



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

*DIPARTIMENTO DI SCIENZE DI VITA E
DELL'AMBIENTE*

Corso di laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

**L'interazione tra nicotinamide-fosforibosiltrasferasi e il GAPDH
preserva il salvage pathway indotto da NMN/NAD⁺ nel nucleo**

**A nicotinamide phosphoribosyltransferase-GAPDH interaction sustains the stress-
induced NMN/NAD⁺ salvage pathway in the nucleus**

Tesi di laurea di:
SILVIA SARACINO

Docente referente :
Prof. DANIELE DI MARINO



NAMPT

E' un enzima coinvolto nella sintesi della nicotinamide adenin dinucleotide (NAD)



Coenzima coinvolto nella regolazione del metabolismo energetico, in sistemi ossidanti, espressione genica, funzioni immunitarie, invecchiamento e morte cellulare.

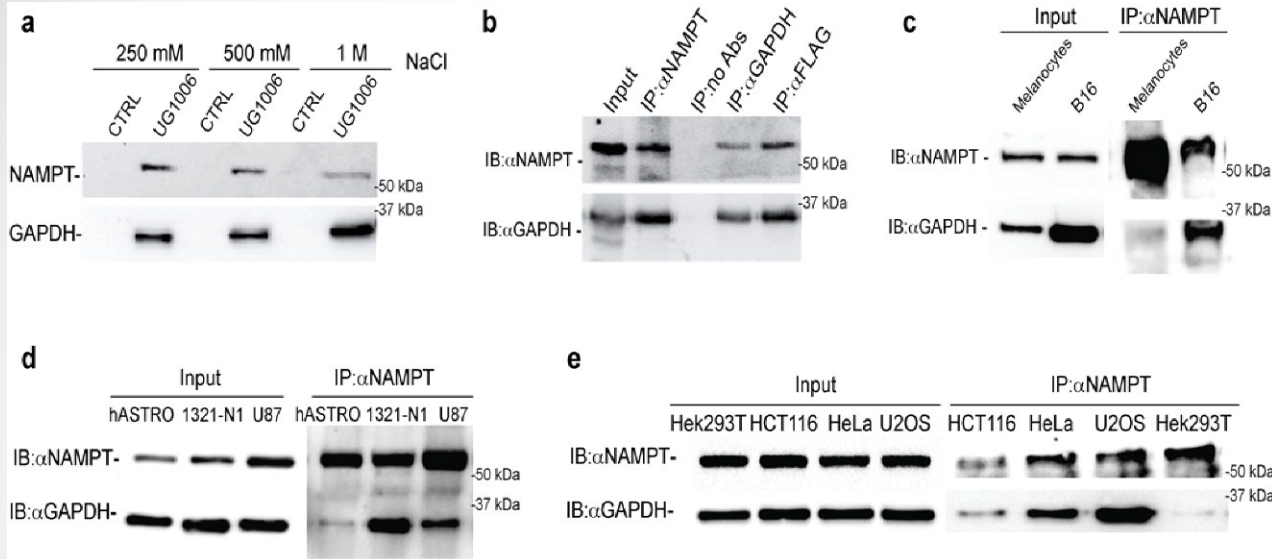


Materiali e metodi:

- Colture cellulari umane e murine (Murinae)
- Sintesi di un inibitore UG1006 NAMPT
- Creazione di linee cellulari mutate
- Immunoprecipitazione
- Tecniche di immunofluorescenza
- Cromatografia liquida ad alta prestazione per la misurazione di NMN/NAD⁺
- Costruzione di un biosensore NAD⁺ e generazione di cellule che lo esprimono
- Tecniche SAXS
- Test enzimatico per rilevare l'attività di NAMPT e GAPDH
- Previsione della struttura e progettazione peptidi

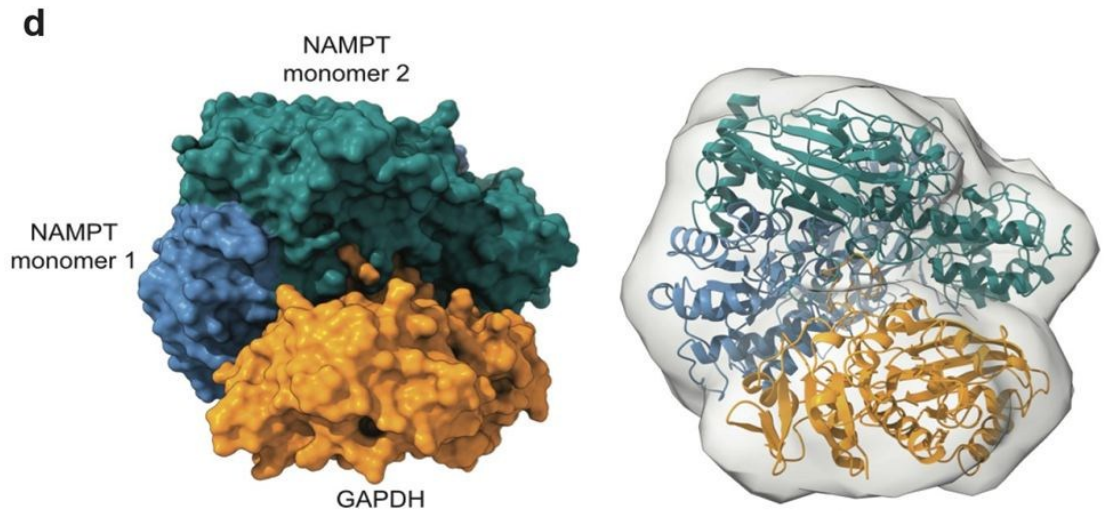


NAMPT e GAPDH formano un complesso stabile



Grolla et al., JBC Journal (2020)

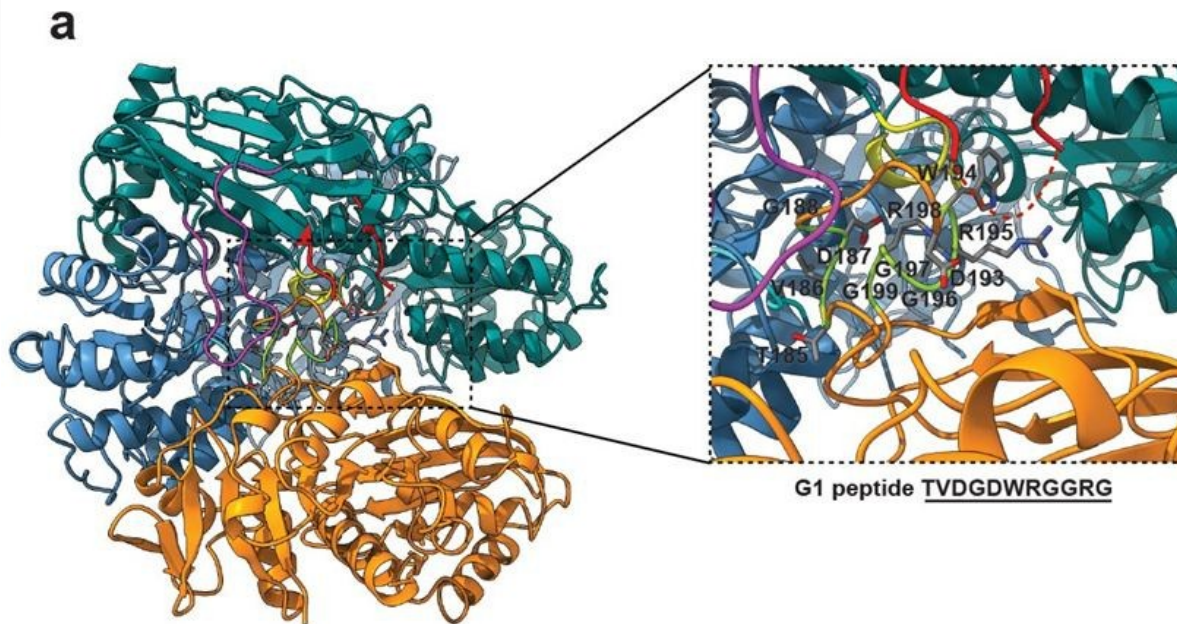
Complesso di peso molecolare pari a 140kDa e raggio di Stoke di 41,8 Å, che adotta una forma *globulare* in soluzione.



Esperimenti di immunoprecipitazione su varie linee cellulari

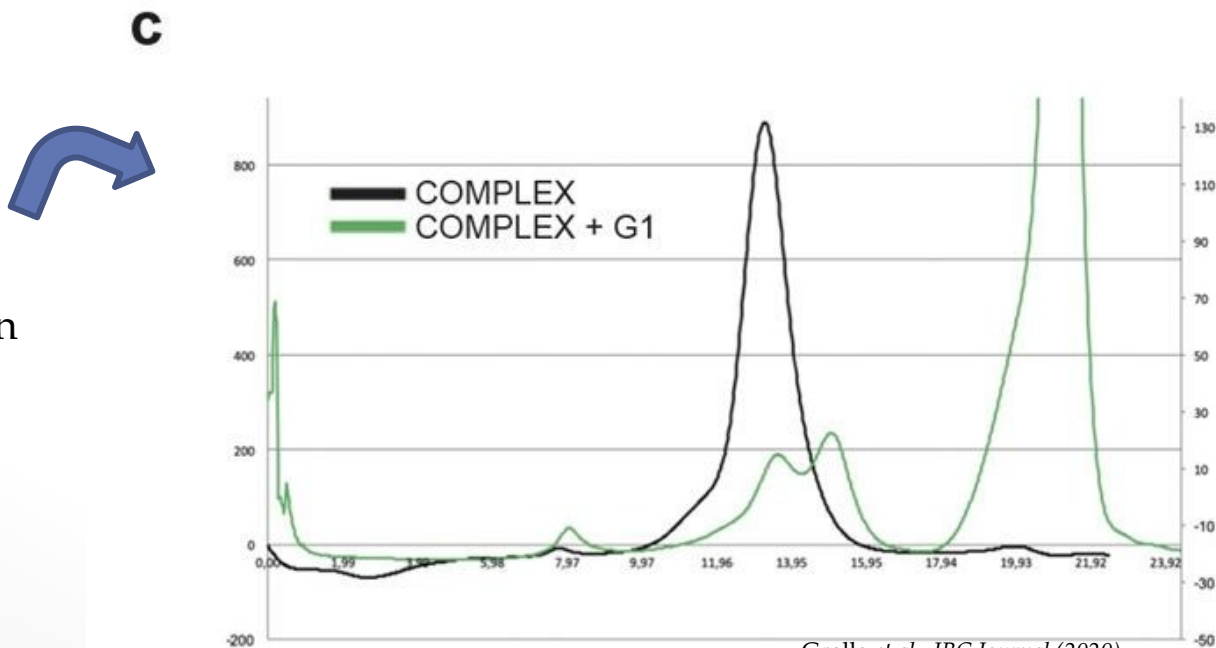


- Interfaccia di legame delle due proteine, con regione di GAPDH poco strutturata al centro.



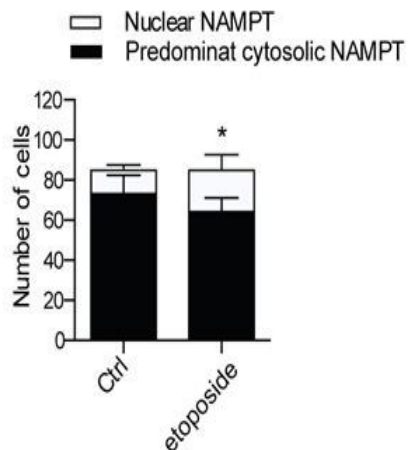
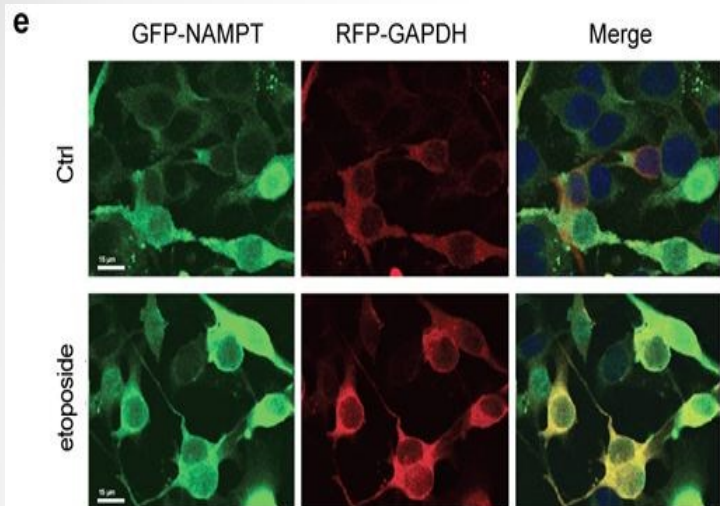
Grolla et al., JBC Journal (2020)

- Analisi SEC, con profilo di eluizione : il peptide G1 è in grado di generare una perturbazione nella formazione del complesso.



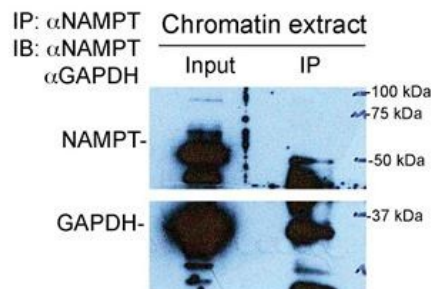
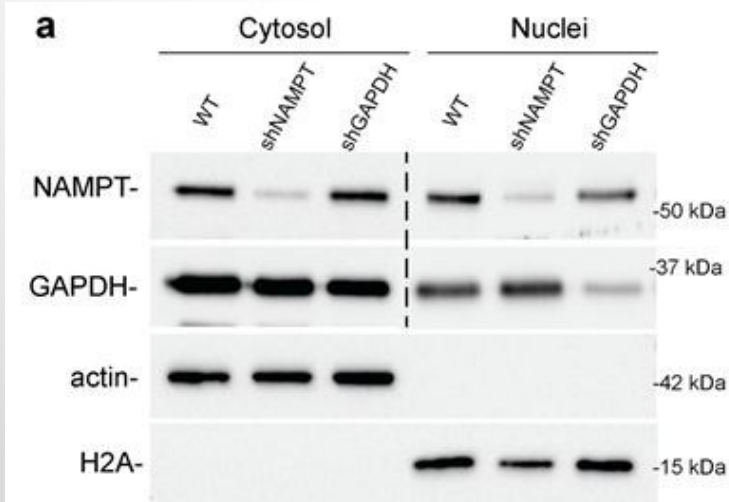


NAMPT e GAPDH non solo nel citoplasma...ma anche nel NUCLEO



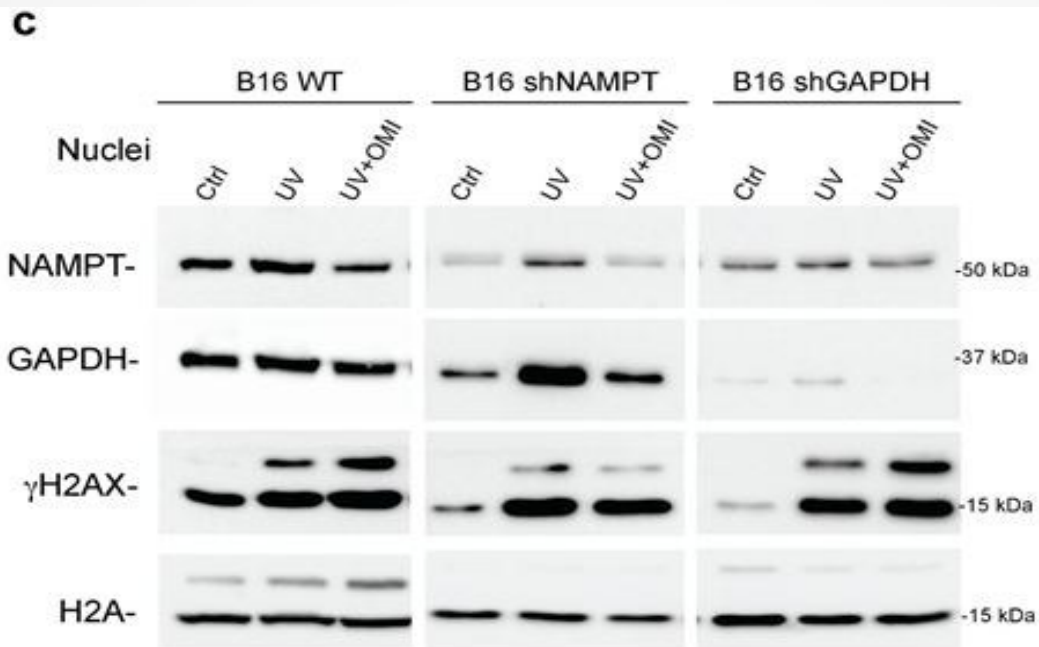
- Induzione di stress cellulare porta ad un aumento dei livelli di GAPDH e NAMPT nel nucleo

Grolla et al., JBC Journal (2020)

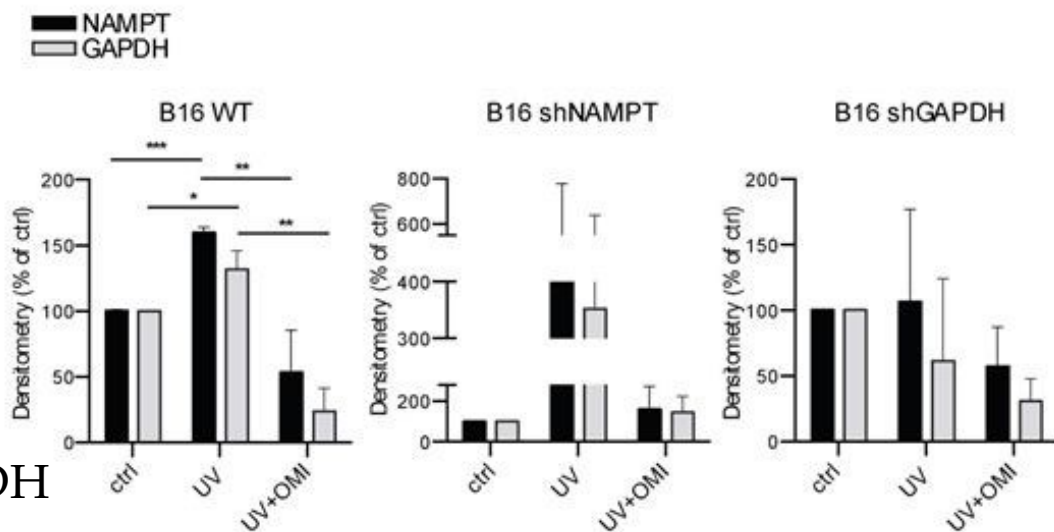


- GAPDH come trasportatore nucleare

Grolla et al., JBC Journal (2020)



d

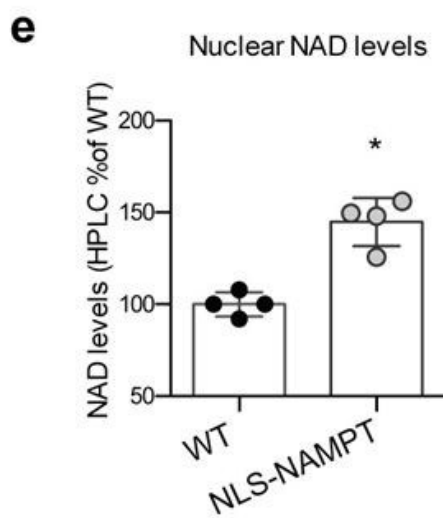
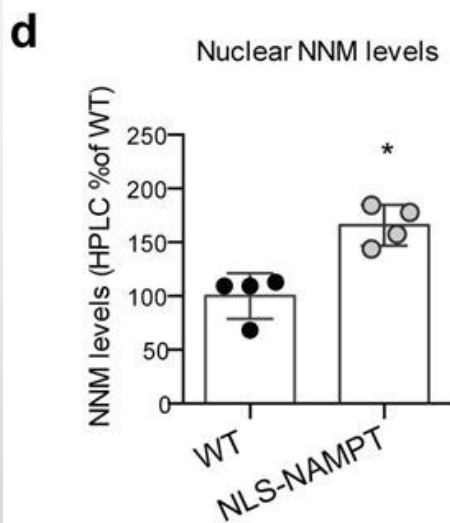
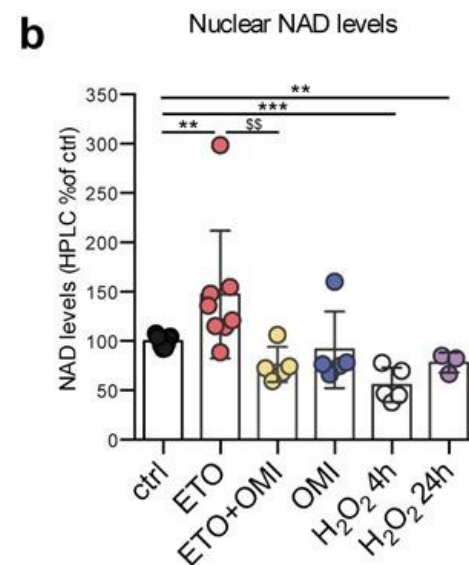
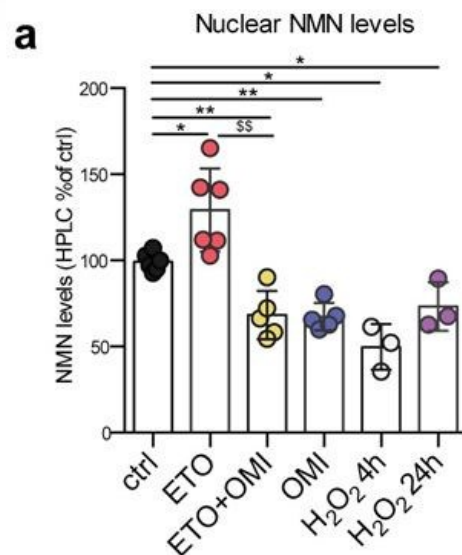


- Trasporto nucleare ridotto:

Pretrattamento con Omigapil



Riduzione dell'espressione di GAPDH

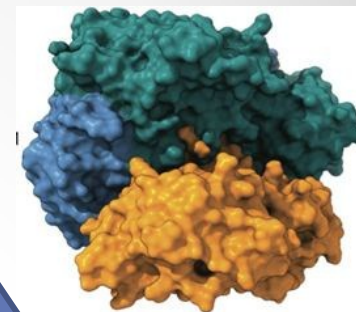


- Nel nucleo, un aumento dei livelli di NMN, è correlato ad un aumento dei livelli di NAD⁺ (fig. a/b).
- Situazione analoga si osserva in linee cellulari con un NAMPT con una sequenza di localizzazione nucleare (fig. d/e).



Conclusione:

NAMPT+GAPDH



- Oligomero eterotrimerico, situato nel citoplasma e anche nel nucleo;

- Modificazioni delle componenti proteiche portano all'inibizione del complesso o ad una riduzione dell'efficienza di trasporto.

- Viene ricostruito il pool NMN/NAD⁺ nel nucleo

L'interazione tra NAMPT-GAPDH porta ad un aumento dei livelli di NMN/NAD⁺ nel nucleo, in condizioni di stress, ristabilizza il metabolismo e favorisce la crescita di cellule tumorali.

Nuove frontiere nella ricerca sul cancro!



Riassunto esteso

Ogni cellula possiede un flusso di energia sostenuto dalla chimica subcellulare. NAD⁺ è un cofattore redox con ruoli chiave nel metabolismo energetico e non solo, pertanto la sua presenza è fondamentale per numerosi processi; deve essere perciò presente una via di salvataggio costituita da NAMPT che reintegra NAD⁺.

NAMPT esiste sia in una forma extracellulare che intracellulare, dove in quest'ultima, ha localizzazione prevalentemente citosolica.

Con il presente lavoro, attraverso l'uso di tecniche analitiche e cinetiche e colture cellulari umane e di murino, si mira a evidenziare la presenza del complesso NAMPT-GAPDH che favorisce il trasporto del NAMPT nel nucleo, quando la cellula è sottoposta a stress e favorisce il consumo del NAD⁺.