



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE
(DISVA)**

Corso di laurea magistrale
Scienze della Nutrizione e dell'Alimentazione

*VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA NAMPT MEDIATA:
UN CONFRONTO TRA DIVERSI MODELLI DI ESPRESSIONE*

*EVALUATION OF NAMPT- MEDIATED INFLAMMATORY RESPONSE: A
COMPARISON BETWEEN DIFFERENT EXPRESSION MODELS*

Tesi di laurea magistrale
di:

Giada Belà

Relatore
Chiar.mo Prof.

Massimiliano Gasparrini

**Sessione Luglio 2026
Anno Accademico 2025/2026**

INDICE

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1.....	6
1.1 Niacina.....	6
1.2 Relazione tra niacina e NAD.....	6
1.3 Biosintesi del NAD.....	8
1.4 NAMPT.....	12
1.5 Ruolo della NAMPT e coinvolgimento patologico.....	14
CAPITOLO 2.....	18
2.1 Sistema di espressione pET in Escherichia coli.....	18
2.2 Materiali e metodi.....	20
2.2.1 Espressione della NAMPT.....	20
2.2.2 Purificazione della NAMPT.....	21
2.2.3 Determinazione dell'attività enzimatica di NAMPT.....	23
2.2.4 Quantificazione proteica di NAMPT.....	25
2.2.5 Analisi elettroforetica in SDS-PAGE della proteina NAMPT.....	26
CAPITOLO 3.....	28
3.1 Sistema di espressione mediante baculovirus.....	28
3.2 Materiali e metodi.....	30
3.2.1 Clonaggio plasmide pacgp67-h nampt-his.....	30
3.2.2 Colture cellulari Sf9 e Hi5.....	31
3.2.3 Generazione e amplificazione del baculovirus ricombinante.....	32
3.2.4 Titolazione virale mediante saggio delle placche di lisi.....	33
3.2.5 Espressione della NAMPT.....	34
3.2.6 Purificazione della NAMPT.....	34
3.2.7 Determinazione dell'attività enzimatica di NAMPT.....	34
3.2.8 Quantificazione proteica di NAMPT.....	34

3.2.9 Analisi mediante western blot della proteina NAMPT.....	35
CAPITOLO 4.....	37
4.1 Linea cellulare THP-1.....	37
4.2 Materiali e metodi.....	38
4.2.1 Allestimento del terreno di coltura.....	38
4.2.2 Scongelo delle cellule THP-1.....	38
4.2.3 Controllo della proliferazione cellulare.....	39
4.2.4 Crioconservazione delle cellule THP-1.....	39
4.2.5 Camera di Burker e conteggio cellulare.....	39
4.3 Differenziamento cellulare.....	40
4.3.1 Protocollo di differenziamento cellulare.....	41
4.4 Test ELISA.....	42
4.4.1 Varianti operative del test ELISA.....	43
4.4.2 Test ELISA e valutazione dell'attività pro-infiammatoria di NAMPT..	46
CAPITOLO 5.....	47
5.1 Punica Granatum.....	47
5.2 Preparazione del PSEE.....	47
CAPITOLO 6.....	49
6.1 Obiettivo.....	49
6.2 Risultati e discussione del sistema di espressione della proteina in E. coli.....	49
6.2.1 Produzione della NAMPT: purificazione e analisi elettroforetica dell'enzima.....	49
6.2.2 Determinazione e valutazione della risposta infiammatoria indotta da NAMPT tramite saggio ELISA per TNF- α	52
6.3 Risultati e discussione del sistema di espressione della proteina in Baculovirus.....	53
6.3.1 Crescita cellulare Sf9 e Hi5.....	53
6.3.2 Produzione della NAMPT: amplificazione, espressione, purificazione e western blot della proteina.....	55
CAPITOLO 7.....	62

7.1 Risultati e discussione delle analisi sui macrofagi ottenuti dal differenziamento delle cellule THP-1.....	62
7.1.1 Comparazione della risposta infiammatoria NAMPT-mediata tra NAMPT coli e insetto.....	62
7.1.2 Curva dose-risposta: valutazione della proporzionalità tra la quantità di proteina aggiunta e la risposta infiammatoria.....	63
7.1.3 Verifica della risposta infiammatoria mediata dall'estratto di melograno (PSEE).....	63
7.1.4 Valutazione dell'effetto protettivo del PSEE sull'infiammazione NAMPT indotta.....	64
CONCLUSIONE.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	68

INTRODUZIONE

La nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT) è un enzima chiave della via di recupero del NAD, in quanto catalizza la conversione della nicotinammide (NAM) in nicotinammide mononucleotide (NMN), rappresentando il passaggio limitante per il mantenimento dell'omeostasi del NAD nelle cellule. (Bieganski P., 2004) Il NAD a sua volta, non è solo un cofattore essenziale nelle reazioni redox coinvolte nella produzione di energia, ma anche il substrato di numerosi enzimi NAD-dipendenti, come PARP, CD38 e le sirtuine, che regolano processi cruciali come il riparo del DNA, il rimodellamento della cromatina, la risposta allo stress, la senescenza e la funzione immunitaria. Alterazioni dei livelli di NAD e/o della sua biosintesi sono state associate a diverse condizioni patologiche, tra cui malattie metaboliche, cardiovascolari, neurodegenerative, e neoplastiche. (Covarrubias & al., 2021)

La proteina NAMPT è espressa in forma intracellulare (iNAMPT) ed extracellulare (eNAMPT), assumendo un ruolo pleiotropico che va oltre la sola funzione enzimatica: la iNAMPT, localizzata nel citosol, nel nucleo e nei mitocondri, contribuisce al metabolismo energetico e alla resistenza allo stress attraverso la regolazione degli enzimi NAD-dipendenti; mentre la forma extracellulare eNAMPT si comporta come una adipochina/citochina, con attività pro-infiammatorie, pro-angiogeniche e pro-proliferative. Elevati livelli circolanti di eNAMPT sono stati descritti in obesità, diabete, malattie cardiovascolari, patologie infiammatorie croniche e numerosi tumori, rendendola un potenziale biomarcatore e bersaglio terapeutico nei contesti di infiammazione cronica e carcinogenesi.

Studi recenti hanno messo in evidenza come gli enzimi biosintetici del NAD, e in particolare NAMPT, possano agire come mediatori della risposta infiammatoria attraverso l'interazione con il recettore Toll-like 4 (TLR4), con conseguente attivazione di NF- κ B e rilascio di citochine proinfiammatorie quali TNF- α e IL-6. In modelli cellulari monocitico-macrofagici, eNAMPT è in grado di modulare profondamente il microambiente infiammatorio, contribuendo allo sviluppo e alla progressione di patologie metaboliche e neoplastiche e confermando il suo ruolo di "ponte" fra metabolismo del NAD e immuno-infiammazione. In questo quadro, le linee THP-1 differenziate in macrofagi rappresentano un modello sperimentale consolidato per studiare la risposta infiammatoria e la produzione di TNF- α in risposta a stimoli come la NAMPT. (Semerina & al., 2023)

Parallelamente, cresce l'interesse verso molecole di origine naturale con proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, in grado di modulare le vie di segnalazione coinvolte nell'infiammazione cronica. Tra queste, l'estratto etanolic dei semi di *Punica Granatum* (PSEE) ha stimolato un particolare

interesse, soprattutto per il suo alto contenuto in composti fenolici e acidi grassi linolenici coniugati, già associati ad effetti protettivi in modelli di carcinogenesi e stress ossidativo. L'ipotesi che tali composti possano interferire con la cascata infiammatoria mediata da NAMPT, e, in particolare, con il rilascio di TNF- α , apre interessanti prospettive in ambito nutraceutico e preventivo.

Alla luce di queste considerazioni, il presente lavoro di tesi è stato finalizzato ad indagare il ruolo della NAMPT nella modulazione della risposta infiammatoria in macrofagi derivati da cellule THP-1, utilizzando la produzione di TNF- α come marcatore di attivazione. A tal scopo, la NAMPT umana è stata espressa e purificata in due distinti sistemi eterologhi, procariotico (*Escherichia Coli* Clear-Coli) ed eucariotico (sistema baculovirus in cellule di insetto), al fine di confrontare l'attività pro-infiammatoria della proteina ricombinante prodotta nei due contesti. Inoltre, è stato valutato il potenziale effetto protettivo del PSEE sulla risposta infiammatoria NAMPT-indotta, con l'obiettivo di verificare se e in che misura un ingrediente nutraceutico di origine vegetale possa modulare la cascata citochinica associata alla NAMPT.

CAPITOLO 1

1.1 Niacina

La niacina, conosciuta più comunemente come vitamina B3 o vitamina PP, è un nutriente essenziale per il metabolismo umano, in quanto coinvolta in diversi processi fisiologici cellulari. Viene assunta in maniera esogena e l'assunzione minima raccomandata (RDA) è compresa tra 15 e 20 mg/die. (E. Wuerch, 2023)

Le fonti alimentari dalle quali acquisirla sono diverse, rendendola quindi disponibile attraverso una dieta bilanciata caratterizzata da carne (fegato, petto di pollo, tacchino) e prodotti derivati, da pesce, in particolare azzurro, da cereali integrali e prodotti a base di cereali, da legumi come lenticchie e fagioli, da frutta secca, soprattutto noci e arachidi; in misura minore questa vitamina è presente in verdure, uova e latticini che, comunque, contengono il triptofano che ne è un precursore, quindi coinvolto nella biosintesi della niacina stessa. (Mielgo-Ayuso & al., 2018)

Mantenere determinate concentrazioni di vitamina B3 è molto importante poiché una sua carenza, nella forma più grave, rappresenta la causa dello sviluppo della malattia denominata Pellagra (da cui anche il nominativo di vitamina PP), caratterizzata da demenza, diarrea, dermatite e morte. L'insorgere di questa condizione è stata ampiamente eliminata in paesi sviluppati grazie, ad esempio, all'arricchimento della farina con niacina, ma ci sono ancora carenze subcliniche che possono promuovere la suscettibilità nei confronti di altre patologie; infatti, i benefici dell'integrazione di tale vitamina sono stati studiati e osservati in vari modelli sperimentali di cancro, malattie cardiovascolari, dermatologiche, polmonari e mentali (M. Meyer-Ficca, 2016). Non solo: la supplementazione con la vitamina B3 può aumentare i livelli di NAD nei tessuti a favore della salute mitocondriale, con riduzione del danno ossidativo e sembra avere un ruolo positivo promettente nei confronti di malattie metaboliche come il diabete di tipo 2 in quanto ha mostrato giovamenti sulla sensibilità all'insulina e sul profilo lipidico. (J. Yoshino, 2018)

1.2 Relazione tra Niacina e NAD

La niacina si presenta sottoforma di due vitameri principali: l'acido nicotinico e la nicotinammide, dai quali deriveranno rispettivamente l'acido nicotinico mononucleotide, la nicotinammide riboside (NR) e la nicotinammide mononucleotide (NMN). Questi rappresentano

i precursori per la produzione della nicotinammide adenina dinucleotide (NAD^+) (Fig. 1) attraverso tre processi metabolici principali: il percorso di Preiss-Handler a partire dall'acido nicotinico proveniente dalla dieta; la savage pathway, nonché il percorso di recupero con riciclo della nicotinammide proveniente dalle attività enzimatiche del NAD^+ come sottoprodotto e/o con l'utilizzo della nicotinammide riboside derivante dalla dieta; ed infine la Kynurenine pathway, ossia la via di biosintesi de novo a partire principalmente dal triptofano alimentare che subirà otto passaggi enzimatici; per cui si tratta di una via energeticamente dispendiosa e lunga e di conseguenza meno efficiente nell'aumentare i livelli di NAD^+ al contrario della via di recupero che sarà quella principalmente deputata a mantenerne l'omeostasi e quindi la concentrazione. (E. Wuerch, 2023)

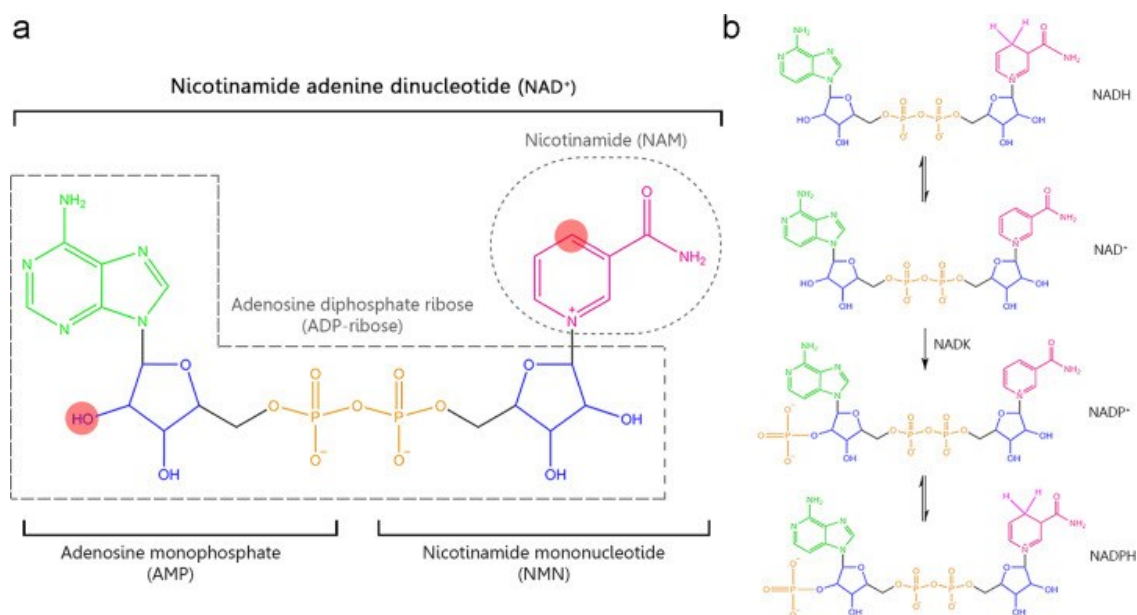


Figura 1 - Struttura della nicotinammide adenina dinucleotide (NAD^+) (Navas & Carnero, 2021)

Il NAD^+ e il NADP , fosforilato da chinasi, sono importanti coenzimi per le ossidoreduttasi e il NAD^+ funge da substrato per le reazioni enzimatiche redox-indipendenti portate avanti, ad esempio, dalle sirtuine (SIRT), dalle poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP) e dalle ADP-ribosio ciclico sintasi (cADPR) come CD38, che lo catabolizzeranno con formazione del sottoprodotto precedentemente nominato, quale la nicotinammide mononucleotide. (Covarrubias & al., 2021) Ciò implica che ci sia una corretta omeostasi tra la biosintesi e l'utilizzo di essi, al fine di mantenere un corretto funzionamento metabolico cellulare, in quanto il NAD^+ assume il ruolo di accettore di protoni, in percorsi come la glicolisi e la

fosforilazione ossidativa, diventando NADH, coadiuvante al gradiente protonico mitocondriale e nella produzione di ATP mediante la catena di trasporto degli elettroni; inoltre, essendo cofattori di tali enzimi, la ridotta biosintesi, la sua interruzione o la diretta mancanza di precursori di NAD^+ e NADP, come la niacina, possono portare ad attività cellulari disregolate, pertanto l'integrazione della niacina stessa è essenziale per riportare i livelli adeguati di tali substrati, ripristinando la corretta funzione metabolica. (E. Wuerch, 2023)

1.3 Biosintesi del NAD

Oltre al contesto biochimico-metabolico, il NAD^+ è coinvolto direttamente ed indirettamente in diverse funzioni cellulari, tra cui la riparazione del DNA, il rimodellamento della cromatina e le modificazioni epigenetiche, la senescenza cellulare, nonché nell'infiammazione, nel ritmo circadiano, nella segnalazione cellulare e nel funzionamento delle cellule immunitarie. Inoltre, suoi livelli inadeguati sono stati osservati in corso di malattie cardiovascolari, metaboliche, neurodegenerative, immunitarie, nell'invecchiamento, dove viene prettamente depleto, e nel cancro dove, invece, aumenta inevitabilmente in seguito alla maggiore richiesta di energia attraverso la glicolisi. (Covarrubias & al., 2021)

Le concentrazioni di NAD^+ possono essere incrementate tramite la dieta, l'esercizio fisico ed integratori di precursori, come anche da attivatori ed inibitori della NAMPT che abbiamo detto essere l'enzima limitante la velocità nel percorso di recupero del NAD^+ stesso. (Manickam & al., 2025)

Come accennato precedentemente, per soddisfare la dinamica ed elevata richiesta cellulare di NAD^+ per i processi redox e non, le cellule lo sintetizzano a partire precursori alimentari, come il triptofano, l'acido nicotinico e la nicotinammide, attraverso le vie *de novo* e/o di Preiss-Handler; oppure, in alternativa, può essere rigenerato in seguito al riciclo dei suoi derivati catabolici, come la NAM o la nicotinammide riboside (NR), attraverso la via di recupero (Fig. 2), che è anche quella prediletta e maggiormente utilizzata per ricostituirne le riserve (Navas & Carnero, 2021):

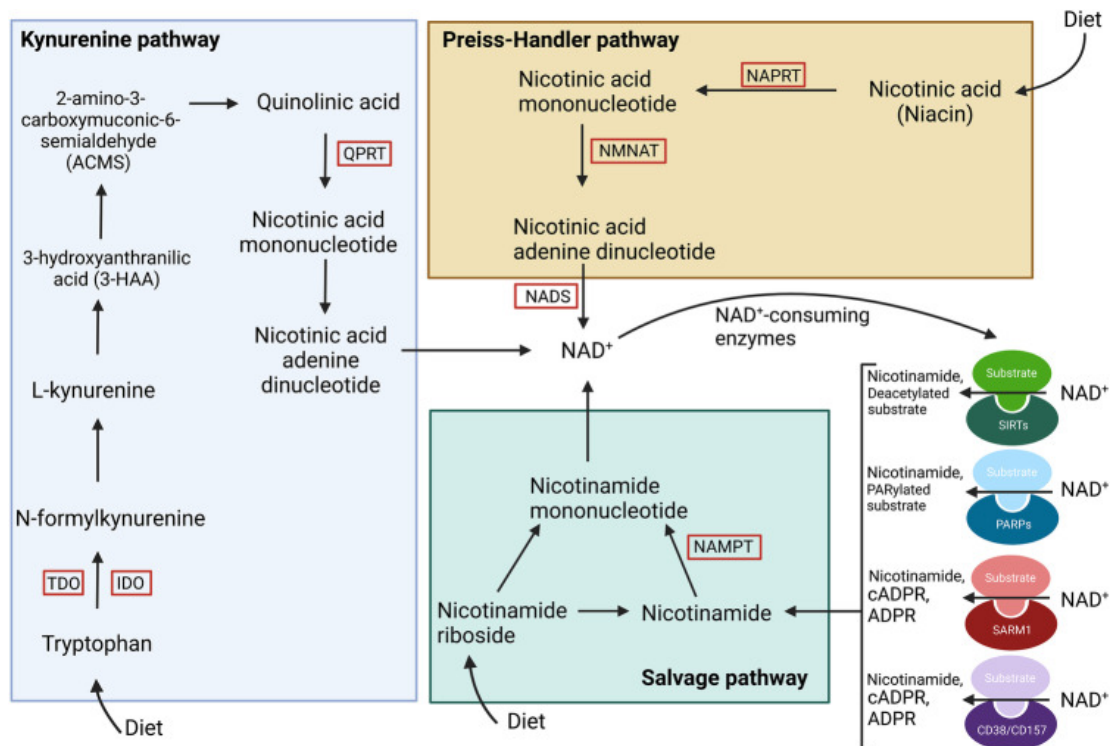


Figura 2 - Vie di biosintesi del NAD⁺ (E. Wuerch, 2023)

- 1) *Via de novo o delle chinurenine (Kynurenine pathway):* la via della chinurenina consta di due rami principali, uno dei quali trasforma la chinurenina in acido chinurenico (metabolita neuroattivo); mentre l'altro rappresenta, appunto, la via di sintesi de novo del NAD⁺ a partire dall'amminoacido essenziale triptofano. Quest'ultimo viene innanzitutto convertito in N-formilchinurenina (NFK) grazie all'azione dell'indoleammina 2,3-diossigenasi (IDO) o dell'enzima triptofano 2,3-diossigenasi (TDO), i quali, funzionando rispettivamente come monomero e tetramero, richiedono ossigeno molecolare che, insieme al ferro del loro gruppo eme, catalizzano tale reazione redox. (Castro-Portuguez & Sutphin, 2020) Questo passaggio è cruciale e solitamente è modulato dallo stato infiammatorio e dai livelli di glucocorticoidi nell'organismo, i quali possono aumentare l'attività della via delle chinurenine in situazioni di stress. (Tanaka & al., 2024)

Dopodiché, l'N-formilchinurenina subisce la rimozione del gruppo formilico da parte dell'enzima arilformamidasi, diventando chinurenina, la quale sarà la molecola chiave che verrà metabolizzata in diversi intermedi, con anche proprietà fisiologiche e neuroprotettive, tra cui l'acido chinolico, potente neurotossico ad alte

concentrazioni, che è fondamentale per la sintesi del NAD^+ : l'acido chinolico viene convertito in nicotinammide mononucleotide (NMN), convergendo con la via di Preiss-Handler dove avranno in comune la via di conversione della NMN in adenina dinucleotide dell'acido nicotinico (NAAD) ed infine NAD . (Covarrubias & al., 2021)

Questa via di sintesi de novo dal triptofano è importante, soprattutto in caso di carenza di niacina alimentare, per supportare e soddisfare le necessità del NAD di tessuti coinvolti in processi immunitari e infiammatori dato che questo metabolismo può incrementare in caso di stress, infezioni e infiammazioni croniche; inoltre, essendo, tale via, soggetta a reazioni e quindi regolazioni complesse, può allo stesso tempo, contribuire nella formazione di neurotrasmettitori e neurotossine mettendo in evidenza lo stretto legame che si instaura sia con il metabolismo energetico che con la neurobiologia. (Morrens & al., 2020)

- 2) *Via di Preiss-Handler (Preiss-Handler pathway)*: tale via prevale, principalmente, nel momento in cui viene assunta niacina alimentare, più specificatamente sotto forma di acido nicotinico, permettendo così di incrementare le riserve di NAD^+ attraverso, appunto, la supplementazione alimentare e/o farmacologica. Inoltre, questo ramo di sintesi è stato oggetto di interesse di molti studi, in particolare, riguardo il suo impatto nella gestione delle dislipidemie, in quanto è stato visto come alti livelli di acido nicotinico hanno avuto effetti benefici nei confronti dei lipidi plasmatici; tuttavia, ciò è stato in parte abbandonato a causa degli effetti collaterali osservati in correlazione ad alte dosi di niacina. (Bieganowski & Brenner, 2004)

La Preiss-Handler pathway prende inizio, quindi, dalla forma di niacina rappresentata dall'acido nicotinico, di derivazione alimentare, il quale entra nella cellula, attraverso i trasportatori SLC5A8 e SLC22A13, dove subirà l'aggiunta del gruppo fosforibosile, proveniente dalla 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP), da parte della fosforibosiltransferasi (NAPRT) convertendosi in NMN. Quest'ultima, successivamente, viene adenilata in NAAD attraverso l'azione della nicotinammide mononucleotide adenililtransferasi (NMNAT1, 2 e 3). Il processo va a completarsi con la trasformazione della NAAD in NAD^+ per mezzo di una reazione di amidazione, in cui il gruppo carbossilico dell'acido nicotinico viene sostituito dal gruppo amminico;

ciò grazie alla NAD sintetasi che utilizza la glutammina, come donatore di azoto, per catalizzare tale conversione. (Covarrubias & al., 2021) (Peng & al., 2024)

- 3) *Via di recupero o di salvataggio (Salvage pathway)*: l'85% del totale di NAD^+ che viene rigenerato proviene dal percorso di recupero che permette alla cellula di riutilizzare i derivati della niacina in maniera più efficiente nella produzione del NAD^+ , soprattutto in condizioni di elevata richiesta energetica o di richiesta da parte di enzimi come sirtuine e poli-(ADP-ribosio) polimerasi (PARP) in procinto di attivarsi (Su & al., 2024).

La via di salvataggio può partire da due precursori principali, quali la nicotinammide (NAM) e/o la nicotinammide riboside (NR): nel primo caso, la NAM deriva anche dalla dieta ma, principalmente, rappresenta il sottoprodotto proveniente dall'utilizzo e degradazione del NAD^+ da parte degli enzimi accennati precedentemente (sirtuine, PARP, CD38, etc.) (Peng & al., 2024). Questa NAM viene riconvertita in NAD^+ previa fosforilazione in NMN da parte della NAMPT (Fig. 3) che catalizza la reazione utilizzando la PRPP come donatore del gruppo fosforibosile; dopodiché la NMN viene adenilata con l'aggiunta dell'adenina effettuata dalla NMNAT concludendo il percorso con la formazione del NAD^+ . (Covarrubias & al., 2021)

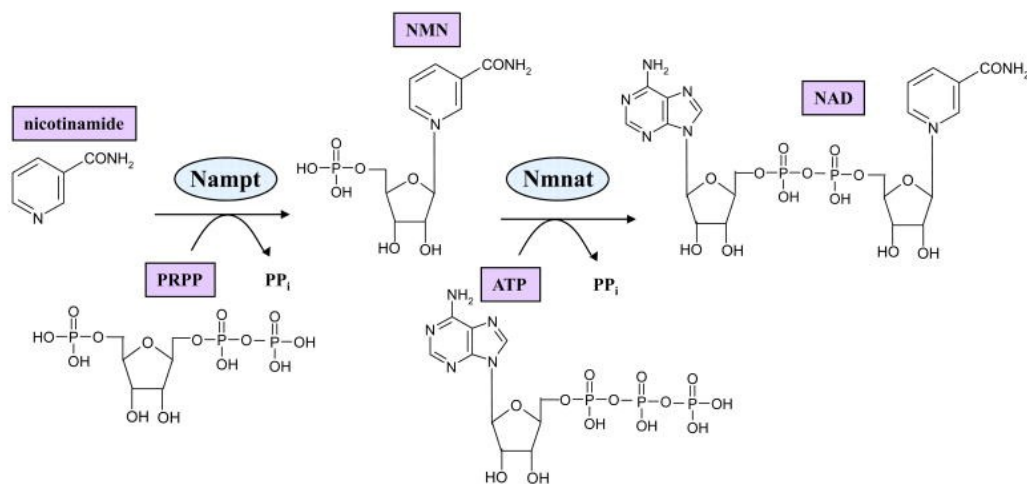


Figura 3 - Reazioni di catalizzazione della Nampt e della Nmnat nella biosintesi del NAD^+ (Garten & al., 2009)

La NAMPT rispetto alla NMNAT ha una attività catalitica inferiore di 46 volte per cui, vediamo, che catalizza il passaggio limitante della sintesi di NAD^+ ; pertanto variazioni su di esso, piuttosto che sulla NMNAT, possono influenzare in maniera

importante il metabolismo del NAD^+ e gli eventi NAD^+ -dipendenti. (Shackelford & al., 2013)

Anche la nicotinammide riboside (NR), che è un precursore vitaminico della vitamina B3 presente in diversi alimenti quotidiani come il latte, la frutta, la verdura e la carne, può rappresentare la molecola di inizio nella produzione del NAD^+ , a partire dalla fosforilazione in NMN attuata da due isoforme principali dell'enzima nicotinammide riboside chinasi (NRK1 e NRK2) che utilizzano l'ATP. Dopodiché si procede con la via di conversione della NMN in NAD^+ mediata dalla NAMPT e dalla NMNAT. (Covarrubias & al., 2021)

NAM e NR rappresentano un vantaggio per mantenere livelli adeguati di NAD senza dover assumere niacina ad alti dosaggi che potrebbero andare anche ad avere effetti collaterali, come l'inibizione degli enzimi NAD-dipendenti per una sovrapproduzione di NAD^+ . La via di salvataggio è, inoltre, molto meno dispendiosa in termini energetici di quella del triptofano. Questa dinamicità nell'utilizzo, soprattutto, di diversi precursori è di supporto, in particolare alle cellule con elevata richiesta energetica come quelle del muscolo, delle ossa o del cervello; oppure in condizioni di stress ossidativo e invecchiamento, dove un aumento dell'attività degli enzimi NAD-dipendenti rende necessario un rapido turnover del NAD^+ stesso. (Fletcher & al, 2017)

1.4 Nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT)

La nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT) o anche detta visfatina, è stata identificata per la prima volta nel 1957 da Preiss e Handler come enzima coinvolto nella sintesi del NAD e il suo gene codificante, altamente conservato, denominato fattore di potenziamento delle colonie di cellule pre-B (PBEF - Pre-B cell enhancing factor), è stato selezionato, per la prima volta dalla banca genetica del cDNA dei linfociti del sangue periferico nel 1994.

La NAMPT è una fosforibosiltransferasi di classe II omodimerica, il cui gene è localizzato sul cromosoma 7, più specificatamente tra 7q22.1 e 7q31.33, con una lunghezza di 34,7 kb e contiene 11 esoni e 10 introni. È costituito da 491 amminoacidi, con un peso molecolare di 52 kDa (Peng & al., 2024); è un enzima coinvolto nel metabolismo della nicotinammide adenina dinucleotide (NAD), in particolare, modula la concentrazione di quest'ultima

mediante la conversione della nicotinammide (NAM) in nicotinammide mononucleotide (NMN). (Fig. 4)

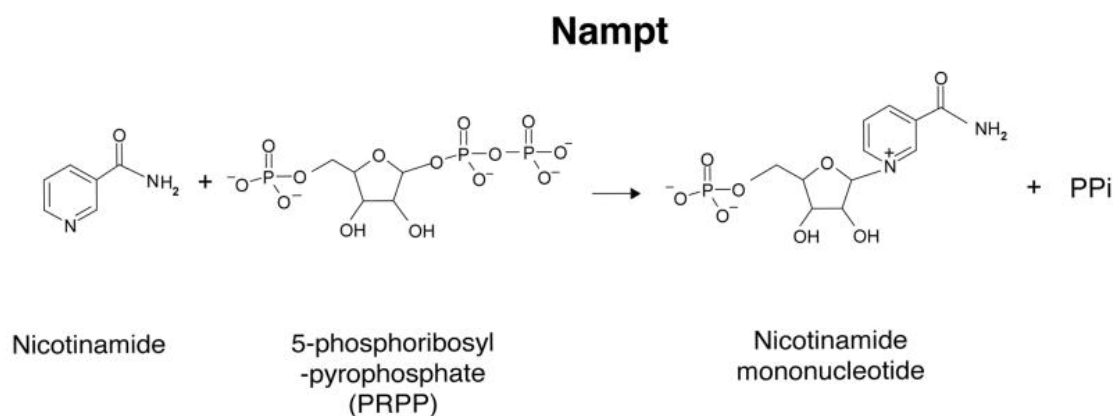


Figura 4 - Reazione enzimatica catalizzata dalla nicotinammide fosforibosiltransferasi (Nampt)

PPi, pirofosfato inorganico (Imai, 2009)

Si trova sia nel nucleo che nel citosol, nonché nei mitocondri secondo diversi studi; inoltre, è stato dimostrato che viene trasportato all'interno della circolazione sistemica per mezzo di vescicole extracellulari, al fine, poi, di essere reinternalizzato e partecipare alla formazione del NAD nelle cellule interessate. (Semerena & al., 2023)

Ubiquitariamente è espressa nel midollo osseo, nel fegato, nel muscolo come anche in altre linee cellulari, quali: immunitarie, fibroblastiche, cardiomiocitiche, neuronali. Questa espressione avviene in due forme: intracellulare (iNAMPT), soprattutto a livello del tessuto adiposo bruno, fegato e reni; ed extracellulare (eNAMPT), che si ritiene derivi dalla modificazione post-traduzionale dell'iNAMPT. La prima è una proteina pleiotropica, presente nel citoplasma, nel nucleo e nei mitocondri ed è coinvolta nella catalizzazione della biosintesi del NAD come anche nel metabolismo energetico, nelle reazioni antiossidanti, nella proliferazione cellulare e nell'apoptosi; la seconda, invece, assume i ruoli di enzima, citochina e fattore di crescita, tant'è che è coinvolto nel mantenimento dell'omeostasi tissutale, dei livelli della NAD e nella modulazione delle reti infiammatorie mediante il rilascio di citochine proinfiammatorie.

Una volta indotta la sua espressione da parte di lipopolisaccaridi di derivazione patogena (LPS) e di citochine infiammatorie provenienti dall'ospite (TNF- α , IL-6, IL-1 β), la NAMPT agirà a livello intracellulare influenzando l'attività di enzimi NAD-dipendenti coinvolti nel sistema di difesa antistress, come la ADP-ribosio polimerasi (PARP), CD-38 e le SIRT,

mediante la modulazione dell'attività biosintetica del NAD (Peng & al., 2024); oltre ciò, si è visto che il suo ruolo è rivolto anche a livello extracellulare con attività enzimatiche, pro-infiammatorie, pro-angiogeniche e adipocitochiniche: diversi studi, *in vivo* e *in vitro*, hanno osservato come eNAMPT non solo eserciti una forte attività biosintetica di NAD, ma possiede anche effetti insulino-mimetici, di mediazione del rilascio di insulina, di prevenzione da disfunzione metabolica e soprattutto di regolazione dell'infiammazione mediante l'attivazione, ad esempio, del fattore nucleare kappa-light-chain-enhancer (NF- κ B) o della proteina chinasi attivata da mitogeni (MAPK), che a loro volta stimolano la produzione e il rilascio di citochine pro-infiammatorie e chemochine con reclutamento, differenziazione e potenziamento delle cellule immunitarie, tra cui monociti e macrofagi, ed aumento dell'espressione delle molecole di adesione endoteliali (Semerena & al., 2023). Ulteriormente, è stata anche confermata la sua funzione di fattore pro-angiogenico promuovendo l'espressione di fattori come VEGF2 e proteasi appartenenti alla famiglia MMP coinvolte nel rimodellamento della matrice extracellulare, il quale promuove un microambiente favorevole all'angiogenesi.

In riferimento a questo, studi clinici hanno riportato come la NAMPT sia coinvolta nel processo di sviluppo di patologie infiammatorie e metaboliche come diabete ed obesità, di malattie cardiovascolari come l'aterosclerosi, ma anche nell'osteoartrite, nell'artrite reumatoide, nelle malattie infiammatorie intestinali (IBD), nonché nello sviluppo di patologie tumorali (Semerena & al., 2023).

1.5 Ruolo della NAMPT e coinvolgimento patologico

La NAMPT è stata identificata come biomarcatore universale per l'infiammazione cronica, poiché, assumendo il ruolo di citochina, si ha una sua over-espressione in corso di malattie infiammatorie acute e croniche.

eNAMPT, come già accennato, è considerata come una proteina multifunzionale, simil-citochina prodotta e secreta dagli adipociti e sovraregolata da stimoli infiammatori, in seguito ai quali viene rilasciata dalle cellule vascolari. (Romacho & al., 2020)

L'aumentata espressione è stimolata da fattori coinvolti nella promozione dell'insulino-resistenza come IL-6 e TNF- α (Peng & al., 2024) e livelli elevati di eNAMPT sono stati riscontrati in pazienti aterosclerotici con malattia coronarica e con diabete di tipo 2; ciò rafforzato da ulteriori studi recenti che hanno evidenziato la possibile associazione tra livelli aumentati

di eNAMPT e la disfunzione endoteliale e la presenza di metanalisi che suggeriscono tale proteina come biomcatore non solo per predire l'obesità, il diabete, la resistenza all'insulina o la sindrome metabolica, ma anche per lo sviluppo di malattie cardiovascolari. (Romacho & al., 2020)

Non è ancora chiaro se eNAMPT è direttamente coinvolto nei meccanismi alla base dell'obesità, ma è stata dimostrata la sua azione di induzione dell'inflammosoma NLPR3, il quale innesca, non solo l'infiammazione cronica di basso grado caratteristica dell'obesità, ma è anche causa del danno glomerulare e della disgregazione delle proteine di giunzione nelle cellule endoteliali vascolari del topo, assumendo così un ruolo anche nella disfunzione endoteliale. Quest'ultimo suggerisce il suo contributo nello sviluppo di patologie aterosclerotiche, supportato anche dal fatto che concentrazioni plasmatiche elevate sono state misurate in seguito alla rottura della placca meccanicamente indotta e/o in pazienti con diagnosi di infarto miocardico acuto, ipotizzando una relazione con l'instabilità della placca stessa. (Semerena & al., 2023). A supporto, abbiamo anche la capacità dimostrata di eNAMPT di aumentare in maniera significativa la trascrizione del fattore nucleare Nf-kB, nelle cellule endoteliali vascolari umane, il quale dà il via alla cascata di segnale che induce l'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali e all'endotelio aortico, attivando la molecola di adesione intracellulare (ICAM-1) e la molecola di adesione delle cellule vascolari (VCAM-1); non solo, ma anche delle metalloproteinasi della matrice (MMP-2/9). (Garten & al., 2009)

La promozione dell'espressione di IL-6, MMP-1 e MMP-3, è stata individuata da altri studi, in particolare, anche nell'artrite reumatoide ed eNAMPT è stato visto sovraespresso nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di pazienti affetti da psoriasi (Peng & al., 2024); allo stesso tempo sono stati osservati aumentati livelli di mRNA di eNAMPT in campioni di biopsia del colon e nel tessuto adiposo viscerale in pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD), come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, tant'è che recentemente è stata studiata, su modelli animali murini, la riduzione di eNAMPT tramite un anticorpo neutralizzante al fine di migliorare significativamente i sintomi e l'infiammazione associata, con diminuzione della produzione di citochine nelle cellule immunitarie presenti in tale condizione. (Colombo & al., 2023)

A livello cerebrale, l'eNAMPT è stato perlopiù studiato in relazione all'ischemia cerebrale, dove, secondo Lu *et al*, la sua espressione viene indotta selettivamente dopo l'ischemia, probabilmente come risposta allo stress a lungo termine (Lu & al., 2009) e Chen *et al* hanno

concluso che è un fattore infiammatorio dannoso che coadiuva nell'aggravamento del danno neuronale ischemico promuovendo il rilascio di TNF- α dalle cellule gliali, mediante, però, un meccanismo non correlato all'attività enzimatica. (Chen & al., 2015) In contrapposizione a questo è stato dimostrato che la iNAMPT, espressa principalmente nei neuroni, protegge gli stessi dai danni ischemici tramite la sintesi del NAD, della quale è l'enzima chiave. (Zhao & al., 2013)

L'iNAMPT è presente nei nuclei, nei mitocondri e nel citosol e oltre ad assumere il ruolo di enzima limitante la velocità nel percorso di recupero della biosintesi del NAD, è coinvolta nel metabolismo energetico, migliorando la proliferazione delle cellule endoteliali, l'inibizione dell'apoptosi, la regolazione del tono vascolare e la stimolazione dell'autofagia, soprattutto in condizioni di malattia come l'ictus. (Chen & al., 2015)

L'espressione di iNAMPT è stimolata da vari stress cellulari e della restrizione nutrizionale, di conseguenza è stato visto come sia in grado di agire nella resistenza allo stress cellulare, in particolare genotossico, mediante le sirtuine mitocondriali (Sirt3 e Sirt4), grazie alle quali mantiene i livelli di NAD nei mitocondri e fornisce protezione contro la morte cellulare sopprimendo la traslocazione del fattore induttore dell'apoptosi (AIF) dai mitocondri al nucleo. (Imai, 2009) (Garten & al., 2009)

Da qui, un riferimento importante è rivolto ad altre patologie caratterizzate da infiammazione, per lo più cronica, ossia quelle neurodegenerative, come il morbo di Alzheimer, di Parkinson, la malattia di Huntington e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), dove in particolare è stato visto da Zhu et al. che la disfunzione mitocondriale, insieme allo stress ossidativo e all'infiammazione cronica, è uno dei fattori coinvolti nella progressione delle neuropatologie poiché l'elevato consumo energetico e il rapido consumo di NAD, inibiscono la sintesi di ATP, alterando l'omeostasi energetica e portando alla morte neuronale; pertanto, migliorare la mitogenesi potrebbe essere una potenziale strategia farmacologica per il loro trattamento: iNAMPT è in grado di mediare i mitocondri nella produzione di energia attraverso l'utilizzo dell'enzima di biosintesi del NAD, la chinasi NRK1 per permetterne la formazione a partire dai precursori. (Zhu & al., 2022)

Inoltre, eNAMPT, previa produzione del NAD, influenza direttamente l'attivazione della microglia, ossia le cellule immunitarie del sistema nervoso ed una regolazione anomala di questo meccanismo può andare ad accentuare il processo infiammatorio accelerando la morte neuronale e la progressione delle malattie neurodegenerative. (Zhu & al., 2022)

Altre evidenze interessanti riguardano la relazione fra l'iNAMPT e il tumore: è stato dimostrato che la sovraespressione di iNAMPT è presente in diversi carcinomi, tra cui quelli dell'ovaio, della mammella, del colon-retto, dello stomaco ed anche in linfomi maligni, come quello di Hodgkin. La sua presenza è stata correlata ad una maggiore crescita, invasione e metastasi tumorale. In seguito alla sua up-regolazione sono stati identificati diversi bersagli molecolari coinvolti nella carcinogenesi, come Sirt-1, CtBP e PARP-1 che sono in grado di attenuare l'attività di oncosoppressori come p53 o di degradare rapidamente il NAD^+ con conseguente morte cellulare. (Shackelford & al., 2013)

Inoltre, iNAMPT che con le sue capacità pro-angiogeniche ne supporta la crescita attivando la cascata di segnale della chinasi regolata da ERK1/2 e inducendo il fattore di crescita endoteliale (VEGF) insieme a MMP2/9. (Garten & al., 2009)

Per quanto riguarda eNAMPT, invece, sono maggiori le evidenze di correlazione con la progressione del cancro, in quanto si ritiene che eserciti effetti proliferativi attivando diverse vie di segnalazione come MAPK/ERK, PI3K/AKT, c-Abl/STAT3 (Semerena & al., 2023); promuove la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali, secondo Sancini et al. attraverso l'induzione della transizione epitelio mesenchimale (EMT) previa attivazione del TGF- β e della segnalazione di NF-kB/Snail. (Sancini & al., 2014)

eNAMPT, è ulteriormente in grado di favorire l'immunosoppressione nel microambiente tumorale inducendo la polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo pro-tumorigenico M2, come è stato visto nella leucemia linfatica cronica (Audrito & al., 2015).

Tra le azioni osservate, desta particolare attenzione quella di proteggere le cellule tumorali dall'apoptosi inibendo la survivina e migliorare loro la capacità antiossidante attivando enzimi antiossidanti e ciò potrebbe contribuire alla loro resilienza e resistenza ai farmaci (Semerena & al., 2023).

CAPITOLO 2

2.1 Sistema di espressione pET in *Escherichia Coli*

La capacità di ottenere elevate quantità di proteine tramite l'espressione in microrganismi ha profondamente trasformato il settore della ricerca, poiché ha reso possibile l'impiego su larga scala di proteine ricombinanti in ambito industriale ed ha progressivamente sostituito l'utilizzo di tessuti e organi di origine animale e vegetale. Qualsiasi sistema di espressione richiede il clonaggio del gene di interesse in un opportuno vettore di espressione, posto sotto il controllo di un promotore specifico. Nel contesto dell'espressione in *E. coli*, il costrutto ricombinante viene introdotto nelle cellule batteriche mediante trasformazione, ottenuta per via chimica, ad esempio tramite trattamento con cloruro di calcio, oppure elettroporazione; in entrambi gli approcci consentono il trasferimento del vettore ricombinante all'interno della cellula. La trascrizione del gene nell'ospite è mediata dal riconoscimento del promotore presente sul vettore da parte della RNA polimerasi cellulare. L'attività trascrizionale risulta costitutiva in presenza di un promotore sempre attivo, mentre è avviata solo in risposta a specifici stimoli ambientali quando il promotore è di tipo inducibile. (Rosano & Ceccarelli, 2014)

I principali svantaggi dei sistemi di espressione batterici risiedono nella differenza tra i codoni utilizzati dai batteri e quelli tipici dei mammiferi, che può determinare una riduzione dell'espressione proteica oppure la produzione di proteine tronche; a ciò si aggiunge l'incapacità del sistema di effettuare tutte le modifiche post-traduzionali caratteristiche degli organismi eucariotici e la possibilità che la proteina di interesse, una volta sintetizzata all'interno della cellula, formi aggregati proteici biologicamente inattivi, noti come corpi di inclusione. (Wurm & al., 2016)

Escherichia coli è il microrganismo più impiegato per la produzione di proteine ricombinanti, in quanto si replica rapidamente, risulta facilmente trasformabile e dispone di un'ampia gamma di vettori di espressione disponibili. (Rosano & Ceccarelli, 2014)

Tra i vari plasmidi commercialmente disponibili, il sistema pET è uno dei sistemi più utilizzati per il clonaggio e l'espressione di proteine ricombinanti in *Escherichia coli*. I plasmidi pET contengono, nella loro sequenza, un gene che conferisce resistenza all'ampicillina, un'origine di replicazione e un sito di clonaggio multiplo preceduto dal promotore del

batteriofago T7. Numerosi plasmidi della serie pET consentono inoltre di inserire, all'estremità N-terminale o C-terminale della proteina di interesse, una coda di residui di istidina, utile per la successiva purificazione mediante cromatografia di affinità su resina Ni-NTA (Fig. 5) (Gopal & Kumar, 2013)

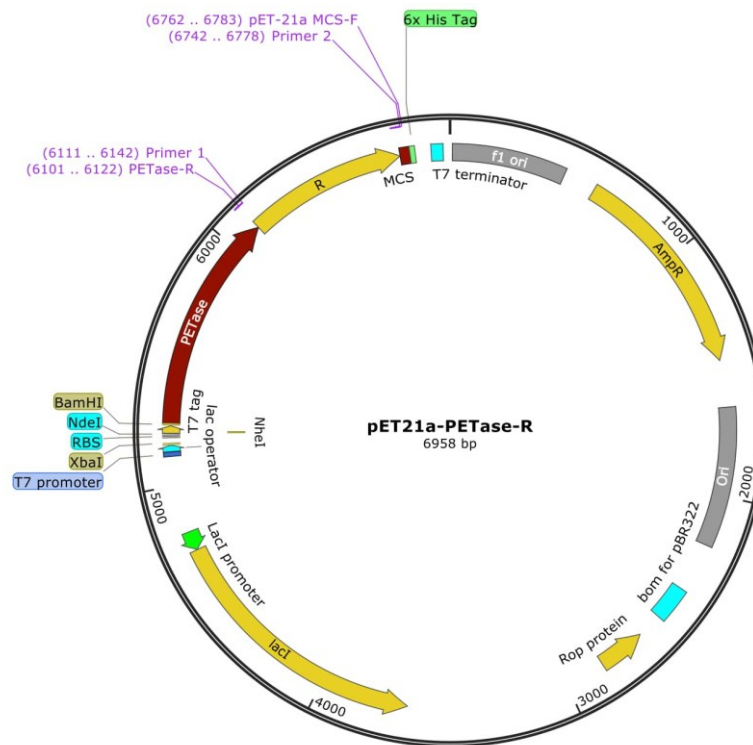


Figura 5 - Schema di un plasmide pET

<https://2023.igem.wiki/bioplus-china/engineering>

Il gene codificante la proteina ricombinante viene clonato nel vettore selezionato e il costrutto così ottenuto è trasformato nel ceppo di *Escherichia coli* BL21 (DE3). Questo ceppo contiene nel proprio genoma il frammento fagico DE3, che codifica per la RNA polimerasi di T7, la cui espressione è regolata dal promotore dell'operone del lattosio (lacUV5). Il promotore di T7 è altamente specifico e non viene riconosciuto dalla RNA polimerasi batterica; pertanto, il gene eterologo non viene trascritto nei ceppi privi di una fonte di RNA polimerasi di T7. (Studier & Moffatt, 1986)

L'aggiunta di isopropil β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) alle colture cellulari determina l'inattivazione del repressore legato al promotore lacUV5, inducendo la trascrizione e, di conseguenza, l'espressione del gene che codifica per la RNA polimerasi di T7. La polimerasi

così prodotta riconosce il proprio promotore posizionato a monte del gene di interesse nel vettore e ne avvia la trascrizione (Fig. 6). (Studier & Moffatt, 1986)

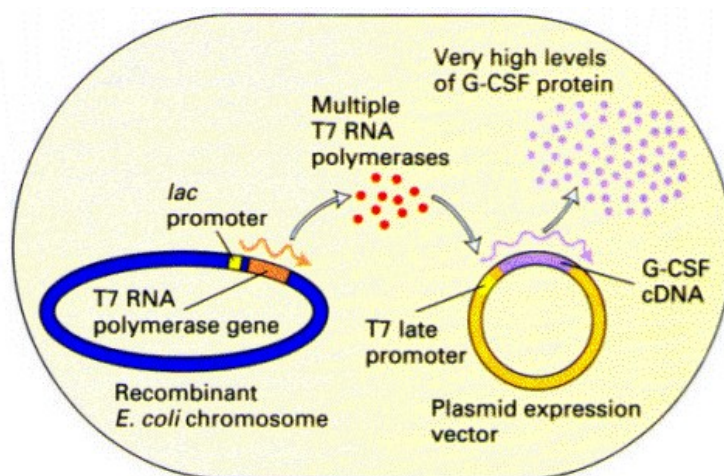


Figura 6 - Schema del sistema di espressione pET

La RNA polimerasi di T7 è estremamente attiva e, già poche ore dopo l'induzione con IPTG, la proteina ricombinante può costituire oltre il 50% del totale delle proteine cellulari. (Studier & Moffatt, 1986)

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Espressione della NAMPT

Le cellule ClearColi BL21 (DE3), una linea batterica derivata da *Escherichia coli* BL21 (DE3) geneticamente modificata mediante delezione di due catene aciliche del lipopolisaccaride (LPS), sono state trasformate con un vettore pET progettato per l'iperespressione della NAMPT. Tale modifica genetica previene il legame dell'endotossina al recettore Toll-like 4 (TLR4), riducendo significativamente la risposta immunitaria LPS-dipendente associata alle proteine ricombinanti prodotte, rispetto a quanto osservato con cellule di *E. coli* wild-type (Mamat & al., 2013). La coltivazione è stata effettuata in terreno Luria Bertani (LB) addizionato con ampicillina alla concentrazione di 0,1 mg/mL per la selezione dei cloni trasformanti (Tab. 1) (Miller, 1972):

Composto	Concentrazione [mg/mL]
NaCl	10
Tryptone	10
Estratto di lievito	5

Tabella 1 – Composizione del terreno di Luria Bertani

la coltura è stata incubata a 37°C in agitazione orbitale a 160 RPM, monitorando la crescita batterica mediante spettrofotometria a 600 nm, lunghezza d'onda alla quale la densità ottica risulta direttamente proporzionale alla concentrazione cellulare. Al raggiungimento di una densità ottica di 0,6, la temperatura di incubazione è stata ridotta a 23°C per un'ora, dopodiché l'espressione proteica è stata indotta mediante aggiunta di 0,8 mM di isopropil- β -D-tiogalattopiranoside (IPTG). La coltura è stata quindi mantenuta a 23°C per 16 ore in agitazione a 140 RPM, favorendo una produzione proteica ottimale stabile. Al termine dell'incubazione, la sospensione cellulare è stata centrifugata a 5.000 x g per 10 minuti a 4°C per separare il surnatante e ottenere il pellet cellulare. Quest'ultimo è stato risospeso in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) e sottoposto a una seconda centrifugazione alle medesime condizioni. Il surnatante è stato quindi eliminato e il pellet cellulare finale è stato conservato a -80°C per le successive fasi di purificazione (Rosano & Ceccarelli, 2014).

2.2.2 Purificazione della NAMPT

Quattro sono stati i tamponi impiegati durante l'intera procedura di purificazione: il tampone A, il tampone B, il tampone di lisi e il tampone di conservazione; ognuno con una composizione propria caratteristica (Tab. 2).

Tampone A		Tampone B	
Composto	Concentrazione (mM)	Composto	Concentrazione (mM)
Hepes pH7.5	50	Hepes pH7.5	50
NaCl	500	NaCl	500
Imidazolo	10	Imidazolo	350
Tris(2-carbossietil) fosfina idrossicloruro (TCEP)	1	Tris(2-carbossietil) fosfina idrossicloruro (TCEP)	1

Tampone di lisi		Tampone di conservazione	
Composto	Concentrazione (mM)	Composto	Concentrazione
Hepes pH7.5	50	Hepes pH7.5	50 mM
NaCl	500	NaCl	300 mM
Imidazolo	10	Glicerolo	20 %
Tris(2-carbossietil) fosfina idrossicloruro (TCEP)	1		
Fenilmetano sulfonilfluoruro (PMSF)	1		
Cocktail Inibitore	50µL/g di pellet		

Tabella 2 – Composizione dei tamponi di purificazione.

Per l'estrazione della proteina ricombinante, il pellet cellulare ottenuto dalla centrifugazione delle cellule trasformate è stato risospeso in tampone di lisi (Tab. 2), aggiunto in rapporto 1:24 rispetto al volume iniziale della coltura batterica. La sospensione risultante è stata sottoposta a disaggregazione cellulare mediante sonicazione (5 cicli da 45 secondi ciascuno, 100W, frequenza 0,5 Hz) al fine di indurre la lisi delle cellule batteriche e il conseguente rilascio della proteina ricombinante nel mezzo (Sambrook & Russel, 2001). Il lisato grezzo così ottenuto è stato quindi centrifugato a 20.000 giri per 30 minuti a 4 °C, rimuovendo i detriti cellulare e ottenendo un lisato chiarificato rappresentato dal surnatante. La purificazione della proteina è stata effettuata mediante un sistema di cromatografia FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), utilizzando il dispositivo NGC Medium Pressure Chromatography Sistem (Bio-Rad); il lisato chiarificato è stato caricato su una colonna contenente 1 mL di resina Ni-NTA, previamente equilibrata con il tampone A (Tab.2). La resina Ni-NTA contiene ioni nichel divalenti (Ni^{2+}) legati all'acido nitrilotriacetico, a sua volta derivatizzato con una matrice di agarosio, e sfrutta la capacità del nichel di interagire selettivamente con la coda di istidine localizzata al C-terminale della proteina ricombinante (Bornhorst & Falke, 2000). Dopo aver equilibrato con tampone A, l'eluizione della NAMPT è stata ottenuta applicando un gradiente di imidazolo da 10 mM a 350 mM (Tampone B – Tab. 2) come mostrato in Fig. 7.

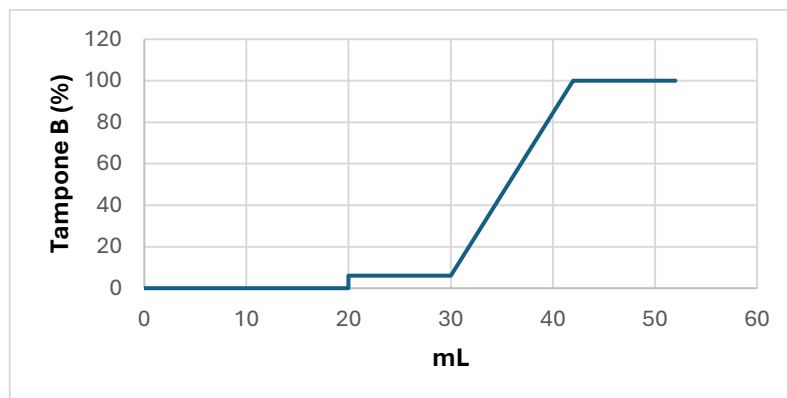


Figura 7 – Profilo di eluizione di NAMPT su colonna Ni-NTA

L'imidazolo, caratterizzato da una maggiore affinità per il nichel rispetto alle istidine, compete con esse e favorisce il distacco della proteina dalla resina; il processo di eluizione è stato monitorato a 280 nm, lunghezza d'onda corrispondente all'assorbimento tipico delle proteine. Le frazioni raccolte durante l'eluizione sono state sottoposte a saggio di attività enzimatica della NAMPT, e quelle risultate attive sono state combinate in un unico pool per le successive analisi e per la conservazione (Walker, 2010).

Poiché l'imidazolo presente nel tampone di eluizione può compromettere la stabilità della proteina, il pool proteico è stato ulteriormente purificato per gel filtrazione su una colonna contenente resina Sephadex G-25, equilibrata ed eluita con il tampone di conservazione (Tab. 2). Al fine di ridurre eventuali contaminazioni da endotossine, la preparazione proteica è stata trattata con una resina a base di ϵ -poli-L-lisina, in grado di legare con elevata affinità il lipopolisaccaride (LPS). La resina, equilibrata con il tampone di conservazione, è stata incubata con il campione per 1 ora a 4°C sotto agitazione costante; al termine dell'incubazione è stata rimossa mediante centrifugazione a 500 x g per 1 minuto e il surnatante risultante è stato conservato a -20°C per le analisi successive. (Magalhaes & al., 2007)

2.2.3 Determinazione dell'attività enzimatica di NAMPT

L'attività enzimatica della NAMPT è stata quantificata mediante un saggio spettrofotometrico che sfrutta la conversione stechiometrica del prodotto di reazione NMN in NADH, catalizzata dagli enzimi ancillari nicotinammide adeniltransferasi (NMNAT) e alcool deidrogenasi (ADH) (Fig. 8).

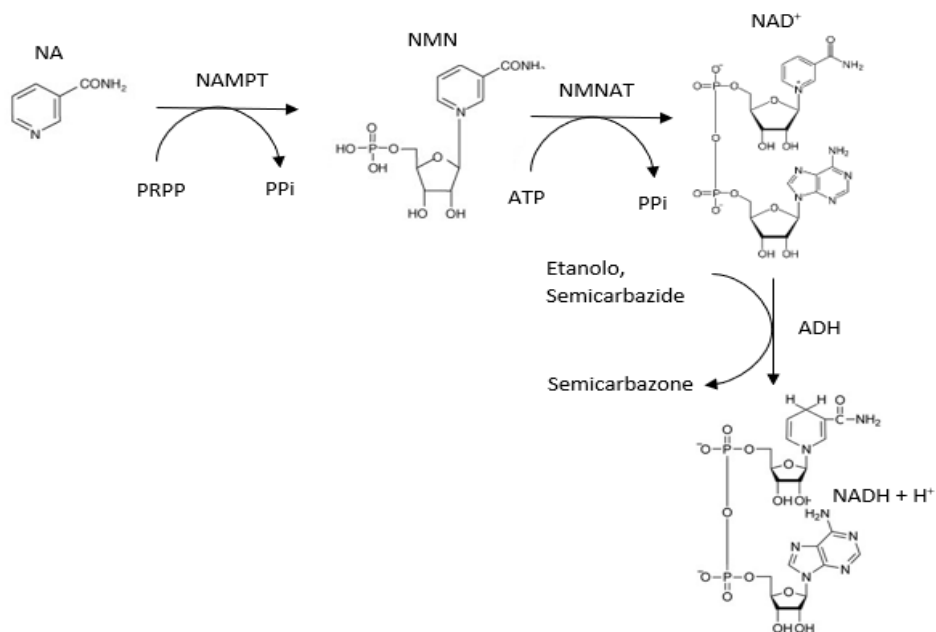


Figura 8 – Rappresentazione delle reazioni alla base del saggio dell'attività enzimatica

La miscela di reazione, la cui composizione è riportata in Tab. 3 è stata allestita direttamente nella cuvetta dello spettrofotometro, alla quale sono state aggiunte quantità definite di NAMPT; l'incremento dell'assorbanza a 340 nm, indicativo della formazione di NADH, è stato seguito nel tempo mantenendo la temperatura a 37°C, secondo il protocollo validato da Zamporlini et al. (Zamporlini & al., 2014)

Composto	Concentrazione
Hepes/NaOH pH 7.5	80 mM
Semicarbazide	30 mM
Etanolo	75 mM
MgCl ₂	12 mM
BSA	0.5 mg/mL
ADH	12.5 U/mL
ATP	1 mM
PRPP	0.5 mM
NMNAT	0.2 U/mL
NAM	0.5 mM

Tabella 3 – Composizione della miscela di reazione per la determinazione dell'attività enzimatica

L'attività enzimatica, espressa in U/ mL, è stata ricavata dal rapporto tra la pendenza delle rette ottenute ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$, ossia il cambiamento di assorbanza al minuto), moltiplicate con il

volume finale (μL_{mix}), e il prodotto tra il coefficiente di estinzione molare del NADH (pari a 6,22 a 340 nm) e il volume iniziale ($\mu\text{L}_{\text{usati}}$) della soluzione enzimatica aggiunta:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\frac{\Delta\text{Abs}}{\text{min}} * Vf}{\varepsilon * Vi}$$

Un'unità enzimatica (U) è definita come la quantità di NAMPT in grado di catalizzare la formazione di 1 μmole di NMN al minuto alla temperatura di 37°C.

2.2.4 Quantificazione proteica di NAMPT

La concentrazione proteica nei campioni è stata determinata mediante il saggio colorimetrico di Bradford, un metodo rapido e sensibile basato sul legame del colorante blu brillante di Coomassie ai gruppi carbossilici e amminici delle proteine tramite interazioni di Van der Waals ed elettrostatiche e sulla conseguente variazione spettrale nel visibile, misurabile in assorbanza (Noble & Bailey, 2009): in questo saggio, μg di proteine reagiscono con il colorante generando un complesso la cui intensità di assorbimento attorno a 590-595 nm aumenta in modo proporzionale alla concentrazione proteica presente nel campione. (Ernst & Zor, 2010)

Per la calibrazione del saggio è stato impiegato come standard l'albumina di siero bovino (BSA), preparando soluzioni a concentrazione nota e misurandone l'assorbanza a 595 nm dopo incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente con il reattivo di Bradford (Noble & Bailey, 2009). I valori di assorbanza delle soluzioni standard sono stati quindi riportati in funzione della concentrazione di BSA per ottenere la retta di taratura (Fig. 9), e le concentrazioni proteiche dei campioni incogniti sono state ricavate interpolando i rispettivi valori di assorbanza nella porzione lineare della curva. (Ernst & Zor, 2010)

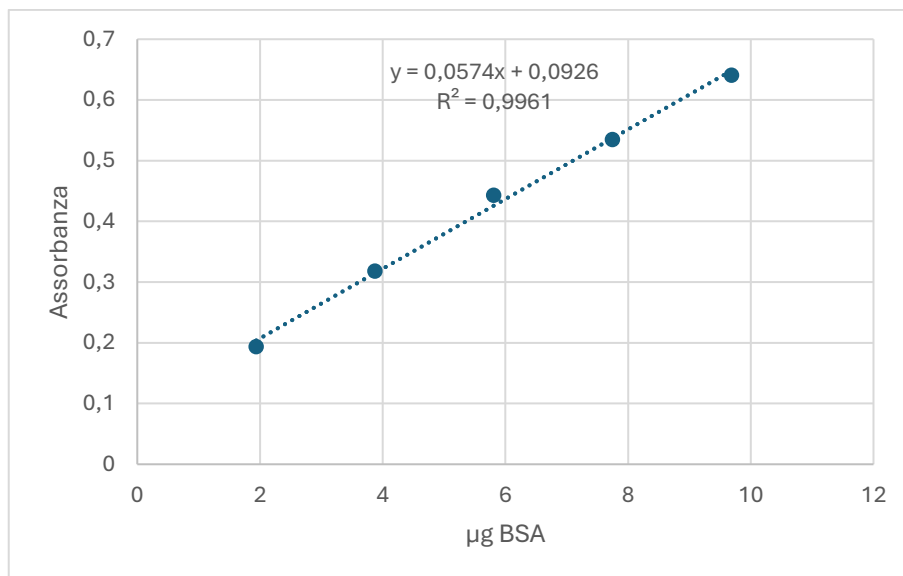


Figura 9 – Esempio di retta di taratura del saggio calorimetrico di Bradford

2.2.5 Analisi elettroforetica in SDS-PAGE della proteina NAMPT

L'analisi del profilo proteico dei campioni è stata eseguita mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE), utilizzando il sistema discontinuo descritto da Laemmli, ampiamente adottato per la separazione delle proteine in condizioni denaturanti (Laemmli, 1970). In questo metodo, il sodio dodecil solfato (SDS) denatura i polipeptidi e conferisce loro una carica negativa pressochè uniforme, consentendo la migrazione dal polo negativo al polo positivo e una separazione dipendente principalmente dal peso molecolare delle proteine. Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state visualizzate mediante colorazione con Coomassie Brilliant Blu R-250, un colorante che forma complessi non covalenti con i residui amminici e basici delle catene polipeptidiche, più specificatamente mediante interazioni ioniche tra i gruppi acidi solfonici del colorante e i gruppi amminici e acidi delle proteine, e consente una sensibilità nell'ordine dei nanogrammi, tipicamente intorno 30-100 ng di proteina (Neuhoff & al., 1988).

La procedura di colorazione è stata effettuata immergendo il gel per circa un'ora in una soluzione di Coomassie Brilliant Blu R-250 allo 0,25%, seguita da un passaggio di decolorazione in una soluzione contenente 40% metanolo e 10% acido acetico, fino all'ottenimento di bande proteiche nitide e ben definite, in accordo con protocolli convenzionali di

colorazione con Coomassie per SDS-PAGE, rappresentative delle proteine presenti nei campioni analizzati (Neuhoff & al., 1988) (Peisker, 1988).

CAPITOLO 3

3.1 Sistema di espressione mediante Baculovirus

I baculovirus costituiscono una famiglia di virus a DNA che infettano gli insetti e vengono impiegati dall'uomo sia come agenti di controllo biologico (pesticidi) che come vettori per l'espressione genica eterologa. La famiglia *Baculoviridae* comprende due generi distinti, vale a dire i virus della nucleopoliosi, che sono virioni di dimensioni rilevanti capaci di infettare lepidotteri, imenotteri, e ditteri; e i virus granulosi caratterizzati da virioni ridotti, di piccole dimensioni, specifici per i lepidotteri.

Nel decorso del ciclo replicativo si distinguono due varianti morfologiche dei baculovirus:

- I budded virus (BV), incaricati della disseminazione intracellulare, recano il nucleocapside circondato da un envelope mutuato dalla membrana plasmatica ospite, con la glicoproteina GP64 esposta in superficie per favorire l'ingresso e quindi l'infezione;
- I virus nella conformazione oclusa (ODV), immersi in una matrice di poliedrina, deputati alla trasmissione orizzontale tra individui ospiti.

L'infezione inizia con l'assunzione orale di ODV da parte dell'insetto su vegetali contaminati. La poliedrina salvaguarda i virioni dalle condizioni ambientali, assicurando vitalità pluriennale. Durante la fase iniziale (0-6 ore post-infezione), la dissoluzione della matrice negli ambienti alcalini intestinali libera gli ODV, che penetrano l'epitelio mediante fusione con la membrana cellulare, evadono dagli endosomi, raggiungono il nucleo ospite e lì si autoriproducono. Nella fase intermedia (6-24 ore), parte dei virioni fuoriescono come BV, raggiungendo e colonizzando altri tessuti larvali per un'infezione diffusa. Contemporaneamente, i virioni persistenti nel nucleo, al termine del ciclo (18-72 ore), vengono racchiusi in una nuova matrice poliedrinica e dispersi all'esterno a seguito della lisi cellulare (Fig. 10). (Scholz & Suppmann, 2017)

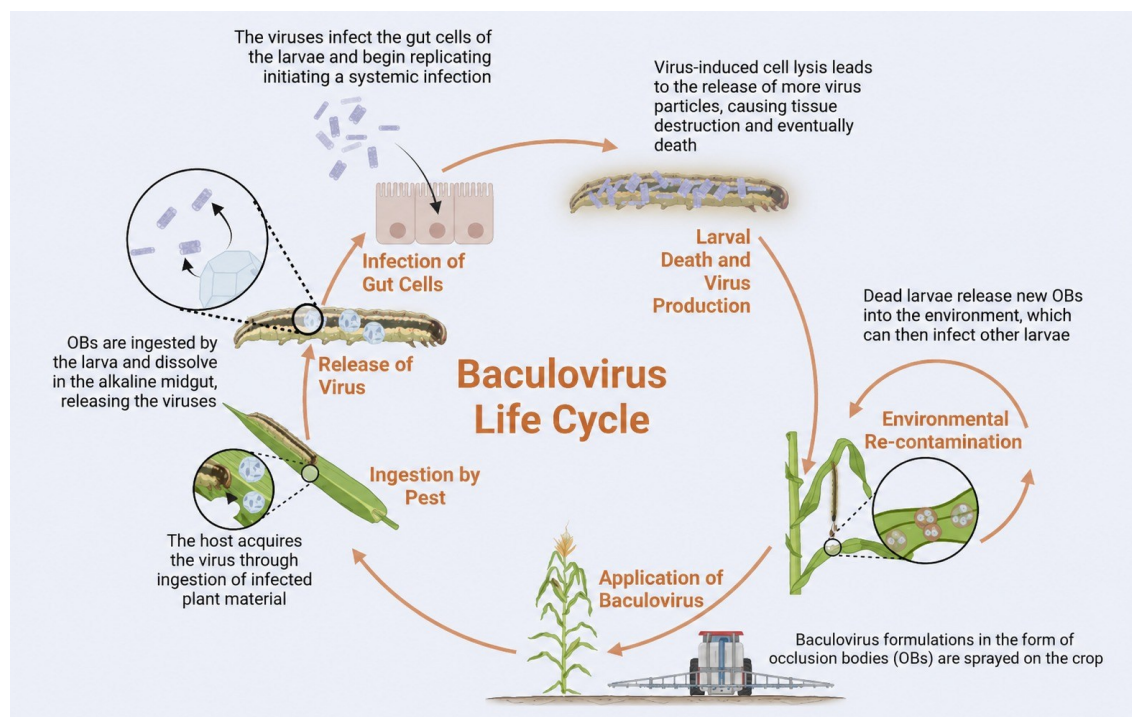


Figura 10 - Ciclo di infezione del baculovirus (Gonthier, 2025)

Il baculovirus maggiormente studiato è quello della nucleopoliedrosi di *Autographa colifornica* (AcMNPV), dotato di un genoma circolare a doppio filamento di DNA di circa 134 kbp, capace di infettare un'ampia gamma di Lepidotteri, all'incirca una trentina di specie, e di codificare numerosi geni che sfruttano il ciclo cellulare e l'apoptosi delle cellule di insetto a proprio beneficio. Negli ultimi vent'anni sono stati sviluppati numerosi vettori di espressione basati su baculovirus, impiegati per ottenere elevate quantità di proteine ricombinanti; poiché non sono mai state descritte infezioni da baculovirus in un uomo o in altri mammiferi, questi sistemi di espressione sono considerati tra i più sicuri ad oggi disponibili in commercio. (Chambers & al., 2018)

La generazione di un baculovirus ricombinante avviene tramite ricombinazione omologa tra una regione non essenziale del DNA virale e un vettore di trasferimento contenente il gene di interesse; in genere si sostituisce la sequenza codificante la poliedrina con il gene eterologo, dato che la poliedrina non è richiesta per la replicazione in coltura e il suo promotore consente un'elevata produzione della proteina. (Kost & al., 2005)

Rispetto ai sistemi di espressione in batteri, le cellule di insetto sono in grado di sintetizzare proteine con modifiche post-traduzionali simili a quelle delle cellule eucariotiche e non formano corpi di inclusione. (Kost & al., 2005)

Per l'ottenimento del virus ricombinante, il DNA del baculovirus viene co-trasferito nelle cellule di insetto insieme al plasmide ricombinante. La doppia ricombinazione omologa che avviene nel genoma virale ristabilisce la funzionalità dell'ORF1629 e sostituisce la sequenza BAC con il promotore della poliedrina e del gene di interesse. Di conseguenza, soltanto i virioni ricombinanti in cui l'ORF1629 è presente in forma completa sono in grado di replicarsi efficacemente (Fig. 11). (Gwak & al., 2019)

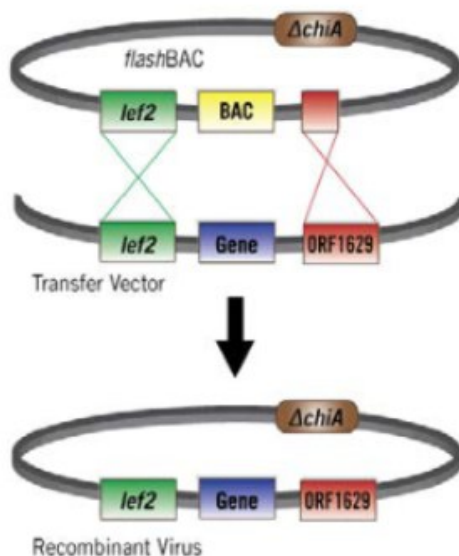


Figura 11 - Ricombinazione omologa tra baculovirus e vettore di trasferimento
(https://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Expression_Systems/NOVAGEN_InsectCellExpression.pdf)

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Clonaggio del plasmide PAcGP67 – h-NAMPT-his

Il clonaggio per inserire il gene codificante la NAMPT umana con le code di istidina (presente nel vettore pET15B), nel vettore PAcGP67 (PAcGP67-TLR4 – Addgene Plasmid #20863) è stato realizzato mediante il KIT In-Fusion® HD Cloning Kits, utilizzando come enzimi di restrizione NOT I e BAMH I. Il buon esito del clonaggio, oltre a prove interne di digestione, è stato verificato attraverso il sequenziamento del plasmide fatto dalla ditta BMR genomics (Fig.12). Questo vettore contiene la sequenza segnale gp67 all'N-terminale del gene inserito, che indirizza la proteina nella via secretoria.

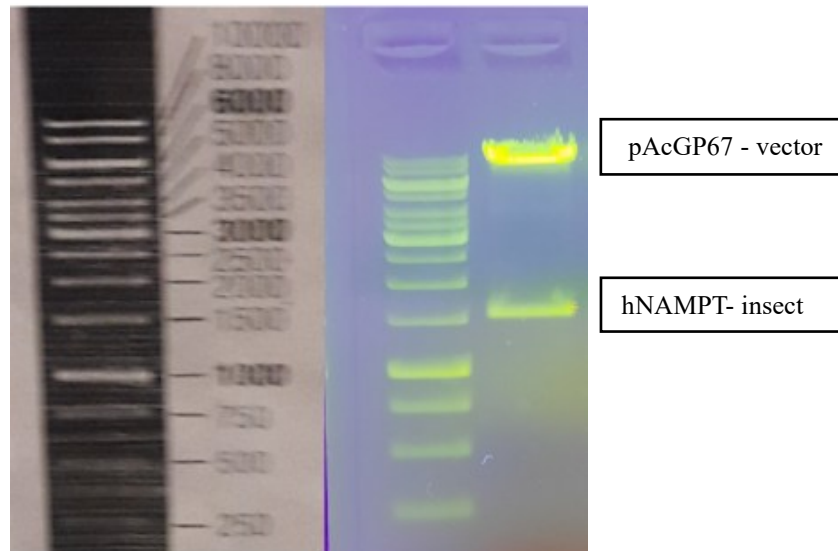


Figura 12 - Rappresentazione della digestione del vettore e della liberazione dell'inserto su gel d'agarosio

3.2.2 Colture cellulari Sf9 e Hi5

Le cellule Sf9 e Hi5 sono state inizialmente mantenute in coltura aderente in fiasche T25, con l'ausilio di terreni di crescita privi di siero, specifici per ciascuna linea: rispettivamente BacVector® Insect Cell Medium per le Sf9 ed Express Five™ SFM™ per le Hi5. Sono state tenute in incubazione a 28 °C, in ambiente non umidificato.

Lo stato della coltura e la morfologia cellulare sono stati monitorati quotidianamente mediante osservazione al microscopio invertito.

Al raggiungimento di una confluenza compresa tra circa l'85% e il 95%, le cellule sono state sottoposte a lavaggio con tampone fosfato salino (PBS) e sono state staccate delicatamente dal fondo mediante raschietto sterile (scraper); dopodiché sono state conteggiate con la camera di Burkner (Fig. 15). Le colture sono state quindi trasferite in condizioni di sospensione inoculando 1×10^7 cellule in 20 mL di terreno fresco, seguite da incubazione a 28°C in incubatore non umidificato e agitazione a 140 rpm.

La densità cellulare è stata verificata giornalmente mediante conteggio in camera di Burkner e, una volta raggiunto un intervallo di $2-4 \times 10^6$ cell/mL, le colture sono state sottoposte a subcoltura riportando la densità iniziale a $0,5 \times 10^6$ cell/mL, così da mantenere le cellule in fase di crescita esponenziale ottimale.

3.2.3 Generazione e amplificazione del baculovirus ricombinante

Per la generazione di un baculovirus ricombinante in grado di iperesprimere hNAMPT è stato impiegato il sistema BacMagic, utilizzando cellule Sf9 in fase esponenziale seminate in piastre da 35 mm alla densità di 1×10^6 cellule per piastra e lasciate aderire per 1 ora a 28°C su superficie piana. Nel mentre dell'attesa è stata allestita la miscela di trasfezione contenente il vettore di trasferimento pACGP67-hNAMPT e il DNA virale.

Una volta terminato il tempo di incubazione, il terreno è stato rimosso e sul mostrato cellulare sono stati aggiunti 1 mL di miscela di trasfezione, oppure 1 mL di solo terreno per il controllo negativo. Le colture trasfettate sono state quindi mantenute a 28°C per 5 giorni, monitorando quotidianamente al microscopio invertito l'insorgenza dell'effetto citopatico tipico dell'infezione baculovirale. Al termine di questo periodo di incubazione, il surnatante contenente il baculovirus ricombinante, definito popolazione virale 0 (PV0), è stato raccolto, centrifugato a 1000 x g per 10 minuti a 4°C per rimuovere i detriti cellulari e conservato alla stessa temperatura per i successivi passaggi di amplificazione.

Prima di procedere con l'espressione dell'enzima nelle cellule Hi5, il virus è stato amplificato e titolato: la prima amplificazione è stata ottenuta infettando cellule Sf9 in crescita esponenziale a 2×10^6 cell/mL con 500 µL di PV0, controllando l'andamento della crescita nei giorni successivi e accogliendo il terreno una volta osservato l'arresto proliferativo; il surnatante, dopo centrifugazione a 1000 x g per 20 minuti a 4°C per eliminare le cellule morte, è stato indicato come popolazione virale 1 (PV1), sulla quale è stato eseguito il saggio delle placche per la determinazione del titolo virale.

La seconda amplificazione, finalizzata all'ottenimento della PV2, è stata condotta infettando nuovamente le cellule con una molteplicità di infezione (MOI) pari a 0,05 pfu/cell e seguendo la stessa procedura descritta in precedenza.

Il MOI, espresso come numero medio di unità formanti placca per cellula (pfu/cell), è stato calcolato sulla base del titolo virale e della densità cellulare utilizzando l'apposita formula:

$$mL \text{ di inculo virale} = \frac{MOI \left(\frac{pfu}{cell} \right) * \text{numero di cellule}}{\text{titolo virale} \left(\frac{pfu}{mL} \right)}$$

3.2.4 Titolazione virale mediante saggio delle placche di lisi

Il saggio delle placche di lisi viene impiegato per determinare il titolo del baculovirus, espresso come unità formanti placca per millilitro (pfu/mL), dove ogni placca corrisponde alla lisi locale del monostrato cellulare (Fig. 13) causata da una singola particella virale infettiva. Di conseguenza, il numero di placche osservate è direttamente proporzionale al numero di pfu presenti nel campione e la conoscenza accurata del titolo è essenziale per impostare in modo ottimale le infezioni destinate all'espressione della proteina ricombinante, per le quali sono generalmente considerati adeguati titoli pari ad almeno $5-8 \times 10^7$ pfu/mL, mentre valori inferiori a 1×10^7 pfu/mL risultano non idonei agli studi di espressione.

Per l'esecuzione del saggio, le cellule Sf9 sono state seminate in quattro piastre da 35 mm alla densità di $0,9 \times 10^6$ cellule per piastra e lasciate aderire per 1 ora a temperatura ambiente su superficie piana. Nel frattempo, la popolazione virale PV1 è stata sottoposta a diluizioni seriali fino a 10^{-7} , in modo da ottenere, dopo infezione, piastre con placche ben separate e facilmente enumerabili. Raggiunta una sub-confluenza, il terreno è stato rimosso e 1 mL delle diverse diluizioni virali è stato distribuito sulle piastre, mentre nel controllo negativo è stato aggiunto 1 mL di solo terreno; dopo un'ora di adsorbimento a temperatura ambiente, l'inoculo virale è stato eliminato e alle piastre sono stati aggiunti 2 mL di uno strato di agarosio costituito da 2/3 di terreno con il 5% di siero bovino fetale e 1/3 di agarosio al 3% in acqua Milli-Q, lasciando solidificare a temperatura ambiente. Una volta indurito lo strato di agarosio, è stato aggiunto 1 mL di terreno sovrastante per garantire condizioni ottimali di crescita cellulare e di replicazione virale; quindi, le piastre sono state trasferite in un contenitore umidificato e incubate a 28°C. Dopo 4 giorni, per visualizzare le placche, è stato aggiunto a ciascuna piastra 1 mL di rosso neutro, un colorante vitale che penetra nelle cellule integre e si accumula nei lisosomi, colorando di rosso le cellule vive mentre le aree lisate dal virus rimangono incolori. Dopo 2 ore di incubazione a 28°C il colorante è stato rimosso e le piastre sono state mantenute a temperatura ambiente, al buio, per almeno 3 ore prima della lettura; le placche sono state quindi conteggiate su un piano luminoso e il titolo virale è stato calcolato moltiplicando il numero di placche per il corrispondente fattore di diluizione.

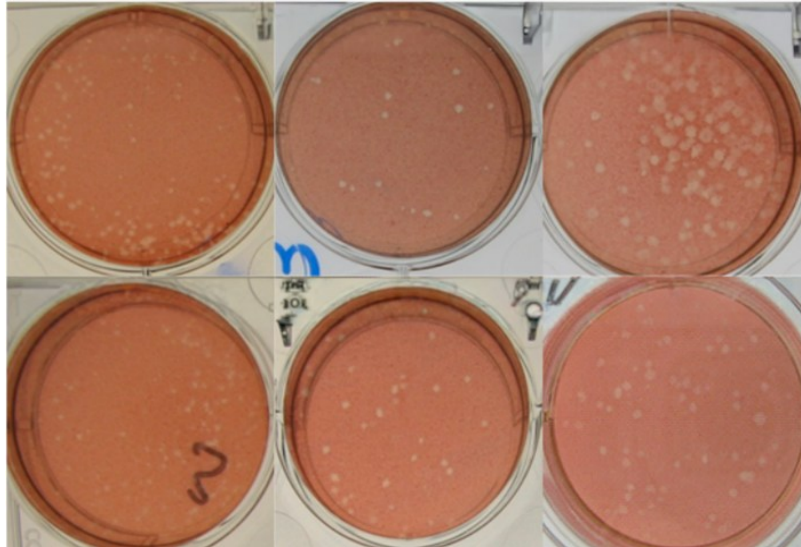


Figura 13 – Esempio di placche di lisi del saggio per la titolazione virale

3.2.5 Espressione della hNAMPT

Le cellule Hi5 sono state incubate in sospensione a 28°C a 140 RPM e una volta raggiunta densità cellulare di 2×10^6 cell/mL sono state infettate con la popolazione virale contenente la hNAMPT al fine di ottenere un MOI di 5 pfu/cell e una infezione simultanea di tutte le cellule con conseguente produzione sincrona della proteina eterologa.

Sono state poi raccolte diverse aliquote della sospensione cellulare a 0, 24, 48 e 72 h di incubazione, che sono state successivamente sottoposte a centrifugazione da 1000 x g per 10 minuti a 4°C per promuovere l'allontanamento delle cellule e recuperare il surnatante contenente la proteina ricombinante, conservato a -20°C, preparando allo stesso tempo dei campioni da analizzare successivamente in elettroforesi.

3.2.6 Purificazione della NAMPT

La procedura adottata è analoga a quella descritta nel sottoparagrafo 2.2.2.

3.2.7 Determinazione dell'attività enzimatica di NAMPT

La procedura adottata è analoga a quella descritta nel sottoparagrafo 2.2.3.

3.2.8 Quantificazione proteica di NAMPT

La procedura adottata è analoga a quella descritta nel sottoparagrafo 2.2.4.

3.2.9 Analisi mediante western blot della proteina NAMPT

Il Western blot è una tecnica immunoenzimatica utilizzata per rilevare specifiche proteine in un campione sfruttando anticorpi selettivi. In questo caso, 10 μ L dei terreni di coltura delle cellule Hi5 infettate con il virus ricombinante sono stati analizzati mediante analisi elettroforetica in SDS-PAGE seguendo l'analogo protocollo spiegato nel sottoparagrafo 2.2.5.

Come controllo positivo sono stati caricati 100ng di hNAMPT purificata.

Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa tramite elettroblotting, così da renderle accessibili al riconoscimento anticorpale.

La membrana è stata quindi sottoposta a lavaggio in tampone TRIS salino (TBS) (Tab. 4) e successivamente saturata con una soluzione di blocco per evitare legami aspecifici tra la superficie della membrana e gli anticorpi.

Dopo un ulteriore lavaggio con tampone contenente Tween e TBS (TTBS) (Tab. 4), la membrana è stata incubata in agitazione per 16 h a 4°C con l'anticorpo primario anti-hNAMPT diluito 1:500 in TBS.

Tampone tris salino (TBS)	
Composto	Concentrazione (mM)
TrisHCl pH 7.6	20
NaCl	137

Tampone con tween e tris salino (TTBS)	
Composto	Concentrazione (mM)
TrisHCl pH 7.6	20
NaCl	137
Tween	0.18

Tabella 4 – Tamponi per western blot

Al termine dell'incubazione, la membrana è stata lavata con TTBS, per rimuovere l'anticorpo primario non complessato, e poi incubata per 1 h a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario, diluito 1: 10.000 nel tampone di blocco. La regione variabile dell'anticorpo secondario riconosce l'anticorpo primario, mentre la regione costante è coniugata con perossidasi di rafano (HRP), che consente la rilevazione in chemiluminescenza della banda corrispondente ad hNAMPT.

L'eccesso di anticorpo secondario è stato eliminato lavando nuovamente la membrana in TTBS e la rilevazione è stata effettuata aggiungendo il tampone contenente 750 µL di luminolo e 750 µL di perossido di idrogeno (H₂O₂). In presenza di quest'ultimo, la perossidasi di rafano catalizza l'ossidazione del luminolo a 3-amminoftalato, il cui decadimento è accompagnato dall'emissione di fotoni con massima intensità intorno a 425 nm; il segnale emesso è stato acquisito mediante sistema di imaging Chemidoc.

CAPITOLO 4

4.1 Linea cellulare THP-1

Le cellule THP-1 sono una linea cellulare di leucemia monocitica acuta umana isolata dal sangue periferico, che viene ampiamente utilizzata negli studi di ricerca improntati sulle vie di segnalazione correlate ai macrofagi e sul rilascio di farmaci, nonché per lo studio di meccanismi di infezione dei patogeni e dell'immunità innata dell'ospite. Sono quelle maggiormente scelte rispetto ad altre linee cellulari leucemiche perché possiedono caratteristiche morfologiche e funzionali simili ai monociti primari umani; inoltre, in laboratorio, sono di facile coltura ed espansione, con un background genetico stabile che permette la riproducibilità dei risultati sperimentali. (Liu & al, 2023)

I macrofagi sono cellule immunitarie innate ed a causa della loro bassa concentrazione e delle procedure di isolamento svantaggiose in termini di tempi e semplicità, vengono ottenuti più facilmente attraverso la differenziazione di queste cellule THP-1, indotte in tale processo solitamente mediante l'utilizzo di forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA), la cui aggiunta promuove l'adesione delle cellule alla plastica della coltura tissutale e la loro modificazione morfologica nella forma stellata (Liu & al, 2023): secondo lo studio di Huang et al. dopo il trattamento con PMA per 24 ore, è incrementata in maniera significativa l'espressione di CD68 (marker di differenziamento) e le prove morfologiche sono state testimonianza della polarizzazione in macrofagi M0, in quanto le cellule THP-1 si mostravano rotonde e piccole mentre gli M0 più grandi e contenenti granuli (Fig. 14).

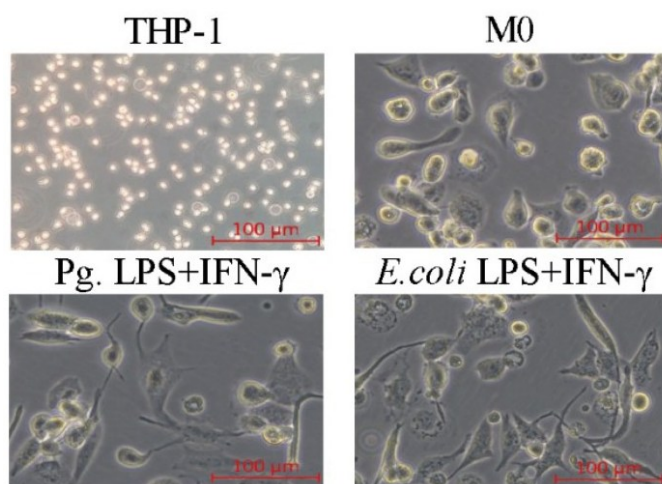


Figura 14 - Differenziazione delle cellule THP1 per generare macrofagi. (Huang & al., 2019)

4.2 Materiali e metodi

Per la crescita, il mantenimento e la successiva differenziazione della linea monocitica cellulare THP-1 è necessario definire e standardizzare delle condizioni di coltura tali da garantire la vitalità cellulare e le capacità funzionali.

L'adozione di protocolli standardizzati è fondamentale per garantire la riproducibilità sperimentale e l'attendibilità dei risultati ottenuti nelle sperimentazioni di laboratorio.

4.2.1 Allestimento del terreno di coltura

Il terreno di base per la coltura e quindi la crescita delle cellule THP-1 è l'RPM-1640 formulato ATCC, già contenente D-glucosio (2g/L), HEPES (10mM) e sodio piruvato (10mM) indispensabili per il mantenimento del pH e il supporto delle funzioni metaboliche. Questo viene reso completo addizionandolo con il 10 % di siero bovino fetale (FBS) per rendere disponibili nutrienti e fattori di crescita necessari, con il 3-mercaptoetanolo ad una concentrazione finale di 0,05 mM importante per mantenere un ambiente riducente e preservarne la stabilità proteica intracellulare, con l'1% di Penicillina/Streptomicina (P/S) per prevenire le contaminazioni batteriche e con l'1% di L-glutammina per la sintesi proteica e la proliferazione cellulare. Il terreno così arricchito viene incubato a 37°C, pronto così per il successivo utilizzo.

4.2.2 Scongellamento delle cellule THP-1

Le cellule THP-1 criopreservate sono state sottoposte ad un protocollo di scongelamento rapido (2 minuti) al fine di ridurre al minimo il danno cellulare indotto dallo shock termico e garantirne il loro massimo livello di vitalità: la fiala contenente la sospensione cellulare è stata immersa in un bagnomaria termostato a 37°C fino al completo scioglimento del contenuto, attenzionando il fatto di mantenere l'O-ring e il tappo fuori dall'acqua al fine di ridurre la possibilità di contaminazione; dopodiché la sospensione cellulare è stata diluita mediante l'aggiunta di 10 mL di PBS (Phosphate Buffered Saline), ossia il tampone fosfato salino per ridurre la concentrazione di DMSO (dimetilsolfossido), crioprotettore impiegato durante la fase di congelamento. La sospensione risultante è stata quindi centrifugata a 125 x g per 6 minuti a temperatura ambiente.

Al termine della centrifugazione, il surnatante è stato prelevato e rimosso, mentre il pellet

cellulare è stato risospeso in 10 mL di terreno di coltura completo. Tale sospensione cellulare è stata infine trasferita in una flask di coltura T-75, raggiungendo una densità iniziale di $0,8 \times 10^6$ cellule/mL e mantenuta in incubazione con atmosfera controllata al 5% di CO₂ e ad una temperatura di 37°C.

4.2.3 Controllo della proliferazione cellulare

La densità cellulare della linea THP-1 è stata controllata periodicamente e mantenuta nell'intervallo di concentrazione compreso tra 2×10^5 e 1×10^6 cellule/mL, ciò in particolare al raggiungimento della fase di crescita esponenziale con il superamento del valore massimo dell'intervallo: in tale caso, la coltura viene diluita mediante l'aggiunta di terreno fresco ristabilendo così la concentrazione ottimale. Tale operazione è stata ripetuta con frequenza ogni 2-3 giorni al fine di prevenire l'accumulo di metaboliti di scarto e il depauperamento delle componenti nutritive del mezzo, garantendo condizioni di crescita ideali e la riproducibilità degli esperimenti.

4.2.4 Crioconservazione delle cellule THP-1

Per la conservazione a lungo termine delle cellule, viene prelevato un volume adeguato di sospensione cellulare e centrifugato a $100 \times g$ per 10 minuti. Il pellet cellulare viene poi risospeso in 900 µL di surnatante, al quale sono stati aggiunti 100 µL di DMSO.

Successivamente, aliquote da 1 mL della sospensione sono state trasferite in criovial sterili e quindi stoccate a -80°C.

4.2.5 Camera di Burker e conteggio cellulare

La camera di Burker è lo strumento utilizzato per calcolare la quantità di cellule presenti in coltura in seguito alla proliferazione cellulare: è una camera con profondità di 0,1 mm, composta da 9 quadrati grandi da 1 mm² ciascuno, suddivisi ulteriormente, da doppie linee distanti 0,05 mm, in 16 quadrati più piccoli da 0,025 mm² (Fig. 15). (Gunetti & al., 2012)

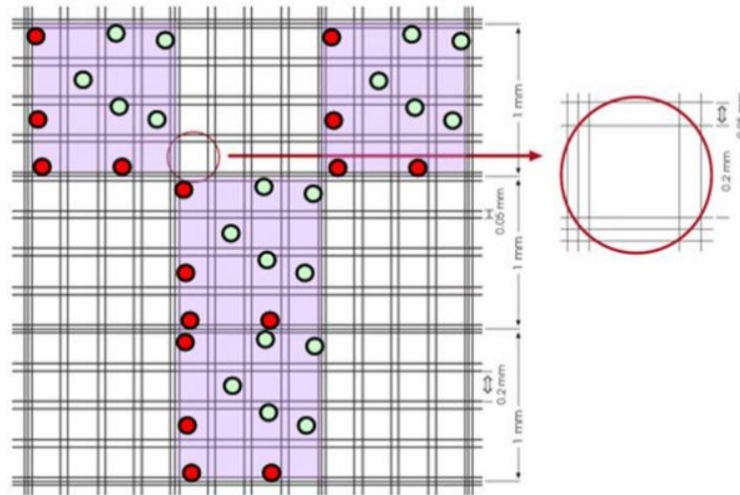


Figura 15 – Camera di Burkert (Gunetti & al., 2012)

Previo trasferimento del contenuto nella flask in una provetta, si prepara successivamente una eppendorf in modo tale da diluire il campione e facilitare il conteggio; dopodiché, al momento della conta, viene posto il vetrino copri-oggetti sopra la camera di Burkert e, una volta stabilizzato, con una micropipetta viene prelevata una piccola quantità di campione che verrà inserita delicatamente nell'intercapedine formatosi tra il vetrino e la camera, notando la dispersione più o meno completa all'interno del quadrante.

Allestito il materiale di lettura, si pone la camera al microscopio ottico con un ingrandimento di 10x e si inizia il conteggio delle cellule su tre quadrati da 1 mm^2 per poi calcolare il valore medio e quindi la densità complessiva della sospensione cellulare, mediante tale formula:

$$\text{Densità sospensione cellulare} \left(\frac{\text{cell}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{media delle cellule contate (cell)}}{\text{volume cella (mm}^3\text{)} * \text{fattore di conversione}} * \text{fattore di diluizione}$$

dove il volume della cella è di $0,1 \text{ mm}^3$ e il fattore di conversione da μL a mL è 0,001.

4.3 Differenziamento cellulare

Come detto precedentemente il PMA è un estere del forbolo, un composto in grado di attivare la protein chinasi C (PKC) innescando la cascata di segnalazione che promuove la differenziazione monocitica. Tale composto rappresenta un modello sperimentale ampiamente validato per indurre il differenziamento dei monociti in macrofagi (Zeng & al., 2015): le cellule THP-1 sono state quindi trattate con PMA per un periodo variabile compreso tra le 24 e 72

ore, in funzione del grado di differenziazione richiesto per le successive applicazioni sperimentali.

4.3.1 Protocollo di differenziamento cellulare

In ogni pozzetto di una 12 well viene inserito 1 ml di una coltura cellulare allestita al fine di ottenere $0,5 \times 10^6$ cells/ml e quindi $0,5 \times 10^6$ cell/well. Una volta distribuito, vengono aggiunti 1,5 μ L di PMA 100 μ M cada uno, per ottenere una concentrazione finale di 150 nM; successivamente, si ripongono le cellule trattate ad incubare per 48 ore avviando così il processo di differenziamento: prima del trattamento le cellule THP-1 si trovano sospese, con forma piccola, rotondeggiante e trasparente, mentre dopo l'induzione con PMA tendono ad aderire alla parete della piastra well diventando più grandi, poligonali e con pseudopodi estesi, acquisendo perciò le caratteristiche morfologiche dei macrofagi (Fig. 16). (Liu & al, 2023)

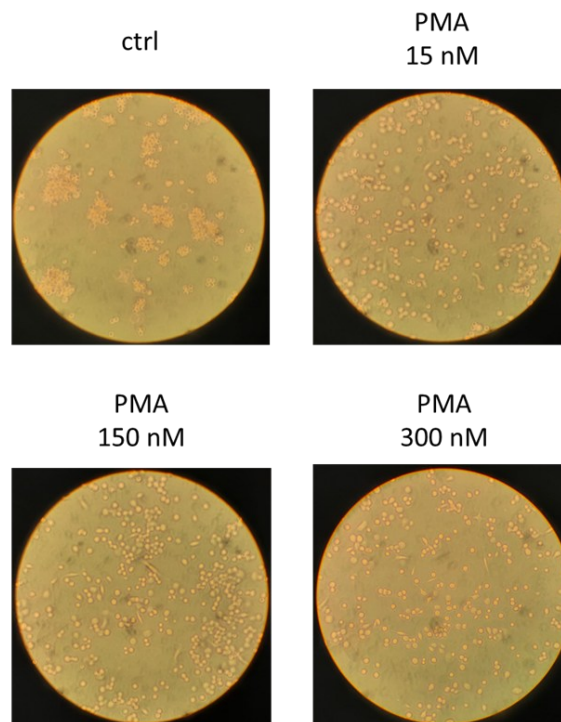


Figura 16 - Confronto morfologico delle cellule THP-1 prima e dopo l'induzione di PMA (diverse concentrazioni) mediante microscopio ottico

Al termine del tempo di incubazione viene cambiato il terreno sostituendolo con quello fresco e si lasciano nuovamente in incubazione per 24 ore in fase di recovery per il completamento del differenziamento e la stabilizzazione della loro attività funzionale.

4.4 Test ELISA

Il test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) è una fra le tecniche immunoenzimatiche, che utilizzano le proprietà catalitiche degli enzimi per rilevare e quantificare le reazioni immunologiche, che comunemente viene utilizzata nelle analisi cliniche (Zubair, 2026): si basa sul concetto di reazione antigene-anticorpo, ossia la specifica risposta immunitaria deputata alla protezione dell'organismo da agenti patogeni, tossine e sostanze xenobiotiche; quindi, sfruttando tale interazione, l'ELISA consente una sensibile e selettiva analisi quantitativa e qualitativa di molecole specifiche quali proteine, peptidi, acidi nucleici, ormoni, in campioni biologici come siero e/o plasma e in estratti cellulari. Ciò grazie all'utilizzo di enzimi che marcheranno l'anticorpo e l'antigene e ad un substrato cromogenico che permetterà lo sviluppo di un colore corrispondente alla concentrazione dell'antigene presente, successivamente rilevata utilizzando un lettore di micropiastre. (Sakamoto & al., 2017)

Generalmente i test ELISA vengono eseguiti su piastre di polistirene da 96 pozzetti e solitamente quattro sono le fasi principali: il rivestimento della piastra con un antigene o un anticorpo; il blocco dei siti di legame non specifici con BSA; il rilevamento di antigeni o anticorpi mediante sistema enzimatico (comunemente perossidasi di rafano-HRP e fosfatasi alcalina) con aggiunta di un substrato cromogeno e la misurazione del segnale dopo l'aggiunta del substrato. Ciascuna di questa fase è intervallata da 2 o più cicli di lavaggio, a seconda del protocollo specifico, effettuati con una soluzione tampone, ad esempio la soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) con un detergente non ionico, al fine di eliminare il materiale non complessato. (Zubair, 2026)

Inoltre, per arrestare l'ultima fase del saggio immunoenzimatico, nonché la reazione enzima-substrato che di solito ha una durata di 30-60 minuti per il completamento, viene aggiunta una soluzione di arresto, rappresentata, ad esempio, da idrossido di sodio, acido cloridrico o acido solforico, scelta a seconda delle singole reazioni. (Sakamoto & al., 2017)

Per effettuare la lettura finale, inizialmente i pozzetti della piastra vengono allestiti con diluizioni seriali di concentrazioni note e successivamente alla rilevazione dei dati da parte

della strumentazione di lettura questi verranno utilizzati per la costruzione di una curva standard avente la concentrazione sull'asse x logaritmico e l'assorbanza sull'asse y lineare. (Zubair, 2026)

4.4.1 Varianti operative del test ELISA

Principalmente quattro sono le tipologie di test ELISA:

- ELISA diretto: la piastra viene rivestita con l'antigene o l'anticorpo di interesse ed una volta immobilizzato sulla superficie vengono aggiunti agenti come BSA, caseina, ovoalbumina o altre proteine animali al fine di bloccare il legame di anticorpi o antigeni non specifici ed impedire il più possibile falsi positivi; dopodiché viene addizionato un anticorpo o un antigene primario, di rilevamento, marcato con l'enzima che andrà direttamente a legarsi con la proteina rispettiva immobilizzata (Fig. 17) sviluppando il cambiamento di colore. Questo tipo di ELISA è adatto per l'analisi qualitativa delle macromolecole. (Zubair, 2026) (Sakamoto & al., 2017)

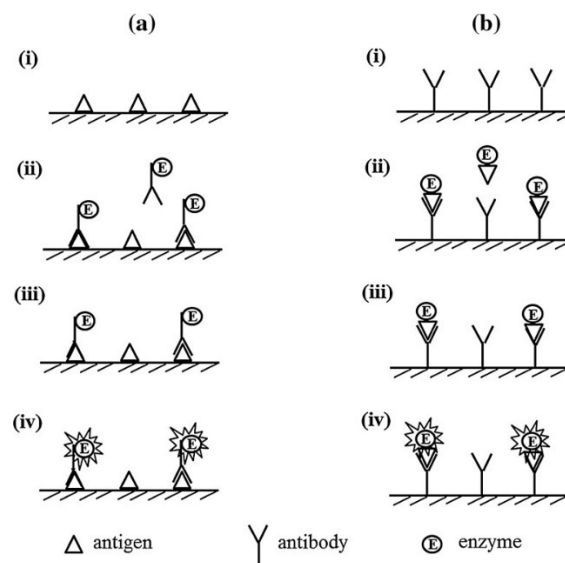


Figura 17 – Meccanismo d'azione dell'ELISA diretto (Sakamoto & al., 2017)

- ELISA indiretto: questa tipologia di test ELISA richiede due anticorpi, uno primario che si legherà all'antigene di interesse immobilizzato sulla superficie della piastra, e un anticorpo secondario marcato con l'enzima che andrà a complessarsi con l'anticorpo primario complementare (Fig. 18) portando alla variazione di colore. Il segnale

aumenta proporzionalmente alla quantità di antigene bersaglio immobilizzato. (Zubair, 2026) (Sakamoto & al., 2017)

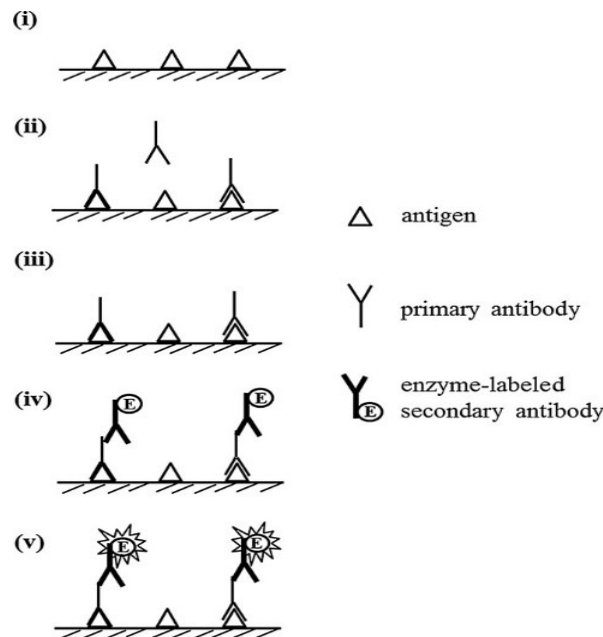


Figura 18 – Meccanismo d'azione dell'ELISA indiretto (Sakamoto & al., 2017)

- ELISA competitivo: si basa sulla competizione tra un antigene non marcato presente nel campione di analisi e un antigene marcato con l'enzima, per il legame con l'anticorpo fissato alla base del pozzetto della piastra (Fig. 19a); oppure possono competere un anticorpo non marcato presente nel siero e un anticorpo marcato enzimaticamente, per complessarsi all'antigene immobilizzato (Fig. 19b). Nel primo caso più antigene è presente nel campione, meno antigene marcato riesce a legarsi all'anticorpo e, di conseguenza, il segnale finale, ossia il cambiamento di colore, risulta più basso; nel secondo caso invece, se il siero non contiene anticorpi specifici, l'anticorpo marcato occuperà tutti i siti antigenici e, dopo l'aggiunta del substrato, comparirà una colorazione più intensa (test negativo), mentre se il siero contiene anticorpi specifici, questi si legheranno all'antigene, riducendone l'interazione con l'anticorpo marcato e portando ad una colorazione poco intensa o ad un pozzetto incolore (test positivo). (Zubair, 2026) (Sakamoto & al., 2017)

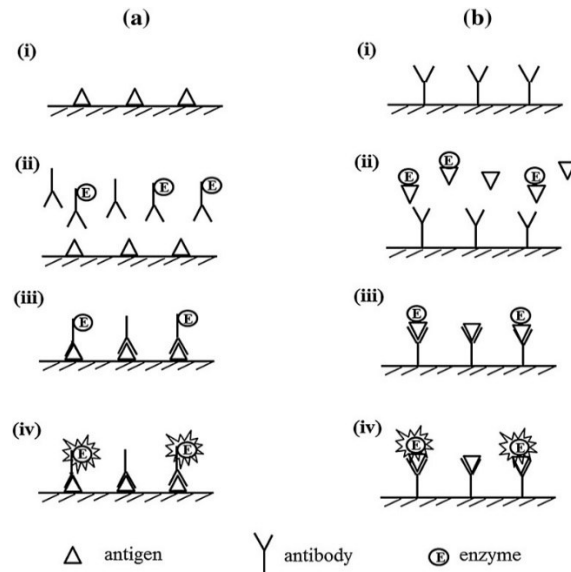


Figura 19 – Modalità d'azione dell'ELISA competitivo (Sakamoto & al., 2017)

- ELISA sandwich: il nome di tale metodo deriva dal fatto che l'antigene, in questo caso, si ritrova racchiuso fra due strati di anticorpi, quello di cattura fissato inizialmente nei pozzetti e quello di rilevamento aggiunto successivamente (Fig.20). Dopodiché viene addizionato il substrato con conseguente sviluppo del colore. (Zubair, 2026) (Sakamoto & al., 2017)

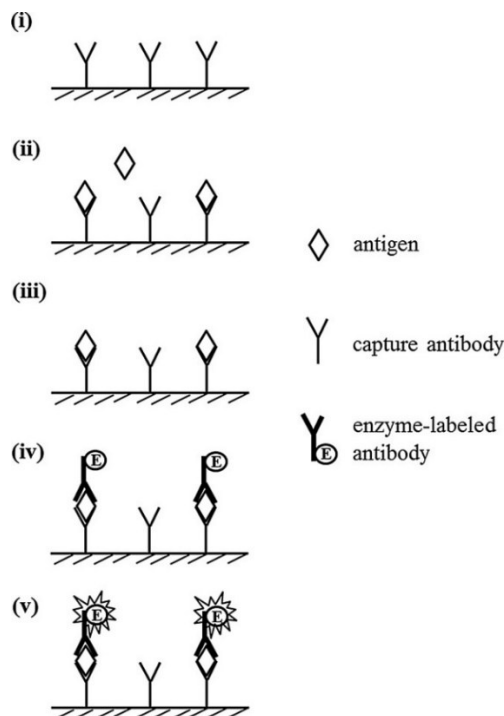


Figura 20 – Meccanismo d'azione dell'ELISA sandwich (Sakamoto & al., 2017)

Quest'ultimo tipo di test ELISA è quello che è stato utilizzato nella sperimentazione di valutazione dell'attività della NAMPT, dove appunto si ha l'immobilizzazione iniziale del suo anticorpo specifico; dopodiché, previa incubazione e lavaggi per ogni fase, si ha l'aggiunta del campione contenente la NAMPT e dell'anticorpo secondario marcato con l'enzima così da formare il complesso antigene-anticorpo. In presenza del substrato, successivamente, l'enzima va a convertirlo nel prodotto cromogeno. Una volta stoppata la reazione, la piastra viene sottoposta a lettura spettrofotometrica, ottenendo i risultati con i quali effettuare la retta di taratura.

4.4.2 Test ELISA e valutazione dell'attività pro-infiammatoria di NAMPT

Nell'ambito di questa sperimentazione è stato impiegato il kit "Human TNF alpha Uncoated ELISA", ovvero un saggio immunoenzimatico di tipo sandwich progettato per la misurazione quantitativa di TNF- α umano in siero, plasma e surnatanti di colture cellulari. In questo formato "uncoated", l'operatore tratta i diversi pozzetti con un anticorpo di cattura anti-TNF- α purificato, blocca i siti non specifici e aggiunge quindi standard ricombinanti e campioni contenenti la citochina; il TNF- α presente si lega all'anticorpo immobilizzato, viene riconosciuto da un secondo anticorpo biotinilato e infine rivelato tramite un complesso streptavidina-perossidasi e il substrato cromogenico TMB, generando un segnale colorimetrico proporzionale alla concentrazione di TNF- α . Questo tipo di ELISA è ampiamente utilizzato per misurare la produzione di TNF- α in risposta a stimoli pro-infiammatori, ad esempio nei surnatanti di macrofagi o monociti trattati con eNAMPT, che, come precedentemente spiegato, è una adipochina/citochina che promuove l'infiammazione e induce il rilascio di TNF- α e altre citochine pro-infiammatorie (Semerena & al., 2023). Perciò, in tale studio sperimentale è stato impiegato come strumento quantitativo il test uncoated ELISA per TNF- α , al fine di valutare l'attivazione infiammatoria indotta da eNAMPT, misurando i livelli di TNF- α secreti dalle cellule in condizioni sperimentali differenti e mettendoli in relazione con il ruolo di NAMPT nella regolazione della risposta infiammatoria.

CAPITOLO 5

5.1 Punica Granatum

Punica granatum L., noto comunemente come melograno e appartenente alla famiglia delle *Punicaceae*, è un arbusto a foglia caduca coltivato soprattutto nell'area mediterranea e negli ultimi decenni ha suscitato un crescente interesse scientifico e pubblico per i suoi potenziali effetti benefici sulla salute umana. Tradizionalmente, il melograno è stato utilizzato nella medicina popolare per il trattamento di infezioni parassitarie, ulcere, diarrea, dissenteria, emorragie, infezioni microbiche e patologie respiratorie, mentre oggi i prodotti derivati dal frutto come olio di semi, succo, succo fermentato, estratto di buccia o di semi, trovano impiego nella protezione cardiovascolare, nell'igiene orale e come coadiuvanti nelle strategie antiobesità. La maggior parte di queste proprietà è attribuita all'elevato contenuto di composti fenolici, responsabili di una capacità antiossidante da due a tre volte superiore a quella del vino rosso o del tè verde e potenzialmente rilevante nella prevenzione di malattie in cui lo stress ossidativo rappresenta un importante fattore eziologico, come il cancro. Oltre ai polifenoli, un ruolo significativo è svolto anche da altre molecole bioattive, in particolare dagli acidi grassi linolenici coniugati (CLN) presenti soprattutto nei semi, che costituiscono un sottoprodotto della produzione di succo ma rappresentano una ricca fonte di acido punico, cui è stata associata una ridotta incidenza di carcinogenesi del colon nel ratto e una modulazione dell'espressione di PARR γ nella mucosa colica. Nonostante le numerose evidenze sulle attività biologiche e antitumorali di succhi, oli ed estratti ottenuti da diverse parti del frutto, le informazioni disponibili sulla composizione e sull'attività citotossica dell'estratto etanologico dei semi di melograno (PSEE) risultano ancora limitate, per cui tale estratto viene considerato un potenziale ingrediente nutraceutico/funzionale di interesse. (Lucci & al., 2015)

5.2 Preparazione del PSEE

I frutti di melograno, cultivar italiano "Dente di Cavallo", sono stati raccolti nei campi della Regione Marche al grado di maturazione ritenuto ottimale per il consumo, nel periodo compreso tra settembre e ottobre 2012. L'identificazione botanica del materiale vegetale è stata verificata e un campione di riferimento è stato depositato presso l'Erbario del Politecnico

delle Mache; tutti i campioni sono stati controllati per accertarne l'integrità e l'assenza di contaminazioni da polvere o insetti.

Per la preparazione dell'estratto etanolic dei semi, il pericarpo è stato rimosso manualmente, quindi è stato separato l'endocarpo ed eliminata con attenzione la polpa tegumentaria avvolta ai semi, i quali sono stati poi lavati con acqua e asciugati in stufa per 12 ore fino a completa essiccazione. I semi essiccati sono stati finemente macinati e sottoposti ad estrazione con 100 mL di etanolo assoluto per un'ora a temperatura ambiente, mantenendo il sistema di agitazione intermittente. La fase sovrastante è stata quindi filtrata su carta Whatman n. 4 (diametro 9,0 cm) e il residuo solido è stato ri-estratto con ulteriori 50 mL di etanolo assoluto; le frazioni filtrate ottenute dai due passaggi estrattivi sono state infine combinate ed evaporate a secco mediante evaporatore rotante. (Lucci & al., 2015)

CAPITOLO 6

6.1 Obiettivo

L'obiettivo principale del presente lavoro di tesi sperimentale è stato quello di osservare, valutare ed analizzare il ruolo della nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT) nella modulazione della risposta infiammatoria. A tal fine, sono stati condotti esperimenti su cellule monocitiche THP-1 differenziate in macrofagi, valutando la produzione della citochina pro-infiammatoria TNF- α come marcatore della risposta infiammatoria. In particolare, lo studio ha previsto una analisi comparativa tra due sistemi di espressione eterologa della NAMPT ricombinante: il sistema procariotico di espressione basato su *Escherichia coli* e il sistema di espressione eucariotico basato su baculovirus in cellule di insetto. Tale confronto ha permesso di valutare l'influenza del sistema di espressione utilizzato sulle proprietà biologiche e sull'attività pro-infiammatoria della proteina ricombinante prodotta.

Inoltre, è stato valutato il potenziale effetto protettivo di un estratto di semi di melograno (PSE, *Pomegranate Seed Extract*) sulla risposta infiammatoria indotta dalla NAMPT ricombinante espressa nel sistema baculovirus. Ciò ha permesso di verificare se i composti bioattivi presenti nell'estratto di melograno potessero modulare o attenuare la cascata infiammatoria innescata dalla proteina prodotta in cellule di insetto.

6.2 Risultati e discussione del sistema di espressione della proteina in *E. coli*

6.2.1 Produzione della NAMPT: purificazione e analisi elettroforetica dell'enzima

La NAMPT ricombinante è stata ottenuta da cellule Clear Coli mediante un singolo passaggio di cromatografia di affinità su resina Ni-NTA, come descritto nel sottoparagrafo 2.2.3.

La Fig. 21 riporta il profilo di eluizione registrato a 280 nm per la colonna Ni-NTA, dal quale si osserva che la proteina viene eluita ad una concentrazione di imidazolo di circa 300 nM.

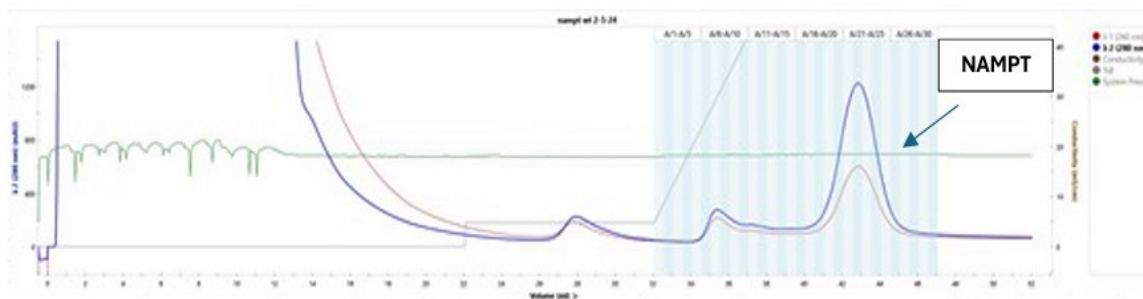


Figura 21 – Profilo cromatografico dell'eluizione della resina Ni-NTA

La frazione proteica eluita è stata successivamente sottoposta a gel filtrazione su colonna PD-10 per allontanare l'imidazolo residuo e poi trattata con resina a base di ϵ -poli-lisina allo scopo di rimuovere le endotossine rimaste.

L'intero schema di purificazione è stato riassunto nella Tab. 5: le unità e le proteine totali sono state calcolate come prodotto tra attività enzimatica, concentrazione proteica e volume, mentre il recupero è stato espresso come percentuale delle proteine totali rispetto al lisato iniziale.

Campione	Volume (mL)	Attività (U/mL)	Unità totali	Conc. proteica (mg/mL)	Proteine totali (mg)	Attività specifica (U/mg)	Recupero (%)
Lisato	13			5.18	67.34		
NiNTA	2.5			2.50	6.25		
Pd-10	3	0.025	0.08	1.70	5.10	0.015	7,57
ϵ -poli-L-lisina	3	0.009	0.03	1.04	3.12	0.009	4,63

Tabella 5 – Schema riassuntivo della procedura di purificazione della proteina NAMPT

Da 250 mL di coltura si sono ottenuti 3,12 mg di NAMPT purificata, corrispondenti ad un recupero del 4,63%.

L'omogeneità della preparazione finale è stata verificata mediante SDS-PAGE caricando 2 μ g di proteine totali (Fig. 22):

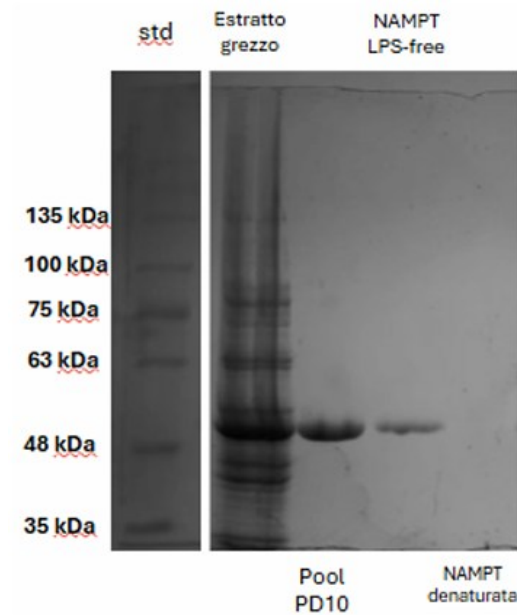


Figura 22 – Analisi elettroforetica in SDS-PAGE

L'analisi elettroforetica mostra una singola banda intorno a 52 kDa, compatibile con il peso molecolare atteso della proteina NAMPT, e conferma che il processo di purificazione è avvenuto in maniera efficace, testimoniato anche dal fatto della progressiva scomparsa delle bande specifiche.

Nel dettaglio, le diverse corsie del gel (Fig. 22) evidenziano l'evoluzione della purezza durante la procedura:

- Estratto grezzo: la presenza di numerose bande indica che il campione iniziale contiene una miscela eterogenea di proteine cellulari, tra cui la NAMPT ma non solo, come tipicamente osservato in un lisato non purificato.
- Pool NAMPT PD-10: rispetto all'estratto grezzo si osserva una marcata diminuzione del numero di bande, segno che i passaggi su Ni-NTA e PD-10 hanno rimosso gran parte delle proteine contaminanti; la banda dominante nella regione 48-63 kDa è in accordo con il peso molecolare previsto per la NAMPT.
- NAMPT LPS-free: la comparsa di una banda nitida indica che la proteina rimane in forma purificata anche dopo il trattamento per la rimozione delle endotossine, suggerendo che la procedura LPS-free non altera l'integrità strutturale della NAMPT.
- NAMPT denaturata: in questa corsia, relativa al campione denaturato, non si osservano bande apprezzabili; l'assenza di bande proteiche è compatibile con una

denaturazione completa della proteina, con conseguente perdita della sua struttura nativa. La denaturazione è stata realizzata aggiungendo 0,05% di tripsina alla NAMPT LPS-free, lasciando poi la miscela in incubazione per 16 h a 37°C.

6.2.2 Determinazione e valutazione della risposta infiammatoria indotta da NAMPT tramite saggio ELISA per TNF- α

Nella prima fase sperimentale, i monociti THP-1 sono stati differenziati in macrofagi mediante trattamento con 150 nM di PMA per 48 h, seguito da ulteriori 24 h di recupero per consentire la piena stabilizzazione funzionale delle cellule. Questo protocollo temporale, descritto nel sottoparagrafo 4.3.1, è stato scelto sulla base di esperimenti preliminari (dati non mostrati) che ne hanno evidenziato l'efficacia. I macrofagi così ottenuti sono stati quindi esposti alla NAMPT a concentrazioni differenti e, dopo 6 h di incubazione, il mezzo di coltura è stato raccolto per quantificare il rilascio della citochina pro-infiammatoria TNF- α tramite saggio ELISA. Prove precedenti hanno infatti dimostrato come il tempo di stimolazione di 6 h risulta essere sufficiente per rilevare un rilascio significativo di TNF- α (dati non mostrati).

I risultati (Fig. 23) hanno evidenziato un incremento progressivo del rilascio di TNF- α all'aumentare della quantità di NAMPT, documentando una chiara correlazione diretta tra dose di enzima e risposta infiammatoria.

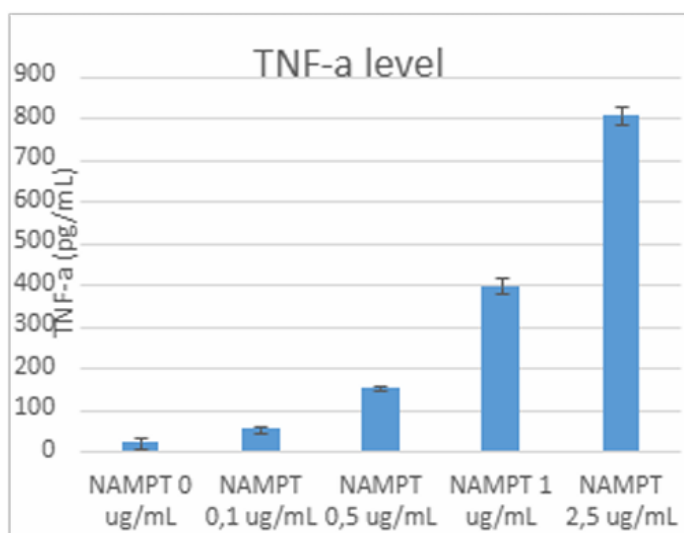


Figura 23 – Risposta dose-dipendente al trattamento con NAMPT per 6 h

Abbiamo successivamente verificato che l'effetto osservato fosse effettivamente imputabile alla NAMPT e non alla presenza di endotossine eventualmente residue dopo il processo di purificazione descritto nel sottoparagrafo 2.2.2. A questo scopo, i monociti, differenziati in maniera analoga alle prove precedenti, sono stati trattati per 6 h con diverse concentrazioni di NAMPT in forma nativa (Wild-Type) e nella corrispondente forma denaturata (0,25 – 1 $\mu\text{g/mL}$): se l'attivazione della risposta infiammatoria fosse stata dovuta a contaminati endotossici, ci si sarebbe aspettato un aumento del TNF- α anche in presenza della NAMPT denaturata; al contrario, i risultati (Fig.24) mostrano che solo la NAMPT nativa è in grado di stimolare la produzione di TNF- α , mentre il campione denaturato non induce alcun rilascio apprezzabile di citochina, attribuendo quindi l'effetto pro-infiammatorio alla proteina funzionalmente integra.

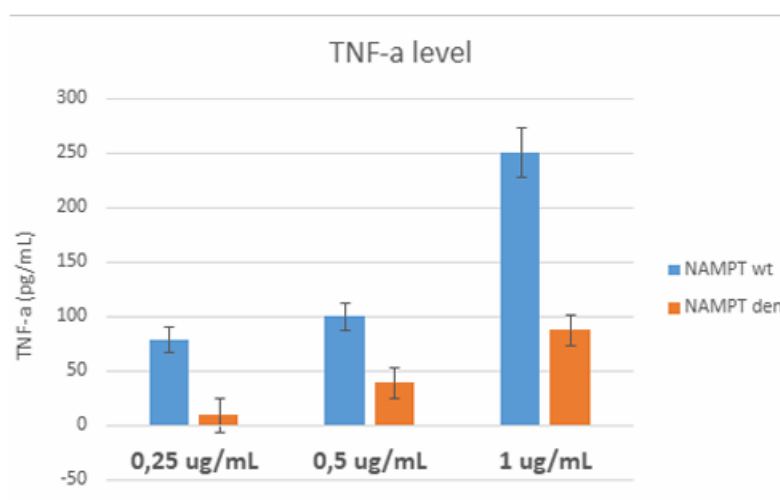


Figura 24 – Confronto tra wt-NAMPT e NAMPT denaturata (6h)

6.3 Risultati e discussione del sistema di espressione della proteina in Baculovirus

6.3.1 Crescita cellulare Sf9 e Hi5

Per la determinazione della curva di crescita delle cellule Sf9 e Hi5, entrambe le linee cellulari sono state coltivate in sospensione ad una densità iniziale di $0,5 \times 10^6$ cell/mL e incubate a 28°C con agitazione a 120 RPM.

L'andamento della proliferazione cellulare è stato monitorato quotidianamente mediante conta con camera di Burkner, e le densità cellulari osservate sono state riportate in Tab. 6.

Giorno	Densità cellule Sf9 (cell*10⁶/mL)	Densità cellule Hi5 (cell*10⁶/mL)
0	0.5	0.5
1	0.5	1.5
2	0.7	3
3	1.3	5.6
4	2.4	7.4
5	4.1	9
6	6.9	10
7	9.3	10.2
8	10.5	10.1
9	10.3	9
10	9.4	/

Tabella 6 – Densità di crescita cellulare

In Fig. 25a e 25b è stata rappresentata la densità cellulare delle due linee in funzione del tempo: nei primi due giorni di incubazione non è stato rilevato alcun incremento della densità delle cellule Sf9, poiché queste si trovavano ancora in fase di latenza e stavano progressivamente adattandosi al terreno di crescita; al contrario, le cellule Hi5 hanno evidenziato sin dal primo giorno una crescita sostenuta. Rispettivamente al secondo e al terzo giorno di incubazione, le cellule Hi5 e Sf9 sono entrate in fase esponenziale, durante la quale, la replicazione avviene alla massima velocità possibile. Al sesto giorno per le Hi5 e all'ottavo giorno per le Sf9 è stata osservata la fase stazionaria, nella quale la densità cellulare rimane costante; in questa fase la crescita si arresta a causa della progressiva riduzione dei nutrienti e dell'accumulo di cataboliti con possibili effetti negativi sulla vitalità cellulare. Al nono e al decimo giorno, rispettivamente per Hi5 e Sf9, è stata rilevata una diminuzione della densità cellulare, indice del progressivo venir meno delle condizioni necessarie alla sopravvivenza e della perdita irreversibile della capacità proliferativa.

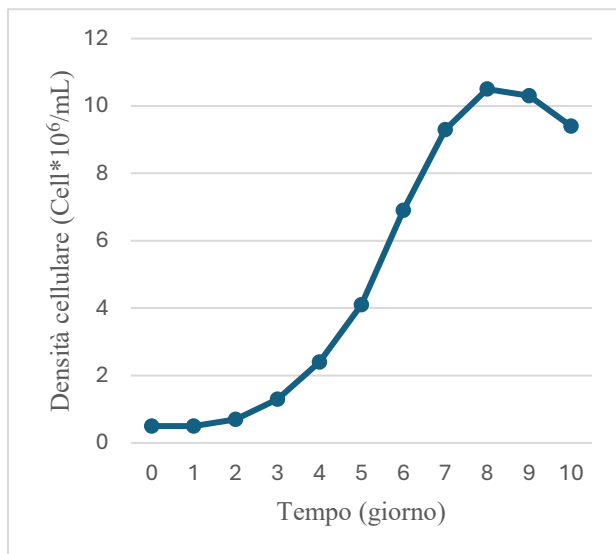


Figura 25a – Curva di crescita delle cellule Sf9

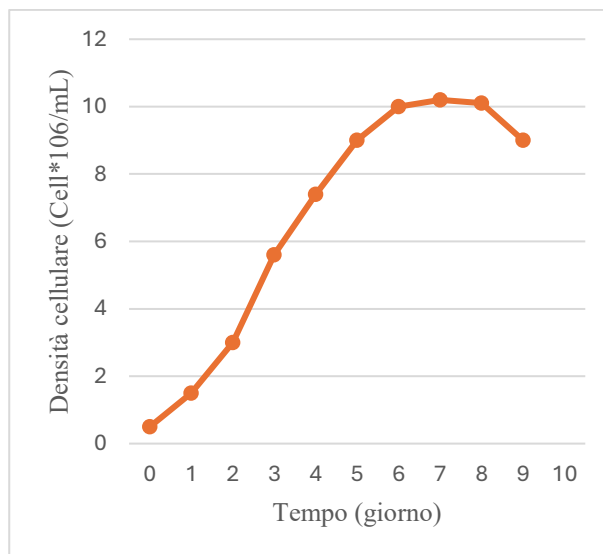


Figura 25b – Curva di crescita delle cellule Hi5

Le due linee cellulari hanno raggiunto densità massime comparabili; tuttavia, le cellule Hi5 hanno mostrato una velocità di crescita superiore rispetto alle Sf9, in quanto replicano ogni 18 h, a fronte delle 24 h richieste dalle Sf9.

Come dimostrato da Zhang et al (Zhang & al., 2005), la fase di crescita cellulare può influenzare in modo considerevole la resa dell'infezione, poiché per ottenere un elevato titolo virale è necessario che le cellule si trovino in uno stato fisiologico ottimale e in un ambiente ricco di nutrienti. Al fine di evitare che le cellule si avvicinassero eccessivamente alla fase stazionaria, l'infezione con il baculovirus ricombinante nelle cellule Sf9 e Hi5 è stata pertanto effettuata ad una densità compresa tra $2 - 4 \times 10^6$ cell/mL, in piena fase esponenziale di crescita.

6.3.2 Produzione della NAMPT: amplificazione, espressione, purificazione e western blot della proteina

In Fig. 26 è mostrata la curva di crescita delle cellule infettate con PV0 di hNAMPT-his in pACGP67, che hanno raggiunto al quarto giorno la massima densità cellulare di 7×10^6 cell/mL (PV1). In grafico è presente anche l'andamento della crescita delle cellule non infettate che sono state utilizzate come controllo.

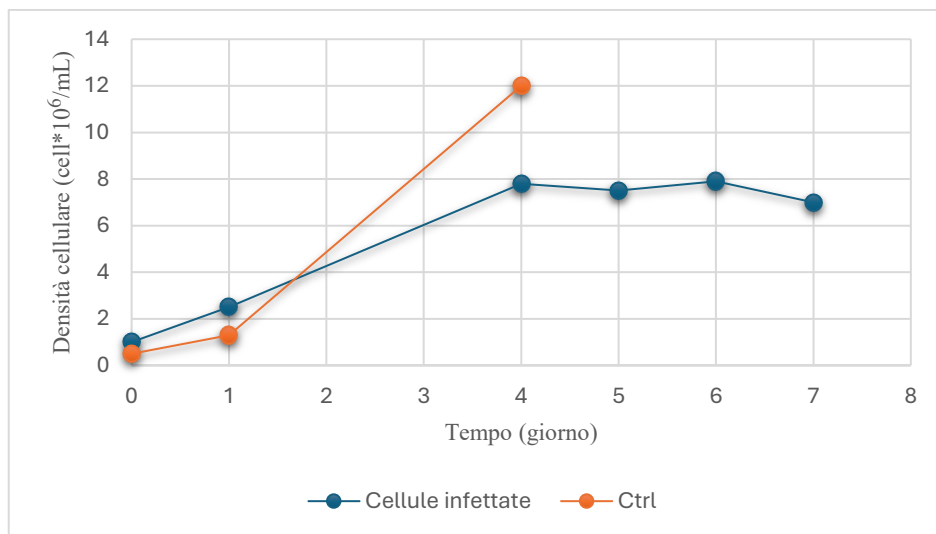


Figura 26 – Amplificazione PV0 delle cellule Sf9 infettate ad un MOI di 0,03 pfu/cell rispetto al controllo

In Fig. 27 è possibile notare, al microscopio ottico, le differenze morfologiche tra le cellule al tempo 0 e al quarto giorno di infezione: nelle cellule infette si osserva un aumento del diametro cellulare con la perdita della forma rotondeggiante e la comparsa di granulosità nel citoplasma; mentre le cellule non infette sono rimaste piccole, sferiche e prive di granulosità. Ciò, insieme all’arresto della crescita dal quarto giorno in poi, ha testimoniato l’avvenuta infezione.

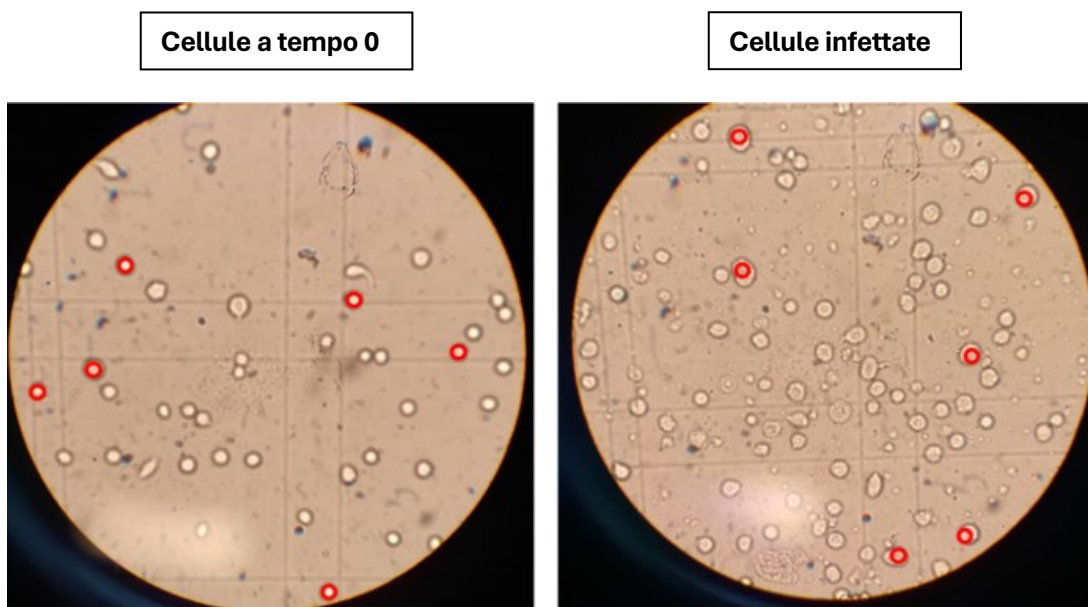


Figura 27 – Cellule Sf9 al microscopio ottico, non trasfettate e infettate con il baculovirus ricombinante. In rosso il diametro “tipo” di una cellula sana.

In Fig. 28 sono riportate le curve di crescita delle cellule infettate con la PV1 raccolta dalla precedente amplificazione e il rispettivo controllo:

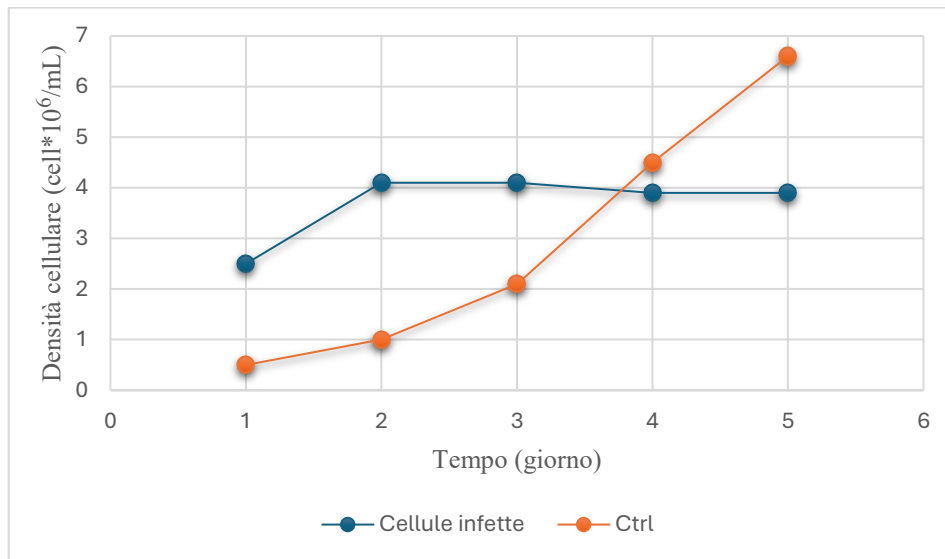


Figura 28 - Amplificazione PV1 delle cellule Sf9 infettate ad un MOI di 0,05 pfu/cell rispetto al controllo

In seguito all'infezione, le cellule hanno arrestato la loro crescita dopo appena 24 h, ad una densità di $4,1 \times 10^6$ cell/mL.

Al quinto giorno di infezione le cellule sono state dunque centrifugate ed è stata raccolta la PV2 hNAMPT-his in pACGP67. La determinazione del titolo virale è stata effettuata tramite il saggio delle placche: alla diluizione -5 le placche si mostrarono numerose e non contabili; mentre alla diluizione -6 e -7 sono state contate rispettivamente 27 e 3 placche. Quindi, il titolo virale finale calcolato e ottenuto è stato di 6×10^7 pfu/mL.

L'infezione delle cellule Hi5 per la produzione della hNAMPT è stata eseguita come descritto nel sottoparagrafo 3.2.5.

Nella rappresentazione grafica (Fig. 29) della crescita cellulare delle Hi5 infette e non, è possibile osservare come le prime hanno arrestato praticamente subito la loro crescita, in seguito all'infezione virale ad un MOI di 5 pfu/cell rispetto alle cellule di controllo.

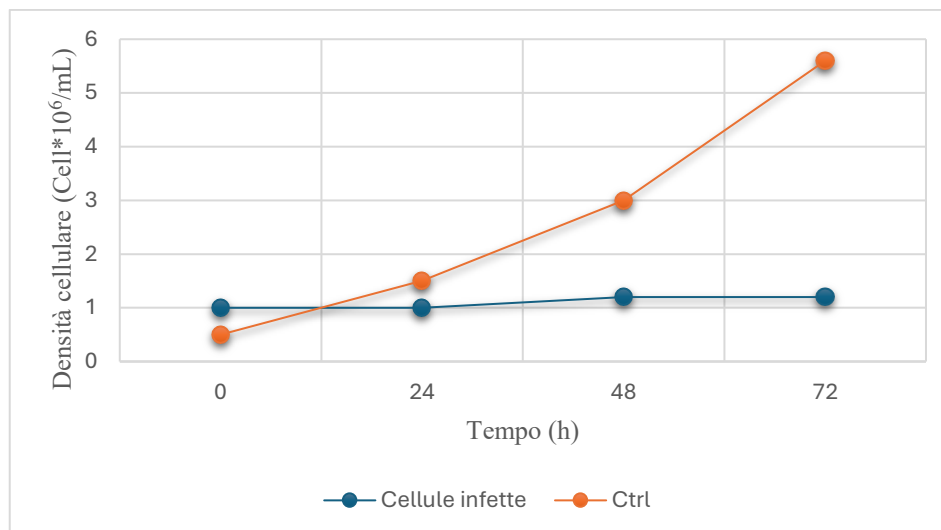


Figura 29 – Variazione della densità cellulare delle Hi5 infettate ad un MOI di 5 pfu/cell rispetto al controllo

La valutazione della corretta espressione proteica è stata effettuata sul terreno di crescita raccolto a 0, 24, 48 e 72 h dall'infezione: nel western blot rappresentato in Fig. 30 si osserva come i massimi livelli di espressione si sono ottenuti attorno alle 72 h dall'infezione.

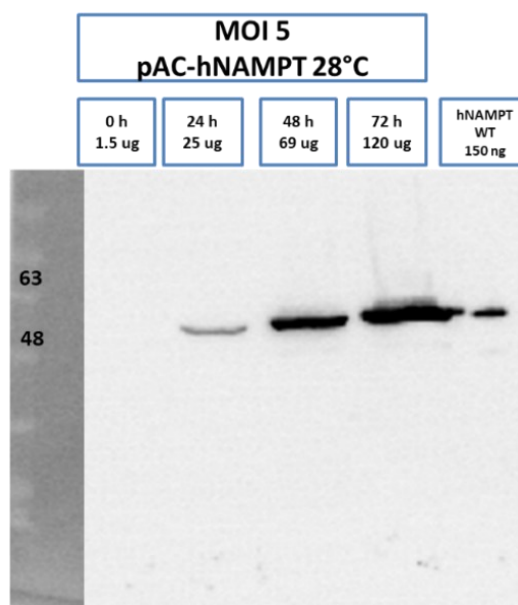


Figura 30 – Analisi western blot per la rilevazione della proteina hNAMPT in terreno raccolto a 0, 24, 48 e 72 h.

La banda rilevata dall'anticorpo è migrata come l'hNAMPT-wt utilizzata come standard (controllo positivo). Questa osservazione, insieme all'assenza della proteina al tempo 0 conferma la corretta espressione proteica.

In questo caso non è necessario il passaggio su colonnina per rimuovere le endotossine come LPS, poiché la proteina ricombinante è stata prodotta mediante una piattaforma, quella basata sul baculovirus, che consente l'ottenimento di proteine eucariotiche con corretta processazione post-traduzionale e con livelli trascurabili di contaminazione da lipopolisaccaride, rispetto ai sistemi di espressione in coli. (Kost & al., 2005)

Per valutare la purezza della preparazione finale, la stessa è stata analizzata mediante SDS-PAGE caricando su gel 1 μ g di NAMPT di insetto comparandolo a 1 μ g di NAMPT in coli (Fig. 32).

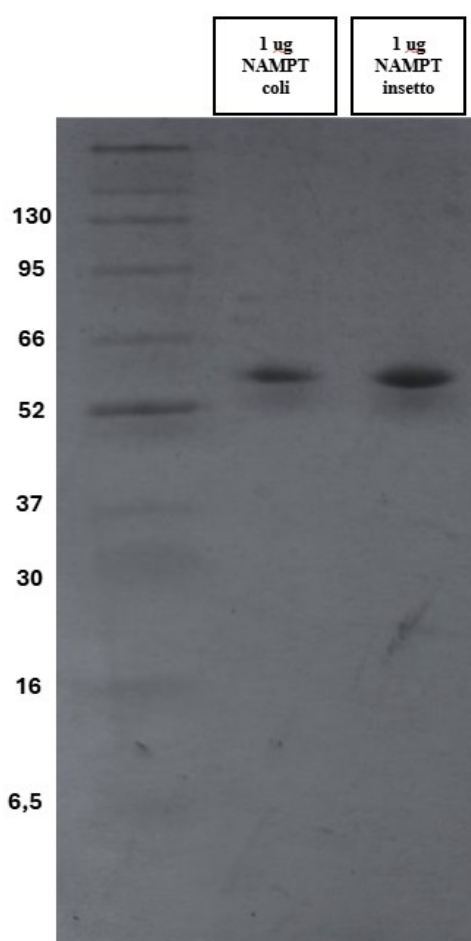


Figura 32 – Analisi in SDS-PAGE della NAMPT in coli e in insetto

Allo stesso modo abbiamo valutato la corretta denaturazione della proteina mediante l'aggiunta di tripsina (1 μ g, 0,05% per 16h a 37°C), rappresentata in Fig. 33.

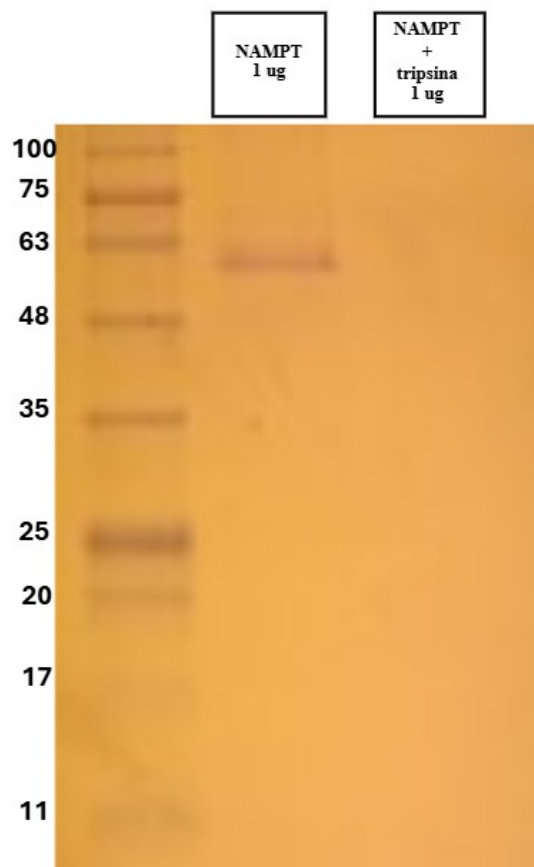


Figura 33 – Analisi in SDS-PAGE della NAMPT denaturata

CAPITOLO 7

7.1 Risultati e discussione delle analisi sui macrofagi ottenuti dal differenziamento delle cellule THP-1

7.1.1 Comparazione della risposta infiammatoria NAMPT-mediata tra NAMPT coli e insetto

Previo differenziamento delle cellule THP-1, svolto come descritto nel sottoparagrafo 4.3.1, le cellule sono state trattate con 1 μ g di NAMPT coli, di insetto e delle rispettive forme denaturate, per un periodo di 6h.

La NAMPT denaturata è stata utilizzata come controllo per essere certi che l'effetto che osserviamo derivi dall'enzima nella sua forma foldata e non da possibili contaminazioni dettate dalla presenza di endotossine.

Terminato il trattamento ed effettuata la lettura dei dati a 500nm e 562nm, in base ai risultati ottenuti e rappresentati in fig. 34, si è concluso che: non c'è differenza nella risposta infiammatoria indotta dall'enzima prodotto nei due tipi di modelli di espressione.

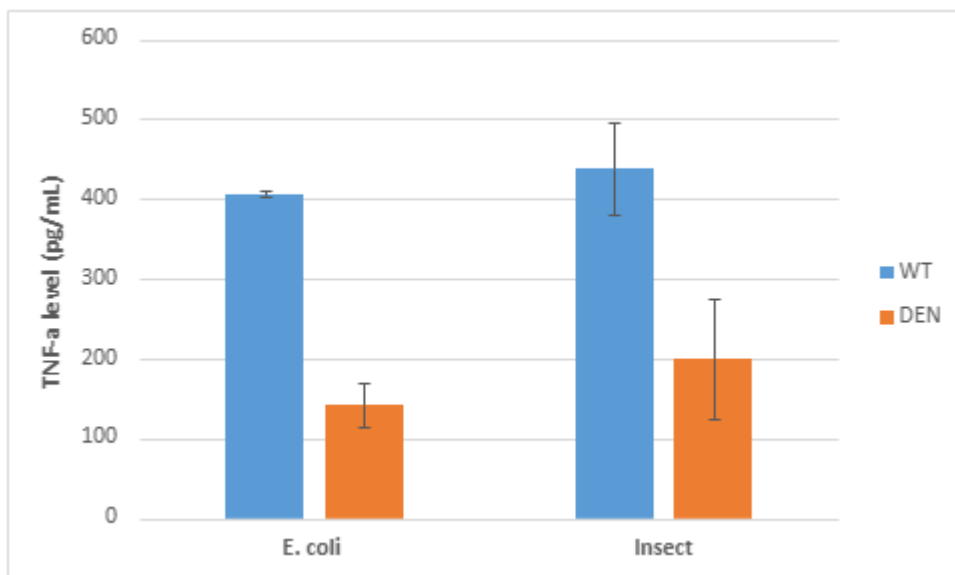


Figura 34 – Confronto della risposta infiammatoria indotta dall'enzima derivante dai due sistemi di espressione differenti.

7.1.2 Curva dose-risposta: valutazione della proporzionalità tra quantità di proteina aggiunta e la risposta infiammatoria.

Le cellule differenziate sono state trattate con NAMPT di insetto per 6 h, a dosi crescenti (0 - 2,5 $\mu\text{g/mL}$); dopodiché i campioni raccolti sono stati saggiati con il kit ELISA procedendo secondo il protocollo previsto.

In seguito alla lettura dei dati a 500 nm e 562 nm, i dati ottenuti sono stati rappresentati graficamente in fig. 35.

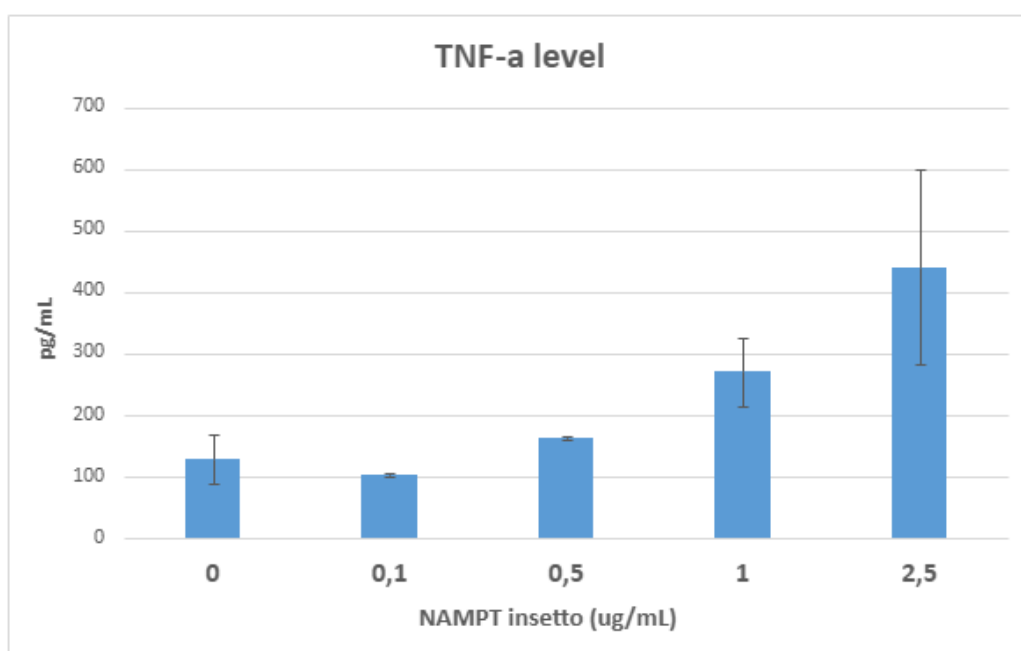


Figura 35 – Curva dose-risposta della produzione di TNF- α in funzione della concentrazione di NAMPT di insetto

Il grafico evidenzia come sia effettivamente presente una variazione della produzione di TNF- α in funzione della dose di NAMPT di insetto applicata; perciò, c'è una proporzionalità tra la dose e l'effetto.

7.1.3 Verifica della risposta infiammatoria mediata dall'estratto di melograno (PSEE)

Per valutare l'effetto pro-infiammatorio del PSEE sono state impiegate tre diverse concentrazioni (5-10-50 $\mu\text{g/mL}$) sulle cellule THP-1 differenziate in macrofagi, analizzando la produzione della risposta infiammatoria, rispetto al controllo, dopo 6h e 24h (Fig. 36)

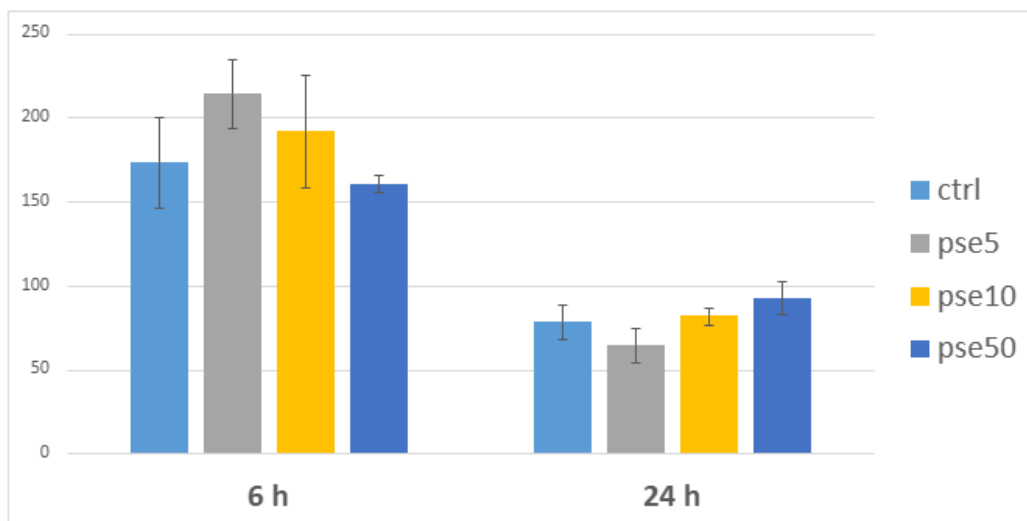


Figura 36 – Valutazione della risposta infiammatoria di cellule THP-1 differenziate trattate con tre concentrazioni di PSEE per 6h e 24h

Il risultato evidenzia come il solo estratto di melagrano non esercita alcun effetto pro-infiammatorio significativo.

7.1.4 Valutazione dell'effetto protettivo del PSEE sull'infiammazione NAMPT indotta

In seguito al differenziamento dei monociti THP-1 con PMA, le cellule sono state trattate simultaneamente con NAMPT di insetto alla concentrazione di 1 $\mu\text{g/mL}$ e con tre dosi differenti di PSEE pari a 5, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, per valutare l'effetto protettivo dell'estratto di melograno nei confronti della risposta infiammatoria indotta dalla NAMPT.

I risultati ottenuti sono stati rilevati in seguito ad un periodo di incubazione di 6 h e sono rappresentati in fig. 37.

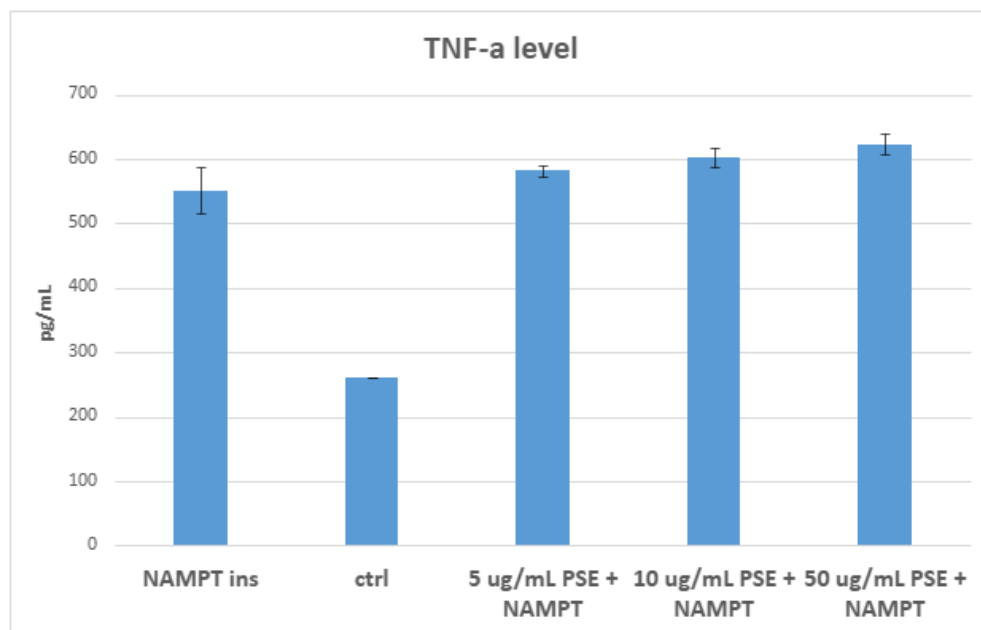


Figura 37 – Valutazione dell'effetto protettivo del PSEE sulla risposta infiammatoria indotta da NAMPT di insetto

Purtroppo, alle condizioni testate si osserva che la combinazione simultanea della NAMPT di insetto con il PSEE non porta ad alcuna riduzione della risposta infiammatoria. Oltre a questo, è stato recentemente evidenziato come neanche il pre-trattamento delle cellule differenziate con PSEE alle diverse concentrazioni per 24 h, sia in grado di ridurre la risposta infiammatoria NAMPT-mediata (6 h a 1 µg/mL), misurata attraverso i livelli di TNF-α e IL-6 (dati non riportati).

CONCLUSIONE

Nel complesso, il lavoro svolto ha permesso di raggiungere l'obiettivo iniziale di caratterizzare il ruolo della nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT) nella modulazione della risposta infiammatoria in macrofagi derivati dalla linea monocitica THP-1, utilizzando la produzione di TNF- α come marcatore di attivazione. A tal fine la NAMPT umana è stata espressa e purificata con successo in due differenti sistemi eterologhi, procariotico (ClearColi) ed eucariotico (sistema baculovirus in cellule di insetto), ottenendo preparazioni omogenee. Le prove funzionali condotte sui macrofagi derivanti dalle cellule THP-1 hanno dimostrato in maniera chiara che la NAMPT ricombinante è in grado di indurre una risposta infiammatoria significativa, evidenziata da un incremento dose-dipendente del rilascio di TNF- α dopo 6 h di stimolazione. L'assenza di produzione di TNF- α in presenza della corrispondente NAMPT denaturata conferma che l'effetto osservato è imputabile alla proteina nella sua forma nativa e non a contaminanti endotossici residui. Inoltre, il confronto tra NAMPT prodotta in ClearColi e NAMPT prodotta in sistema baculovirus ha mostrato che nonostante le differenze nelle caratteristiche biochimiche, le due preparazioni possiedono una capacità sovrapponibile di attivare la risposta infiammatoria nei macrofagi, suggerendo che l'effetto pro-infiammatorio di NAMPT è conservato indipendentemente dal sistema di espressione utilizzato.

Per quanto riguarda l'estratto di melograno (PSEE), i dati ottenuti indicano che, alle concentrazioni e alle condizioni sperimentali testate, il solo PSEE non esercita un effetto pro-infiammatorio apprezzabile sui macrofagi THP-1; allo stesso tempo, il trattamento combinato di NAMPT di insetto e PSEE non ha determinato una riduzione del rilascio di TNF- α rispetto alla stimolazione con la sola NAMPT, suggerendo che, in questo specifico setting sperimentale, l'estratto di semi non è in grado di modulare o attenuare l'infiammazione NAMPT-indotta.

Alla luce del crescente interesse verso il melograno come fonte di composti bioattivi ad azione antiossidante e antinfiammatoria, e considerando che la letteratura attribuisce proprietà rilevanti anche ad estratti ottenuti da altre parti del frutto, in particolare la buccia, ritenuta ricca di composti polifenolici, i risultati di questo lavoro hanno aperto prospettive interessanti per studi futuri. Sebbene il PSEE utilizzato non abbia mostrato attività protettiva nelle condizioni esplorate, sarà di notevole interesse, come già si sta facendo, valutare il

potenziale di estratti derivati dalla buccia di melograno, che si ipotizza possano possedere una maggiore efficacia nel modulare le vie pro-infiammatorie NAMPT-mediate.

BIBLIOGRAFIA

- AMB., P. (2018, February). Insights of hypercarotenaemia: A brief review. *Clin Nutr ESPEN*, 23, 19-24.
- Audrito, V., & al., e. (2015, January 1). Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1(125), 111-123. doi: 10.1182/blood-2014-07-589069
- Bieganowski P., & B. (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a new vitamin B3 pathway. *Cell*, 117, 495-502.
- Bieganowski, P., & Brenner, e. C. (2004, May 14). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell*, 4(117), 495-502. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00416-7
- Bornhorst, J., & Falke, J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.*, 245-254. doi: 10.1016/s0076-6879(00)26058-8
- Castro-Portuguez, R., & Sutphin, e. G. (2020, January 16). Kynurenine pathway, NAD⁺ synthesis, and mitochondrial function: Targeting tryptophan metabolism to promote longevity and healthspan. *Exp Gerontol*. doi:10.1016/j.exger.2020.110841
- Chambers, A. A., & al., e. (2018, February 21). Overview of the Baculovirus Expression System. *Curr Protoc Protein Sci.*(91), 541-546. doi:10.1002/cpps.47
- Chen, X., & al., e. (2015). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Cerebral Ischemia. *Curr Top Med Chem.*, 21(15), 2211-2221. doi: 10.2174/1568026615666150610142234
- Colombo, G., & al., e. (2023, February 1). NAMPT and NAPRT serum levels predict response to anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease. *Frontiers in medicine (Lausanne)*. doi: 10.3389/fmed.2023.1116862
- Covarrubias, A. P., & al., e. (2021, December 22). NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2(22), 119-141. doi:10.1038/s41580-020-00313-x
- E. Wuerch, G. U. (2023, April 21). The Promise of Niacin in Neurology. *Neurotherapeutics.*, 1037-1054. doi:10.1007/s13311-023-01376-2
- Ernst, O., & Zor, T. (2010, April 12). Linearization of the bradford protein assay. *J Vis Exp.*, 38, 1918. doi: 10.3791/1918
- Fletcher, R. R., & al, e. (2017, May 29). Nicotinamide riboside kinases display redundancy in mediating nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in

- skeletal muscle cells. *Molecular Metabolism*, 8(6), 819-832. doi: 10.1016/j.molmet.2017.05.011
- Garten, A., & al., e. (2009, September 4). Linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends Endocrinol Metab.*, 3(20), 130-138. doi: 10.1016/j.tem.2008.10.004
- Gonthier, J. (2025). Baculoviruses: a natural and sustainable solution for pest control. *Biocomm Research group*.
- Gopal, G., & Kumar, e. A. (2013, July 30). Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia coli. *Protein J*, 32, 419-425. doi:https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5
- Gunetti, M. C., & al., e. (2012, May 31). Validation of analytical methods in GMP: the disposable Fast Read 102® device, an alternative practical approach for cell counting. *J Transl Med.*(10), 112. doi: 10.1186/1479-5876-10-112
- Gwak, W. I., & al., e. (2019, August 22). Baculovirus entire ORF1629 is not essential for viral replication. *PLoS One.*, 8(14), e0221594. doi:10.1371/journal.pone.0221594
- Huang, Y. T., & al., e. (2019, April 24). TET1 Knockdown Inhibits Porphyromonas gingivalis LPS/IFN- γ -Induced M1 Macrophage Polarization through the NF- κ B Pathway in THP-1 Cells. *Int J Mol Sci.*, 8(20), 2023. doi: 10.3390/ijms20082023
- Imai, S. (2009). Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): a link between NAD biology, metabolism, and diseases. *Curr Pharm Des.*, 1(15), 20-28. doi: 10.2174/138161209787185814
- J. Yoshino, G. B. (2018, March 6). NAD⁺ Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metab.*, 3(27), 513-528. doi: 10.1016/j.cmet.2017.11.002
- Kost, T. C., & al., e. (2005, May). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol.*, 5(23), 567-575. doi:10.1038/nbt1095
- Laemmli, U. (1970, August 15). Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 5259(227), 680-685. doi:10.1038/227680a0
- Liu, T. H., & al, e. (2023, July 17). Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PLoS One.*, 7(18), e0286056. doi: 10.1371/journal.pone.0286056
- Lu, L., & al., e. (2009, September-October). Elevated visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor plasma concentration in ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.*, 5(18), 354-359. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2009.01.003
- Lucci, P. D., & al., e. (2015). Punica granatum cv. Dente di Cavallo seed ethanolic extract: Antioxidant. *Food Chemistry*, 475-483.

- M. Meyer-Ficca, e. J. (2016, May 9). Niacin. *Advances in Nutrition*, 3(7), 556-558. doi: 10.3945/an.115.011239
- Magalhaes, P. A., & al., e. (2007). Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Pharm Sci.*, 3(10), 388-404.
- Mamat, U. W., & al., e. (2013, August 29). Endotoxin-free protein production—ClearColi™ technology. *Nat Methods*, 10, 916. doi:https://doi.org/10.1038/nmeth.f.367
- Manickam, R., & al., e. (2025, May 12). Nampt: a new therapeutic target for modulating NAD⁺ levels in metabolic, cardiovascular, and neurodegenerative diseases. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 7(103), 208-224. doi:https://doi.org/10.1139/cjpp-2024-0400
- Mielgo-Ayuso, J., & al., e. (2018, June 29). Dietary Intake and Food Sources of Niacin, Riboflavin, Thiamin and Vitamin B₆ in a Representative Sample of the Spanish Population. The Anthropometry, Intake, and Energy Balance in Spain (ANIBES) Study. *Nutrients*, 7(10), 846. doi: 10.3390/nu10070846
- Miller, J. (1972). Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Morrens, M. P., & al., e. (2020, September). Blood-based kynurenine pathway alterations in schizophrenia spectrum disorders: A meta-analysis. *Schizophr Res.*, 43-52. doi:10.1016/j.schres.2020.09.007
- Navas, L., & Carnero, e. A. (2021, January 1). NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduct Target Ther.*, 1(6), 2. doi:10.1038/s41392-020-00354-w
- Neuhoff, V. A., & al., e. (1988, June). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.*, 6(9), 255-262. doi:10.1002/elps.1150090603
- Noble, J., & Bailey, M. (2009). Quantitation of protein. *Methods Enzymol.*(463), 73-95. doi:10.1016/S0076-6879(09)63008-1
- Peisker, K. (1988, May). Application of Neuhoff's optimized Coomassie brilliant blue G-250/ammonium sulfate/phosphoric acid protein staining to ultrathin polyacrylamide gels on polyester films. *Electrophoresis.*, 5(9), 236-238. doi: 10.1002/elps.1150090510
- Peng, A., & al., e. (2024, October 24). The function of nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) and its role in diseases. *frontiers in molecular biosciences*, 11:1480617. doi: 10.3389/fmolb.2024.1480617
- Romacho, T., & al., e. (2020, March 25). Visfatin/eNampt induces endothelial dysfunction in vivo: a role for Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 inflammasome. *Scientific reports*, 1(10), 5386. doi: 10.1038/s41598-020-62190-w

- Rosano, G., & Ceccarelli, E. (2014, April 17). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.*, 5, 172. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
- Rosano, G., & Ceccarelli, e. E. (2014, April 17). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
- Sakamoto, S. W., & al., e. (2017, November 21). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med.*, 1(72), 32-42. doi:10.1007/s11418-017-1144-z
- Sambrook, J., & Russel, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual (3-Volume Set)* (Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scholz, J., & Suppmann, e. S. (2017, November 16). A new single-step protocol for rapid baculovirus-driven protein production in insect cells. *BMC Biotechnol.*, 17(83). doi:https://doi.org/10.1186/s12896-017-0400-3
- Semerena, E., & al., e. (2023, October 17). Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase: role in disease pathophysiology and as a biomarker. *Frontiers in immunology*, 14:1268756. doi: 10.3389/fimmu.2023.1268756
- Shackelford, R., & al., e. (2013, November). Nicotinamide phosphoribosyltransferase in malignancy: a review. *Genes & Cancer*, 11-12(4), 447-456. doi:10.1177/1947601913507576
- Soncini, D., & al., e. (2014, October 20). Nicotinamide phosphoribosyltransferase promotes epithelial-to-mesenchymal transition as a soluble factor independent of its enzymatic activity. *Journal of biological chemistry*, 49(289), 34189–34204. doi:10.1074/jbc.M114.594721
- Studier, F., & Moffatt, e. B. (1986, May 5). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113-130. doi:https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2
- Su, M. Q., & al., e. (2024, September 20). Mechanisms of the NAD⁺ salvage pathway in enhancing skeletal muscle function. *Front Cell Dev Biol.* doi:10.3389/fcell.2024.1464815
- Tanaka, M. S., & al., e. (2024, November 27). A Paradigm Shift in Tryptophan-Kynurenine Metabolism for Innovative Clinical Applications. *Int J Mol Sci.*, 23(25), 12767. doi:10.3390/ijms252312767
- Walker, J. (2010). *The protein protocols Handbook: second edition*. University of Hertfordshire, Hatfield, UK, Totowa, New Jersey: Humana press.

- Wurm, D. V., & al., e. (2016, October). The E. coli pET expression system revisited-mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 20(100), 8721-8729. doi:10.1007/s00253-016-7620-7
- Zamporlini, F. S., & al., e. (2014, Novembre). Novel assay for simultaneous measurement of pyridine mononucleotides synthesizing activities allows dissection of the NAD(+) biosynthetic machinery in mammalian cells. *FEBS J.*, 22(281), 5104-5119. doi: 10.1111/febs.13050
- Zeng, C. W., & al., e. (2015, December). Pathways related to PMA-differentiated THP1 human monocytic leukemia cells revealed by RNA-Seq. *Sci China Life Sci.*, 12(58), 1282-1287. doi:10.1007/s11427-015-4967-4
- Zhang, Y. E., & al., e. (2005). Insect cells-Baculovirus system: Factors affecting growth and low MOI infection. *Biochemical Engineering Journal*, 27(1), 8-16. doi:10.1016/j.bej.2005.05.013
- Zhao, B., & al., e. (2013, December 31). Cerebral ischemia is exacerbated by extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase via a non-enzymatic mechanism. *PLoS One.*, 12(8). doi: 10.1371/journal.pone.0085403
- Zhu, Y., & al., e. (2022, July 12). From Rate-Limiting Enzyme to Therapeutic Target: The Promise of NAMPT in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Pharmacology - Sec. Neuropharmacology*, 13. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.920113>
- Zubair, M. C. (2026, January). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *StatPearls [Internet]*.