme S, Hagmann ML, Berndt P, Engel AM, et al. *Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer*. Clin Cancer Res. 2005 Sep 15;
86. Xie X, Yu H, Wang Y, Zhou Y, Li G, Ruan Z, et al. *Nicotinamide N-methyltransferase enhances the capacity of tumorigenesis associated with the promotion of cell cycle progression in human colorectal cancer cells*. Arch Biochem Biophys. 2014 Dec 15; 564:52-66.
87. Xie X, Liu H, Wang Y, Zhou Y, Yu H, Li G, et al. *Nicotinamide N-methyltransferase enhances resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells through inhibition of the ASK1-p38 MAPK pathway*. Oncotarget. 2016 Jul 19;
88. Jang JS, Cho HY, Lee YJ, Ha WS, Kim HW. *The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates*. Oncol Res. 2004;14(10):491-9.
89. Chen C, Wang X, Huang X, Yong H, Shen J, Tang Q, et al. *Nicotinamide N-methyltransferase: a potential biomarker for worse prognosis in gastric carcinoma*. Am J Cancer Res. 2016 Feb 15;6(3):649-63
90. Pozzi V, Campagna R, Sartini D, Emanuelli M. *Nicotinamide N-Methyltransferase as Promising Tool for Management of Gastrointestinal Neoplasms*. Biomolecules. 2022;12(9):1173.
91. Cui Y, Yang D, Wang W, et al. *Nicotinamide N-methyltransferase decreases 5-fluorouracil sensitivity in human esophageal squamous cell carcinoma through metabolic reprogramming and promoting the Warburg effect*. Mol Carcinog. 2020;
92. Serritelli EN, Sartini D, Campagna R, Pozzi V, Martin NI, van Haren MJ, et al. *Targeting nicotinamide N-methyltransferase decreased aggressiveness of osteosarcoma cells*. Eur J Clin Invest. 2024 Jun;54(6):e14185
93. Tomida M, Mikami I, Takeuchi S, Nishimura H, Akiyama H. *Serum levels of nicotinamide N-methyltransferase in patients with lung cancer*. J Cancer Res Clin Oncol. 2009 Sep;135(9):1223-9.

94. Sartini D, Morganti S, Guidi E, Rubini C, Zizzi A, Giuliante R, et al. *Nicotinamide N-methyltransferase in non-small cell lung cancer: promising results for targeted anti-cancer therapy*. Cell Biochem Biophys. 2013;
95. Sartini D, Seta R, Pozzi V, Morganti S, Rubini C, Zizzi A, et al. *Role of nicotinamide N-methyltransferase in non-small cell lung cancer: in vitro effect of shRNA-mediated gene silencing on tumourigenicity*. Biol Chem. 2015 Mar;
96. Kim J, Hong SJ, Lim EK, Yu YS, Kim SW, Roh JH, et al. *Expression of nicotinamide N-methyltransferase in hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis*. J Exp Clin Cancer Res. 2009 Feb 16;28:20.
97. Kassem HSh, Sangar V, Cowan R, Clarke N, Margison GP. *A potential role of heat shock proteins and nicotinamide N-methyl transferase in predicting response to radiation in bladder cancer*. Int J Cancer. 2002 Oct 10;
98. D'Andrea FP, Safwat A, Kassem M, Gautier L, Overgaard J, Horsman MR. *Cancer stem cell overexpression of nicotinamide N-methyltransferase enhances cellular radiation resistance*. Radiother Oncol. 2011 Jun;99(3):373-8.
99. Wu Y, Siadaty MS, Berens ME, Hampton GM, Theodorescu D. *Overlapping gene expression profiles of cell migration and tumor invasion in human bladder cancer identify metallothionein 1E and nicotinamide N-methyltransferase as novel regulators of cell migration*. Oncogene. 2008 Nov 6;
100. Sartini D, Muzzonigro G, Milanese G, Pozzi V, Vici A, Morganti S, et al. *Upregulation of tissue and urinary nicotinamide N-methyltransferase in bladder cancer: potential for the development of a urine-based diagnostic test*. Cell Biochem Biophys. 2013 Apr;65(3):473-83.
101. Pozzi V, Di Ruscio G, Sartini D, Campagna R, Seta R, Fulvi P, et al. *Clinical performance and utility of a NNMT-based urine test for bladder cancer*. Int J Biol Markers. 2018 Jan;33(1):94

102. Campagna R, Pozzi V, Spinelli G, et al. *The Utility of Nicotinamide N-Methyltransferase as a Potential Biomarker to Predict the Oncological Outcomes for Urological Cancers: An Update*. *Biomolecules*. 2021;11(8):1214. Published 2021 Aug 16.
103. Sartini D, Muzzonigro G, Milanese G, Pierella F, Rossi V, Emanuelli M. *Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel tumor marker for renal clear cell carcinoma*. *J Urol*. 2006 Nov;176(5):2248-54.
104. Neely BA, Wilkins CE, Marlow LA, Malyarenko D, Kim Y, Ignatchenko A, et al. *Proteotranscriptomic Analysis Reveals Stage Specific Changes in the Molecular Landscape of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma*. *PLoS One*. 2016 Apr 29;11(4):e0154074. eCollection 2016.
105. Zhang J, Xie XY, Yang SW, Wang J, He C. *Nicotinamide N-methyltransferase protein expression in renal cell cancer*. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010 Feb;11(2):136-43.
106. Kim DS, Choi YP, Kang S, Gao MQ, Kim B, Park HR, et al. *Panel of candidate biomarkers for renal cell carcinoma*. *J Proteome Res*. 2010 Jul 2;9(7):3710-9.
107. Tang SW, Yang TC, Lin WC, Chang WH, Wang CC, Lai MK, et al. *Nicotinamide N-methyltransferase induces cellular invasion through activating matrix metalloproteinase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma cells*. *Carcinogenesis*. 2011 Feb;32(2):138-45
108. Su Kim D, Choi YD, Moon M, Kang S, Lim JB, Kim KM, et al. *Composite three-marker assay for early detection of kidney cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013 Mar;22(3):390-8.
109. You Z, Liu Y, Liu X. *Nicotinamide N-methyltransferase enhances the progression of prostate cancer by stabilizing sirtuin 1*. *Oncol Lett*. 2018 Jun;15(6):9195-9201. Epub 2018 Apr 12
110. Ganzetti G, Sartini D, Campanati A, et al. *Nicotinamide N-methyltransferase: potential involvement in cutaneous malignant melanoma*. *Melanoma Res*. 2018;28(2):82-88.
111. Campagna R, Salvolini E, Pompei V, et al. *Nicotinamide N-methyltransferase gene silencing enhances chemosensitivity of melanoma cell lines*. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021;34(6):1039-1048.

112. Kawasaki H, Taira K, Morris KV. *siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells*. Cell Cycle. 2005 Mar;4(3):442-8. Epub 2005 Mar 7.
113. Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. *Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA*. Nat Rev Genet. 2001;2(2):110-119
114. Bustin SA. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol. 2000 Oct. 25(2):169-93.
115. Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 1970 Aug 15;227(5259):680-5
116. Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. *Wound-healing assay*. Methods Mol Biol. 2005;294:23-29.
117. Harms KL, Healy MA, Nghiem P, et al. *Analysis of Prognostic Factors from 9387 Merkel Cell Carcinoma Cases Forms the Basis for the New 8th Edition AJCC Staging System*. Ann Surg Oncol. 2016;23(11):3564-3571.
118. Cogshall K, Tello TL, North JP, Yu SS. *Merkel cell carcinoma: An update and review: Pathogenesis, diagnosis, and staging*. J Am Acad Dermatol. 2018;78(3):433-442
119. Xu J, Moatamed F, Caldwell JS, et al. *Enhanced expression of nicotinamide N-methyltransferase in human papillary thyroid carcinoma cells*. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(10):4990-4996.
120. Neely BA, Wilkins CE, Marlow LA, et al. *Proteotranscriptomic Analysis Reveals Stage Specific Changes in the Molecular Landscape of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma*. PLoS One. 2016;11(4):e0154074.
121. Sartini, D., Muzzonigro, G., Milanese, G., Pozzi, V., Vici, A., Morganti, S. et al. *Upregulation of Tissue and Urinary Nicotinamide N-Methyltransferase in Bladder Cancer: Potential for the Development of a Urine-Based Diagnostic Test*. Cell Biochemistry and Biophysics, (2013);65(3), 473–483.
122. Sartini D, Santarelli A, Rossi V, et al. *Nicotinamide N-methyltransferase upregulation inversely correlates with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma*. Mol Med. 2007;13(7-8):415-421.

123. Pozzi V, Sartini D, Morganti S, et al. *RNA-mediated gene silencing of nicotinamide N-methyltransferase is associated with decreased tumorigenicity in human oral carcinoma cells*. PLoS One. 2013;8(8):e71272.
124. Sartini D, Molinelli E, Pozzi V, et al. *Immunohistochemical expression of nicotinamide N-methyltransferase in lymph node metastases from cutaneous malignant melanoma*. Hum Cell. 2023;36(1):480-482.
125. Campagna R, Pozzi V, Sartini D, et al. *Beyond Nicotinamide Metabolism: Potential Role of Nicotinamide N-Methyltransferase as a Biomarker in Skin Cancers*. Cancers (Basel). 2021;13(19):4943.
126. Bach D, H Kim D, Bae SY, Kim WK, Hong JY, Lee HJ et al. *Targeting nicotinamide N-methyltransferase and miR-449a in EGFR-TKI-resistant non-small-cell lung cancer cells*. Molecular Therapy -Nucleic Acids. 2018; 11: 455–467.
127. Cui Y, Zhang L, Wang W, Ma S, Liu H, Zang X, et al. *Downregulation of nicotinamide N-methyltransferase inhibits migration and epithelial-mesenchymal transition of esophageal squamous cell carcinoma via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway*. Mol Cell Biochem. 2018;460:93–103.