



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea in
Scienze biologiche**

**LA DEPLEZIONE DI NNMT CONTRIBUISCE ALLA SOPRAVVIVENZA DELLE
CELLULE CANCEROGENE NEL FEGATO MIGLIORANDO L'AUTOFAGIA IN CASO DI
CARENZA DI NUTRIENTI**

**NNMT DEPLETION CONTRIBUTES TO LIVER CANCER CELL SURVIVAL BY ENHANCING
AUTOPHAGY UNDER NUTRIENT STARVATION.**

Tesi di Laurea di
Fabrizia Lo Muzio

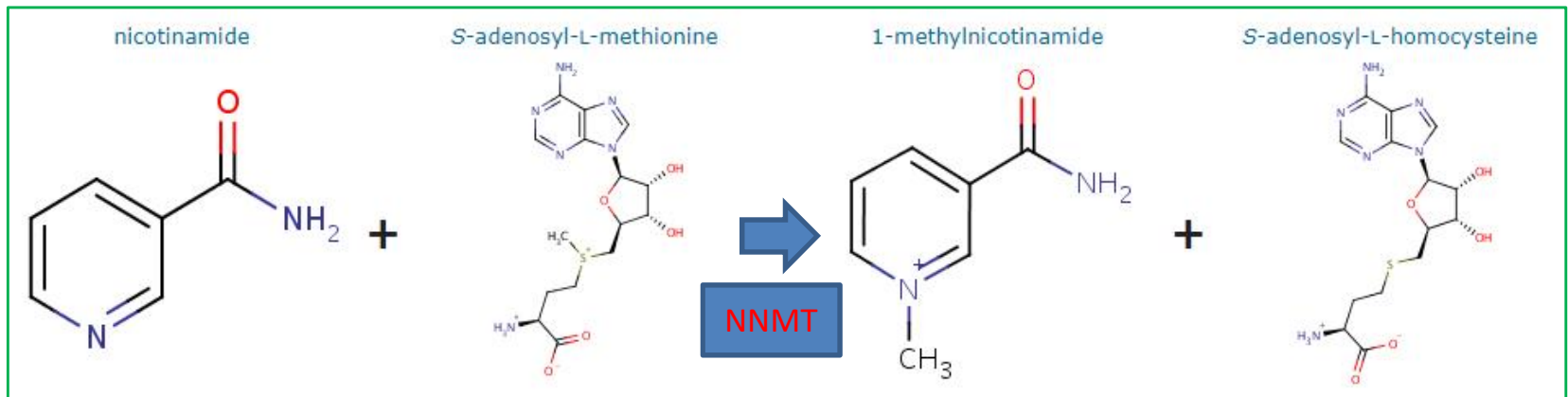
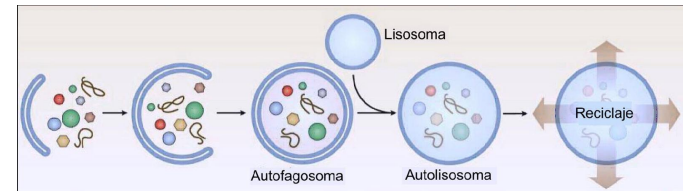
Docente Referente
Chiar.mo Prof.
Davide Sartini

**Sessione: Autunnale
Anno Accademico: 2018/2019**

RIASSUNTO

- **CONTESTO:** L'enzima nicotinamide N-metiltrasferasi (NNMT) è stato correlato a diversi tipi di cancro e recentemente anche a problemi del metabolismo, ma il suo ruolo nella regolazione dell'autofagia non è ancora stato investigato. Pertanto questo studio è stato svolto per determinare il ruolo dell' NNMT sulle varie fasi dell'autofagia.
- **METODI:** Alcune linee cellulari (SK-Hep-1, Hep3B, Huh-7, HepG2, SNU-475 e SNU-449) insieme al lisato di normali cellule epatiche sane sono state incubate in condizioni di carenza di aminoacidi o di glucosio, per investigare la carenza di glucosio. Sono stati quindi condotti due tipi di test: il test di metilazione in vitro ed il test per la protein fosfatasi 2A (PP2A). Per investigare invece la tumorigenesi dello xenotrapianto, cellule SK-Hep-1 trasfettate con il controllo negativo o con NNMT shRNA sono state iniettate in cavie BALB/c. Successivamente sulle cellule trasfettate con un plasmide, che codifica ptfLC3, è stata eseguita la microscopia ad immunofluorescenza.
- **RISULTATI:** L' NNMT regola negativamente l' autofagia nella fase di attivazione dell'ULK1 attraverso l'attività della proteina fosfatasi 2A (PP2A). In particolare, il knockdown di NNMT aumenta la metilazione di PP2A e pertanto migliora l'attività della fosfatasi. La conseguente defosforilazione di p-ULK1 (S638) inibisce l'attività di ULK1, determinando l'induzione dell'autofagia. La downregolazione di NNMT salva le cellule tumorali in condizioni di carenza di nutrienti *in vivo*, che è stata alleviata dal trattamento con inibitori ULK1.
- **CONCLUSIONI:** Questi risultati suggeriscono un nuovo meccanismo mediante il quale le cellule tumorali si proteggono dalla deprivazione di nutrienti attraverso la soppressione dell'NNMT per accelerare l'autofagia.

INTRODUZIONE



MATERIALI E METODI

Culture cellulari:

SK-Hep-1

Hep3B

Huh-7

HepG2

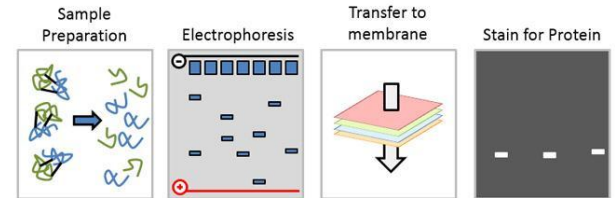
SNU-475

SNU 449

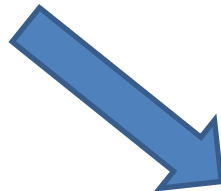
lisato di cellule
pancreatiche sane



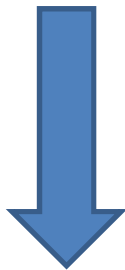
Saggio di metilazione in vitro



Saggio di fosfatasi della PP2A



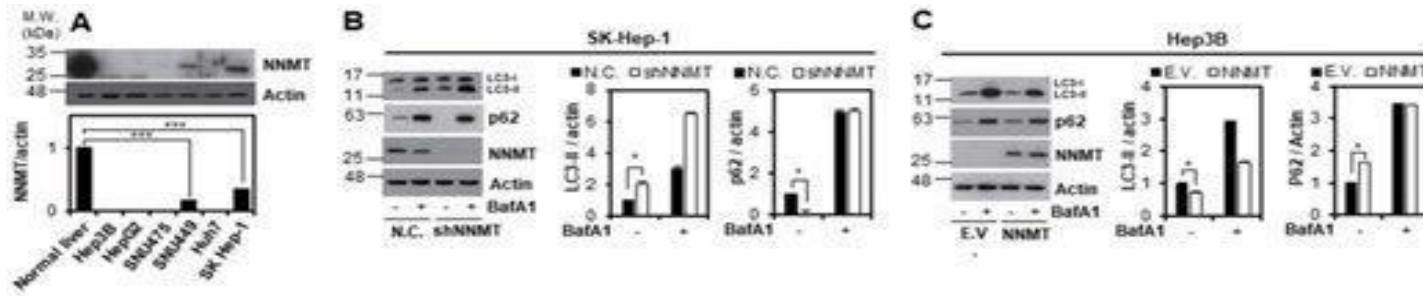
Tumorigenesi dello xenotrapianto:



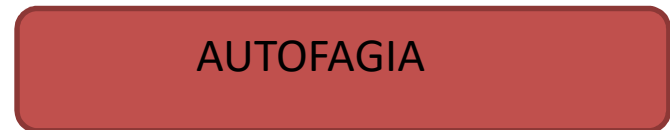
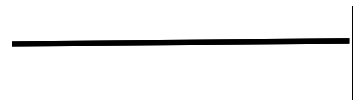
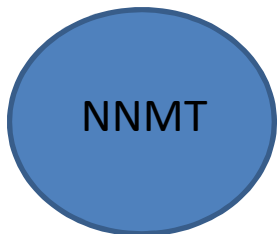
Microscopia a immunofluorescenza



RISULTATI

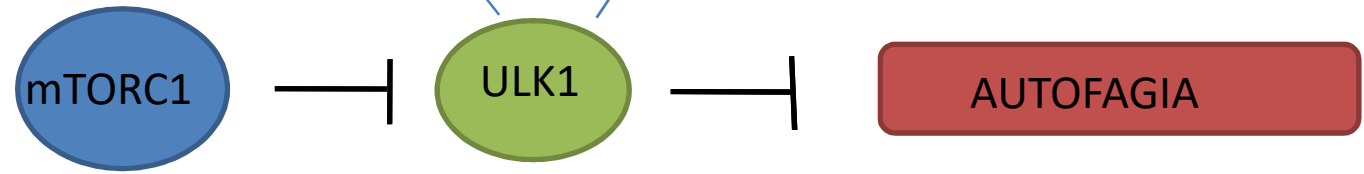


NNMT regola negativamente l'autofagia nelle cellule tumorali del fegato.

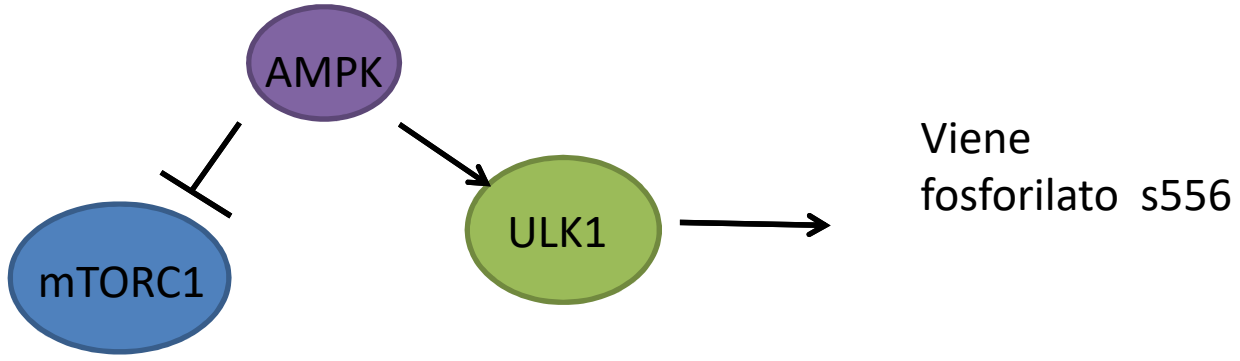


Viene fosforilato s638
s758

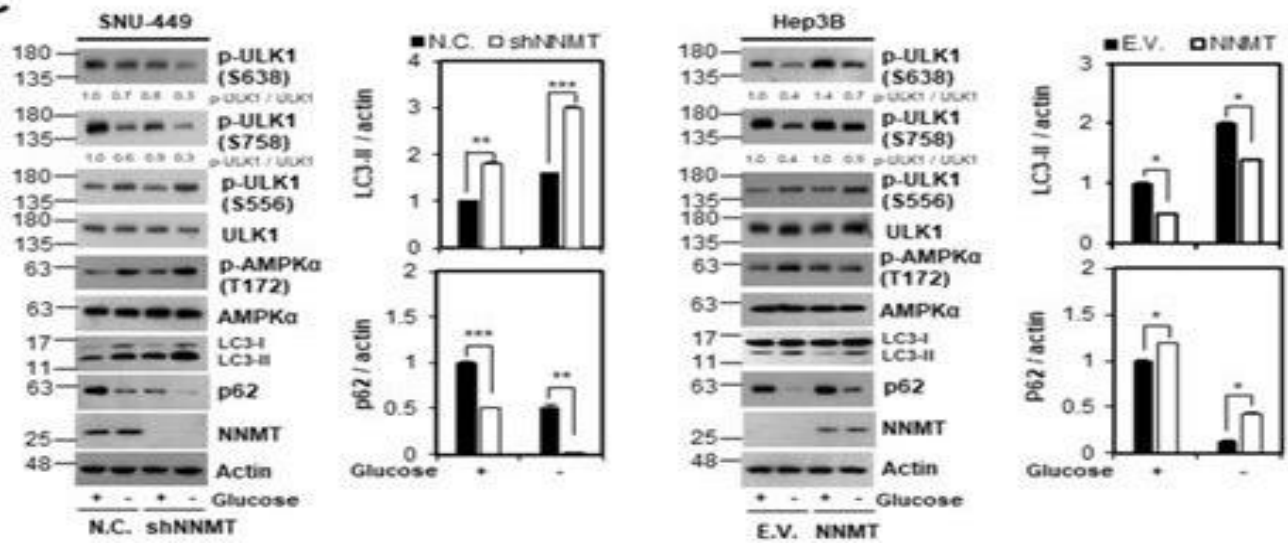
IN CONDIZIONI STABILI:



IN CONDIZIONI DI STRESS:



C



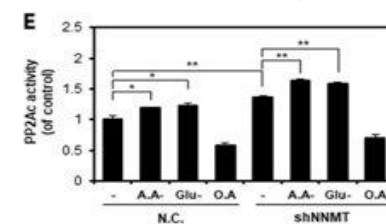
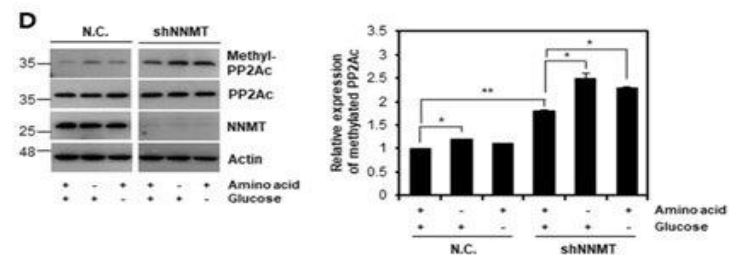
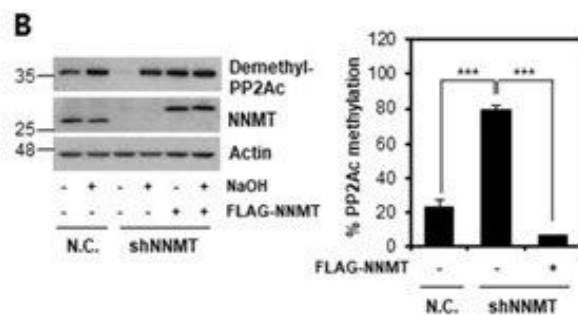
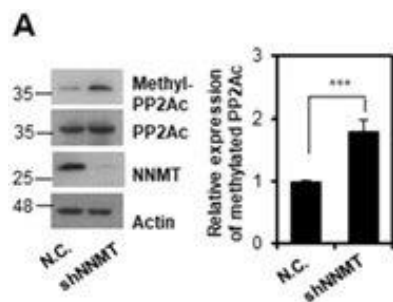
La fosforilazione di s638 e s758 è influenzata da NNMT

DOWNREGULATION
DI NNMT

AUMENTA LA
METILAZIONE
DI PP2A

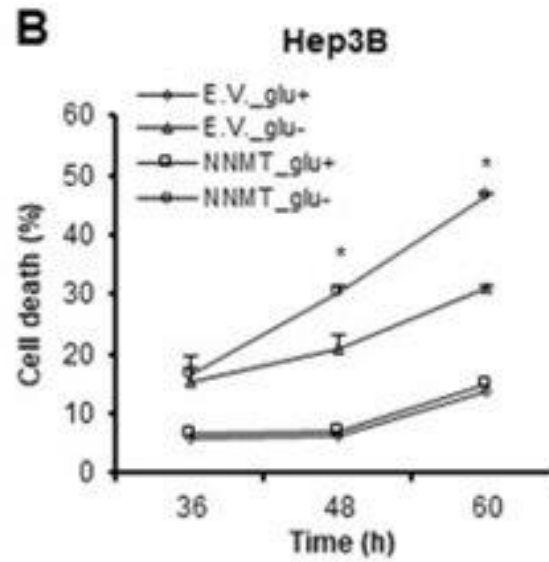
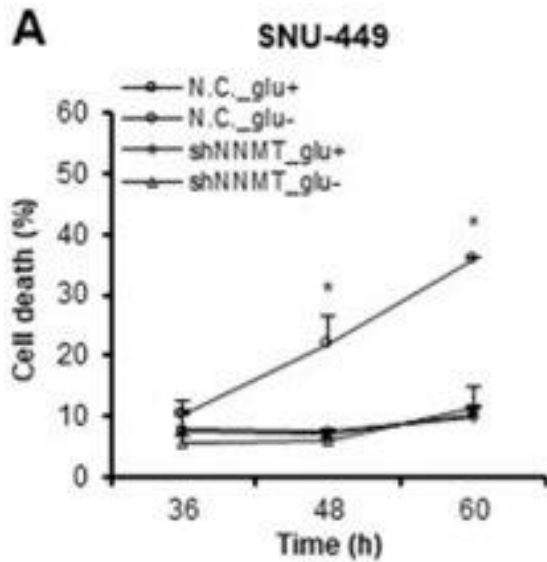
ULK1 VIENE
DEFOSFORILATO

AUTOFAGIA



Sotto carenza di
nutrienti:

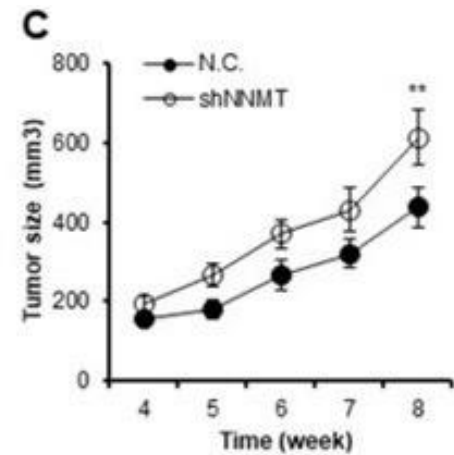
Linee cellulari in carenza di glucosio per 60 h.

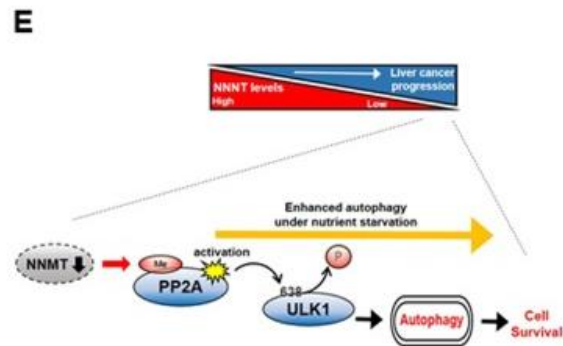
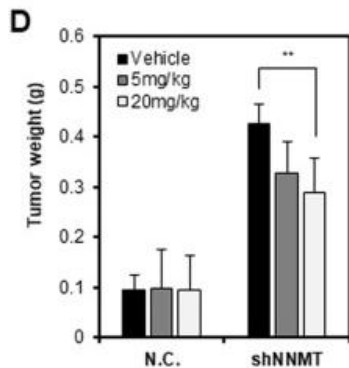
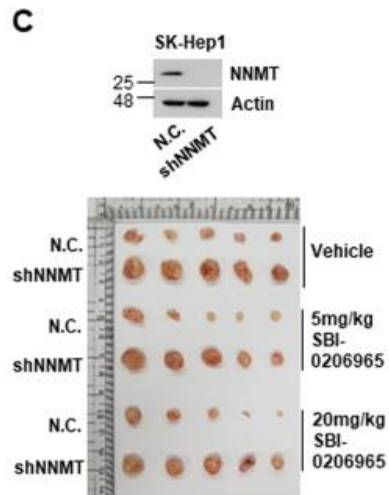
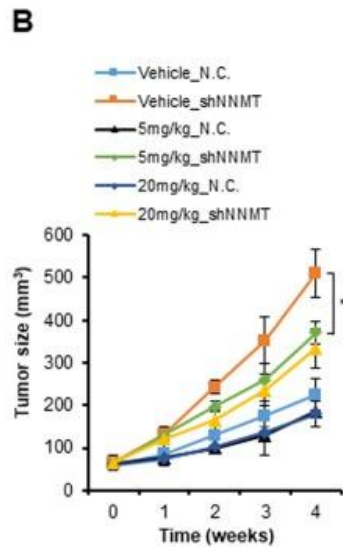
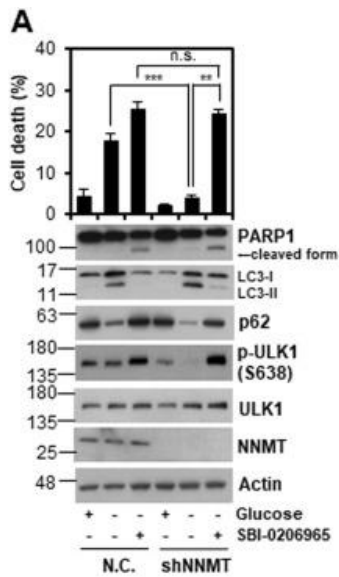


Il silenziamento dell' NNMT migliora la crescita del tumore epatico e la resistenza alla carenza di nutrienti.



8 settimane
 →
 dopo





Le cellule tumorali epatiche con knockdown NNMT mostrano una maggiore sensibilità all'inibitore dell'autofagia.

