Compendio della tesi

Il carcinoma polmonare rappresenta la neoplasia più diffusa a livello mondiale, con 1,8 milioni di nuovi casi stimati nel 2012. Negli uomini, il carcinoma polmonare è la neoplasia più diffusa (con 1,2 milioni di nuovi casi, 16,7% del totale), mentre nelle donne, i tassi di incidenza sono generalmente più bassi rispetto a quelli maschili.

Il carcinoma polmonare è la principale causa di morte per cancro in tutto il mondo, con 1,59 milioni di decessi registrati nel 2012. Nei maschi, tale neoplasia è la principale causa di morte per cancro, sia nei paesi industrializzati che in quelli meno sviluppati, mentre nelle donne, il tasso di mortalità per carcinoma polmonare ha superato quello relativo al carcinoma della mammella nei paesi industrializzati.

A livello globale, i tassi di mortalità seguono quelli di incidenza, dovuta all'alta letalità di tale neoplasia. Il tasso di sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi è attualmente al 52% nei casi di carcinoma polmonare localizzato, ma si riduce fino a circa il 4% in quelli con neoplasia in stadio avanzato. Attualmente, la maggior parte dei pazienti a cui viene diagnosticato il carcinoma polmonare presenta forme localmente avanzate e quindi non trattabili dal punto di vista chirurgico. Pertanto risultano di fondamentale importanza l'identificazione di nuovi biomarcatori per una diagnosi precoce di tale neoplasia.

Oggetto del presente lavoro di ricerca è stato l'enzima nicotinamide N-metiltrasferasi (NNMT), che catalizza la reazione di N-metilazione della nicotinamide, utilizzando la S-adenosil-L-metionina come donatore di gruppo metilico, convertendola ad N1-metilnicotinamide, composto che nell'uomo può essere escreto con le urine come tale o essere ulteriormente ossidato a 2- e 4-piridone, anch'essi escreti per via urinaria.

L'enzima NNMT appartiene alla categoria degli enzimi del metabolismo di fase II dove svolge un ruolo di primaria importanza nei processi di biotrasformazione e detossificazione di numerosi farmaci e di composti xenobiotici.

E' noto un coinvolgimento dell'NNMT in numerose patologie umane, sia a carattere non neoplastico, sia a carattere neoplastico. In particolare, numerosi studi hanno permesso di evidenziare un aumento dell'espressione dell'enzima in numerose neoplasie, quali il carcinoma renale e il carcinoma della vescica, il carcinoma tiroideo di tipo papillare, il carcinoma del colon, il carcinoma pancreatico e il carcinoma gastrico, il carcinoma orale squamocellulare e il carcinoma polmonare. Nonostante gli studi effettuati al fine di chiarire il ruolo svolto dall'enzima nel metabolismo della cellula tumorale, risulta a tutt'oggi ancora parzialmente sconosciuto il significato dell'overepressione dell'enzima osservato nelle neoplasie.

Pertanto, l'obiettivo del presente progetto di ricerca è stato quello di valutare gli effetti biologici associati all'aumento dell'espressione dell'NNMT nel carcinoma polmonare e nel carcinoma orale.
Nella prima parte del presente lavoro, allo scopo di esplorare il coinvolgimento dell'enzima nel metabolismo della cellula tumorale, è stato analizzato il livello di espressione dell'NNMT nella linea cellulare di carcinoma polmonare A549, a cui è seguito il silenziamento genico dell'enzima e la valutazione in vitro dell'effetto di tale silenziamento sulla tumorigenicità.
Al fine di effettuare il silenziamento dell'NNMT è stato utilizzato il vettore plasmidico pLKO.1 puro, codificante short hairpin RNAs (shRNAs) contenenti sequenze nucleotidiche complementari a differenti regioni dell'mRNA per l'NNMT.
L'influenza del silenziamento dell'NNMT sulla proliferazione cellulare è stata valutata mediante il saggio dell'MTT che ha evidenziato una riduzione significativa della capacità proliferativa nelle cellule silenziate rispetto a quelle di controllo.
È stata inoltre analizzata la capacità di formare colonie in assenza di adesione al substrato, mediante il saggio in soft-agar, che valuta la proliferazione cellulare ancoraggio-indipendente, indice questa del potenziale tumorigenico della cellula. I risultati ottenuti hanno mostrato come nelle cellule silenziate le colonie fossero di dimensioni ridotte e meno numerose rispetto a quelle presenti nelle cellule di controllo.
Allo scopo di approfondire lo studio del ruolo svolto dall'enzima nel metabolismo della cellula neoplastica, l'attività di ricerca è stata quindi rivolta alla valutazione degli effetti indotti dall'overespressione dell'NNMT su una linea cellulare di carcinoma orale squamocellulare.
Il carcinoma orale squamocellulare (OSCC) rappresenta la lesione neoplastica più frequente del cavo orale. Nonostante i progressi effettuati in campo terapeutico, il tasso di sopravvivenza a 5 anni dei pazienti affetti da tale patologia non è aumentato nelle ultime decadi, restando al di sotto del 50%. Pertanto, lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella tumorigenesi risultano necessari per l'identificazione di nuovi marcatori per una diagnosi precoce, così come per l'identificazione di nuovi target terapeutici.
Studi condotti al fine di esplorare il coinvolgimento dell'enzima nel carcinoma orale squamocellulare, hanno evidenziato una correlazione inversa tra l'overespressione dell'NNMT con la presenza di metastasi linfonodali, il pT, lo stadio patologico ed il grado istologico, attribuendo all'enzima un potenziale valore prognostico. Inoltre, è stata osservata un'aumentata espressione salivare dell'NNMT nei pazienti affetti da OSCC rispetto ai soggetti sani, suggerendo un impiego di tale enzima come biomarcatore per la diagnosi precoce dell'OSCC.
Nel presente lavoro di ricerca, al fine di approfondire il ruolo svolto dall'NNMT nell'oncogenesi orale, è stato valutato l'effetto dell'overespressione dell'enzima nella linea cellulare di carcinoma

orale HSC-2, la quale presenta un basso livello di espressione dell'enzima, rappresentando quindi un modello ideale per tale studio.

A tale scopo, è stato effettuato il clonaggio molecolare della sequenza codificante l'NNMT umana nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3 ed il vettore ricombinante pcDNA3-NNMT ottenuto è stato utilizzato per gli esperimenti di overespressione.

L'effetto dell'upregolazione dell'NNMT è stato valutato sulla proliferazione cellulare mediante il saggio colorimetrico MTT. I risultati ottenuti hanno evidenziato un significativo aumento della capacità proliferativa nelle cellule trasfettate con il vettore pcDNA3-NNMT rispetto ai controlli, confermando che l'enzima svolge un ruolo importante nella capacità tumorigenica della cellula neoplastica.

Diversi studi hanno inoltre mostrato un effetto dell'NNMT sull'apoptosi. Il silenziamento genico dell'enzima ha portato all'induzione dell'apoptosi in una linea cellulare di carcinoma della mammella, mentre l'overespressione dell'NNMT in una linea cellulare di carcinoma colorettale ha portato ad una inibizione dell'apoptosi.

Al fine di esplorare i meccanismi molecolari responsabili degli effetti cellulari osservati, nel presente lavoro di ricerca, l'effetto dell'enzima sulla proliferazione cellulare e sull'apoptosi è stato analizzato a livello molecolare, esplorando i livelli di espressione della β-catenina, delle isoforme della survivina e del Ki-67. I risultati ottenuti hanno mostrato una significativa upregolazione dell'isoforma antiapoptotica ΔEx3 della survivina nelle cellule HSC-2 overesprimenti l'NNMT rispetto alle cellule di controllo.

In conclusione, i risultati ottenuti hanno dimostrato che l'NNMT svolge un ruolo importante nella proliferazione e nella capacità tumorigenica della cellula tumorale polmonare ed orale, candidando l'enzima quale interessante bersaglio molecolare per una terapia antineoplastica.

Nonostante la correlazione osservata tra i livelli di espressione dell'NNMT e dell'isoforma ΔEx3 della survivina sembra suggerire un coinvolgimento dell'NNMT nell'apoptosi, ulteriori studi sono necessari al fine di comprendere se la survivina potrebbe avere effettivamente un ruolo nel mediare gli effetti dell'NNMT osservati sull'apoptosi.