UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (D3A)

Dottorato di Ricerca in Scienze Agrarie Alimentari ed Ambientali (XV ciclo)

QUANTIFICAZIONE DELLA NICOTINAMIDE RIBOSIDE E DEI SUOI PRECURSORI NMN E NAD NEL LATTE MEDIANTE UN NUOVO SAGGIO ENZIMATICO FLUORIMETRICO

Docente guida:
Prof.ssa Nadia Raffaelli

Dottorando
Dott. Simone Ummarino

A.A. 2013/2014-2015/2016

INDICE

1. INTRODUZIONE 1

1.1 Proprietà generali della vitamina B3 1

1.2 Ruoli funzionali del NAD, La forma biologicamente attiva della vitamina B3 7

1.2.1 Ossidoriduzione del NAD 7

1.2.2 Il NAD nelle reazioni di ADP-Ribosilazione catalizzate dalle ADP ribosiltrasferasi 8

1.2.3 NAD nelle reazioni di deacetilazione catalizzate dagli enzimi Sirtuine 12

1.2.4 Il NAD nell'omeostasi del calcio mediata dalla NAD glicoidrolasi 13

1.3 Nicotinamide Riboside 15

1.4 Trasportatori della Nicotinamide Riboside in Procarioti ed Eucarioti 22

1.4.1 Trasporto di NR negli eucarioti 22

1.4.2 Trasporto di NR nei batteri 24

1.5 Vie Metaboliche di biosintesi del NAD a partire da NR in Procarioti ed Eucarioti 26

1.5.1 Biosintesi del NAD a partire da NR nei lieviti 26

1.5.2 Biosintesi del NAD a partire da NR nell'uomo 28

1.5.3 Biosintesi del NAD a partire da NR nei batteri 29

1.6 Secrezione di NR da lieviti 32

1.7 Gli effetti benefici indotti dalla somministrazione della NR 36

1.7.1 Protezione da disordini metabolici 36

1.7.2 Protezione da disordini mitocondriali 39

1.7.3 Effetti neuroprotettivi 42

1.7.4 Effetti sulla longevità cellulare 48

2. SVILUPPO DI UN NUOVO SAGGIO ENZIMATICO PER L ANALISI SIMULTANEA DI NR, NMN E NAD NEL LATTE. 53

3. Applicazioni del saggio enzimatico su diverse matrici alimentari 99

3.1 Determinazione di NR, NMN e NAD nei campioni di Birra 100

3.1.1 Preparazione degli estratti dei nucleotidi da campioni di Birra 101

3.1.2 Discussione dei Risultati 106

3.2 Determinazione di NR, NMN e NAD nei campioni di Kefir 110

3.2.1 Preparazione degli estratti dei nucleotidi da campioni di Kefir 111

3.2.2 Discussione dei Risultati 114

4. CONCLUSIONI 116

5. BIBLIOGRAFIA 120

1. INTRODUZIONE

1.1 Proprietà generali della vitamina B3

La Nicotinamide Riboside (NR), L'Acido Nicotinico (NA) e La Nicotinamide (Nam) sono tre forme collettivamente conosciute con il termine vitamina B_3 (o niacina, o vitamina PP, Pellagra-Preventing). (Figura 1) [1]

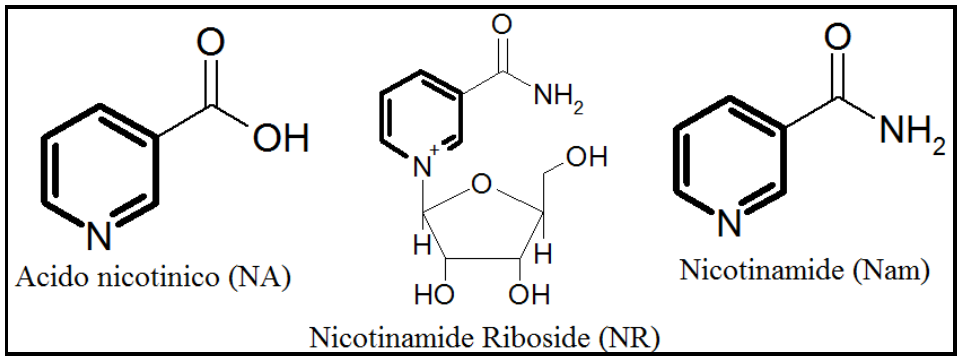

Figura 1. Struttura molecolare delle tre forme della vitamina B_3

Queste tre forme vitaminiche possono essere presenti nella dieta come tali, oppure possono essere assunte in seguito alla digestione del Nicotinamide adenin dinucleotide (NAD) e/o del Nicotinamide mononucleotide (NMN) (Figura 2).

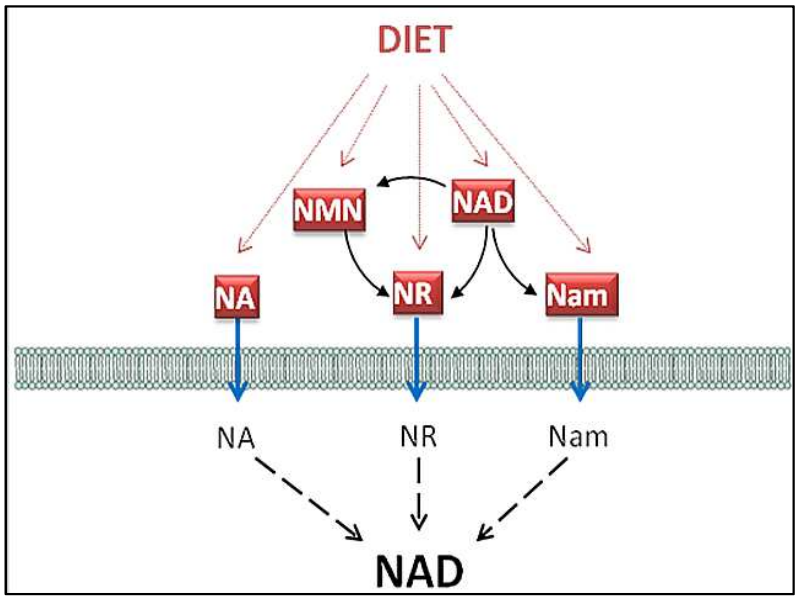

Figura 2. Assunzione tramite la dieta dei precursori del NAD: NR, NA e Nam

Tutte e tre le forme della vitamina B_3 sono precursori del NAD e del suo derivato fosforilato (Nicotinamide Adenin Dinucleotide Fosfato) NADP (Figura 3)

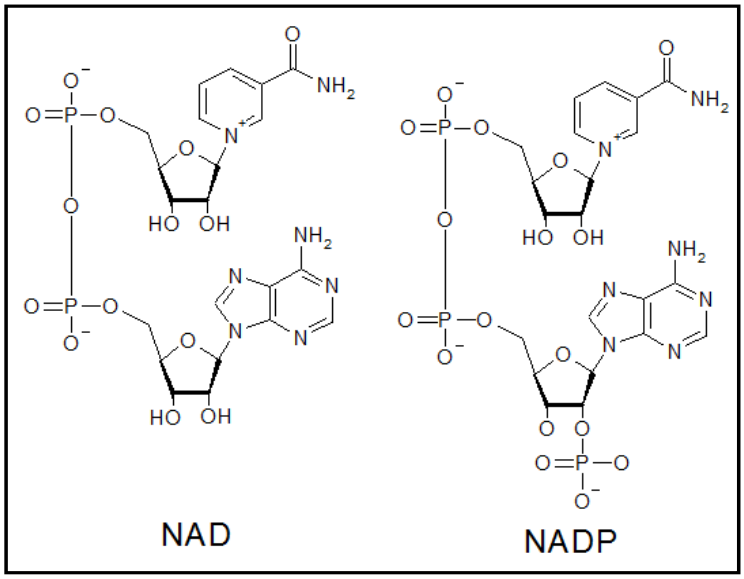

Figura 3. Struttura molecolare del NAD e NADP

La scoperta della niacina come vitamina deriva da ricerche condotte sulle cause della patologia nota come pellagra. Nel secolo scorso la pellagra era comune nelle zone rurali del Sud America, ed era stata inizialmente considerata una malattia infettiva. Tuttavia nel 1914 Joseph Goldberger verificò l'ipotesi che la patologia potesse essere causata da una deficienza alimentare e scoprì che con una dieta a base di latte fresco, mais e carne essa veniva prevenuta e curata [2]. Infatti uno dei primi trattamenti anti-pellagra era considerato il consumo di 1,5-2 pinte di latte bovino [3]. Ventitre anni più tardi Conrad Arnold Elvehjem ed i suoi collaboratori dell'Università del Wisconsin-Madison, dopo aver ottenuto da un estratto deproteinizzato di fegato, una frazione di acido nicotinico e nicotinamide, dimostrarono che queste molecole avevano la proprietà di guarire una malattia dei cani conosciuta per la sua sintomatologia come "black tongue" (lingua nera), nota da tempo per essere equivalente alla pellagra umana [4]. Pertanto, fu introdotto il termine "vitamina PP" (PP sta per Pellagra Preventing) che scaturisce proprio da queste ricerche, in quanto esse rivelano l'azione di prevenzione della vitamina nei confronti della pellagra. Successivi studi metabolici identificarono la Nam un componente strutturale fondamentale dei coenzimi NAD e NADP. Il NAD ed i suoi derivati ossidati e/o fosforilati: NAD(P), NAD(H), e NAD(P)H sono cofattori essenziali per gli enzimi ossidoreduttasi che lo utilizzano nelle reazioni di ossiduriduzione. Il NAD è inoltre usato da altre classi d'enzimi che lo impiegano come

substrato in reazioni coinvolte nel riparo del DNA, nel controllo dell' espressione genica, nella regolazione del metabolismo energetico e nella mobilizzazione degli ioni Ca^{2+} intracellulare [5]. Il NAD è da considerarsi uno dei metaboliti più abbondanti negli organismi viventi ed il suo rapido consumo da parte degli enzimi che lo usano come substrato ne stimola il costante rifornimento [6]. Nei soggetti affetti da pellagra la diminuzione dei livelli cellulari di NAD e NADP è il risultato di una dieta assente dei suoi precursori, infatti dallo stesso Elvehjem fu dimostrato come animali affetti da pellagra presentavano una significativa diminuzione dei livelli di NAD e NADP nei muscoli e fegato [7].

Tra le patologie da carenze vitaminiche, la pellagra rimane senz'altro quella più diffusa del passato: si stima che nei soli Stati Uniti, oltre 100.000 persone sono morte a causa della pellagra tra il 1900 e il 1940, quando la malnutrizione dovuta alla povertà ha rappresentato la principale causa della malattia [8]. La pellagra è stata definita come la malattia delle 4 D (Dermatitis, Diarrhea, Dementia, Death) e mostra sintomi come la disepitelizzazione (desquamazione-perdita della pelle) delle mani e del collo, diarrea, perdita di appetito e di peso, lingua arrossata e gonfia, depressione e ansia. Oggi la deficienza di vitamina B_3 è un evento molto raro nei paesi industrializzati [9], tuttavia diverse situazioni fisiopatologiche, come varie malattie neurodegenerative (Parkinson, Alzheimer), sindrome metabolica, HIV, malattie autoimmuni, dipendenza da alcool, anoressia, nonché

numerose patologie legate all'invecchiamento sembrano riprodurre una o più manifestazioni pellagra-simili. Inoltre disturbi pellagra–simili (dermatite, disturbi psichici) sono tipici di una malattia metabolica nota come malattia di Hartnup, causata da un'anomalia nel trasporto gastrointestinale e renale di alcuni amminoacidi tra cui il triptofano (precursore della vitamina B3). Tali sintomi vengono alleviati ed in alcuni casi prevenuti dalla somministrazione della vitamina [10].

Ad oggi è noto che l'acido nicotinico, la nicotinamide [11] ed il triptofano [12] sono precursori del NAD e con essi è attualmente considerata precursore del NAD anche la nicotinamide riboside, una nuova forma vitaminica recentemente scoperta nel latte e per la quale è stata identificata la via metabolica che ne permette la conversione a NAD [1].

Dal punto di vista metabolico, la vitamina B3 è peculiare fra quelle del gruppo B in quanto gli animali hanno la capacità di sintetizzare la niacina a partire dal triptofano. Si ritiene che 60 mg di triptofano possano dare origine ad 1 mg di niacina ("1 equivalente di niacina"). Perciò in numerose tabelle, la quantità di niacina non è espressa come "niacina" ma come "numero di equivalenti di niacina", includendo la quantità di triptofano e tenendo conto della conversione del triptofano in niacina. L'entità di questa conversione è generalmente accettata a livelli di 60 : 1, ma il valore non è tale in ogni situazione e varia da individuo a individuo. Infatti la conversione risente della quantità di

triptofano alimentare e dello stato nutrizionale niacinico. Se il contenuto di triptofano è scarso, l'utilizzazione per la formazione della vitamina viene in parte penalizzata e si può scendere a rapporti più bassi (anche fino ad oltre 120 : 1), inoltre, poiché il triptofano dà origine anche alla serotonina, importante neurotrasmettitore, si ha una competizione per la sua utilizzazione in caso di deficienza niacinica. Questo spiegherebbe anche il fatto che nella pellagra si osserva una forma di demenza [13]. In una dieta povera di triptofano, l'azione protettiva nei confronti della pellagra si realizza con l'assunzione giornaliera (RDA) di niacina pari a 16 mg per gli uomini e 14 mg per le donne. Sono considerati "equivalenti di niacina" anche il NAD, NAD(H), NAD(P) e il NAD(P)H e i metaboliti del NAD che possono essere utilizzati per la sintesi del coenzima.

Come riportato da Goldberger [2], la niacina è abbondante nel latte e nei prodotti lattiero-caseari come anche nella carne, uova, pesce alcuni vegetali e grano integrale. Il mais contiene elevate quantità di Na e Nam, ma in forme legate non biodisponibili. Per incrementare la biodisponibilità di niacina è necessario sottoporre il mais a trattamento alcalinizzante. Tale pratica era utilizzata dalle popolazione precolombiane native del Sud America, le quali erano quindi protette dalla deficienza da vitamina B_3 nonostante la loro alimentazione fosse a base di mais. Studi condotti su animali [14] hanno dimostrato che il mais non trattato causa la deficienza della vitamina e che tale effetto

può essere contrastato qualora la dieta a base di mais sia integrata con il latte in cui sono presenti tutte le forme della vitamina [1].

1.2 Ruoli funzionali del NAD, la forma biologicamente attiva della B3

1.2.1 Ossidoriduzione del NAD:

NAD e NADP sono considerati i principali coenzimi delle deidrogenasi cellulari, e giocano pertanto un ruolo vitale nel metabolismo energetico della cellula. Nelle reazioni redox catalizzate dalle deidrogenasi l'anello piridinico dei due dinucleotidi può fungere da accettore o donatore di elettroni come mostrato in figura 4,

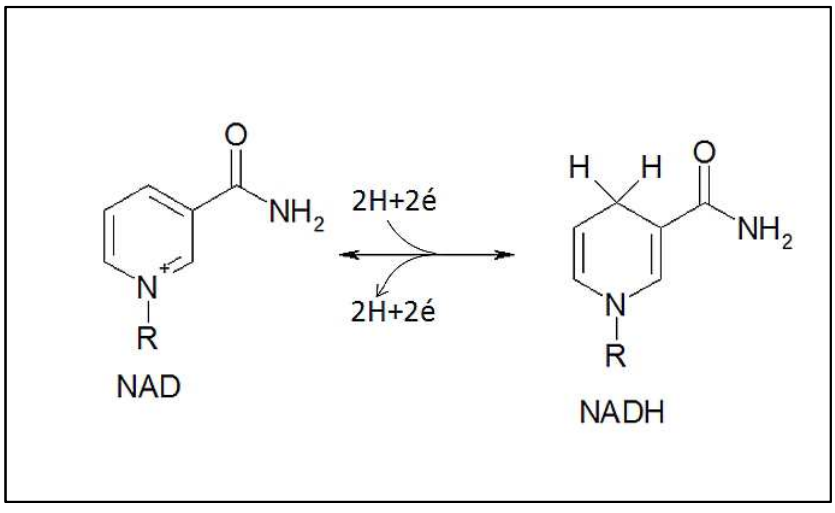

Figura 4 : Meccanismo di ossidazione e riduzione dell'anello piridinico del NAD^+.

NAD e NADP sono impiegati come coenzimi redox sia nell'anabolismo (come ad esempio la gluconeogenesi, sintesi degli acidi grassi e dei nucleotidi) che nel catabolismo (ad esempio la glicolisi e il catabolismo degli acidi grassi). In particolare, nella fosforilazione ossidativa il NADH dona i suoi elettroni all'accettore finale (O_2) attraverso i trasportatori che compongono la catena respiratoria mitocondriale. L'energia generata dal flusso di elettroni innesca un processo fortemente esoergonico utilizzato per la sintesi di ATP. Per ogni mole di NADH ossidato si formano 2,5 moli di ATP.

1.2.2 Il NAD nelle reazioni di ADP-Ribosilazione catalizzate dalle ADP ribosiltrasferasi:

L'ADP–ribosilazione è una reazione enzimatica che consiste nel trasferimento della porzione adenosil-fosforibosidica dal NAD a specifici residui di proteine accettrici con il contemporaneo rilascio di Nam. La reazione è catalizzata dalle ADP-ribosiltrasferasi, una famiglia di enzimi composta da due classi principali: le mono-ADP-ribosiltrasferasi (ART) e le poli-(ADP-riboso)-polimerasi (PARP). Le ART trasferiscono sulla proteina accettrice una sola subunità di ADPR, mentre le PARP possono trasferire unità multiple legandole tra loro mediante legami glicosidici, formando così polimeri di ADP-riboso (poli-ADPR). La reazione è schematizzata in figura 5.

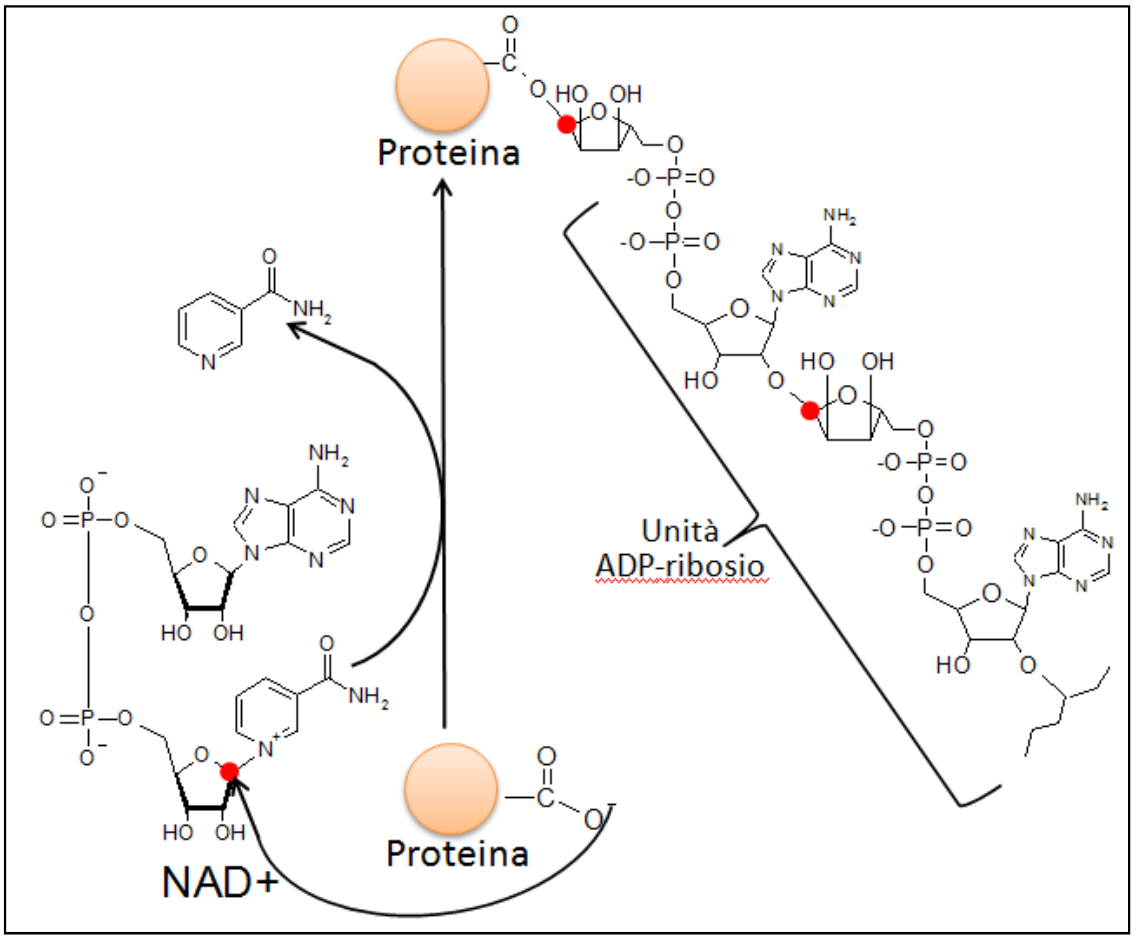

Figura 5: Reazione di ADP-ribosilazione catalizzata da PARP

L'ADP ribosilazione della proteina accettrice ne modifica la funzione biologica. Attraverso questo meccanismo le PARP sono ad esempio direttamente coinvolte nei processi di riparo del DNA, nell'induzione di processi infiammatori e della morte cellulare, inoltre influenzano il ritmo circadiano e le funzioni neuronali. Ci sono 17 diversi geni codificanti per le PARP e tra questi enzimi, PARP1 e PARP2 sono maggiormente attivi nella cellula [15]. PARP1 si attiva in risposta a rotture nei filamenti di DNA che possono essere provocate da diversi

fattori come un danno genotossico o possono essere indotte da agenti alchilanti e radicali liberi. Per mezzo del dominio N-terminale contenente due motivi zinc-finger ad alta affinità per il DNA, PARP1 si lega in maniera specifica sul filamento danneggiato e mediante il dominio C-terminale catalizza l'ADP-ribosilazione dell' istone H1, del dominio centrale di se stessa, e di altre proteine target coinvolte nel riparo del DNA [16]. L'elevata carica negativa del polimero costituito da unità di ADP-riboso, ha la funzione di segnalare e promuovere l'intervento di proteine quali: XRCC1, p53, DNA ligasi III, DNA polimerasi ed NF-kB coinvolte in diversi meccanismi di riparo del DNA. In figura 6 è mostrata PARP1 che in seguito al danno al DNA si auto ADP-ribosila, reclutando (X) XRCC1, (β) DNA polimerasi-β, (3) DNA ligasi III che intervengono nel riparare il tratto di DNA danneggiato [17].

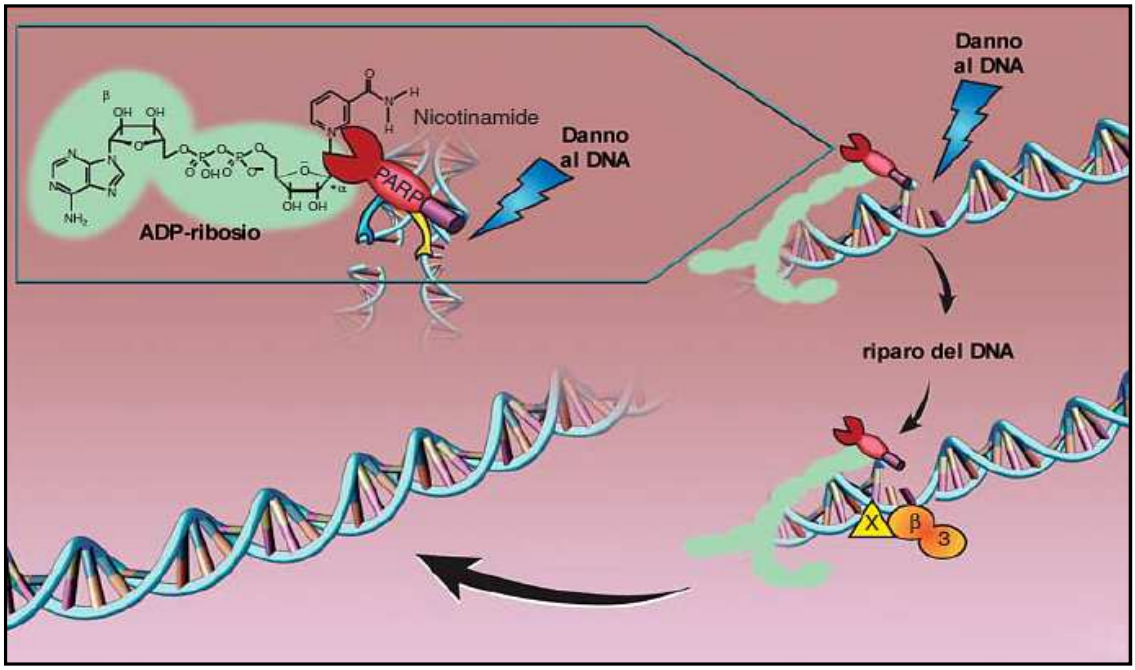

Figura 6: Attività catalitica di PARP-1 nel riparo del DNA. Nel complesso proteico: (X) XRCC1, (β) DNA polimerasi-β, (3) DNA ligasi III.

1.2.3 Il NAD nelle reazioni di deacetilazione catalizzate dagli enzimi Sirtuine.

Le Sirtuine sono una classe di deacetilasi specifiche che catalizzano la deacetilazione di proteine target, tra cui vari fattori di trascrizione ed enzimi, coinvolti in importanti processi cellulari quali: la biogenesi mitocondriale, l'omeostasi energetica, la sensibilità all'insulina, il riparo del DNA, la comunicazione cellulare, l'apoptosi. Come mostrato in Figura 7 nella deacetilazione catalizzata dalle Sirtuine, il gruppo acetile è rimosso dalla proteina target e trasferito all'ADP-ribosio del NAD, con liberazione di Nam e formazione dei due isomeri 2' e 3'-acetil riboso [18].

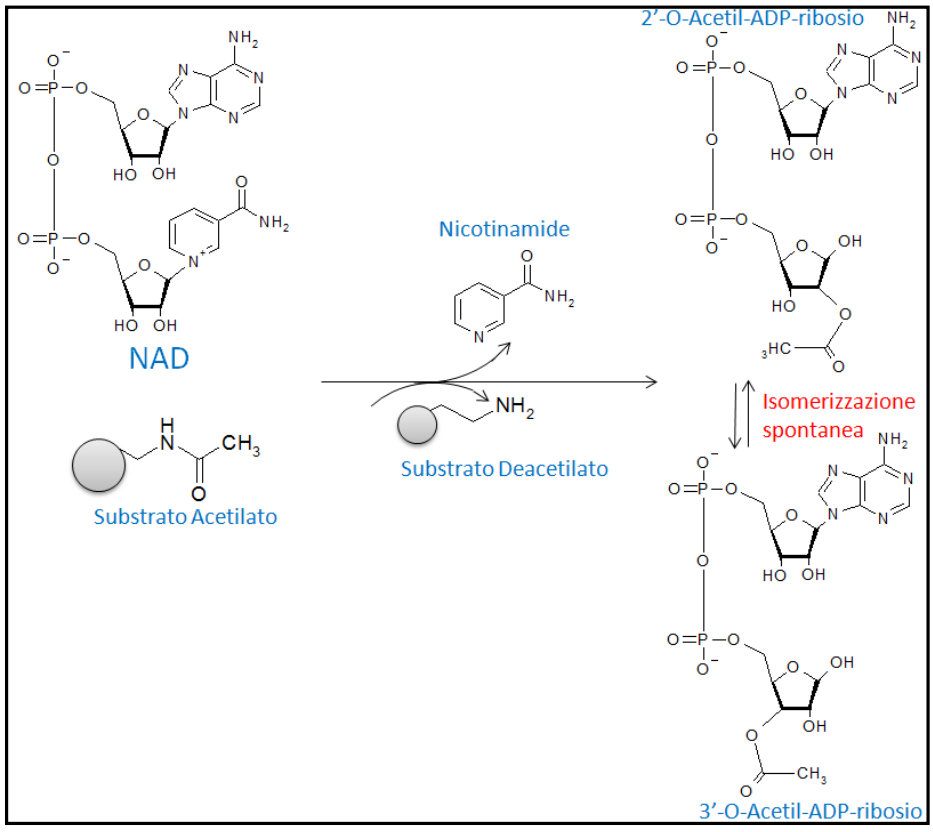

Figura 7: Deacetilazione NAD-dipendente catalizzata dalle Sirtuine

Nei mammiferi sono presenti sette enzimi (SIRT1-7) appartenenti alla famiglia delle sirtuine, che sono localizzate in compartimenti cellulari diversi: le isoforme SIRT6 e SIRT7 sono predominanti nel nucleo [19, 20], mentre SIRT3, SIRT4 e SIRT5 sono state osservate solo nei mitocondri [21], SIRT1 è prevalente nel nucleo e nel citosol [22], mentre SIRT2 è l'isoforma predominante nel citoplasma [23]. Dato che le reazioni enzimatiche catalizzate dalle sirtuine richiedono NAD come substrato, la loro attività può variare in maniera strettamente correlata al particolare status energetico/ossidativo della cellula [24]. Pertanto le sirtuine sono considerate sensori dello stato metabolico e dello stress cellulare.

1.2.4 Il NAD nell'omeostasi del calcio mediata dalla NAD glicoidrolasi

La NAD glicoidrolasi è una glicoproteina anche conosciuta come CD38, o ADP-ribosil ciclasi, o ADP-ribosio ciclico idrolasi [26]. Questa proteina di transmembrana è multifunzionale, infatti svolge il ruolo di antigene in quanto coinvolto nell'attivazione della proliferazione cellulare, è poi un enzima che catalizza la sintesi di derivati del NAD come l'NaADP (acido nicotinico adenindinucleotide fosfato), L'ADPR e l'ADPR ciclico, che sono tutti messaggeri secondari intracellulari impiegati nelle vie di segnalazione del Ca^{2+} (fig 8) [27].

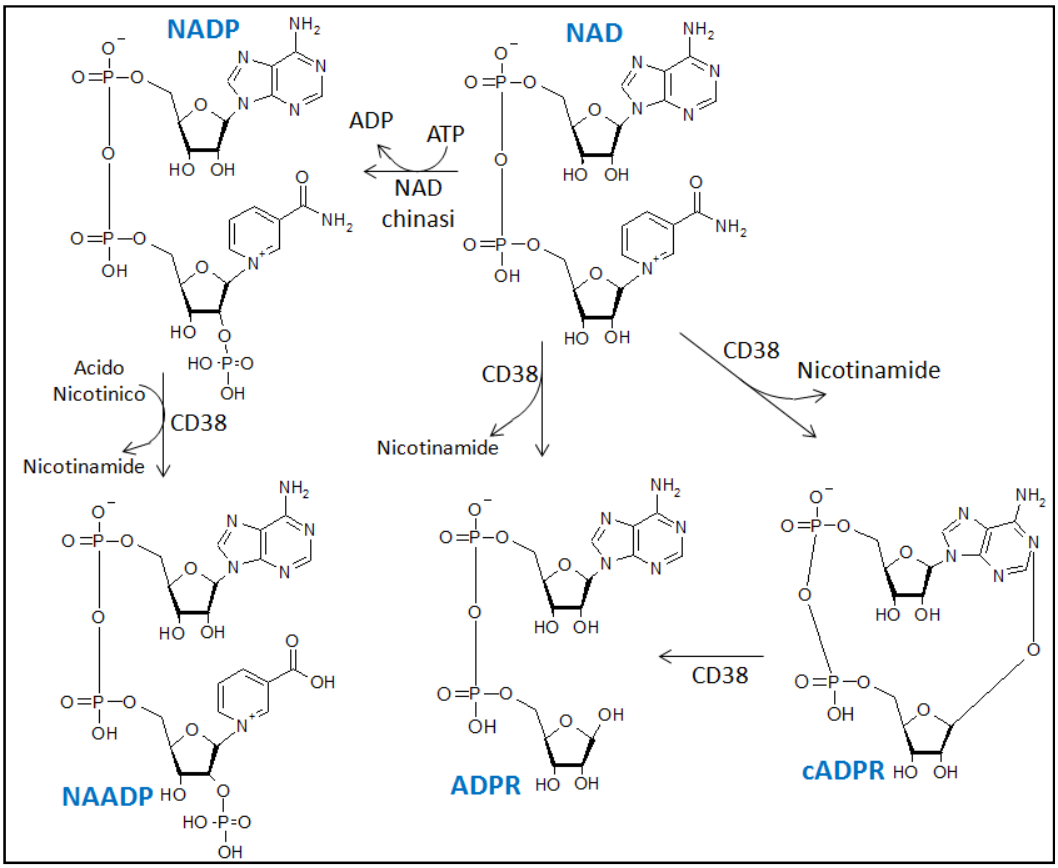

Figura 8: Reazioni catalizzate da CD38

La sintesi di questi derivati del NAD, avviene mediante il dominio catalitico extracellulare di CD38, in seguito questi messaggeri sono traslocati all'interno della cellula dove si legano ai recettori RyRs (ryanodine receptors) presenti sul reticolo sarcoplasmatico, e promuovono il rilascio di calcio.

1.3 Nicotinamide Riboside

Il merito della scoperta della NR è stato attribuito a Charles Brenner ed i suoi collaboratori che mossi dal concetto che la NR era conosciuta come un precursore del NAD nel batterio *Haemophilus Influenza* [28-30], dimostrarono nel 2004 [1]: che l'NR è presente nel latte, che negli organismi procarioti segue una via metabolica di conversione a NAD indipendente dalle altre forme vitaminiche, ed inoltre che questo pathway biosintetico resta conservato nelle cellule eucariote. Negli esperimenti di C. Brenner è stato caratterizzato ed utilizzato il lievito *Saccharomyces cerevisae* (QNS1), Periciò per capire nel dettaglio gli esperimenti bisogna far riferimento ai pathways biosintetici del NAD che erano conosciuti essere operativi in *S. cerevisae* prima della scoperta della vitamina NR, e che sono schematizzati in (Figura 9).

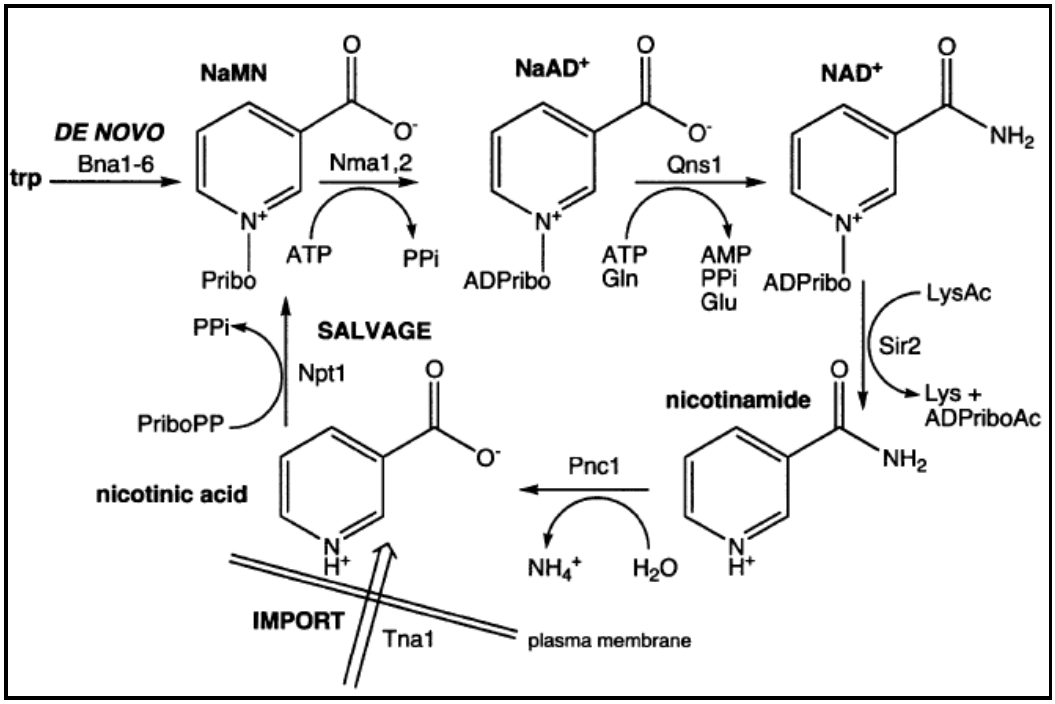

Figura 9. Tre vie biosintetiche del NAD operative in *S. cerevisae*

Il NAD può essere sintetizzato *de novo* a partire dal triptofano, un aminoacido aromatico essenziale, utilizzando i prodotti dei geni bna1-bna6, nma1,2 e qns1. Questa via è detta appunto "*de novo*" in quanto non usa un composto di partenza contenente l'anello piridinico preformato. Una seconda via è originata dal trasporto di acido nicotinico dall'ambiente extracellulare e prevede la sua conversione a NAD tramite i prodotti del gene npt1, nma1,2 e qns1. Infine la terza via coinvolge l'utilizzo della Nam extracellulare e il recupero della Nam intracellulare originata dal consumo del NAD ad opera di enzimi come Sir2. Questa via prevede la conversione della Nam a NAD tramite i prodotti dei geni pnc1, npt1, nma1,2 e qns1. Come si può osservare dallo schema riportato in Fig. 9 l'acido nicotinico

mononucleotide (NaMN) è un metabolita comune a tutte e tre le vie ed è convertito ad acido nicotinico adenin dinucleotide (NaAD) dagli enzimi acido nicotinico mononucleotide adenililtrasferasi Nma1 ed Nma2 [31]. Infine l'enzima Qns1 (NAD sintetasi), converte l'NaAD a NAD.

Nell'esperimento in cui è stata scoperta l'NR, gli autori hanno fatto uso sia del lievito *S. cerevisae* (QNS1) che di un ceppo mutante (Δqns1) ottenuto mediante delezione del gene "qns1", responsabile dell'espressione dell'enzima Qns1. Come schematizzato in Figura 10 mentre Il *S. cerevisae* (QNS1) per crescere sfrutta tutti e tre i pathways di biosintesi del NAD, il *S. cerevisae* (Δqns1) potrebbe crescere solo se fosse in grado di convertire l'NR a NAD. La conversione dell'NR a NAD infatti prevede una iniziale trasformazione dell'NR a NMN e una successiva adenilazione dell'NMN a NAD senza la necessità di Qns1 (Figura 10).

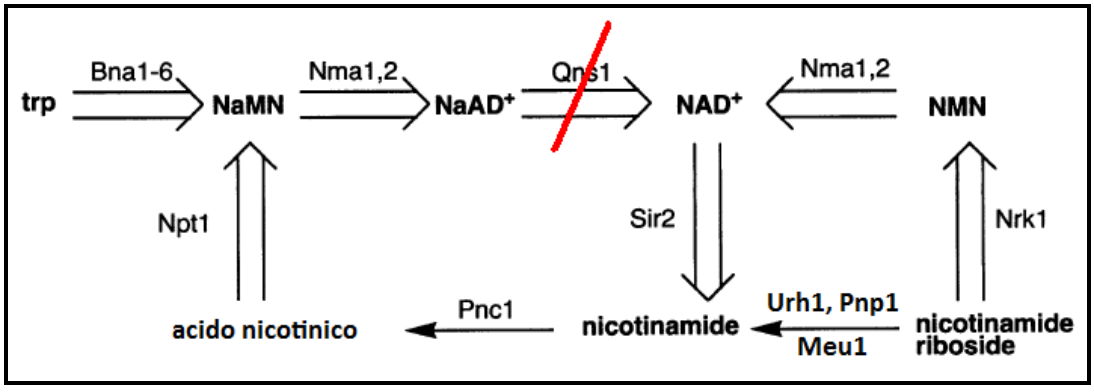

Figura 10. Pathways di biosintesi del NAD in *S. cerevisae* (QNS1) e (Δqns1). La barra rossa indica che tale via è stata inattivata in seguito alla delezione del gene qns1 del lievito mutante

Infatti come mostra la Figura 11, la crescita del mutante è stata osservata solo se nel terreno è addizionata la nicotinamide riboside; in questo modo gli autori stabiliscono che il lievito è in grado di convertire NR a NAD mediante un pathway nuovo ed indipendente da quelli descritti per le altre forme vitaminiche.

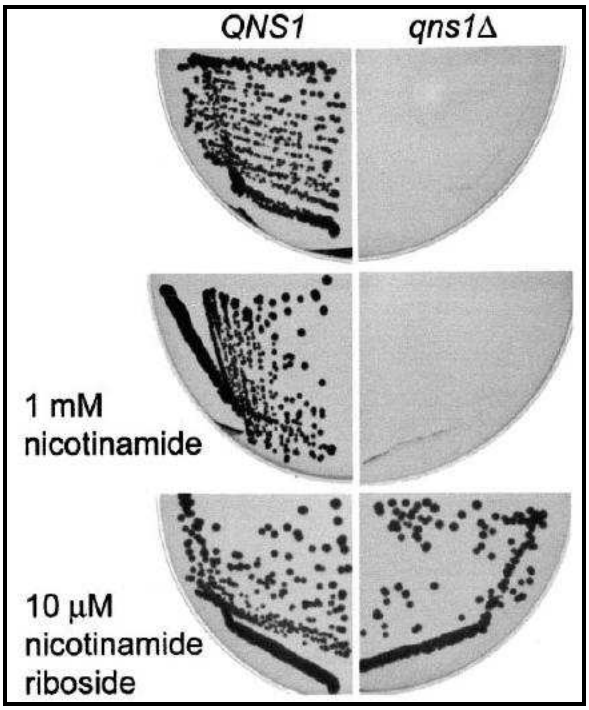

Figura 11. Crescita dei lieviti *S. cerevisae* (QNS1) ed il *S. cerevisae* (Δqns1) in terreno sintetico completo contenente destrosio, addizionato di vari precursori del NAD.

Nello stesso lavoro gli autori identificano l'enzima Nrk1 che fosforila la NR in NMN. Confermano anche che l' NMN prodotto viene convertito a NAD dai due enzimi Nma1-2 con attività NMN/NaMN adenilil trasferasica [31].

In Figura 12 è mostrato che il *S. cerevisae* (Δqns1) riesce a crescere in presenza di siero di latte bovino. Nella stessa figura è mostrato che il doppio mutante, (Δqns1, Δnrk1), che è stato deleto contemporaneamente dei geni responsabili dell'espressione degli enzimi Qsn1 e Nrk1, non può crescere. Questi esperimenti confermano la presenza di nicotinamide riboside nel siero di latte bovino.

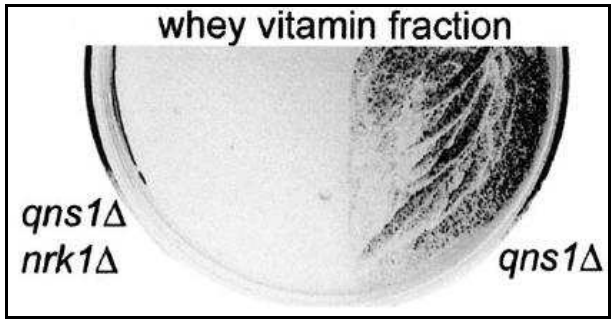

Figura 12. Crescita di ceppi mutanti di *S. cerevisae* in presenza di siero di latte bovino

In Figura 13 è mostrato come i lieviti mutanti *S. cerevisae (*Δqns1, Δnrk1) ingegnerizzati per l'espressione dei due enzimi nicotinamide riboside chinasi (NRK1 ed NRK2) umani, convertono l'NR in NAD e quindi crescono su terreno contenente NR.

Questo esperimento conferma il ruolo degli enzimi NRK1-2 umani nella sintesi del NAD, e quindi mette in luce che la via metabolica di conversione dell'NR a NAD è conservata nelle cellule eucariote.

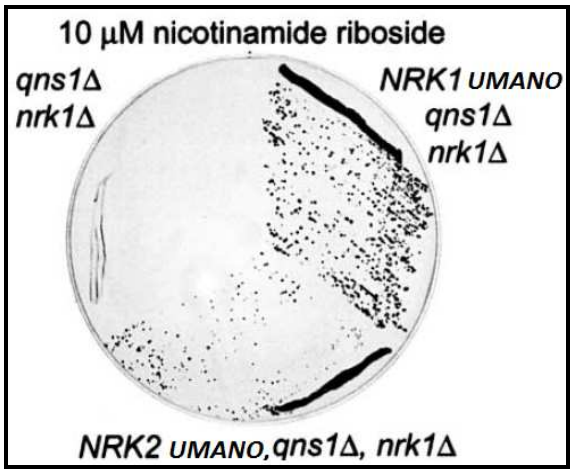

Figura 13. Crescita di ceppi mutanti di *S. cerevisae* in presenza di nicotinamide riboside 10 µM

In seguito alla scoperta della nicotinamide riboside, sono state individuati altri aspetti che hanno supportato il concetto che la NR sia precursore del NAD in altri organismi viventi quali funghi, batteri ed alcuni vertebrati; di seguito sono citati alcuni articoli esemplificativi selezionati dalla letteratura: Candida glabrata è un fungo che è stato descritto crescere in presenza di NR [32]; Il batterio gram-negativo *Haemophilus influenzae* che è causa di otite media ed infezioni del tratto respiratorio nell'uomo non possiede il pathway de novo e non può utilizzare i substrati Nam ed NA per crescere, deve quindi ricorrere all'utilizzo di NR, NMN o NAD presenti nell'ambiente extracellulare [33]; in diverse linee cellulari umane l'NR esogena addizionata al terreno durante la crescita produce aumento di NAD dose-dipendente [34]

1.4 Trasporto della Nicotinamide Riboside in Procarioti ed Eucarioti

L'opinione correntemente accettata che descrive l'assorbimento dell'NR da parte degli organismi viventi prevede che essa venga traslocata dall'ambiente extracellulare all'interno della cellula mediante uno specifico trasportatore di membrana.

1.4.1 Trasporto di NR negli eucarioti

In *Saccharomyces cerevisae,* come trasportatore di NR è stato identificato Nrt1, codificato del gene yor071 [35]. A tale scopo, C. Brenner ed i suoi collaboratori hanno fatto crescere un ceppo *S.cerevisae wild type* (BY4742) e dei ceppi *S.cerevisae* mutanti ciascuno dei quali deleto di un gene responsabile dell'espressione di un trasportatore vitaminico, compreso Nrt1.

Questi lieviti sono stati fatti crescere in due diverse condizioni: la prima condizione prevedeva un terreno di coltura "NA-free", cioè assente di acido nicotinico, e la seconda un terreno di coltura NA-free a cui era stato addizionato NR in concentrazione finale di 10 μM. Nel ceppo *wild type* cresciuto nel primo terreno è stata misurata una concentrazione intracellulare di NAD ≈ 0.8 mM, mentre nel lievito cresciuto nel secondo terreno la concentrazione di NAD intracellulare risultava aumentata fino ≈2 mM. Tale aumento era dovuto dalla conversione in NAD della NR aggiunta al terreno. Confrontando i vari

ceppi mutanti che erano stati sottoposti allo stesso esperimento è stato osservato che nel ceppo (Δyor071) cresciuto in presenza di NR, la concentrazione di NAD intracellulare non aumentava in maniera significativa (≈1 mM) e addirittura restava più bassa di quella misurata negli altri mutanti esaminati (da ≈1,7 a 2mM) (Figura 14).

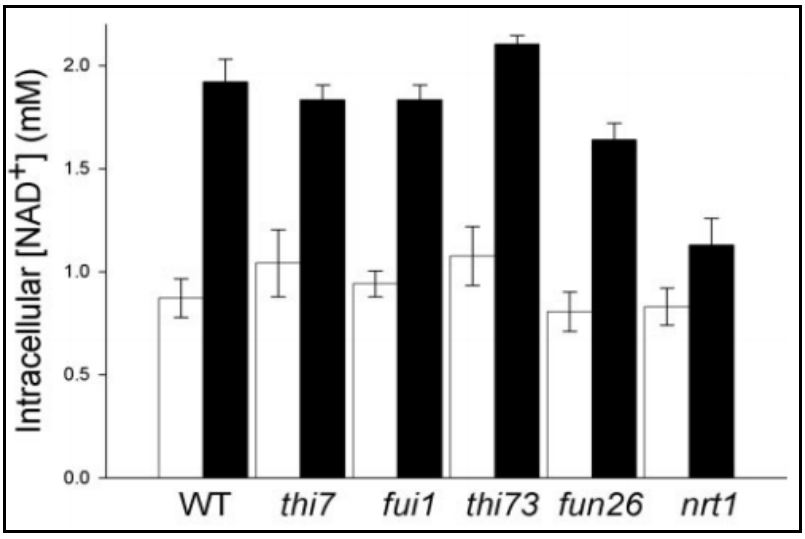

Figura 14: Concentrazione di NAD intracellulare determinata in diversi ceppi di lieviti deleti di diversi trasportatori, cresciuti nel terreno NA-free (barre bianche) e NA-free + 10μM di NR (barre nere).

I dati raccolti hanno così suggerito che la conversione di NR in NAD aumenta in maniera significativa nei lieviti mutanti che possono esprimere Nrt1, per questo motivo Nrt1 è stato considerato responsabile dell' "uptake" di NR in *S.cerevisae*. Il preciso meccanismo di come la nicotinamide riboside venga trasportata nelle

cellule eucariote deve ancora essere chiarito, ma nello stesso lavoro è stato messo in luce la dipendenza da pH di Nrt1. Infatti il trasporto avviene in maniera ottimale nel range di pH 3,5-6,5. La *Km* determinata per il trasportatore è 22 μM.

Un trasportatore omologo di Nrt1 non è presente nell'uomo [36], tuttavia studi condotti su trasportatori nucleosidici umani in oovociti di rana hanno indicato che l'alta espressione dei trasportatori equilibrativi Ent1 e Ent2 e del trasportatore di concentrazione CNT3 aumenta l' "uptake" di due composti analoghi all'NR, la tiazofurina e la benzamide riboside [37]. Inoltre è stato dimostrato che nei lieviti Fun26 funge da trasportatore vacuolare della NR [38]. Esso è omologo di alcuni ENT umani [39].

1.4.2 Trasporto di NR nei batteri

PnuC è il trasportatore della NR nei batteri. Tale trasportatore appartiene alla classe Pnu (Pyridine nucleotide uptake), una famiglia di proteine di membrana coinvolte nell'assorbimento di diverse vitamine del complesso B. PnuC è stato isolato dal batterio patogeno *H. influenzae* e ne è stata risolta la struttura cristallina [40, 41]. Per PnuC ci sono omologhi di sequenza in batteri appartenenti a diversi gruppi tassonomici. Oltre la famiglia delle *Pasteurellace (Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus parasuis*, e *Actinobacillus pleuropneumoniae)* anche *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* hanno questo trasportatore [41].

L'esatto meccanismo di trasporto mediato da PnuC non è ancora chiarito, ma è stato stabilito che non avviene per trasporto attivo o passivo, bensì sembra essere strettamente influenzato dall'attività chinasica intracellulare dell'enzima NadR, che converte NR in NMN nel citosol [42, 43]. Non ci sono dati che spieghino come NadR sia coinvolto nell'attivazione di PnuC; tuttavia in letteratura sono riportati esperimenti che dimostrano come per un ceppo di *H.influenzae* ingegnerizzato per l'espressione di una forma ricombinante di NadR, l'assorbimento di [^{14}C] NR diminuisce in maniera significativa [43].
Non ci sono trasportatori omologhi di PnuC negli eucarioti. Un'ipotesi che è stata recentemente considerata in merito, è la possibilità che ci siano delle relazioni evoluzionistiche tra la classe Pnu e la classe eucariotica SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters - trasportatori a bassa affinità degli zuccheri), infatti le proteine appartenenti alle due classi presentano elementi di struttura secondaria comune [41].

1.5 Vie Metaboliche di biosintesi del NAD a partire da NR in Procarioti ed Eucarioti

1.5.1 Biosintesi del NAD a partire da NR nei lieviti

Nel lievito *S. cerevisiae* la NR dopo esser stata traslocata nell'ambiente intracellulare viene convertita a NAD in due distinti pathways metabolici come mostrato in (Fig. 15):

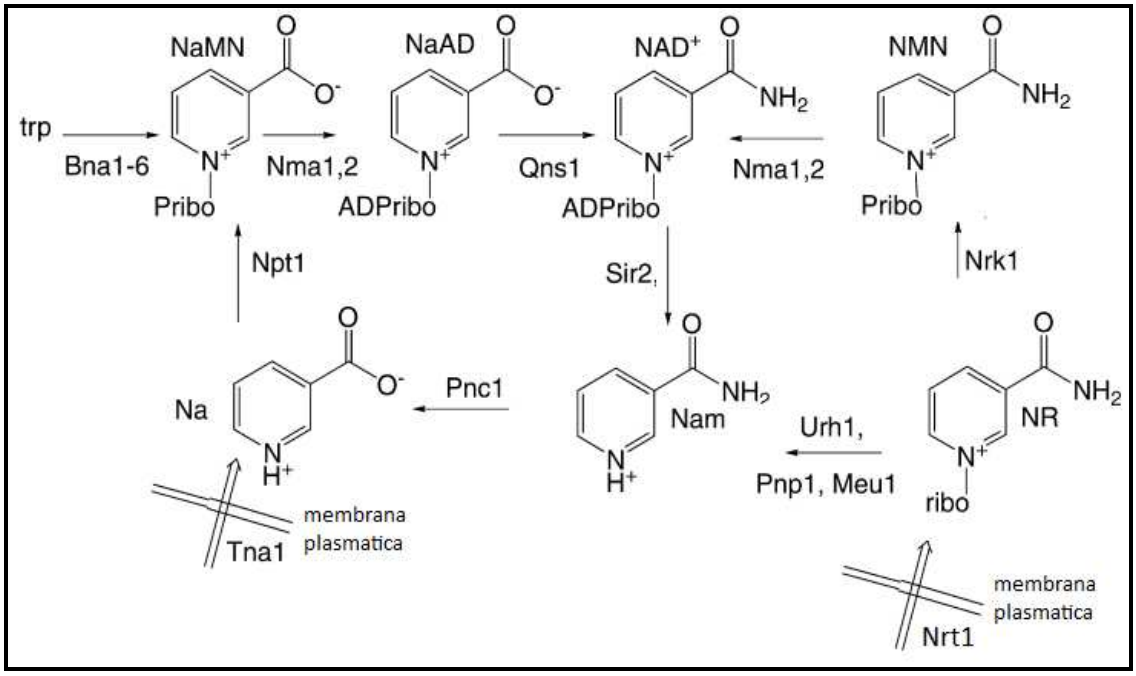

Figura 15: Pathways di conversione della NR a NAD nei lieviti

Nella prima via L'NR viene fosforilata a NMN dall'enzima Nrk1 (chinasi). L'NMN viene successivamente adenilato a NAD a spese di ATP, e la reazione è catalizzata dagli enzimi Nma1 ed Nma2 (adeniltransferasi).

La seconda via è originata dalla rottura del legame N-glicosidico della NR.

Dallo studio del genoma dei lieviti e da esperimenti condotti su lieviti mutanti è emerso che la rottura di tale legame avviene per mezzo di alcuni enzimi (nucleosidasi), in particolare una idrolasi e due fosforilasi. Queste due classi di enzimi si distinguono dal punto di vista meccanicistico in quanto l'idrolasi utilizza l'acqua per la rottura del legame glicosidico producendo base azotata e ribosio, mentre le fosforilasi utilizzano il fosfato per la rottura dello stesso legame e producono la base azotata ed il ribosio 1-fosfato. L'idrolasi è l'enzima Urh1, che è specifica per l'uridina e la citidina e non presenta enzimi omologhi nei vertebrati [44], le fosforilasi sono Meu1 (metiltioadenosina fosforilasi), coinvolto anche nella repressione dell'attività dell' Ornitina carbossilasi nei lieviti e nelle cellule umane [45], e Pnp1, per il quale è riportato in letteratura il suo ruolo nella degradazione e recupero delle basi puriniche [46].

In Figura 15 la Nam libera che viene prodotta è poi deamidata a Na mediante Pnc1 (pirazinamidasi/ nicotinamidasi). Na viene convertito a NaMN dall'enzima Npt1 (fosforibosil trasferasi) e la NaMN è convertita a NaAD dai due enzimi Nma1 ed Nma2. La maggior parte degli enzimi eucarioti coinvolti nell'adenililazione non discrimina bene tra i due substrati NaMN ed NMN, infatti gli enzimi Nma1-2 hanno anche attività NMN adenilliltrasfersica [47]. Nell'ultimo passaggio Qns1 (NAD sintetasi) converte l' NaAD in NAD.

1.5.2 Biosintesi del NAD a partire da NR nell'uomo

Le stesse vie di biosintesi del NAD a partire da NR che sono presenti nel metabolismo dei lieviti restano quasi totalmente conservate nell'uomo, seppur con alcune importanti differenze. Come mostrato in Fig.16

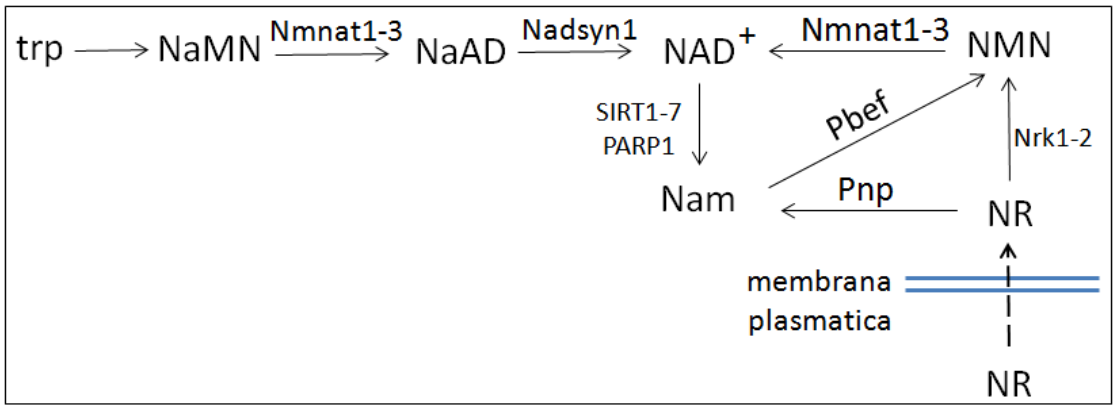

Figura 16: Pathways di conversione della NR a NAD nell'uomo

dopo l'uptake dell'NR, essa è convertita a Nam mediante l'enzima Pnp (purina nucleoside fosforilasi), omologo del Pnp1 dei lieviti. L' attività catalitica di Pnp è stata dimostrata *in vitro* ben 53 anni prima della scoperta della nicotinamide riboside [48]. Quest'enzima riceve particolare attenzione nel campo della ricerca scientifica in quanto è stato osservato che in alcuni particolari casi nei neonati possono riscontrarsi anomalie genetiche che determinano una bassa espressione di Pnp, ciò stimola l'apoptosi delle cellule-T che si riflette nello sviluppo di patologie autoimmuni e del cancro durante il primo anno di vita [49].

Data l'assenza di Pnc1 nell'uomo, la Nam prodotta è poi convertita ad NMN dall'enzima nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT) che è stato inizialmente identificato come Pre-B cell colony-Enhancing Factor (PBEF), cioè una citochina che interviene nella maturazione dei precursori dei linfociti B [50, 51].

L'NMN prodotto nella reazione catalizzata da NAMPT è successivamente adenilato a NAD mediante l'enzima Nicotinammide Mononucleotide Adeniltrasferasi presente in tre isoforme (NMNAT1, NMNAT2, NMNAT3). Le tre isoforme sono caratterizzate da una diversa localizzazione intracellulare (nucleo, citoplasma e mitocondrio), da una diversa struttura quaternaria e differenti proprietà cinetiche [52-54].

Nell'altra via biosintetica, L'NR è fosforilata a NMN a spese di ATP nella reazione catalizzata da due isoenzimi Nrk1-2 [1]. Per le due isoforme è stata determinata una omologia del 57%, ed entrambe hanno valori di Km per la NR nel range del basso micromolare. Mentre Nrk1 è espressa in tutti gli organi, Nrk2 anche chiamato MIBP (Muscle Integrin Binding Protein), è stato dimostrato essere selettivamente espresso nel cuore e nel muscolo scheletrico.

1.5.3 Biosintesi del NAD a partire da NR nei batteri

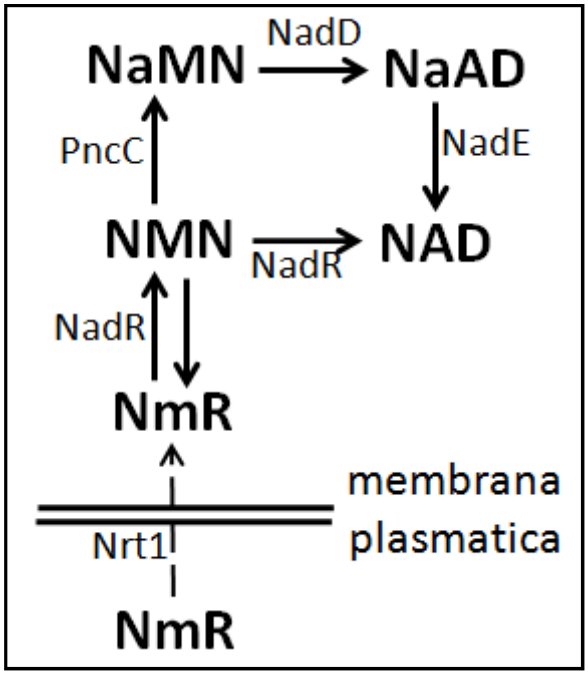

Figura 17: Vie biosintetiche del NAD a partire da NR nei batteri

L'assorbimento e l'utilizzo della NR nel metabolismo dei batteri comincia con il suo trasporto all'interno della cellula mediato da PnuC. Come mostrato in Figura 17, nel citosol la vitamina viene convertita a NAD attraverso vie distinte.

In alcune specie batteriche un unico enzima, NadR, catalizza la conversione dell'NR a NAD attraverso la formazione dell'intermedio NMN. NadR è costituito da due distinti domini catalitici fusi tra loro: il dominio "nicotinamide riboside chinasi" responsabile della formazione di NMN, ed il domino "nicotinamide mononucleotide adenil trasferasi" responsabile della conversione del prodotto

intermedio a NAD [55]. Non in tutti i batteri NadR è costituito dalla fusione dei due domini. Infatti in certe specie batteriche, come per esempio *Legionella pneumophila, Francisella tularensis* e *Acinetobacter baylyi* il NadR ha solo attività NR chinasica. In questi batteri l'NMN è convertito a NAD dall'attività NMN adenililtrasferasica dell'enzima NadM. Alternativamente, l'NMN viene convertito a NaMN, e la reazione è catalizzata dall' NMN deamidasi PncC [56]. L'NaMN viene quindi adenilato a NAAD dall'enzima NadD e infine NAAD viene amidato a NAD dall'enzima NadE. I due enzimi NadD e NadE, sono stati caratterizzati in molte specie batteriche [57, 58] in cui risultano essenziali per la loro sopravvivenza. Inoltre NadD e NadE sono considerati dei target per la progettazione di nuove molecole ad azione antibatterica, infatti è stato recentemente dimostrato che l'interveto farmacologico indirizzato alla modulazione dell'attivià dei due enzimi è una strategia utile nel debellare l'infezione da *M. tubercolosis* [59].

1.6 SECREZIONE DI NR DA LIEVITI

Le vitamine assimilate dai mammiferi non sono solo quelle presenti negli alimenti ed introdotte con la dieta, ma possono essere prodotte anche dal microbiota intestinale. Per esempio, alcuni batteri del genere *Lactis* o *Bifidobacterium* sono noti per essere produttori di vitamine nel colon umano [60]. Attualmente non sono ben individuati batteri che secernono NR. Tuttavia in letteratura sono riportati risultati di studi condotti su lieviti che in particolari condizioni di crescita possono secernere nicotinamide riboside nel terreno di coltura. Ad esempio in un lavoro svolto da C. Brenner [61] ed i suoi collaboratori è stato dimostrato che un ceppo di *S. cerevisiae* mutante *(Δnrk1, Δurh1, Δpnp1)* in cui sono stati deleti i geni Nrk1, Urh1 e Pnp1 (e di conseguenza le due vie metaboliche di conversione della NR in NAD sono assenti), presenta accumulo di NR intracellulare (Fig 18A). Tale accumulo è indotto dalla conversione di NMN in NR ad opera dell'enzima nicotinamide mononucleotide 5'-nucleotidasi (Isn1). Come mostrato in Figura 18 B gli autori hanno determinato che la concentrazione intracellulare di NR varia da 15μM a 122μM dopo 24hr d'incubazione a 37°C in presenza di NA 3μM.

Figura. 18A

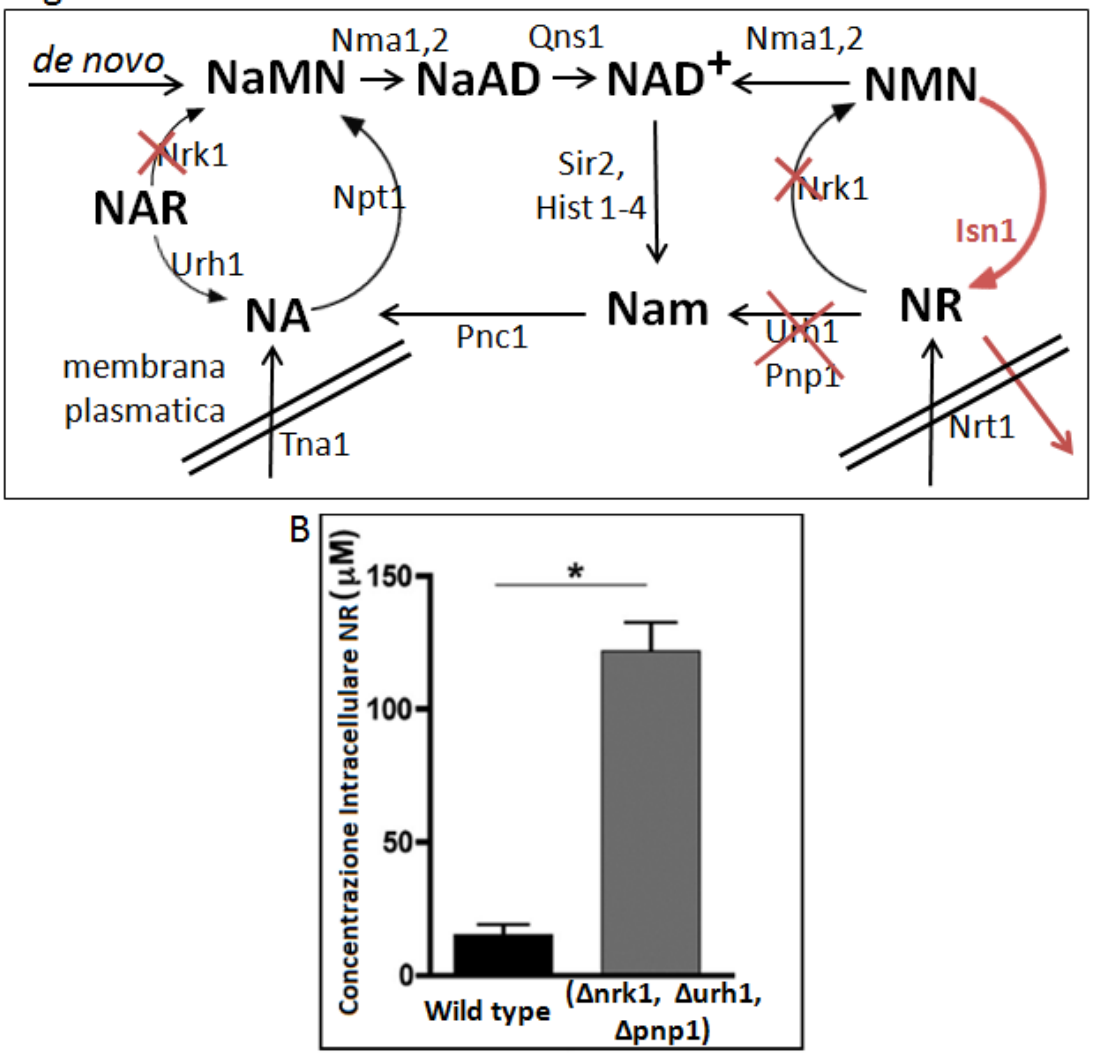

Figura 18: A. Schema delle vie biosintetiche del NAD in *S.cerevisae (Δnrk1, Δurh1, Δpnp1)*. Le barre rosse indicano le vie che sono state rese inattive in seguito alla delezione dei geni Δ*nrk1*, Δ*urh1*, Δ*pnp1*.

B. Concentrazioni intracellulari di NR per *S.cerevisae(wild-type)* e *S.cerevisae(Δnrk1, Δurh1, Δpnp1)*cresciuti in presenza di NA 3µM.

Il forte accumulo di NR nell'ambiente intracellulare si riflette in un suo parziale rilascio nel terreno di coltura; infatti nel terreno prelevato in fase stazionaria di crescita del lievito mutante è stata determinata una concentrazione di NR pari a ≈ 4μM. Il meccanismo con cui la nicotinamide riboside è trasportata all'esterno della cellula è ancora sconosciuto, tuttavia è stato dimostrato che è indipendente dal meccanismo d'importazione mediato dal trasportatore Nrt1.

Inoltre è stato stabilito che la concentrazione extracellulare di NR aumenta all'aumentare della concentrazione di NA addizionando al terreno, e ciò accade perché l'enzima Isn1 è attivato da NA.

La secrezione di NR da parte dei lieviti riceve particolare attenzione in ambito biochimico in quanto sono attualmente studiate strategie per la sintesi NR che potrebbero trovare applicazione in processi di produzione della vitamina su scala industriale. Infatti i ceppi individuati come produttori di NR sono spesso inseriti in procedure standardizzate e brevettate; come nel caso dei ceppi mutanti di *S.cerevisae* PAB076 *(Δnrk1, Δurh1, Δpnp1)* e PAB038 *(Δnrk1, Δurh1, Δpnp1,* Δnrt1) che brevettati dall'azienda Chromadex-NIAGEN (US8,114,626) sono impiegati per la produzione della NR attualmente commercializzata. Esistono inoltre anche metodi di sintesi organica o enzimatica di NR. Un metodo di sintesi chimica è quello proposto nel 2007 da Anthony Sauve che prevede la sintesi stereoselettiva della vitamina in sole due reazioni [34] , come mostrato nello schema in figura 19.

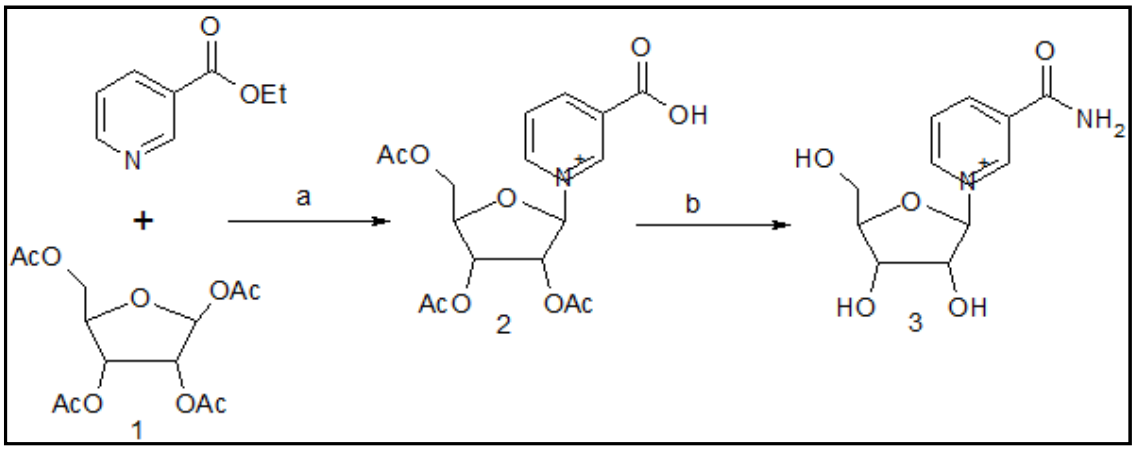

Figura 19. Reazioni impiegate per la sintesi di NR. Condizioni di reazione per i due step reattivi: (a) CH_2Cl_2, TMSOTf, 25°C, 4hr;
(b) NH3/MeOH, 4 °C, 12hr;

La sintesi Inizia con la reazione di accoppiamento tra due composti commercialmente disponibili: 1,2,3,5-tetra-O-acetil-β-D-ribofuranosio ed etil nicotinato in CH_2Cl_2 e TMSOTf (trimetilsilil trifluorometansulfonato). In seguito all'interpretazione degli spettri ^{1}H-NMR ottenuti per il prodotto intermedio (Fig 19. 2) è stato stabilito che la razione procede con la formazione stereoselettiva del solo isomero-β e con resa del 90%. Nel secondo step reattivo il prodotto intermedio viene fatto reagire con NH_3/MeOH a 4°C per 12hr, l'ammonolisi dell'estere e la deprotezione degli ossidrili del 2',3',5'-tri-O-acetil-β-etil nicotinato riboside produce la formazione della Nicotinamide Riboside con resa dell'85%. Anche questo metodo di sintesi della vitamina è stato in seguito ottimizzato e soggetto a patent (US8106184) dalla stessa Chromadex-NIAGEN.

7. GLI EFFETTI BENEFICI INDOTTI DALLA SOMMINISTRAZIONE DELLA NR

Diversi studi hanno dimostrato che la stimolazione della biosintesi del NAD mediante la somministrazione dei precursori vitaminici è in grado di prevenire o addirittura curare malattie legate all'invecchiamento e a disordini metabolici [5, 62]. Gli effetti benefici dell'innalzamento della concentrazione intracellulare del NAD sono dovuti al fatto che il NAD è cosubstrato *rate-limiting* degli enzimi Sirtuine: è stato dimostrato infatti che la variazione della concentrazione intracellulare di NAD si riflette nella modulazione dell'attività delle sirtuine.

1.7.1 Protezione da disordini metabolici

In uno dei primi lavori sugli effetti benefici di NR è stato dimostrato come la sua somministrazione a modelli di topo inducesse aumento di NAD in alcuni organi con conseguente attivazione di SIRT1 e SIRT3 come schematizzato in Figura 20.

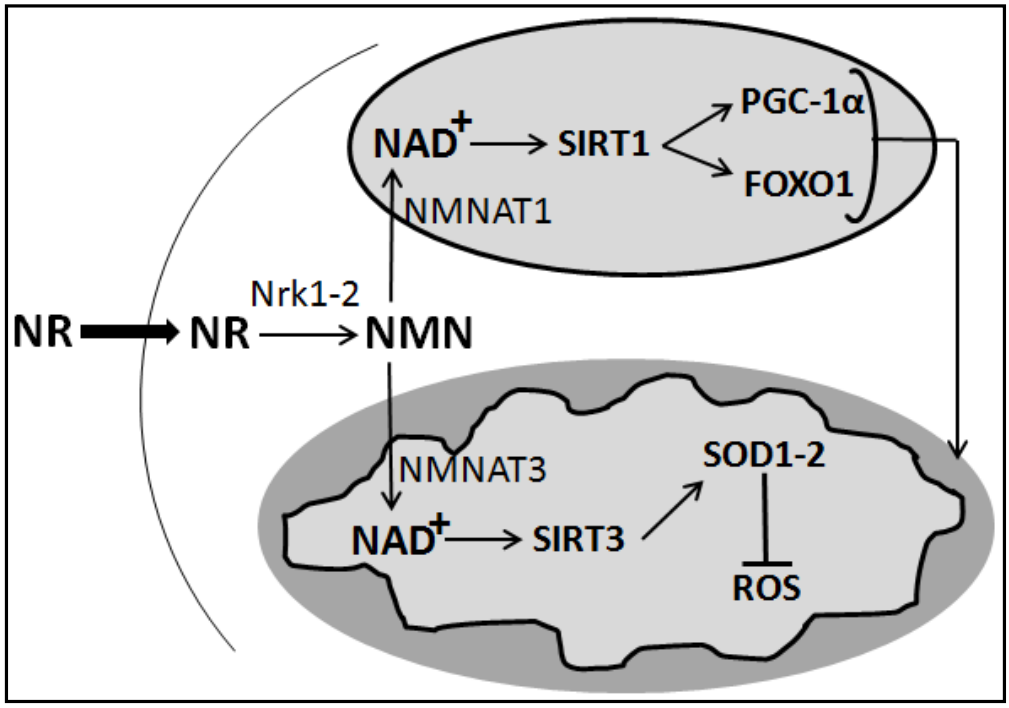

Figura 20: Schema rappresentativo dall'effetto protettivo stimolato da NR

In particolare SIRT1 deacetila e quindi attiva i fattori trascrizionali FOXO1 e PGC-1alpha, il primo favorisce l'aumento dell'ossidazione degli acidi grassi [63] , ed il secondo induce un'aumentata biogenesi mitocondriale. Questi due effetti forniscono protezione contro l'obesità indotta da una dieta ricca di grassi e/o disordini metabolici

SIRT3 nei mitocondri stimola l'espressione di specifici geni target come sod1 e sod2. Il gene sod1 codifica per la proteina superossido dismutasi 1 o superossido dismutasi rame e zinco dipendente (SOD1 o CuZnSOD) mentre sod2 codifica per l'enzima mitocondriale superossido dismutasi 2, anche conosciuta come superossido dismutasi manganese dipendente (SOD2 o MnSOD). I due isoenzimi

catalizzano la conversione del superossido (O_2^-) in perossido d'idrogeno (H_2O_2) e diossigeno (O_2) [64]:

$$O_2^- + O_2^- + 2H \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Tale reazione permette di eliminare specie reattive all'ossigeno (ROS) e quindi conferisce protezione dal danno ossidativo.

Negli esperimenti in vivo, ad un gruppo di topi è stata somministrata una *"chow diet"*(CD), dieta standard addizionata e non addizionata di NR 400 mg/kg/giorno, mentre ad un secondo gruppo di topi è stata somministrata una "*high fat diet"* (HFD), cioè una dieta ricca di grassi, supplementata e non di NR 400 mg/kg/giorno. Dopo 8 settimane sono state effettuate diverse analisi. La differenza più significativa è stata osservata nel peso corporeo [63] (figura 21).

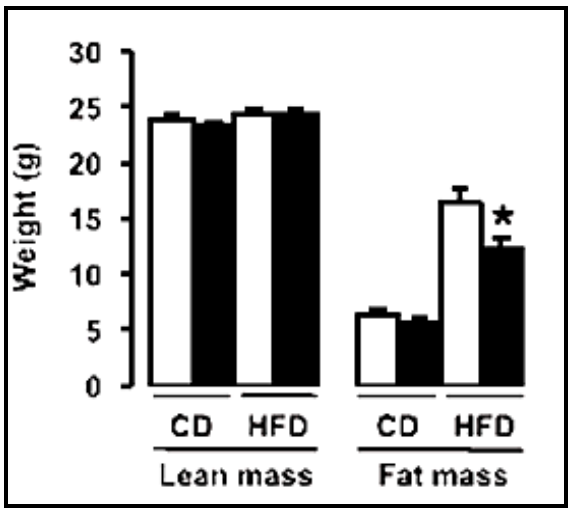

Figure 21. Le barre bianche si riferiscono ai topi che hanno seguito la dita in assenza di NR, le barre nere si riferiscono ai topi che hanno seguito la dieta supplementata di NR

Infatti, nei topi che hanno seguito la dieta supplementata di NR è stata osservata una significativa riduzione di massa grassa, che non viene ridistribuita in altri tessuti; inoltre questi topi appaiono più attivi e resistenti, presentano elevata capacità termogenica in seguito ad esposizione al freddo che può essere correlata all'aumento del metabolismo ossidativo. Il loro fegato mostra una riduzione del contenuto di trigliceridi del 40%. I livelli di NAD sono risultati elevati nei muscoli, nel fegato e nel tessuto adiposo bruno (BAT) e di conseguenza è stata misurata una maggiore attività delle sirtuine. Gli organi in cui sono stati riscontrati questi effetti sono proprio quelli in cui sono maggiormente espressi gli enzimi NRK1 ed NRK2, in linea quindi con la maggior possibilità di questi di assorbire NR [65]. L'assunzione della NR induce aumento della biogenesi mitocondriale, ed in particolare, dall'analisi microscopica delle cellule del BAT si osservano dei mitocondri con alta densità di creste che corrisponde all'aumento della capacità ossidativa.

1.7.2 Protezione da disordini mitocondriali

L'aumento della biogenesi mitocondriale indotto da NR potrebbe essere sfruttato nel trattamento di malattie che interessano i mitocondri. A tal proposito è stato studiato l'effetto che NR produce in topi affetti da miopatia mitocondriale (MM) [66], una malattia genetica causata da delezioni aspecifiche nel DNA mitocondriale (mtDNA); i mitocondri assumono una struttura distorta ed anomala

che è causa di disfunzione della catena respiratoria. Gli individui affetti da MM mostrano sintomatologia molto variabile, ma in generale sviluppano tutti la progressiva perdita della motilità muscolare, che con più frequenza sembra interessare occhi e cuore; la patologia nello stadio finale conduce alla paralisi completa delle funzioni motorie. L'effetto protettivo di NR nei confronti della MM è stato studiato in topi modello che in seguito a delezioni genetiche indotte nel mtDNA del muscolo scheletrico e del cervello hanno sviluppato MM al dodicesimo mese dopo la nascita. In seguito alla comparsa di MM alcuni di questi topi sono stati nutriti per 9 mesi continuativi con una dieta a cui è stata addizionata NR nel dosaggio di 400mg/kg/giorno. L'analisi microscopica dei mitocondri del muscolo scheletrico ha rilevato delle significative differenze tra i topi nutriti con la dieta supplementata di NR ed i topi di controllo sottoposti alla stessa dieta, ma priva di NR (Figura 22 A-B).

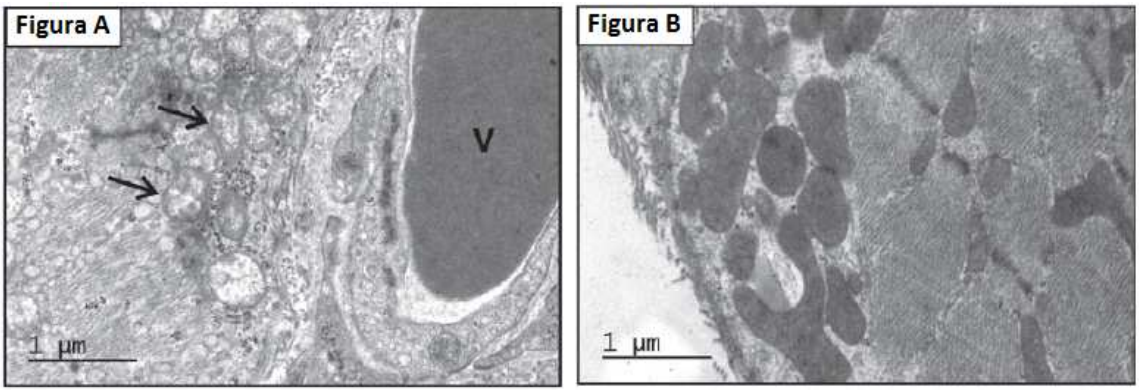

Figura 22. A. Mitocondri del tessuto quadricipite femorale di topi affetti da MM. Le frecce evidenziano i mitocondri con struttura distorta per effetto della patologia. **B:** Mitocondri del tessuto quadricipite femorale di topi affetti da MM a cui è stata somministrata la dieta addizionata con NR. I mitocondri sono di dimensioni normali e le zone scure all'interno dimostrano la maggiore densità di creste mitocondriali.

I mitocondri dei topi affetti da MM mostrano una struttura distorta con le creste mitocondriali concentriche, mentre i mitocondri dei topi affetti da MM che hanno seguito la dieta a cui è stata addizionata NR hanno una struttura normale ed un alta densità di creste mitocondriali. Anche in questi topi la somministrazione di NR induce alti livelli di NAD che attivano SIRT1 nella deacetilazione del fattore trascrizionale PGC-1alfa, responsabile dell'aumento della biogenesi mitocondriale nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo.

I topi affetti da MM a cui è stata somministrata NR presentano una significativa regressione della patologia; infatti questi topi sottoposti

ai test delle capacità motorie che prevedono periodi di corsa prolungati presentano un'aumentata resistenza. Inoltre i topi mostrano anche un'aumentata respirazione o velocità di scambio, che è stata misurata comparando il consumo di O_2 e produzione di CO_2 durante il giorno/notte e dopo esposizione al freddo. Il peso del fegato risulta mantenersi stabile (≈1,2g) e la concentrazione di alanina amminotransferasi (ALAT) nel sangue a valori standard, indica che il fegato non ha subito danni.

E' stato anche dimostrato che gli elevati livelli di NAD indotti da NR stimolano la risposta UPR^{mt} (mitochondrial unfolded protein response). In particolari condizioni cellulari provocate da patologie come la MM o dalla condizione di "*starvation*" si determina uno squilibrio tra le proteine nucleari e quelle mitocondriali, questo sbilanciamento "*mitonucleare*" attiva l' UPR^{mt}, uno specifico meccanismo altamente conservato nei mammiferi e nei vermi che genera una risposta nucleare volta al ripristino delle funzioni mitocondriali [67]. E'stato inoltre dimostrato che l'induzione di questo processo cellulare può attenuare gli effetti provocati dalla MM.

1.7.3 Effetti Neuroprotettivi

Varie ricerche sono state rivolte allo studio degli effetti di NR nel trattamento di malattie neurodegenerative, come L'Alzheimer [68] . Questa patologia prevede la formazione di placche amiloidi nella zona dendritica e sulla superficie delle cellule neuronali della corteccia

cerebrale, che ne ostacolano la neurotrasmissione. I malati di Alzheimer sviluppano col tempo progressiva perdita di memoria e della capacità cognitiva che porta alla demenza. E' stato dimostrato che l'NR somministrata a modelli di topo malati di Alzheimer induce aumento di NAD nelle cellule neuronali con conseguente maggiore attività di SIRT1 nel deacetilare PGC-1alfa (come schematizzato in Figura 20). Questo fattore trascrizionale gioca un ruolo regolatorio cruciale nella formazione e accumulo delle placche Aβ-amiloidi, infatti in seguito alla sua deacetilazione induce l'espressione di BACE (beta-site APP-Cleaving Enzyme), uno specifico enzima, che degrada le placche amiloidi in APP (Amiloid Precursor Protein), frammenti polipeptidici a più basso peso molecolare.

A topi modello Tg2576, malati di Alzheimer, sono stati somministrati 250mg/kg/giorno di NR sciolti in acqua per 3 mesi (un dosaggio equivalente a 1300 mg/kg/giorno per l'uomo). Le funzioni cognitive dei topi sono state valutate mediante test standardizzati dai quali è emersa una maggiore capacità cognitiva dei topi che hanno assunto la vitamina. Nella corteccia cerebrale di questi topi è stato dimostrato l'aumento della concentrazione del NAD e dell'espressione di PGC1-alpha. L'analisi stereologica dei tessuti cerebrali ha dimostrato la minor presenza di placche amiloidi e mediante saggio ELISA è stata dimostrata significativa riduzione dei livelli di Aβ-amiloidi (Figura 23).

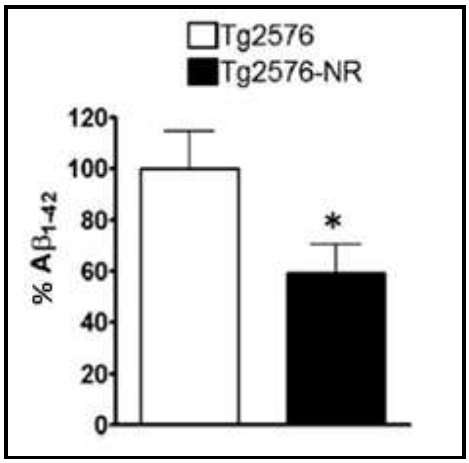

Figura 23: Livelli di Aβ-amiloidi nei neuroni.

L'NR è stata dimostrata indurre anche degli effetti benefici nel prevenire la perdita dell'udito causato da esposizione a rumore [69]. In diversi studi è stato dimostrato che la persistente esposizione a rumore genera il danneggiamento di alcune strutture della coclea, in particolare il rumore provoca la rottura e degenerazione delle fibre nervose dei gangli spirali, che perdono i loro contatti sinaptici con le cellule ciliate interne ed esterne [70]. La connettività sinaptica tra gangli spirali e cellule ciliate è di centrale importanza in quanto mantiene attive le capacità uditive. I neuriti nella coclea possono degenerare rapidamente nelle 24 hr che seguono il trauma acustico ed in particolare nei mitocondri dei gangli spirali si formano specie reattive all'ossigeno [71, 72]. E' stato dimostrato che la somministrazione di NR preserva l'integrità dei contatti sinaptici tra i neuriti e le cellule dell'orecchio, inducendo l'aumento di NAD e l'aumento di attività di SIRT3 nei mitocondri. La maggior attività di

SIRT3 è stata dimostrata associata ad un aumento dell'attività della glutatione perossidasi (GPX) che catalizza la riduzione dei ROS secondo la reazione schematizzata in FIigura 24.

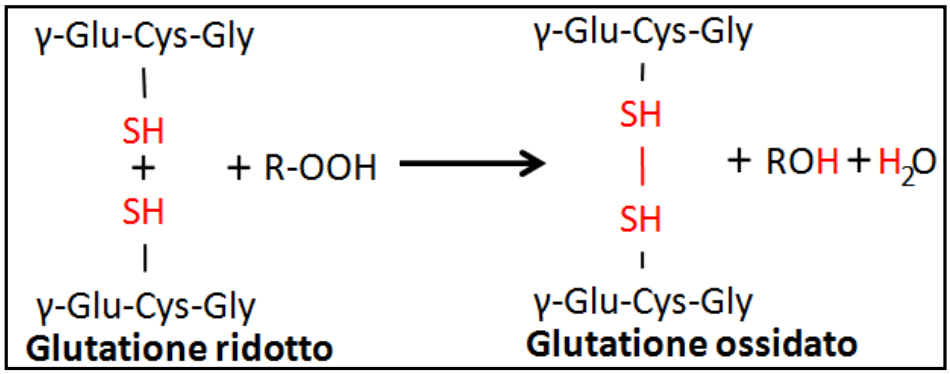

Figura 24: Reazione di riduzione delle ROS catalizzata dal GPX

Negli esperimenti sono stati utilizzati dei topi *wild type* a cui è stato causato un trauma acustico mediante esposizione a rumore (90db) per 2hr. Dopo 24hr è stata testata la loro risposta a degli stimoli uditivi di diversa intensità: 8000HZ, 10db; 16000Hz 21db; 32000Hz 38db. Se il topo in esame non percepisce gli stimoli uditivi per 24hr dopo l'induzione del trauma, allora il danno è considerato transiente, mentre se il topo non percepisce gli stimoli uditivi per un tempo superiore a 14 giorni dopo l'esposizione al trauma, il danno è considerato permanente. Per valutare gli effetti protettivi di NR, ad un gruppo di questi topi sono stati iniettati 1000mg/Kg NR per 5 giorni prima del danno acustico e/o per 14 giorni dopo il danno acustico. Dai grafici riportati in Figura 25 si osserva come, a differenza dei topi di controllo, i topi trattati con NR riescono a percepire stimoli uditivi a valori di ≈ 20db in tutte e tre le frequenze testate.

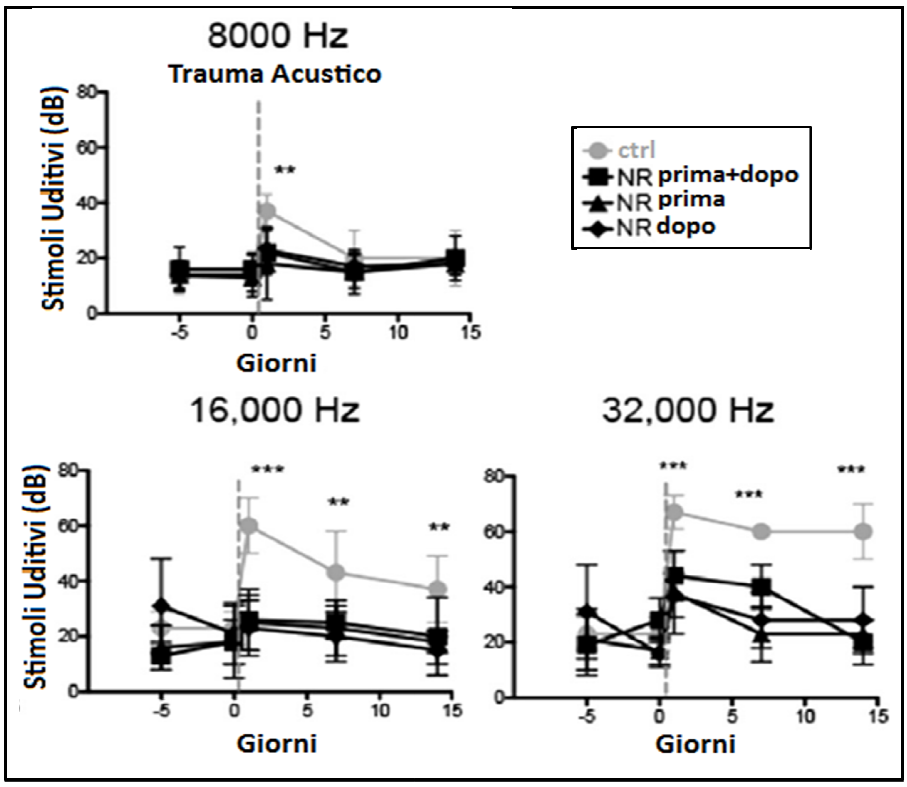

Figura 25: Risposta dei topi agli stimoli uditivi dopo il trauma acustico.

Altri risultati mostrano che i livelli di NAD diminuiscono del 60% in seguito al trauma acustico e mediante l'analisi microscopica con dei marcatori immunofluorescenti è stato dimostrato il distacco dei neuriti dalle cellule ciliate interne. Figura 26.

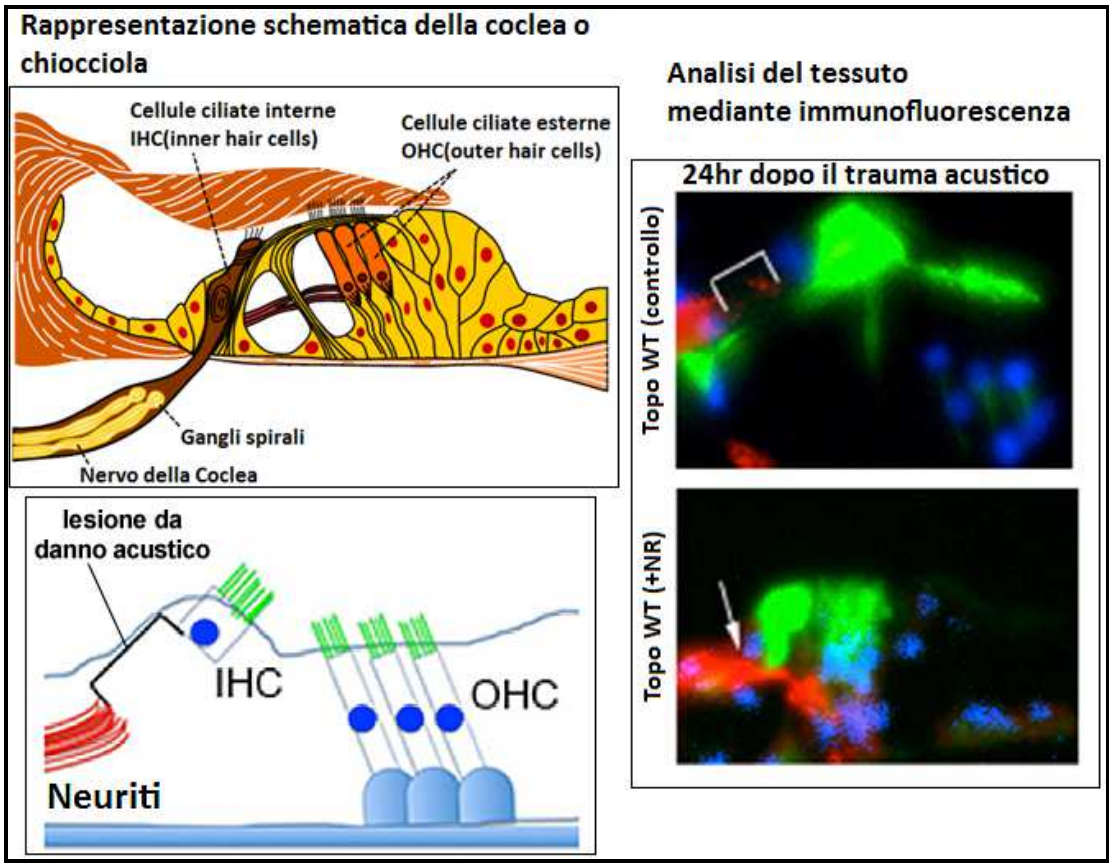

Figura 26: Analisi della coclea mediante immunofluorescenza. Gangli sprirali in rosso (staining con anticorpo anti-NF2000), nuclei delle cellule ciliate interne in blu (staining con DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole), Actina in verde (staining con anti-actnina)

I neuriti dei topi non trattati per effetto della degenerazione della zona sinaptica indotta dal danno acustico si ritraggono di 29.5 ± 12.9 μm dopo 24 hr, e di 23 ± 3.6 μm dopo 14 giorni; mentre nei topi a cui è stata somministrata NR il distacco dei neuriti dalle cellule ciliate è significativamente più attenuato; infatti si ritraggono di 4.3 ± 4.5 μm dopo 24hr dal trauma e di 4.3 ± 4.5 μm dopo 14 giorni dal trauma.

1.7.4. Effetti sulla longevità cellulare

La somministrazione di NR si riflette anche nell'allungamento della vita cellulare [73, 74]. Esperimenti condotti su *Saccharomyces cerevisae* hanno dimostrato che addizionando il terreno di coltura di questi lieviti con NR, e l'aumento conseguente dei livelli di NAD intracellulari promuove l'attività di Sir2 che determina l'allungamento della vita di *S.cerevisae.* Sir2 infatti reprime la formazione di DNA extracromosomiale circolare, che una volta accumulato all'interno della cellula diviene dannoso procurando invecchiamento e sterilità del lievito [75].

L'allungamento della vita mediato da NR è stato dimostrato anche in linee cellulari umane come Hepa1.6, ed HEK293T e in alcuni organismi. Ad esempio l'aumento dei livelli di NAD e/o il suo ripristino stimolato da NR in *Caenorhabditis elegans* previene i disordini metabolici associati all'invecchiamento e la somministrazione di NR per lunghi periodi porta all'allungamento del tempo di vita del verme. Gli effetti benefici in *Caenorhabditis elegans* sono dovuti all'aumento di attività di Sir-2 (omologo di SIRT1), che pruomuove l'UPR^{mt}. La risposta allo squilibrio tra proteine mitocondriali e proteine nucleari produce infatti anche l'attivazione di chaperonine che intervengono nel ripiegare correttamente le strutture proteiche denaturate, questi processi portano all'allungamento del tempo vita. Inoltre l'aumento di attività di Sir-2 si riflette nella deacetilazione di FOXO1 che è traslocato nel nucleo dove attiva il

fattore trascrizionale DAF-16, e la conseguente trascrizione di *sod-3*. SOD3 è un enzima appartenente alla famiglia delle superossido dismutasi che è deputato a reprimere la formazioni di ROS nei mitocondri [67].

Gli effetti benefici di NR nello stimolare longevità negli organismi viventi ha suscitato l'interesse di alcuni studiosi nell'utilizzare questa vitamina per rallentare la senescenza di cellule staminali [76]. Le cellule staminali durante lo sviluppo fetale si dividono rapidamente per supportare una crescita velocissima, che rallenta e cessa subito dopo l'adolescenza; a questo punto la maggior parte delle cellule staminali diventa quiescente dividendosi ad intermittenza per mantenere l'equilibrio tissutale. Le cellule staminali adulte sono essenziali nel rigenerare i tessuti, sono però suscettibili a senescenza durante l'invecchiamento. La quantità di cellule staminali non diminuisce necessariamente con l'età, in quanto esse sono capaci di rigenerarsi, ma la loro funzione di produrre cellule progenitrici e diversi tipi di cellule staminali adulte è compromessa durante l'invecchiamento. Anche se non è stato ancora spiegato il complesso meccanismo mediante il quale la funzione mitocondriale regola la senescenza delle cellule staminali, è stato attualmente dimostrato che l'attività dei mitocondri è strettamente legata al mantenimento delle cellule staminali muscolari (MuSCs) [77] ed analogamente, disfunzioni mitocondriali sono considerate un *biomarker* di senescenza in queste cellule. Il trattamento con NR, che aumenta

l'attività mitocondriale, ed è risultato efficace nel modulare la senescenza delle MuSCs, di cellule staminali neuronali e dei melanociti [78, 79]**.** In un recente lavoro sono state individuate le disfunzioni mitocondriali che la senescenza produce nelle MuSCs. Dall'analisi dei geni delle MuSCs di topi anziani (≈ 24 mesi dalla nascita) e giovani (≈ 3mesi dalla nascita) è stato possibile dimostrare che la senescenza riduce significativamente l'espressione di enzimi coinvolti nel ciclo degli acidi tricarbossili (TCA) e nella fosforilazione ossidativa (OXPHOS). Tra le varie disfunzioni mitocondriali indotte dalla senescenza è stata osservata anche perdita del potenziale di membrana dei mitocondri e riduzione della concentrazione di ATP. Inoltre sono stati individuati diversi biomarkers e/o regolatori dell' UPR^{mt}, che si attiva in risposta allo stress delle funzioni mitocondriali. In seguito al trattamento con NR, somministrata per 6 settimane ai due gruppi di topi (anziani e giovani), si è osservato un significativo aumento del numero delle MuSCs; i due gruppi di topi hanno mostrato una resistenza maggiore durante la corsa per tempi e/o distanze prolungate. Nei topi anziani la somministrazione di NR induce l'espressione dei geni coinvolti nel TCA e nell' OXPHOS e riduce i livelli di mRNAs codificante per CDKN1A, una proteina regolatrice del ciclo cellulare, la cui espressione viene indotta durante la senescenza. Inoltre è stata dimostrato aumento dell'espressione di proibitine ed altri marcatori dell'UPR^{mt}. Le proibitine svolgono la funzione di chaperonine come mtHSP70, HSP60, and HSP10 e

vengono quindi coinvolte nella regolazione della funzione e morfologia mitocondriale. L'effetto indotto da NR nell'aumento della replicazione delle MuSCs potrebbe essere sfruttato nel trattamento di malattie che interessano il muscolo scheletrico. Infatti MuSCs di topi anziani che hanno seguito il trattamento con NR sono state trapiantate in modelli di topo affetti da distrofia muscolare (*Mdx*). E' stato osservato che queste MuSCs stimolano nel ricevente la miogenesi delle fibre muscolari scheletriche e la rigenerazione del tessuto muscolare, che contrastano la graduale perdita delle funzioni muscolari indotte dalla patologia. Dall'analisi d'immunofluorescenza effettuata sul muscolo scheletrico dei topi Mdx in seguito al trapianto delle MuSCs provenienti da topi donatori a cui è stata somministrata NR è visibile la maggior presenza di distrofina.

Nelle fibre muscolari la distrofina presiede alla formazione di un complesso proteico che connette il citoscheletro di una fibra muscolare alla matrice extracellulare circostante attraverso la membrana cellulare, la mancanza di distrofina è una delle cause della distrofia muscolare. (Figura 27).

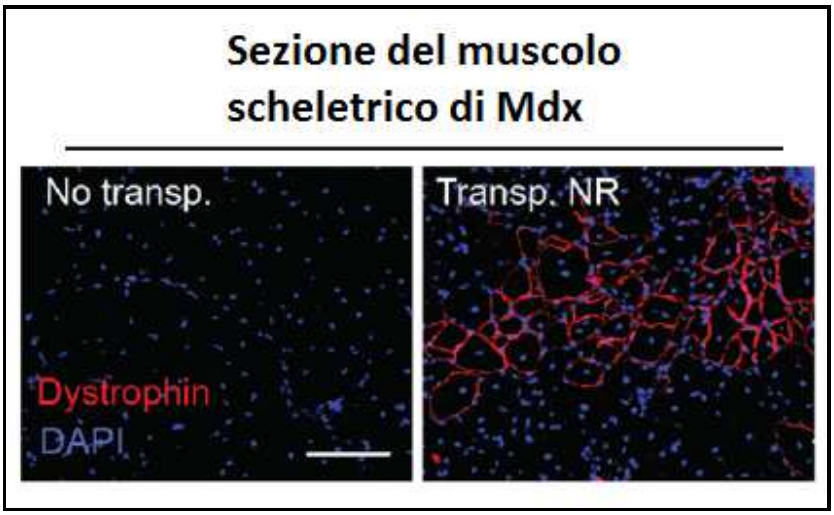

Figura 27: Analisi mediante immunofluorescenza della sezione di muscolo scheletrico di *Mdx* prima e dopo 4 giorni dal trapianto di cellule MuSCs . Distrofina in rosso (immunostaining con anticorpo anti-Dystrophin) nuclei delle cellule MuSCs (immunostaining con DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole)

Per capire il meccanismo attraverso cui NR aumenta le funzioni mitocondriali di MuSCs in senescenza, è stato effettuato un esperimento che ha coinvolto dei topi mutanti ($SIRT1^{MuSC-/-}$). Questi topi sviluppano delle MuSCs (*SIRT1-knockout*) cioè che non possono esprimere SIRT1. La somministrazione di NR a questi topi non ha avuto effetto sulle funzioni mitocondriali e la replicazione delle MuSCs. I risultati dimostrano l'effetto di NR è mediato da SIRT1.
Gli esperimenti descritti mettono in luce le proprietà anti-ageing della Nicotinamide Riboside, che è attualmente considerato un supplemento alimentare in grado di allungare il tempo di vita degli esseri viventi.

2. SVILUPPO DI UN NUOVO SAGGIO ENZIMATICO PER L ANALISI SIMULTANEA DI NR, NMN E NAD NEL LATTE.

Le tre forme della vitamina B3, la Nicotinamide Riboside, la Nicotinamide e l'Acido Nicotinico, possono essere assunte mediante la dieta come tali oppure possono derivare dalla digestione del NAD e/o dell' NMN ottenuta mediante l'azione combinata di enzimi nella del microbiota intestinale [80]. Una volta assunte, tutte e tre le vitamine diventano precursori del NAD, che rappresenta la forma biologicamente attiva. Negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato come la somministrazione dell'NR e del suo diretto precursore NMN determina un significativo aumento del contenuto intracellulare di NAD in molti tessuti e organi murini, che si riflette in un miglioramento del metabolismo energetico e delle funzioni mitocondriali. Per questo motivo la supplementazione della dieta con NR è oggi considerata un mezzo promettente per il trattamento di malattie metaboliche, mitocondriali e disordini neurodegenerativi. Dati gli effetti benefici attribuiti all'aggiunta di questa vitamina nella dieta, risulta importante comprendere la sua distribuzione negli alimenti al fine di stabilire quali ne sono ricchi e quindi quali potrebbero indurre gli stessi effetti. La scarsità d' informazioni sul contenuto della NR e dell' NMN negli alimenti è essenzialmente dovuta all'assenza di metodi adatti alla loro determinazione. Ad oggi in letteratura non sono riportati dati che dimostrano la presenza di

NMN negli alimenti, mentre tracce di NR sono state rilevate nel latte mediante un saggio microbiologico. Il saggio fa uso di un ceppo mutante di *S.cerevisiae*, auxotrofo per la nicotinammide riboside. La crescita di questo lievito mutante in un terreno addizionato di siero da latte bovino ha dimostrato la presenza di NR in questa matrice alimentare. Tuttavia i livelli della vitamina non sono stati quantizzati. Oltre al saggio microbiologico [74] è stato sviluppato un metodo LC-MS [81] che ha consentito la quantizzazione di NR, NMN e NAD in estratti cellulari di lievito.

Né il metodo microbiologico, né quello cromatografico sono mai stati applicati per lo screening di questi analiti negli alimenti. Si tratta in effetti di metodi lunghi e dispendiosi. Il saggio microbiologico prevede inoltre l'utilizzo di microrganismi opportunamente ingegnerizzati per crescere solo in presenza di NR, ed è quindi vincolato all'uso di specifici ceppi di batteri o lieviti. Il metodo basato sull'utilizzo della cromatografia LC/MS è di elevata sensibilità ma richiede costi elevati.

In effetti manca ad oggi un metodo che consenta lo screening accurato e sensibile della nicotinammide riboside in fonti alimentari. Tale metodo dovrebbe richiedere ridotti tempi d'analisi, essere di basso costo, pratico ed adatto per una possibile automatizzazione.

L'obiettivo del mio lavoro di tesi è stato lo sviluppo di un metodo alternativo a quelli precedentemente descritti, sensibile, accurato e

veloce per la simultanea quantificazione dell'NR, NMN e NAD negli alimenti.

Parte dei risultati ottenuti in questo lavoro di tesi sono stati oggetto della pubblicazione che segue. Nell'articolo è descritto il principio del metodo che è stato sviluppato che si basa su di un saggio enzimatico fluorimetrico applicato alla determinazione del contenuto dei tre analiti in latti di diverse specie animali, compreso l'uomo.

Simultaneous quantitation of nicotinamide riboside, nicotinamide mononucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide in milk by a novel enzyme-coupled assay

Simone Ummarino[a], Massimo Mozzon[a], Federica Zamporlini[a], Adolfo Amici[b], Francesca Mazzola[b],Giuseppe Orsomando[b], Silverio Ruggieri[a], Nadia Raffaelli[a*]

[a]Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, Ancona 60131, Italy;

[b]Department of Clinical Sciences, Section of Biochemistry, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, Ancona 60131, Italy;

*Corresponding Author: Raffaelli Nadia, Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Via Brecce Bianche, 60131, Ancona, Italy. Tel.:(039) 071 2204 682; Fax: (039) 071 2204 677;

Abbreviated running title:B3 vitamers quantitation in milk

Manuscript accepted for publication on Food Chemistry (2016) 10.032

ABSTRACT

Nicotinamide riboside, the most recently discovered form of vitamin B3, and its phosphorylated form nicotinamide mononucleotide, have been shown to be potent supplements boosting intracellular nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) levels, thus preventing or ameliorating metabolic and mitochondrial diseases in mouse models. Here we report for the first time on the simultaneous quantitation of nicotinamide riboside, nicotinamide mononucleotide and NAD in milk by means of a fluorometric, enzyme-coupled assay. Application of this assay to milk from different species revealed that the three vitamers were present in human and donkey milk, while being selectively distributed in the other milks. Human milk was the richest source of nicotinamide mononucleotide. Overall, the three vitamers accounted for a significant fraction of total vitamin B3 content. Pasteurization did not affect the bovine milk content of nicotinamide riboside, whereas UHT processing fully destroyed the vitamin. In human milk, NAD levels were significantly affected by the lactation time.

Keywords: vitamin B3, nicotinamide riboside, nicotinamide mononucleotide, NAD, milk, nucleotides, optical assay

1. INTRODUCTION

Following their discovery in 1937 (Elvehjem, 1937), nicotinamide (Nam) and nicotinic acid (NA), collectively known as niacin or vitamin B3, have been long thought to be the only dietary precursors for the synthesis of the coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). In 2004, however, the ribosylated form of nicotinamide, *i.e.* nicotinamide riboside (NR), was found to be able in yeast to efficiently replace Nam and NA for NAD biosynthesis (Bieganowski & Brenner, 2004). Moreover, it was observed that NR administration to several cultured mammalian cell types was able to significantly increase the intracellular NAD content (Yang, Chan & Sauve, 2007), thus pointing to the involvement of NR in NAD biosynthesis also in mammals. Indeed, more recent results demonstrated that mice fed synthetically derived NR showed increased NAD levels in muscle and liver (Canto et al., 2012). The phosphorylated form of NR, *i.e.* nicotinamide mononucleotide (NMN), is also a very efficient extracellular precursor for NAD synthesis (Yoshino, Mills, Yoon & Imai, 2011). It is still matter of debate whether it enters the cell as such, or it is previously dephosphorylated to NR.

Noteworthy, NR and NMN administration to mice was found to recapitulate all the beneficial biological effects deriving from the increase of intracellular NAD content. Indeed, through

increasing NAD bioavailability, NR and NMN administration enhance the activity of the NAD-dependent deacylases sirtuins, thus promoting their signaling cascades, ultimately resulting in a strong protection against diet- and age-induced metabolic abnormalities (Canto, Menzies & Auwerx, 2015; Ruggieri, Orsomando, Sorci & Raffaelli, 2015). In particular, NR administration to different mice models of mitochondrial myopathy has been shown to induce the mitochondrial biogenesis in specific tissues and to ameliorate the hallmarks of the myopathy (Cerutti et al., 2014; Khan et al., 2014). Likewise, NR supplementation to mice models of Alzheimer disease (AD) reduces the amiloid toxicity and markedly attenuates the cognitive deterioration (Gong et al., 2013). In support of the NR neuroprotective role are also the studies demonstrating that NR administration to mice reduces neurite degeneration caused by noise exposure (Brown et al., 2014). On the other hand, NMN administration reduces the lesion volume and attenuates the neuronal loss following traumatic brain injury (Zhang et al., 2015) and improves the mitochondrial bioenergetics in AD mice (Long, Owens, Schlappal, Kristian, Fishman & Schuh, 2015). Altogether these findings suggest that NR and NMN supplementation might be of therapeutic value for the treatment of metabolic and mitochondrial diseases, including neurodegenerative disorders.

It is known that supplementation of the other two forms of vitamin B3, *i.e.* Nam and NA, is also able to increase NAD levels with tissue-specificity, and several clinical studies have been performed to evaluate the two vitamins as possible therapeutic agents (Sauve, 2008). Indeed, NA is a currently used hypolipidemic drug, while Nam treatment can have beneficial effects against obesity and type-2 diabetes (Yang et al., 2014). However, the clinical use of NA can induce cutaneous flushing, and Nam, at the doses that elevate NAD levels, can cause hepatototoxicity (Kang-Lee, McKee, Wright, Swendseid, Jenden & Jope, 1983). Therefore, much interest is currently devoted to the potential therapeutic value of NR and NMN supplementation and, in this view, their abundance in nutritional sources surely deserves to be explored.

Figure 1 outlines the dietary pyridines that can be used as precursors for the biosynthesis of intracellular NAD. The available information indicate that NR, Nam and NA can be found as such in the diet or they can be formed from dietary NAD through a combined action of enzymes of the intestinal mucosa and the gut microbiota (Bogan & Brenner, 2008).

NR was discovered to be present in milk thanks to the finding that a yeast NR-auxotroph strain was able to grow when supplemented with an acid whey fraction of cow's milk (Bieganowski et al., 2004). In addition, the presence of NR has

been hypothesized in fermented food, including beer, since the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is known to actively secrete the vitamin (Bogan et al., 2009; Lu, Kato & Lin, 2009). However, no quantitative assessment of the vitamin has been reported so far, neither in milk nor in any other food. As far as NMN is concerned , there are no data on its presence and quantitation in milk, as well as in any other food sources. In a study on yeast metabolomics, a method has been developed to quantify NR and NMN by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (Evans, Bogan, Song, Burant, Kennedy & Brenner, 2010). Hence, the only available methods for the quantitation of these analytes are expensive and time consuming, as they are based on microbiological assay and LC-MS. Here we report a sensitive, rapid and cheap method based on an enzyme-coupled assay that makes use of an ordinary spectrofluorometric equipment for the simultaneous quantitation of NR, NMN and NAD. We exploited the assay to measure the concentration of these analytes in milks from different dairy species, including bovine, buffalo, ewe, goat and donkey, and in human milk.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Preparation of the NR standard

NR is not commercially available and thus we produced it by treatment of NAD with a partially purified preparation of

alkaline phosphatase from calf intestine (Grade II, AppliChem GmbH). The reaction mixture contained 70 mM NAD, 100 mM (hydroxymethyl)aminomethane chloridate (TRIS/HCl), pH 8.0, 20 mM $MgCl_2$ and 40 Units alkaline phosphatase, in a final volume of 0.3 ml. After 20 hours incubation at 37°C, 0.15 ml cold $HClO_4$ were added to stop the reaction. After 5 min on ice, the sample was centrifuged at 16,000 x g for 3 min at 4°C, the supernatant was neutralized with 1M K_2CO_3, kept on ice for 10 min, and centrifuged as above. We found that under these conditions NAD was completely hydrolyzed to NR and inosine. Indeed, monitoring of the reaction through high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of aliquots withdrawn from the incubation mixture at different times showed that the preparation of alkaline phosphatase contained three activities: a dinucleotide pyrophosphatase, able to split NAD to AMP and NMN, the alkaline phosphatase, yielding adenosine and NR, and adenosine deaminase, converting adenosine to inosine. NR and inosine were separated by loading 50-µl aliquots of the neutralized supernatant onto a Phenomenex C18 Kinetex column (2.6 µm, 4.6 x 150 mm), eluted as described (Grozio et al., 2013). Fractions containing NR were pooled, dried and stored at -20°C.

2.2 Expression and purification of the ancillary enzymes NR kinase and NMN adenylyltransferase (NMNAT)

For NR kinase preparation, PT7-7 vector harbouring *E. coli nadR* gene (Raffaelli et al., 1999) was digested with *Nde*I and *Hind*III restriction enzymes and *nadR* was ligated into pET-28c vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), previously digested with the same enzymes. *E. coli* BL21 cells transformed with the recombinant plasmid were grown in Luria Bertani medium supplemented with kanamycin at 0.05 mg/ml, at 37°C until an optical density at 600nm of 0.6. After 20 min at 25°C, 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside was added to the culture to induce protein expression. After overnight growth at 25°C, cells were harvested by centrifugation and pellets were resuspended in one-fiftieth of the initial culture volume of lysis buffer, consisting of 20 mM TRIS/HCl, pH 8.0, 1.0 mM $MgCl_2$, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 150 mM NaCl, 1 mM tris(2-carboxyethyl) phosphine, containing 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride and 0.002 mg/ml each of leupeptin, antipain and chymostatin protease inhibitors. The suspension was sonicated three times for 1 min at 50 W, with 1-min intervals, and centrifuged at 20,000 x *g* for 20 min at 4°C. The supernatant obtained from 300 ml culture was applied to a HisTrap HP column (1 ml resin, GE Healthcare, Freiburg, Germany) equilibrated with 50 mM TRIS/HCl, pH 7.5, 0.15 M

NaCl, 5 % glycerol (buffer A), containing 10 mM imidazole. After washing with 25 mM imidazole in buffer A, elution of the recombinant proteins was carried out using 450 mM imidazole in buffer A. Active fractions were pooled and stored at -20°C. The NR kinase activity was measured spectrophotometrically by the NMNAT-coupled assay as described (Kurnasov et al., 2002) with minor modifications. In particular, the reaction mixture contained 1 % v/v ethanol, 70 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.5, 8.4 mg/ml semicarbazide/HCl, 20 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 0.2 mM NR, 0.03 Units mouse NMNAT3 (isoform 3), 8.0 Units alcohol dehydrogenase (ADH), 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA).

Expression and purification of mouse NMNAT3 was performed as previously described (Orsomando et al., 2012). The enzymatic activity was assayed by the spectrophotometric coupled-assay described in (Balducci et al., 1995).

One Unit (U) of NR kinase and NMNAT is defined as the amount of enzyme catalyzing the formation of 1 μmol product per min at 37°C.

2.3 Conversion of NR and NMN to NAD and fluorometric detection

0.15 ml of standard solutions of NR and NAD ranging from 0 to 0.3 μM were acidified and neutralized as described in section

2.4 for the preparation of the nucleotide extracts. 40 µl of each nucleotide extract were incubated in the presence of 70 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM $MgCl_2$, 2.5 mM ATP, 0.55 mg/ml BSA, 2.5 mU NR kinase and 10 mU NMNAT3, in a final volume of 145 µl, in the wells of a microplate reader. After 20 min at 37°C, 95 µl cycling reagent were added to each sample to start the NAD cycling reaction. Preparation of the cycling reagent and monitoring of the fluorescence increase in each sample were performed as previously described (Zamporlini, Ruggieri, Mazzola, Amici, Orsomando & Raffaelli, 2014).

2.4 Preparation of milk nucleotide extracts

Samples of raw bovine, ovine, caprine, buffalo and donkey milk from 4 different individuals were collected from local dairy farms and stored at -20°C until analyses. Samples of human milk were collected from four healthy volunteer mothers at 60-120 days lactation. For the study of the influence of the lactation time on the analytes' concentration, samples from those two mothers who had been breasting for about 60 days were collected in the middle of each feed over a 24-h period, and stored at –20°C until assayed. Milk samples were skimmed by centrifugation at 3,000 x *g* for 30 min at 15°C. Nucleotides were extracted as described in (Ferreira, Mendes, Gomes, Faria & Ferreira, 2001). Briefly, 0.15 ml aliquots of skimmed milk were

added to 0.1 ml of 0.33 M cold $HClO_4$. After centrifugation at 2,300 x *g* for 10 min, at 4°C, 0.15 ml of the supernatants were neutralized with K_2CO_3 1.0 M. Neutralized samples were then centrifuged as described above and the supernatants were used for the coupled assay. For the validation of the analytes' extraction procedure, two identical aliquots were taken from three different bovine milk samples. To one aliquot, known amounts of NAD, NR and NMN were added (spiked milk). Both aliquots were skimmed and processed as described above for the nucleotides' extraction. A control sample, containing the three nucleotides in aqueous solution was processed in parallel. For the quantitation of the nucleotides, the processed samples were injected into a Supelcosil LC18 DB column (5 μm, 4.6 x 250 mm), eluted as described in (Balducci et al., 1995). Column temperature was maintained at 8°C. The recovery of each analyte in control and spiked samples was calculated by comparison with the amounts originally added.

2.5 Quantitation of NR, NMN and NAD in milk nucleotide extracts

Seven different assay mixtures were prepared for the simultaneous determination of the three analytes in each milk extract sample. All mixtures included 70 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM $MgCl_2$, 2.5 mM ATP and 0.55 mg/ml BSA. The

"background mixture" was devoid of the extract, which was present in all other mixtures. In the "NAD mixture", no ancillary enzymes were added. The "NMN mixture" contained NMNAT enzyme, whereas four "NR mixtures" were prepared, which contained both NMNAT and NR kinase enzymes, in the absence and in the presence of three different amounts of NR standard. After 20 min incubation at 37°C, the NAD formed in each mixture was subjected to the cycling reaction and the fluorescence increase was recorded as described in section 2.3. The NR standard curve was generated by plotting the rates of fluorescence increase obtained in the individual "NR mixtures" against the respective vitamin concentrations. In the mixtures incubated either in the absence of the ancillary enzymes, or in the presence of the sole NMNAT, or with both NMNAT and NR kinase, the fluorescence increases result from the presence of NAD, the sum of NAD and NMN, and the sum of NAD, NMN and NR, respectively. Therefore, the amount of NR in the milk extract was calculated by subtracting the rate of fluorescence increase measured in the "NMN mixture" from the intercept of the standard curve on the y-axis, and dividing the obtained value by the angular coefficient of the standard curve. The amounts of NMN and NAD in the extract were calculated by subtracting the rates measured in the "NMN mixture" and in the "NAD mixture" from the rates measured in the "NAD mixture" and in

the "background mixture", respectively, and dividing the obtained values by the angular coefficient of the standard curve. The amount of each analyte in the milk sample was finally calculated by taking into account the dilution factor resulting from the extract preparation. All the assay's steps were carried out in the wells of microtiter plates, allowing recording of the fluorescence increase in all samples simultaneously.

2.6 Analysis of the acid- and alkaline-treatment of NR and NMN

Solutions of NR and NMN standards were autoclaved for 30 min in 1N H_2SO_4 or 5N NaOH. After centrifugation, pH values were adjusted to 6.0 by using 10N NaOH or 10N HCl, respectively. Neutralized samples were filtered and injected into a Supelcosil LC18 DB column (5 μm, 4.6 x 250 mm). 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0 served as the mobile phase, at a flow rate of 1.3 ml/min. Temperature was maintained at 18°C.

2.7 Statistical analysis

Analysis of variance (one-way ANOVA; completely randomized) was performed to reveal significant differences between species in the analytes' levels. Tukey's multiple range HSD test was used for comparison of the means. Statistical

analyses were carried out with GraphPadInStat ver. 3.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. RESULTS

3.1 Principle of the coupled assay

The coupled assay enables quantitation of NR and NMN by means of their stoichiometric conversion to NAD, which is measured by a fluorometric cycling assay already described (Graeff & Lee, 2002). Basically, the assay comprises two consecutive reactions, whereby NR is first phosphorylated to NMN by the bacterial enzyme NR kinase of the NadR family, and NMN is adenylylated to NAD by the mammalian enzyme NMNAT (Figure 2). The produced NAD is finally cycled by the combined action of alcohol dehydrogenase (ADH), that reduces NAD to NADH, and diaphorase that re-oxidizes NADH to NAD, with the simultaneous conversion of resazurin into the highly fluorescent resorufin product (Figure 2). In the cycling step the rate of fluorescent resorufin production is proportional to the amount of NAD formed in the two consecutive steps, hence to the amount of either NR or NMN present in the analyzed sample.

3.2 Optimization of the coupled assay

The consistency of the assay requires the stoichiometric conversion of NR and NMN to NAD. This is achieved due to the irreversible nature of the NR kinase -catalyzed reaction, and the addition of an excess of ATP in the assay mixtures, that shifts the equilibrium of the NMNAT-catalyzed reaction towards complete NMN adenylylation. Indeed, we observed that, when the same amounts of NR and NAD were processed in parallel as detailed in section 2.3, very similar rates of fluorescence increase were monitored during the cycling reactions (Figure 3). This confirmed a stoichiometric incorporation of the vitamin and its phosphorylated form NMN into NAD. In addition, a linear correlation was observed between the rates of fluorescence increase and the nucleotides' levels (r^2 = 0.993) (Figure 3). Down to 2.0 nM analyte (0.48 pmol) could be detected in the cycling mixture, which corresponded to about 22 nM in the original sample considering that up to a maximum of 40 µl nucleotide extract could be used in the assay.

3.3 Extraction of NR, NMN and NAD from milk

Extraction of the metabolites of interest from milk samples was performed by using a previously reported procedure optimized and already validated for the measurement of purine

and pyrimidine nucleotides from milk and dairy products (Ferreira et al., 2001). The accuracy of such a procedure for the extraction of NR, NMN and NAD was assessed by processing samples of bovine milk in the absence and in the presence of added known amounts of NAD, NMN and NR, and by analyzing the extracts through HPLC chromatography, as described in section 2.4. The amount of the three analytes in the unspiked samples was below the detection limit of the method. The recovery data for each analyte are summarized in Table 1 and typical chromatograms of a control sample in comparison with unspiked and spiked milk samples are shown in Supplementary Figure S1. The results confirmed that neither the matrix, nor the extraction procedure affected the analytes' recovery.

Importantly, the extraction procedure comprised an acidification step that guaranteed complete degradation of endogenous NADH eventually present in the samples, that would otherwise interfere with the cycling step (Figure 2).

3.4 Application of the assay to the quantitation of NR, NMN and NAD in milk

In the present study, the assay was applied to the analysis of nucleotide extracts prepared from raw milks from different species. The results, summarized in Table 2, showed a marked

variability in the distribution of the analytes in the various types of milk. NAD was particularly abundant in ovine milk, and it was present in all tested human milk samples, although at significantly lower concentration. NR was detected in all bovine, buffalo, donkey and human milk samples, with no significant differences among species, while it was undetectable in ovine and caprine milks. NMN was present in all tested caprine and human milk samples, but only in some of the tested bovine, ovine and donkey milks. It was absent in all tested buffalo milk samples. Notably, the significantly highest levels of NMN were measured in human milk.

3.5 Effect of thermal treatment on NR content in bovine milk

We determined whether the content of NR and NMN in heat-treated commercial bovine milk was affected by the thermal treatments. To this end the assay was performed on commercially pasteurized and UHT-treated bovine milk from three different brands. The results showed that in the pasteurized milks NR content was 1.7 μM $\pm$ 0.15 (Mean $\pm$ SD), *i.e.* very similar to that measured in raw milks, whereas NMN was absent in all tested samples. UHT milks were found to be devoid of both NMN and NR. The results obtained for NR are consistent with its thermal stability. Indeed, we found that NR in water or added to milk was fully stable after 5 min at 75°C, whereas it

was destroyed after 5 min at 95°C. On the other hand, NMN in water or added to milk was fully stable after 5 min at 75°C and about 20% was lost after 5 min at 95°C, in contrast with the finding that it was not detected at all in the pasteurized or UHT milks. Therefore, lack of NMN in heat-treated milks did not appear to be due to its thermal degradation, rather to the absence of the analyte in the original raw milks.

3.6 Influence of the lactation time on NR, NMN and NAD content in human milk

Since nucleotides levels might show fluctuations over the 24h-period lactation (Sanchez et al., 2009), we determined the analytes' concentration in the human milk from two mothers at about 60 days lactation, at different times of the day. As shown in Figure 4, NAD levels showed two peaks at about 11:00 a.m. and 11:00 p.m. On the other hand, NR and NMN showed no significant fluctuations over the different time hours.

3.7 Effect of the acid- and alkaline treatment of NR and NMN

The official method generally used to measure the niacin content in food is a microbiological assay, whereby the food matrix is subjected to an acid or alkaline treatment at high temperature. It is known that under these conditions, Nam, NAD and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) are

converted to NA, and that the alkaline treatment also releases the NA eventually bound to polysaccharides, peptides or glycopeptides (*i.e.* niacinogen) (Sauberlich, 1987). NA in the extracted samples is then quantitated by exploiting its ability to support the growth of *Lactobacillus plantarum* (Eitenmiller, 2008). Therefore, the microbiological assay is not able to discriminate among free Nam, free NA, Nam in the form of NAD or NADP, and NA in the form of niacinogen. In this work, we tested whether NMN and NR would also generate NA when subjected to the acid or alkaline extraction procedure, as described in section 2.6. As might be expected, both NR and NMN molecules were hydrolyzed to NA (Supplementary Figure S2). These results indicate that the niacin quantitated by the microbiological assay also includes the NR and NMN eventually present in the food matrix. In Table 2 the niacin content of milks measured by the microbiological assay performed after the acidic treatment, as reported in the USDA Nutrition database, was compared with the levels of NR, NMN and NAD determined by us in this work. It can be observed that while in ovine and caprine milks, most of total niacin seems to be represented by NAD, in bovine, buffalo and human milks, NR and NMN may account for a significant amount of the total niacin content.

4. DISCUSSION

Following the recently recognized role of NR in boosting intracellular NAD biosynthesis, resulting in strong protection against metabolic and age-related disorders, the aim of this work has been the development of an assay suitable to analyze the content of the vitamin and its dietary precursors NMN and NAD in milk from different species. Milk was chosen as the matrix since the presence of NR in bovine milk had been already reported, but without a quantitative assessment (Bieganowski et al., 2004). Here, we exploited a strategy similar to that previously designed by us for the measurement of the catalytic activity of key enzymes involved in NAD metabolism (Zamporlini et al., 2014). The

assay involves the stoichiometric conversion of NR and NMN to NAD by means of two ancillary enzymes. The yielded NAD, together with the eventual NAD already present in the food matrix, is then quantitated by a fluorometric cycling step. The assay has a sensitivity comparable to that of the LC-MS assays currently available for the quantitation of these analytes (Evans et al., 2010). On the other hand, it is faster, cheaper and amenable to automation, thus opening the way to a high-throughput screening in different foods. Both ancillary enzymes can be easily obtained as fully active and stable recombinant proteins, thus overcoming the limitation of their commercial

unavailability. All the reagents could be made available in kit form, thus offering the opportunity for a further reduction of costs.

We exploited the assay to profile NR, NMN and NAD in raw milks from different species. The results showed that the three vitamers were present in human and donkey milk, while they were selectively distributed in milks from bovine, buffalo, ovine and caprine. Human milk was the richest source of NMN. To our knowledge, this is the first evidence on the presence of NMN in a nutritional source, as well as the first quantitative determination of NR and NMN in food. Considering the nutritional importance of NR and NMN and the potential health benefits of their dietary supplementation through dairy products, a fast and sensitive assay targeting these nutrients would be of interest for the dairy industry. In particular, it would enable to assess the content of the individual vitamers in raw milk and to monitor their stability during processing and storage. The assay might also be exploited to monitor NR levels in novel products intended to supplement the diet with a natural source of the vitamin, e.g. probiotics selected for their ability to secrete NR. Furthermore, our finding that buffalo and donkey milks are characterized by interesting levels of NR, together with the affordability of the assay, might be of interest for small dairy

enterprises to claim NR content in their products from minor dairy species, thus providing them with added value.

In this work, we have demonstrated that the niacin content reported in the nutritional databases also includes NR and NMN, besides free NA, free Nam, Nam in the form of NAD and NADP, and NA in the form of niacinogen. Therefore, by comparing the milk total niacin value reported in the USDA database with the levels of the individual vitamers that we have determined in this work, we could conclude that both in bovine and human milks, NR, NMN and NAD may account for a significant fraction of the total niacin content. This is particularly evident in human milk, where the content of free Nam and free NA has been recently determined by HPLC-UV and ultra performance LC-MS/MS analyses (Hampel, York & Allen, 2012; Ren et al., 2015; Sakurai, Furukawa, Asoh, Kanno, Kojima & Yonekubo, 2005), thus allowing us to draw a more complete picture of the content of different vitamers. While Nam is reported to range from 0.6 μM to 18 μM, depending on the geographic origin of the mother and the lactation stage (Hampel et al., 2012; Ren et al., 2015; Sakurai et al., 2005) , NA is much less abundant, ranging from 0.05 μM to 1.5 μM (Ren et al., 2015). Comparison of these data with our results indicates that NR might be present in human milk at level comparable to Nam, both as such and in the form of its dietary precursors.

To assess NR bioavailability in processed foods, we further studied the influence of common heat treatments on the bovine milk content of this vitamin. The results showed that NR was resistant to pasteurization, but it was fully lost after the UHT processing. It is reported that niacin content is very stable during the heat treatment of milk and less than 10% is lost during the UHT processing (Barraquio, 2014). However, these data do not distinguish the contribution of the individual forms to the total niacin, and do not exclude the transformation of NR in other niacin forms during UHT processing. Our results indicate that NR does not resist UHT treatment, therefore such process should be avoided in order to preserve the nutritional benefits of the vitamin.

In the milks of different individuals from all tested species we recorded a wide interindividual variation of the assayed analytes. This is in agreement with the large variation that several studies have reported on the milk content of other vitamins, including NA and Nam, as well as purine and pyrimidine nucleotides, which has been ascribed to various factors, like the physiological variability among individuals, the lactation stage and the geographic origin (Hampel et al., 2012; Plakantara, Michaelidou, Polychroniadou, Menexes & Alichanidis, 2010; Ren et al., 2015). Notably, we found that in human milk NAD levels peaked twice within the 24 h period

lactation, *i.e.* at the middle of the day and of the night. This behavior reminds that displayed by some purine and pyrimidine nucleotides, which showed rhythmic fluctuations over the 24 h period (Sanchez et al., 2009). Since previous studies have demonstrated that the synthesis of NAD is under the control of the circadian clock, resulting in a rhythmic synthesis of the coenzyme (Nakahata, Sahar, Astarita, Kaluzova & Sassone-Corsi, 2009; Ramsey et al., 2009), our finding indicate that such intracellular oscillation of NAD levels appears to be reflected in secreted milk.

5. CONCLUSION

In this work, we have reported for the first time a method for the analysis of NR and its dietary precursors NMN and NAD in milk. The method is fast, sensitive, amenable to automation and affordable, thus representing a useful analytical tool in the dairy industry. We employed it for the screening of the three vitamers in milk from different species, showing that it can be exploited to monitor the vitamers' content in raw and processed milks. This analytical tool can be instrumental to select the most appropriate sources of the individual vitamers and to design better processing technologies in order to preserve their nutritional benefits.

ADDENDUM IN PROOF

While this work was under review, a paper appeared in the literature reporting on the quantitation of NR in bovine milk by means of LC tandem MS (Trammel S., Yu L., Redpath P., Migau M.E. & Brenner C. (2016). Nicotinamide riboside is a major NAD^+ precursor vitamin in caw milk. *The Journal of Nutrition*, *146*(5), 957-963). Authors measured NR levels of 4.3 $\pm$ 2.6 μM, which are very close to those determined by us in this work.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors would like to thank the breasting mothers Lucia M, Cristiana, Lucia P and Silvia for their voluntary help in the human lactation studies. This work was partly supported by grants from the Polytechnic University of Marche (RSA 2014) to NR and SR.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

Balducci, E., Emanuelli, M., Raffaelli, N., Ruggieri, S., Amici, A., Magni, G., Orsomando, G., Polzonetti, V., & Natalini, P. (1995). Assay methods for nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of wide applicability. *Analytical Biochemistry*, *228*(1), 64-68.

Barraquio, V. (2014). Which milk is fresh? *International Journal of Dairy Science & Processing*, *1*(201), 1-6.

Bieganowski, P., & Brenner, C. (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD+ in fungi and humans. *Cell*, *117*(4), 495-502.

Bogan, K. L., & Brenner, C. (2008). Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD+ precursor vitamins in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, *28*, 115-130.

Bogan, K. L., Evans, C., Belenky, P., Song, P., Burant, C. F., Kennedy, R., & Brenner, C. (2009). Identification of Isn1 and Sdt1 as glucose- and vitamin-regulated nicotinamide mononucleotide and nicotinic acid mononucleotide [corrected] 5'-nucleotidases responsible for production of nicotinamide riboside and nicotinic

acid riboside. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(50), 34861-34869.

Brown, K. D., Maqsood, S., Huang, J. Y., Pan, Y., Harkcom, W., Li, W., Sauve, A., Verdin, E., & Jaffrey, S. R. (2014). Activation of SIRT3 by the NAD(+) precursor nicotinamide riboside protects from noise-induced hearing loss. *Cell Metabolism*, *20*(6), 1059-1068.

Canto, C., Houtkooper, R. H., Pirinen, E., Youn, D. Y., Oosterveer, M. H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P. J., Yamamoto, H., Andreux, P. A., Cettour-Rose, P., Gademann, K., Rinsch, C., Schoonjans, K., Sauve, A. A., & Auwerx, J. (2012). The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metabolism*, *15*(6), 838-847.

Canto, C., Menzies, K. J., & Auwerx, J. (2015). NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metabolism*, *22*(1), 31-53.

Cerutti, R., Pirinen, E., Lamperti, C., Marchet, S., Sauve, A. A., Li, W., Leoni, V., Schon, E. A., Dantzer, F., Auwerx, J., Viscomi, C., & Zeviani, M. (2014). NAD(+)-dependent activation of Sirt1

corrects the phenotype in a mouse model of mitochondrial disease. *Cell Metabolism*, *19*(6), 1042-1049.

Eitenmiller, R. R., Ye, L., & Landen, W.O. (2008). Niacin. *Vitamin Analysis for the health and food sciences* (pp. 361-376). New York: Taylor & Francis Group.

Elvehjem, C. A., Strong F.M., Woolley D.W. (1937). Relation of nicotinic acid and nicotinic acid amide to canine black tongue. *Journal of the American Chemical Society*, *59*(9), 1767-1768.

Evans, C., Bogan, K. L., Song, P., Burant, C. F., Kennedy, R. T., & Brenner, C. (2010). NAD+ metabolite levels as a function of vitamins and calorie restriction: evidence for different mechanisms of longevity. *BMC Chemical Biology*, *10*, 2.

Ferreira, I. M. P. L. V. O., Mendes, E., Gomes, A. M. P., Faria, M. A., & Ferreira, M. A. (2001). The determination and distribution of nucleotides in dairy products using HPLC and diode array detection. *Food Chemistry*, *74*(2), 239-244.

Gong, B., Pan, Y., Vempati, P., Zhao, W., Knable, L., Ho, L., Wang, J., Sastre, M., Ono, K., Sauve, A. A., & Pasinetti, G. M. (2013). Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha regulated beta-secretase 1 degradation and mitochondrial

gene expression in Alzheimer's mouse models. *Neurobiology of Aging*, *34*(6), 1581-1588.

Graeff, R., & Lee, H. C. (2002). A novel cycling assay for cellular cADP-ribose with nanomolar sensitivity. *The Biochemical Journal*, *361*(Pt 2), 379-384.

Grozio, A., Sociali, G., Sturla, L., Caffa, I., Soncini, D., Salis, A., Raffaelli, N., De Flora, A., Nencioni, A., & Bruzzone, S. (2013). CD73 protein as a source of extracellular precursors for sustained NAD+ biosynthesis in FK866-treated tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(36), 25938-25949.

Hampel, D., York, E. R., & Allen, L. H. (2012). Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *903*, 7-13.

Kang-Lee, Y. A., McKee, R. W., Wright, S. M., Swendseid, M. E., Jenden, D. J., & Jope, R. S. (1983). Metabolic effects of nicotinamide administration in rats. *The Journal of Nutrition*, *113*(2), 215-221.

Khan, N. A., Auranen, M., Paetau, I., Pirinen, E., Euro, L., Forsstrom, S., Pasila, L., Velagapudi, V., Carroll, C. J., Auwerx, J.,

& Suomalainen, A. (2014). Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Molecular Medicine*, *6*(6), 721-731.

Kurnasov, O. V., Polanuyer, B. M., Ananta, S., Sloutsky, R., Tam, A., Gerdes, S. Y., & Osterman, A. L. (2002). Ribosylnicotinamide kinase domain of NadR protein: identification and implications in NAD biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, *184*(24), 6906-6917.

Long, A. N., Owens, K., Schlappal, A. E., Kristian, T., Fishman, P. S., & Schuh, R. A. (2015). Effect of nicotinamide mononucleotide on brain mitochondrial respiratory deficits in an Alzheimer's disease-relevant murine model. *BMC Neurology*, *15*, 19.

Lu, S. P., Kato, M., & Lin, S. J. (2009). Assimilation of endogenous nicotinamide riboside is essential for calorie restriction-mediated life span extension in Saccharomyces cerevisiae. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(25), 17110-17119.

Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., & Sassone-Corsi, P. (2009). Circadian control of the NAD+ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*, *324*(5927), 654-657.

Orsomando, G., Cialabrini, L., Amici, A., Mazzola, F., Ruggieri, S., Conforti, L., Janeckova, L., Coleman, M. P., & Magni, G.

(2012). Simultaneous single-sample determination of NMNAT isozyme activities in mouse tissues. *PLoS One*, *7*(12), e53271.

Plakantara, S., Michaelidou, A. M., Polychroniadou, A., Menexes, G., & Alichanidis, E. (2010). Nucleotides and nucleosides in ovine and caprine milk during lactation. *Journal of Dairy Science*, *93*(6), 2330-2337.

Raffaelli, N., Lorenzi, T., Mariani, P. L., Emanuelli, M., Amici, A., Ruggieri, S., & Magni, G. (1999). The Escherichia coli NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity. *Journal of Bacteriology*, *181*(17), 5509-5511.

Ramsey, K. M., Yoshino, J., Brace, C. S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H. K., Chong, J. L., Buhr, E. D., Lee, C., Takahashi, J. S., Imai, S., & Bass, J. (2009). Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD+ biosynthesis. *Science*, *324*(5927), 651-654.

Ren, X. N., Yin, S. A., Yang, Z. Y., Yang, X. G., Shao, B., Ren, Y. P., & Zhang, J. (2015). Application of UPLC-MS/MS Method for Analyzing B-vitamins in Human Milk. *Biomedical and Environmental Sciences*, *28*(10), 738-750.

Ruggieri, S., Orsomando, G., Sorci, L., & Raffaelli, N. (2015). Regulation of NAD biosynthetic enzymes modulates NAD-sensing

processes to shape mammalian cell physiology under varying biological cues. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1854*(9), 1138-1149.

Sakurai, T., Furukawa, M., Asoh, M., Kanno, T., Kojima, T., & Yonekubo, A. (2005). Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, *51*(4), 239-247.

Sanchez, C. L., Cubero, J., Sanchez, J., Chanclon, B., Rivero, M., Rodriguez, A. B., & Barriga, C. (2009). The possible role of human milk nucleotides as sleep inducers. *Nutritional Neuroscience*, *12*(1), 2-8.

Sauberlich, H. E. (1987). Nutritional Aspects of Pyridine Nucleotides In: R. P. D. Dolphin, O. Avramovic *Pyridine Nucleotide Coenzymes, part B* (pp. 599-626). New York: John Wiley & Sons.

Sauve, A. A. (2008). NAD+ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *324*(3), 883-893.

Yang, S. J., Choi, J. M., Kim, L., Park, S. E., Rhee, E. J., Lee, W. Y., Oh, K. W., Park, S. W., & Park, C. Y. (2014). Nicotinamide improves glucose metabolism and affects the hepatic NAD-sirtuin

pathway in a rodent model of obesity and type 2 diabetes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *25*(1), 66-72.

Yang, T., Chan, N. Y., & Sauve, A. A. (2007). Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives: effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mammalian cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, *50*(26), 6458-6461.

Yoshino, J., Mills, K. F., Yoon, M. J., & Imai, S. (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metabolism*, *14*(4), 528-536.

Zamporlini, F., Ruggieri, S., Mazzola, F., Amici, A., Orsomando, G., & Raffaelli, N. (2014). Novel assay for simultaneous measurement of pyridine mononucleotides synthesizing activities allows dissection of the NAD(+) biosynthetic machinery in mammalian cells. *The FEBS Journal*, *281*(22), 5104-5119.

Zhang, X. Q., Lu, J. T., Jiang, W. X., Lu, Y. B., Wu, M., Wei, E. Q., Zhang, W. P., & Tang, C. (2015). NAMPT inhibitor and metabolite protect mouse brain from cryoinjury through distinct mechanisms. *Neuroscience*, *291*, 230-240.

Figure1
Ummarino S. et al

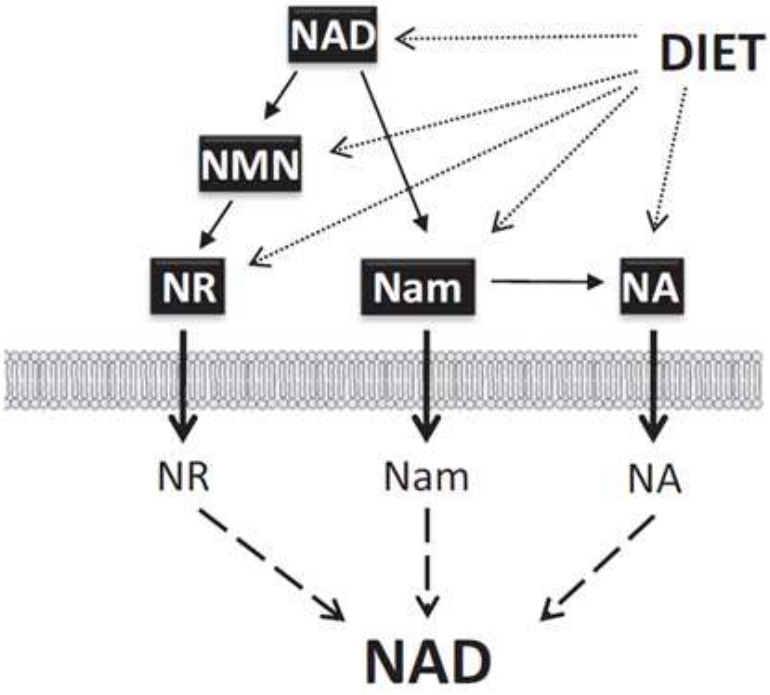

Figure 1. Scheme of dietary pyridines for intracellular NAD biosynthesis. The presence of NR, NA, Nam and NAD in food sources is well documented; the occurrence of NMN as such in food sources is demonstrated for the first time in this work. Abbreviations: NA, nicotinic acid; NR, nicotinamide riboside; Nam, nicotinamide; NMN, nicotinamide mononucleotide; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide.

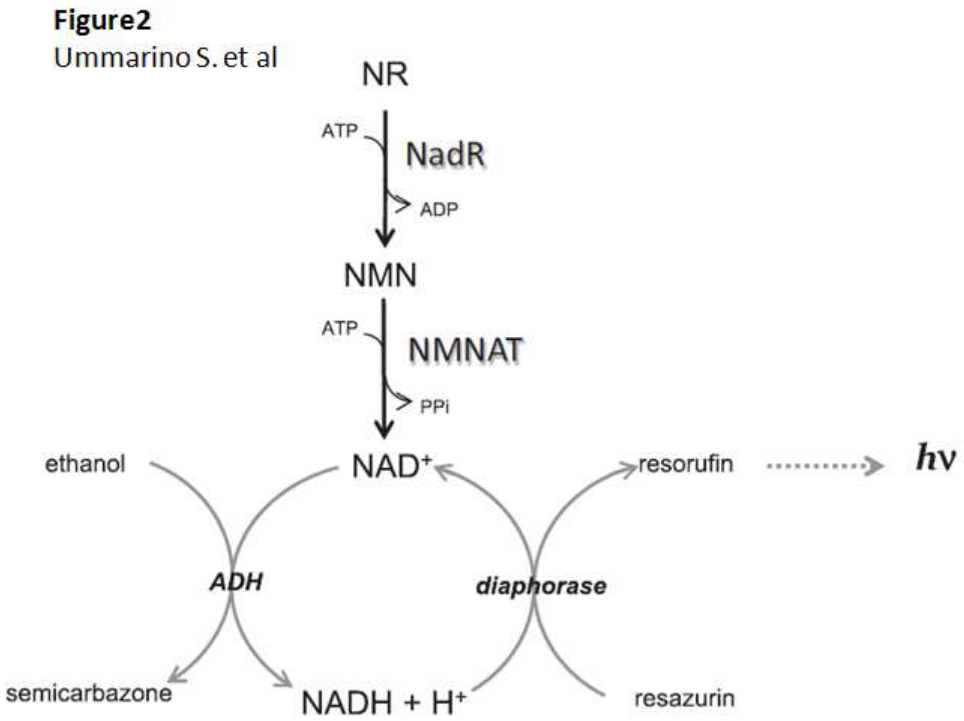

Figure 2. Principle of the coupled assay. Abbreviations: NR, nicotinamide riboside; NMN, nicotinamide mononucleotide; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide reduced; NadR, NR kinase; NMNAT, NMN adenylyltransferase; ADH, alcohol dehydrogenase

Figure 3
Ummarino S. et al

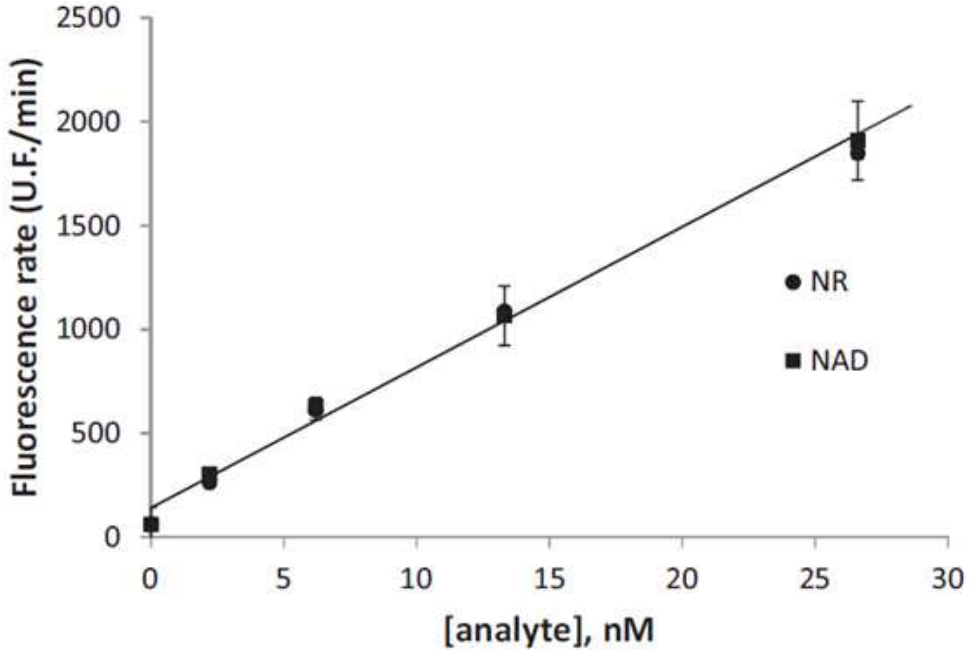

Figure 3. Stoichiometric conversion of NR into NAD. Various amounts of NR and NAD were treated as described in section 2.3. The rates of fluorescence increase were plotted versus the analytes' concentrations in the cycling mixtures. Samples were prepared in duplicate, and values are means ± SD of three independent measurements. F.U., arbitrary fluorescence units

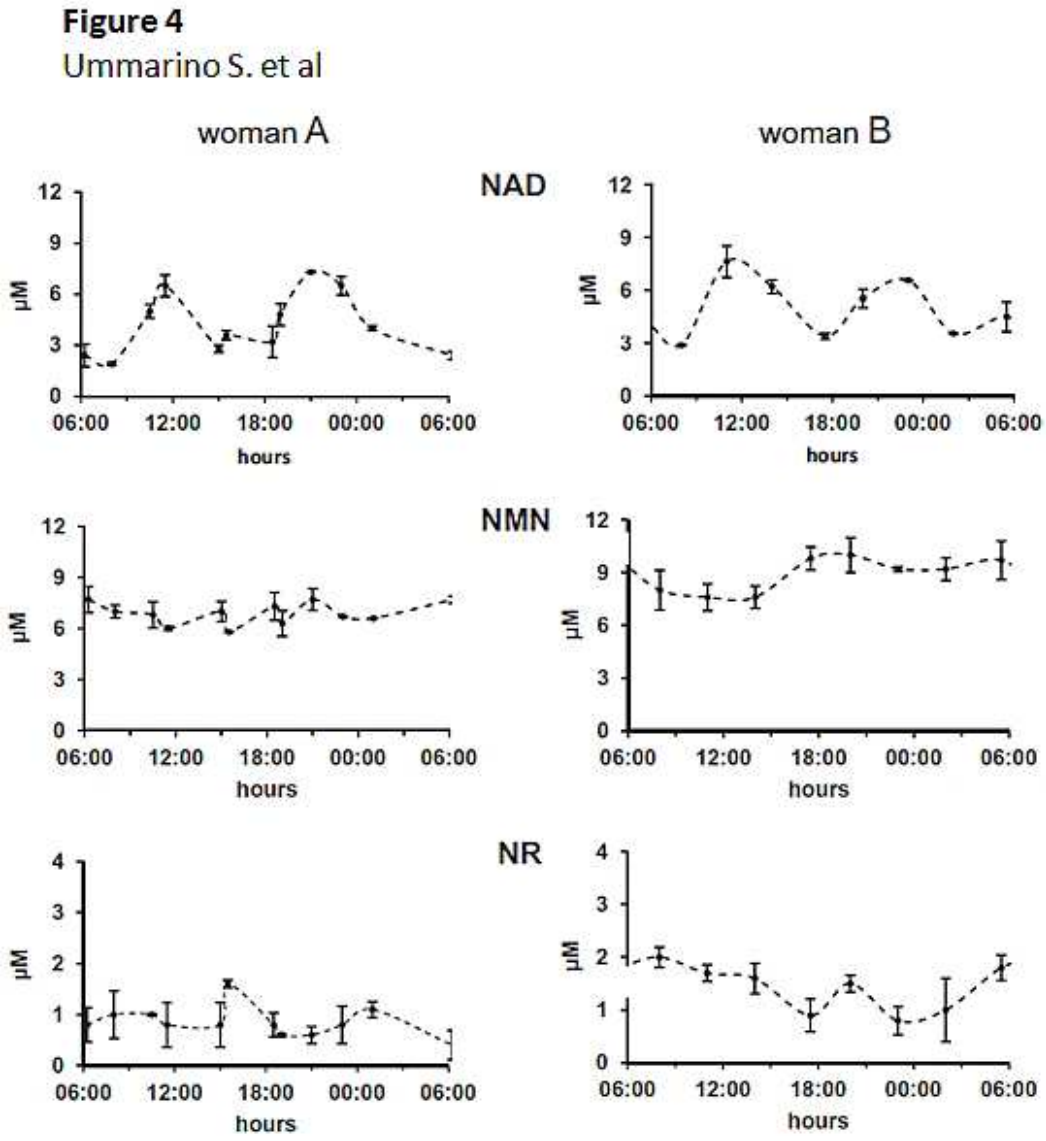

Figure 4. NAD, NMN and NR fluctuation in human milk over the 24-hours lactation period. Samples have been collected from two mothers (woman A and B) who had been breasting for about 60 days. Measurements were performed in duplicate and the means ± SD were reported.

Figure S1

Ummarino S. et al

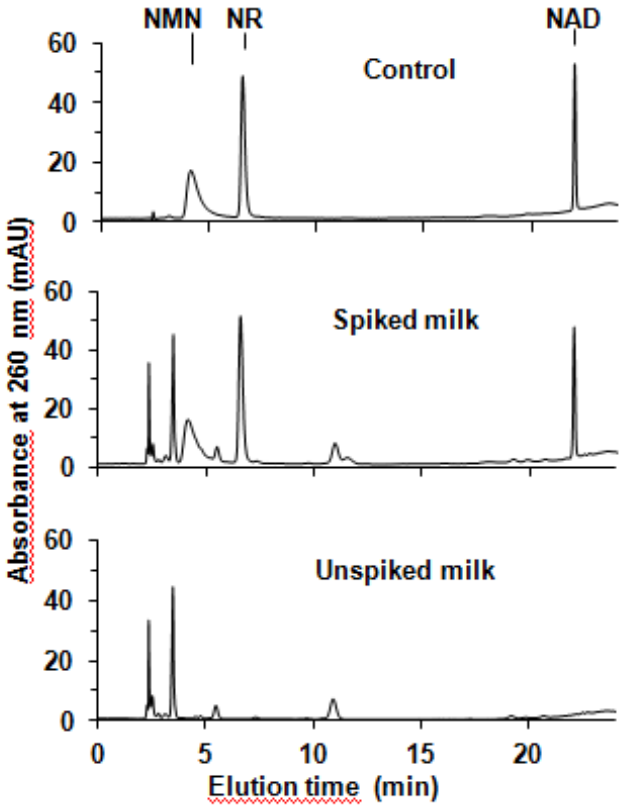

Figure S1. Validation of the extraction procedure of the pyridine analytes. HPLC chromatograms of control, spiked and unspiked milk samples processed as detailed in section 2.4. The recovery data are reported in Table 1.

Figure S2
Ummarino S. et al

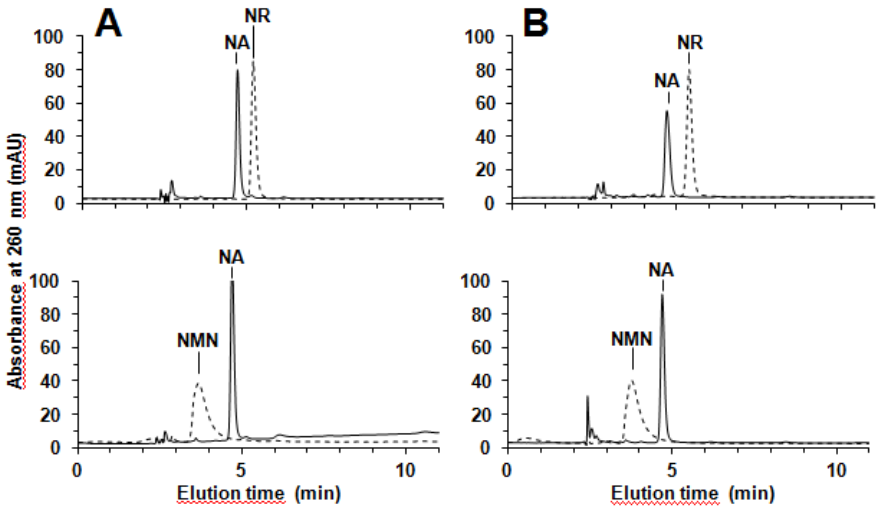

Figure S2. Effect of acid and alkali treatment on NMN and NR. HPLC chromatograms of nucleotides before (dashed line) and after (continuous line) the acid (A) and alkali (B) treatment described in section 2.6. The peak that appeared in the chromatograms following nucleotides' treatments was identified as NA after running a genuine NA standard under the same chromatographic conditions.

	Added analyte	Recovery			
		Control		Spiked milk	
	(μM)	(μM)	(%)	(μM)	(%)
NAD	60	63±6.2	105	58±7.0	97
NR	480	490±69	102	522±65	109
NMN	480	438±81	91	456±63	95

Table 1. Validation of the analytes' extraction procedure. Recovery of each added analyte in control and spiked milk samples. Analytes were quantitated through the HPLC analysis described in section 2.4 and shown in Supplementary Figure S1. Amounts of the analytes in the unspiked milk samples are not shown as they were below the detection limit of the HPLC analysis.

MILK SOURCE	NR	NMN	NAD	NIACIN[2]
bovine	1.7[a] 1.4 (0.5 - 3.6)	0.9[b] 0.6 (0-2.4)	0[3]	7.5
buffalo	4.2[a] 0.6 (0.3-15.0)	0[3]	0.1[b] 0.0 (0-0.2)	7.5
ovine	0[3]	0.3[b] 0.0 (0-1.0)	31.7[a] 26.2 (7.9-66.5)	35.0
caprine	0[3]	2.1[b] 1.8 (1.7-4.6)	16.5[ab] 14.4 (11.6-25.4)	23.0
donkey	3.3[a] 3.2 (1.2-5.6)	0.4[b] 0.3 (0-0.8)	0.1[b] 0.1 (0-0.34)	na
human	1.3[a] 1.2 (0.8 - 1.6)	6.1[a] 6.2 (2.1 - 9.8)	3.6[b] 3.3 (3.2 - 4.5)	14.4

Table 2. Concentrations of NR, NMN and NAD in raw milks comparedto total niacin content (µM)[1]

[1]Values are expressed as means (underlined), medians and concentration range (within brackets).[2]total niacin content from the USDA National Nutrient database for Standard Reference, Release 28, September 2015 (http://www.ars.usda.gov/nea/bhnrc/ndl), measured by the AOAC official method 944.13.

[3]below the detection limit in all tested samples. na, not available.

Different superscript letters within the same column indicate significantly different mean values at = $P < 0.05$.

***Highlights**

- An assay for quantitation of nicotinamide riboside, nicotinamide mononucleotide and NAD is proposed.
- The three B3 vitamers are selectively distributed in milks from different dairy species.
- In human milk the three B3 vitamers significantly contribute to total niacin content.
- UHT but not pasteurization affects bovine milk content of nicotinamide riboside.
- In human milk, lactation time affects NAD but not nicotinamide riboside or nicotinamide mononucleotide levels.

3. APPLICAZIONI DEL SAGGIO ENZIMATICO SU DIVERSE MATRICI ALIMENTARI

In degli articoli riportati in letteratura è ipotizzato che la Nicotinammide Riboside possa essere contenuta in alimenti fermentati da lieviti come la birra. Questa ipotesi trova fondamento sulla base di quanto dimostrato per alcuni ceppi di lievito che in particolari condizioni di crescita, sono capaci di secernere la vitamina nel terreno di coltura [74, 82]. Proprio questa caratterista suggerisce che gli stessi ceppi di lievito riportati nei brevetti ed utilizzati per la produzione di NR, possano essere impiegati nei processi di produzione della birra e di conseguenza possano secernere ed arricchire la bevanda di NR. La presenza di NR nella birra resta tuttavia un' ipotesi ad oggi non ancora confermata sperimentalmente, data la mancanza di un metodo adatto alla sua rivelazione e quantificazione in diverse matrici alimentari. Proprio per questo motivo è stato il saggio enzimatico è stato ottimizzato alla determinazione NR, NMN e NAD in alimenti fermentati da lieviti tra cui la birra ed il kefir.

3.1 DETERMINAZIONE DI NR,NMN e NAD NELLA BIRRA

La birra è una delle più diffuse e più antiche bevande alcoliche del mondo, viene prodotta attraverso la fermentazione alcolica di zuccheri derivanti da fonti amidacee quali malto d'orzo, riso, frumento e mais ad opera di ceppi *Saccharomyces cerevisae* o *Saccharomyces carlsbergensis*. Tra gli ingredienti sono poi aggiunti altri additivi aromatici quali, il luppolo che ne determina il gusto amaro ed alcune spezie di vario tipo. Tra le fasi del processo produttivo, la fase di fermentazione del mosto determina il contenuto alcolico della birra, e ne origina diverse sostanze che ne influenzano gli aspetti organolettici.

Due diverse tipologie di fermentazione vengono considerate nella produzione della birra e che ne identifica una prima classificazione: l'*alta fermentazione* e la *bassa fermentazione*.

Il diverso intervallo di temperatura alla quale si svolgono i due tipi di fermentazione è una condizione fisica imprescindibile per lo svolgimento dei processi enzimatici e chimici peculiari dei due ceppi di lieviti. Dal punto di vista terminologico la dizione "alta" e "bassa" relativa alla fermentazione del mosto di birra, non è legata al diverso intervallo di temperatura ma bensì al moto dei lieviti nel tino a fine fermentazione: Infatti il *S.cerevisiae* sale in "alto" in superficie mentre il *S.carlsbergensis* scende in "basso" sul fondo.

La classificazione più diffusa per le birre è suddivisa in tre diverse tipologie:

- **Ale:** Sono birre prodotte con ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, mediante un processo ad *alta fermentazione* che predilige temperature elevate. Il processo per la realizzazione di queste birre è il più antico e profondamente radicato nella cultura britannica e fiamminga.
- **Lager:** Sono birre prodotte con ceppi di *Saccharomyces carlsbergensis* mediante un processo che predilige temperature basse. Il procedimento di produzione di queste birre è più recente, e dal momento che garantisce una maggior stabilità e ripetibilità, le lager sono le birre più diffuse sul mercato.

- **Lambic:** Sono birre prodotte solo nel Belgio meridionale mediante esposizione del mosto a lieviti indigeni come il *Brettanomyces bruxellensis*. Il processo segue una "*fermentazione spontanea*" in condizioni di temperatura molto variabili.

3.1.1 Preparazione degli estratti dei nucleotidi da campioni di Birra

Sono stati acquistati dei campioni di birra in diversi *Supermercati Discount* nella regione Marche; lista dei campioni: (n°1, 1a; 2, 2a; 3, 3a; 4, 4a; 5, 5a; 6). Altre birre ad *alta fermentazione* sono state comprate presso il birrificio artigianale *San Germano18* (situato in

Via San Germano 18, Camerano, AN), lista dei campioni: (Giana, birra bionda; Gradina, birra aromatizzata; Mezzavalle, birra bianca; Sprevengoli, birra fumè). Una sola birra a *bassa fermentazione* la PHILI, birra chiara, è stata acquistata nel birrificio artigianale *Birrificio del Gomito* (situato in Via Gavone 47/A, Agugliano, AN). Per questo studio si è tentato di determinare la presenza di NR, NMN e NAD anche in un campione di birra ancora in fermentazione, prelevato direttamente dal fermentatore, nel birrificio *San Germano18.* Tutte le birre sono state immediatamente centrifugate a 20000 x g, 20min, 4°C ed i pellets scartati in modo da allontanare i lieviti presenti. Ad un'aliquota di 0.5 ml di birra sono stati aggiunti 0.25 ml di $HClO_4$ 1.2 M. Dopo centrifugazione a 20000 x g, 10min 4°C, il supernatante è stato neutralizzato con 0,157ml di K_2CO_3 1.0 M e congelato a -80° C per 30min. Una volta scongelato gli estratti sono centrifugati nuovamente a 20000 x g, 10min ed analizzati con il saggio enzimatico.

Tabella 1. Risultati ottenuti per la determinazione di NR, NMN e NAD mediante saggio enzimatico in diversi campioni di birra, acquistate nei *Supermercati Discount.*

Campioni	Nucleotide	µM	mg/ml
1	NAD	0,0	0,0
	NR	0,0	0,0
	NMN	0,0	0,0
2	NAD	4,1±0,14	2,7±0,07
	NR	0,0	0,0
	NMN	0,0	0,0
3	NAD	1,5±0,14	1,0±0,06
	NR	0,0	0,0
	NMN	0,0	0,0
4	NAD	1,6±0,57	1,0±0,36
	NR	0,0	0,0
	NMN	0,0	0,0
5	NAD	1,0	0,7
	NR	0,0	0,0
	NMN	0,0	0,0
6	NAD	0	0
	NR	0	0
	NMN	0	0

Tabella 2. Risultati ottenuti per la determinazione di NR, NMN e NAD mediante saggio enzimatico in diversi campioni di birra, ad *alta fermentazione* comprate presso il birrificio artigianale *San Germano18*:

Campioni	Nucleotide	µM	mg/ml
Giana, birra bionda	NAD	3,6	2,3
	NR	0,2	0,05
	NMN	0,55	0,18
Gradina,birra aromatizzata	NAD	0,53±0,20	0,35
	NR	0,11±0,04	0,02
	NMN	0,07±0,15	0,02
Mezzavalle, birra bianca	NAD	5,24	3,48
	NR	0,00	0,00
	NMN	0,00	0,00
Sprevengoli, birra fumè	NAD	1,11±0,08	0,73±0,06
	NR	0,18±0,02	0,04±0,00
	NMN	0,00	0,00

Tabella 3. Risultati ottenuti per la determinazione di NR, NMN e NAD mediante saggio enzimatico nel campione di birra, a *bassa fermentazione* acquistata nel birrificio artigianale *Birrificio del Gomito*

Campione	Nucleotide	µM	mg/ml
PHILI, birra chiara	NAD	0	0
	NR	1,35±0,07	0,3±0,02
	NMN	0	0

Tabella 4. Risultati ottenuti per la determinazione di NR, NMN e NAD mediante saggio enzimatico nel campione di birra *alta fermentazione*, campione prelevato durante fermentazione, nel birrificio artigianale *San Germano18*:

Campione	Nucleotide	µM	mg/ml
Giana, birra bionda (durante fermentazione)	NAD	3,2±0,4	2,1±0,3
	NR	0,6	0,15
	NMN	0,7±0,2	0,23±0,1

3.1.2 Discussione dei risultati

I risultati preliminari ottenuti dalla determinazione e quantificazione di NAD,NMN ed NR nei diversi campioni di birra indicano che l'introduzione di diversi ceppi di lieviti può determinare specificamente variazioni del contenuto dei tre nucleotidi all'interno della bevanda.

Questi risultati rappresentano la prima prova sperimentale della presenza di NR nella birra artigianale. Inoltre la diversa distribuzione di NAD NMN ed NR osservata potrebbe derivare dalla diversa modalità del processo di secrezione dello specifico ceppo, o potrebbero derivare dalle diverse condizioni di temperatura e tempo a cui i lieviti sono sottoposti durante la fermentazione degli zuccheri presenti.

I risultati riassunti relativi alle birre Artigianali in figura 28 riportata di seguito:

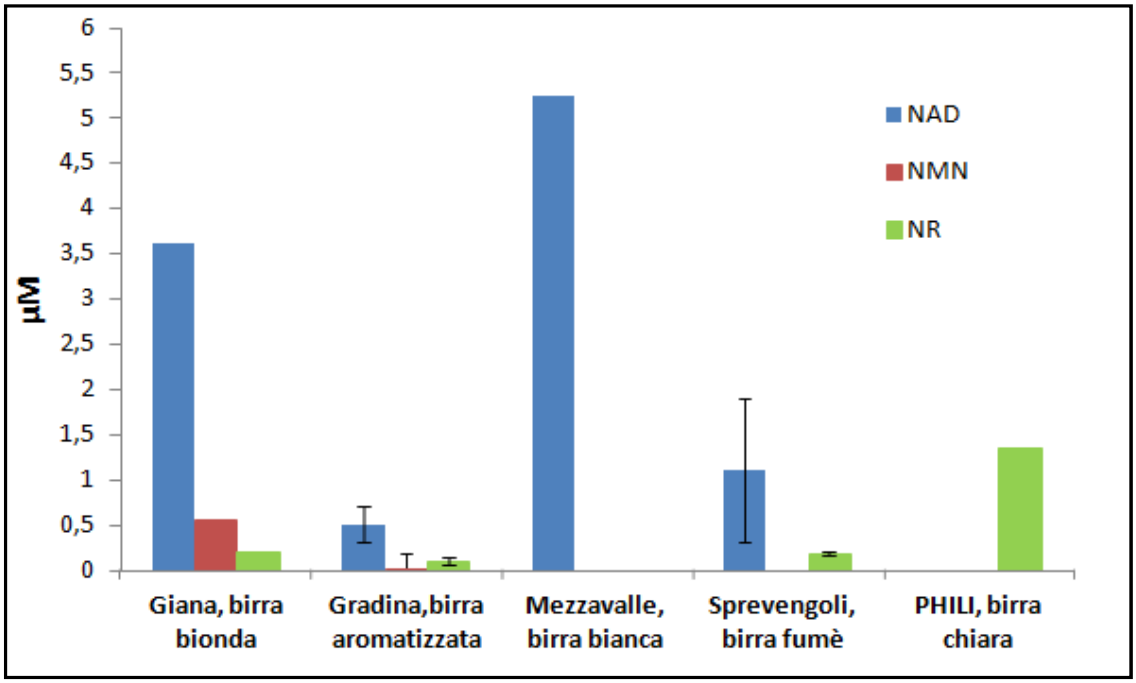

Figura 28: Distribuzione di NR, NMN e NAD nei diversi campioni di birra Artigianale ad Alta e Bassa Fermentazione

mostrano la presenza di NR in 4 birre diverse (Giana, Gradina, Sprevengoli, PHILI) ciò potrebbe significare che tali lieviti possono secernere la vitamina in quantità diverse e che essa non viene riutilizzata come fonte di NAD ma resta nella bevanda fino alla vendita. Risultati molto simili si osservano tra la birra Giana Bionda prelevata dal fermentatore durante il terzo giorno di fermentazione e la stessa birra imbottigliata nel giorno seguente (tab 2 e 4).

Sostaziali differenze sono state osservate tra le birre Artigianali figura 28 in cui sono presenti NAD, NR ed in un caso anche NMN, e le birre comprate nel discount figura 29

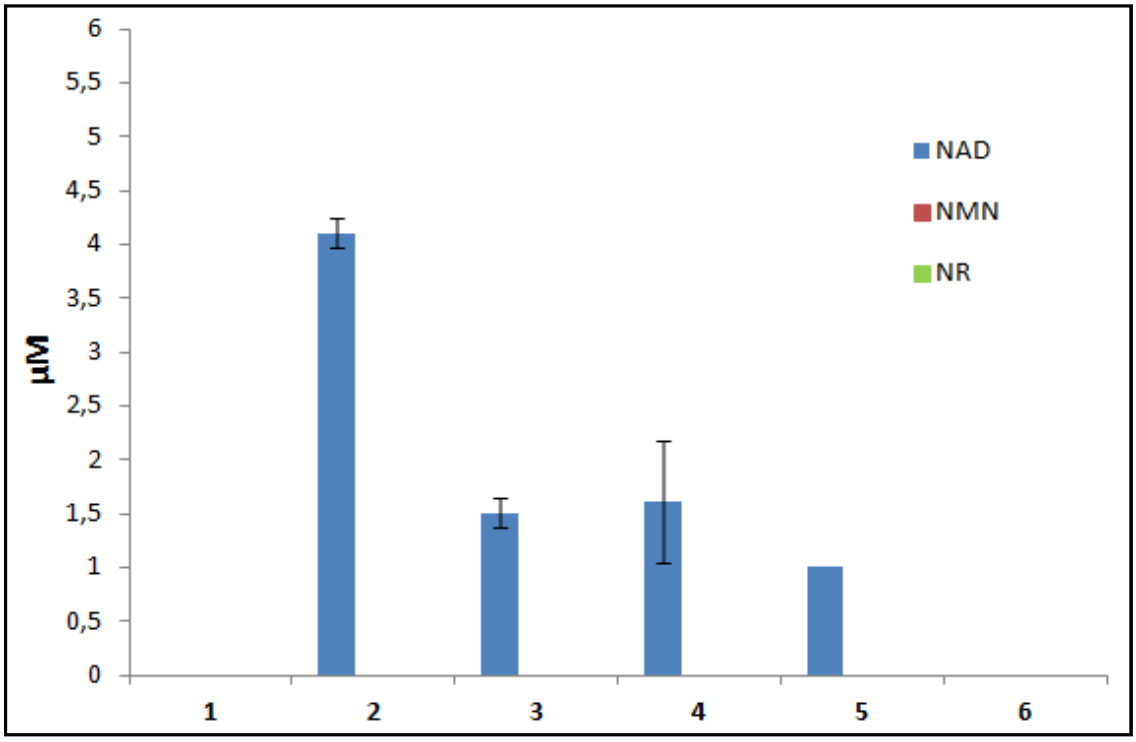

Figura 29: Determinazione di NR, NMN e NAD nei diversi campioni di birra comprati al discount

per le quali è stata determinata la sola presenza di NAD. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nel diverso processo di produzione di queste birre. Nelle birre artigianali la fermentazione degli zuccheri inizia nel tino e continua all'interno della bottiglia, ciò accade in quanto i lieviti che partecipano alla prima fermentazione, non vengono allontanati ed una piccola quantità di questi vengono imbottigliati ed utilizzati per una seconda fermentazione prima della vendita. Durante la "*fermentazione in bottiglia*" è di pratica comune addizionare delle spezie o degli aromi, che possono determinare un sapore specifico che diviene caratteristico di tale bevanda, ciò suscita maggior interesse del

consumatore. L'aggiunta di spezie potrebbe stimolare una diversa secrezione da parte di questi lieviti o risultare una fonte stessa dei tre nucleotidi. Inoltre bisogna considerare che anche le condizioni a cui queste le bevande sono conservate e/o vengono trasportate possono determinare differenze nella quantità di NR presente infatti come dimostrato nell'articolo presentato alla rivista Food Chemistry (riportato nel capitolo 2) particolari condizioni di temperatura possono degradare l'NR.

3.2 DETERMINAZIONE DI NR,NMN e NAD nel Kefir

Il kefir è una bevanda ricca di fermenti lattici ottenuta dalla fermentazione di sostanze contenute nel latte.

I latti considerati "*fermentati*" sono prodotti ottenuti per coagulazione del latte senza sottrazione di siero, per azione esclusiva di popolazioni batteriche e lieviti, che devono mantenersi tali fino al consumo dell'alimento. Il kefìr è una bevanda originaria del Caucaso e tuttora è divenuta molto popolare anche nell'ex Unione Sovietica; a seconda delle diverse condizioni di produzione ed ai ceppi di batteri e/o lieviti utilizzati, può contenere quantità variabili di alcool e/o CO_2.

Il kefir tradizionale viene preparato utilizzando latte fresco (ovino, caprino o bovino) e grani di kefiran. I grani sono formati da un polisaccaride composto di D-glucosio e il D-galattosio in eguali proporzioni, che ospita colonie di batteri e lieviti in associazione simbiotica; i principali batteri che sono utilizzati per la produzione del kefir sono lattobacilli kefiranofaciens e kefiri tuttavia ve ne sono tanti altri che sono attualmente studiati. In tab 5 sono elencati alcuni di questi microrganismi mostrati in un articolo selezionato da letteratura, che sono stati utilizzati nella produzione di kefir da zucchero grezzo [83]:

Tabella 5. Lista dei microrganismi presenti nel kefir prodotto da zucchero grezzo.

Batteri	Lieviti
Lactobacillus paracasei	*Saccharomyces cerevisiae*
Lactobacillus parabuchneri	*Kluyveromyces lactis*
Lactobacillus kefiri	*Lachancea meyersii*
Lactococcus lactis	*Kazachstania aerobia*
Lactobacillus casei	
Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei	
Leuconostoc citreum	
Lactobacillus paracasei subsp. Tolerans	
Lactobacillus buchneri	
Acetobacter lovaniensis	

Gli stessi microrganismi utilizzati per la produzione del kefir potrebbero essere utilizzati per la produzione di altre bevande fermentate a partire da: latti di soia, latti di riso ed acqua con aggiunta di zucchero frutta o altri aromi.

3.2.1 Preparazione degli estratti campioni dei nucleotidi da campioni Kefir.

Il latte di controllo e 6 campioni di Kefir provenienti da cinque regioni italiane, sono stati conservati a -20°C, prima di essere analizzati. Lista dei campioni: L, latte UHT (vaccino); K1, Trentino; K2, Marche; K3, Sicilia; K4,Umbria; K5, Emilia Romagna, K6, Marche. Per questo studio si è tentato di determinare la presenza di NR, NMN e NAD nel

Kefir liquido che rappresenta la parte della bevanda che viene ingerita. Il latte di controllo è stato scremato mediante centrifugazione a 3,000 x g for 30 min at 15°C. I nucleotidi sono stati estratti come descritto in letteratura [84]. Brevemente, ad un aliquota di 0.3ml di latte scremato sono stati aggiunti 0.2 ml di $HClO_4$ 0.33 M. Dopo centrifugazione a 20000 x g per 10min, a 4°C, il supernatante è stato neutralizzato con 0,023ml di K_2CO_3 1.0 M e congelato a -80° C per 30min. I campioni di Kefir sono stati centrifugati 3000 x g for 30 min at 15°C.

Il supernatante è stato trattato come per il latte di controllo seguendo la procedura descritta in (Ferreira, Mendes, Gomes, Faria & Ferreira, 2001). Una volta scongelati gli estratti sono centrifugati nuovamente a 20000 x g per 10min e analizzati al saggio.

Tabella 6. Risultati ottenuti per la determinazione di NR, NMN e NAD mediante saggio enzimatico in diversi campioni di Kefir

Campioni	NR		NMN		NAD	
	µM	mg/ml	µM	mg/ml	µM	mg/ml
Latte UHT (Vaccino)	0	0	0	0	0	0
K2 (Marche)	0	0	0,5	0,16	1,7	1,12
K6 (Marche)	0	0	0	0	0,25	0,16
K1 (Trentino)	0	0	0	0	0	0
K3 (Sicilia)	0	0	0	0	0,7	0,46
K4 (Umbria)	0	0	0,1	0,03	0,2	0,13
K5 (Emilia)	0	0	0	0	0,1	0,06

3.2.2 Discussione dei risultati

La determinazione mediante il saggio enzimatico, delle relative quantità di NR,NMN e NAD nel kefir, fornisce alcune indicazioni utili a valutare se l'introduzione di specifici ceppi batterici e/o lieviti e dei loro processi biologici all'interno del latte, può variare specificamente il contenuto dei tre nucleotidi.

I risultati riassunti in riportati di seguito (fig 30):

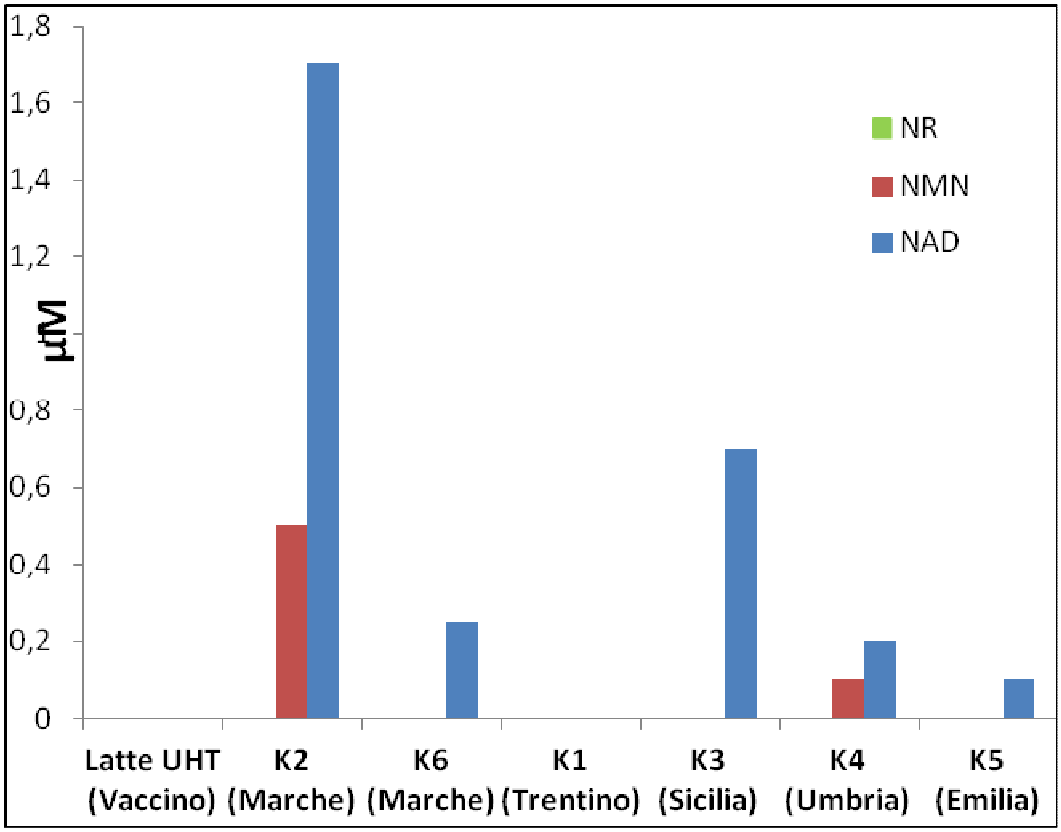

Figura 30: Distribuzione di NR, NMN e NAD nei kefir provenienti da diverse regioni d'Italia.

mostrano come atteso, l'assenza di NR, NMN, e NAD nel latte bovino UHT di partenza. In tutti i campioni di kefir si osserva la

presenza di NAD mentre l'NMN è stato determinato nei campioni K2 e K4 nelle rispettive concentrazioni di 0,5 e 0,1µM.

L'NR non è stata rilevata in nessun campione. Questi risultati indicando che la quantità dei tre nucleotidi presenti nel kefir è strettamente dipendente dalla variabilità delle popolazioni di lieviti e batteri utilizzati nella produzione dell'alimento. L'assenza di NR in tutti i campioni di kefir trova possibile spiegazione in due diverse ipotesi; tutti i microrganismi presenti nei vari kefir non secernono NR, oppure la vitamina secreta da alcune specie viene in seguito utilizzata da altre specie della comunità microbica come fonte di NAD.

4. CONCLUSIONI

Dopo poco tempo dalla scoperta della Nicotinammide Riboside, ne è stato dimostrato il suo effetto principale d'indurre aumento della biosintesi di NAD intracellulare; tale effetto si riflette nell'aumento del metabolismo energetico e biogenesi mitocondriale con la conseguente capacità della cellula di difendersi da stress di varia natura. I risultati degli studi condotti dal National Institutes of Health (NIH) in collaborazione con ChromaDex hanno indicato che la supplementazione alimentare di NR, produce aumento dei livelli di NAD in specifici tessuti ed organi di topo, ed è stato dimostrato che a tale aumento corrisponde aumento della longevità cellulare e/o effetto protettivo nei confronti di patologie tra loro molto diverse. In seguito a queste evidenze sperimentali, l'NR è divenuta presto un target di studio di grande interesse da parte della comunità scientifica. Ad oggi l'NR è considerata un supplemento alimentare e/o farmaco indirizzato al trattamento di disordini metabolici, malattie legate all'invecchiamento, perdita dell'udito, distrofie muscolari e malattie neurodegenerative tra cui l'Alzheimer. Risulta quindi di centrale importanza comprendere la sua distribuzione ed i relativi dosaggi all'interno degli alimenti. In questo lavoro di tesi di dottorato è stato sviluppato un saggio enzimatico fluorimetrico per la quantificazione dell'NR e dei suoi precursori NMN e NAD; versatile ed applicabile a fonti alimentari molto diverse. Il saggio presenta inoltre sensibilità comparabile ai metodi LC-MS attualmente in uso, ma è più veloce,

più economico ed adattabile ad automatizzazione. Il saggio sfrutta la conversione stechiometrica dell'NR presente nel campione da analizzare, a NAD mediante due reazioni enzimatiche consecutive catalizzate dall'enzima batterico NadR e dall'enzima murino NMNAT3. I due enzimi non sono disponibili in commercio, per questo motivo sono stati prodotti in forma ricombinante attraverso un metodo di produzione e purificazione sviluppato ed ottimizzato in laboratorio. Anche l'NR non è commercializzata in Italia e per questo motivo le relative quantità di vitamina utilizzate per le rette di taratura e le miscele di controllo impiegate nel saggio, sono state prodotte mediante un metodo di sintesi enzimatica. La sintesi enzimatica di NR prevede la conversione del NAD a NR e la sua successiva purificazione in HPLC.

Con il saggio enzimatico fluorimetrico sviluppato in questo lavoro di tesi è stato possibile dimostrare la diversa distribuzione dei tre nucleotidi in latti di diversa origine animale compreso quello umano, ciò ha permesso di dimostrare per la prima volta la presenza di NMN nel latte. I risultati ottenuti hanno anche consentito di stabilire che in generale i tre analiti rappresentano una frazione significativa del contenuto totale di vitamina B3. In particolare, nel latte umano l'NR è presente a concentrazioni confrontabili a quelle della nicotinamide. Mediante questo screening è stato possibile ampliare le conoscenze in merito al contenuto di Niacina totale nel latte, ed ampliare il database attualmente in uso USDA Nutrient.

Il saggio enzimatico ha inoltre fornito indicazioni sulla termostabilità dei tre analiti, permettendo una maggiore comprensione di come il loro quantitativo può subire variazioni in seguito a degradazione dovuta dall'effetto termico a cui sono sottoposti i latti commerciali HTST ed UHT. Dallo studio effettuato sul latte umano è stato possibile dimostrare la presenza del ritmo circadiano di sintesi del NAD intracellulare, in seguito alla conseguente secrezione ciclica nel latte, durante il periodo di lattazione. Tale effetto trova diretta connessione con il ritmo ciclico di sintesi intracellulare delle basi puriniche e pirimidiniche, che era già stato descritto in letteratura.

Il saggio è stato in seguito ottimizzato per la determinazione di NR, NMN e NAD in degli alimenti derivati da fermentazioni degli zuccheri, che si attuano nel latte o nella birra, in seguito all'aggiunta di ceppi batterici e/o di lievito. Questo lavoro di screening dei campioni alimentari è stato focalizzato all'analisi di kefir prodotti in diverse regioni italiane e su diverse birre ad alta e bassa fermentazione.

Dai risultati ottenuti è stata dimostrata per la prima volta la presenza di NR nella birra ed è stata dimostrata la possibilità di adattare il saggio all'analisi dei tre nucleotidi in campioni alimentari diversi dal latte.

In conclusione il saggio enzimatico fluorimetrico sviluppato in questo progetto di tesi rappresenta uno strumento analitico adatto per l'analisi e quantificazione dei tre vitameri in diverse fonti alimentari.

Questo studio pensiamo possa contribuire all'ampiamento delle conoscenze relative alla diversa distribuzione dei tre nucleotidi all'interno di altre matrici alimentari; la possibilità di individuare e quantificare l'NR negli alimenti ed è utile quindi a stabilire quali di essi potrebbero indurre degli effetti protettivi nei confronti di diversi contesti patologici. Pensiamo inoltre che il saggio enzimatico fluorimetrico rappresenti una nuova tecnologia che può essere impiegata per monitorare processi di lavorazione e conservazione degli alimenti, al fine di preservare i benefici nutrizionali della vitamina.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Bieganowski, P. and C. Brenner, *Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD+ in fungi and humans.* Cell, 2004. **117**(4): p. 495-502.
2. Goldberger J., W.C., Willets DG., , *The treatment and prevention of pellagra.* Public Health Rep, 1914. **29**: p. 1683-86.
3. Trammell, S.A., et al., *Nicotinamide Riboside Is a Major NAD+ Precursor Vitamin in Cow Milk.* J Nutr. **146**(5): p. 957-63.
4. Elvehjem, C.A., et al., *The isolation and identification of the anti-black tongue factor. 1937.* J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. e22.
5. Belenky, P., K.L. Bogan, and C. Brenner, *NAD+ metabolism in health and disease.* Trends Biochem Sci, 2007. **32**(1): p. 12-9.
6. Mori, V., et al., *Metabolic profiling of alternative NAD biosynthetic routes in mouse tissues.* PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113939.
7. Axelrod AE., M.R., Elvehjem CA., *The effect of nicotinic acid deficiency upon the coenzyme I content of animal tissues.* 1939. **131**: p. 85–93.
8. Turner, R.H., *THE PATHOLOGIC PHYSIOLOGY OF PELLAGRA: I. Tabulated Clinical and Physiologic Data.* J Clin Invest, 1931. **10**(1): p. 61-70.
9. Graham, G.G., *Starvation in the modern world.* N Engl J Med, 1993. **328**(14): p. 1058-61.
10. Penberthy, W.T., *Pharmacological targeting of IDO-mediated tolerance for treating autoimmune disease.* Curr Drug Metab, 2007. **8**(3): p. 245-66.
11. Krehl, W.A., H.J. De la, and et al., *The distribution of niacinamide and niacin in natural materials.* J Biol Chem, 1946. **166**(1): p. 53-7.
12. Sutton TS, E.G., *The nutrition of the newborn dairy calf: I. Changes in the Tryptophan content of the blood plasma following birth and the ingestion of colostrum.* J Dairy Sci, 1937. **31**: p. 183-7.
13. G., A., *Le basi molecolari della nutrizione.* Padova Piccinin, 2003.
14. Krehl, W.A., Teply L.J. and Elvehjem C.A., *Corn as an Etiological Factor in the Production of a Nicotinic Acid Deficiency in the Rat.* Science, 1945. **101**: p. 283.

15. Gradwohl, G., et al., *The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(8): p. 2990-4.
16. Javle, M. and N.J. Curtin, *The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation.* Br J Cancer. **105**(8): p. 1114-22.
17. Pleschke, J.M., et al., *Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins.* J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 40974-80.
18. Tanner, K.G., et al., *Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14178-82.
19. Mostoslavsky, R., et al., *Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6.* Cell, 2006. **124**(2): p. 315-29.
20. Ford, E., et al., *Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription.* Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1075-80.
21. Huang, J.Y., et al., *Mitochondrial sirtuins.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(8): p. 1645-51.
22. Tanno, M., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD+-dependent histone deacetylase SIRT1.* J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6823-32.
23. Vaquero, A., et al., *SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis.* Genes Dev, 2006. **20**(10): p. 1256-61.
24. Gomes, P., T.F. Outeiro, and C. Cavadas, *Emerging Role of Sirtuin 2 in the Regulation of Mammalian Metabolism.* Trends Pharmacol Sci. **36**(11): p. 756-68.
25. Jing, E., S. Gesta, and C.R. Kahn, *SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation.* Cell Metab, 2007. **6**(2): p. 105-14.
26. Aksoy, P., et al., *Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(4): p. 1386-92.
27. Wei, W., R. Graeff, and J. Yue, *Roles and mechanisms of the CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose/Ca(2+) signaling pathway.* World J Biol Chem. **5**(1): p. 58-67.
28. Gingrich, W., and Schlenk, F. , *Codehydrogenase I and other*

pyridinium compounds as V factor for Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae. J. Bacteriol, 1944. **47**: p. 535–550.
29. Shifrine, M., and Biberstein, E.L, *A growth factor for Haemophilus species secreted by a Pseudomonad.* Nature, 1960. **187**: p. 623.
30. Leder, I.G., and Handler, P, *Synthesis of nicotinamide mono-nucleotide by human erythrocytes in vitro.* J. Biol. Chem. , 1951. **189**: p. 889-899.
31. Zhou, T., et al., *Structure of human nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase. Basis for the dual substrate specificity and activation of the oncolytic agent tiazofurin.* J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 13148-54.
32. Ma, B., et al., *Assimilation of NAD(+) precursors in Candida glabrata.* Mol Microbiol, 2007. **66**(1): p. 14-25.
33. Evans, N.M., D.D. Smith, and A.J. Wicken, *Haemin and nicotinamide adenine dinucleotide requirements of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae.* J Med Microbiol, 1974. **7**(3): p. 359-65.
34. Yang, T., N.Y. Chan, and A.A. Sauve, *Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives: effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mammalian cells.* J Med Chem, 2007. **50**(26): p. 6458-61.
35. Belenky, P.A., T.G. Moga, and C. Brenner, *Saccharomyces cerevisiae YOR071C encodes the high affinity nicotinamide riboside transporter Nrt1.* J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8075-9.
36. Mericskay, M., *Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart disease: Pathophysiological implications and therapeutic potential.* Arch Cardiovasc Dis, 2016. **109**(3): p. 207-15.
37. Damaraju, V.L., et al., *Role of human nucleoside transporters in the cellular uptake of two inhibitors of IMP dehydrogenase, tiazofurin and benzamide riboside.* Mol Pharmacol, 2005. **67**(1): p. 273-9.
38. Lin, S.-P.L.a.S.-J., *Phosphate-responsive Signaling Pathway Is a Novel Component of NAD Metabolism in Saccharomyces cerevisiae.* THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2011. **286**(16): p. 14271–14281.
39. Young, J.D., et al., *Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins.* Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 995-1021.

40. Herbert, M., et al., *Nicotinamide ribosyl uptake mutants in Haemophilus influenzae.* Infect Immun, 2003. **71**(9): p. 5398-401.
41. Jaehme, M., A. Guskov, and D.J. Slotboom, *Crystal structure of the vitamin B3 transporter PnuC, a full-length SWEET homolog.* Nat Struct Mol Biol. **21**(11): p. 1013-5.
42. Jaehme, M. and D.J. Slotboom, *Diversity of membrane transport proteins for vitamins in bacteria and archaea.* Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(3): p. 565-76.
43. Merdanovic, M., E. Sauer, and J. Reidl, *Coupling of NAD+ biosynthesis and nicotinamide ribosyl transport: characterization of NadR ribonucleotide kinase mutants of Haemophilus influenzae.* J Bacteriol, 2005. **187**(13): p. 4410-20.
44. Mitterbauer, R., T. Karl, and G. Adam, *Saccharomyces cerevisiae URH1 (encoding uridine-cytidine N-ribohydrolase): functional complementation by a nucleoside hydrolase from a protozoan parasite and by a mammalian uridine phosphorylase.* Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(3): p. 1336-43.
45. Subhi, A.L., et al., *Methylthioadenosine phosphorylase regulates ornithine decarboxylase by production of downstream metabolites.* J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49868-73.
46. Lecoq, K., et al., *YLR209c encodes Saccharomyces cerevisiae purine nucleoside phosphorylase.* J Bacteriol, 2001. **183**(16): p. 4910-3.
47. Gazzaniga, F., et al., *Microbial NAD metabolism: lessons from comparative genomics.* Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(3): p. 529-41, Table of Contents.
48. Rowen, J.W. and A. Kornberg, *The phosphorolysis of nicotinamide riboside.* J Biol Chem, 1951. **193**(2): p. 497-507.
49. Schramm, V.L., *Development of transition state analogues of purine nucleoside phosphorylase as anti-T-cell agents.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1587**(2-3): p. 107-17.
50. Luk, T., Z. Malam, and J.C. Marshall, *Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity.* J Leukoc Biol, 2008. **83**(4): p. 804-16.
51. Sun, Z., H. Lei, and Z. Zhang, *Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF), a cytokine with multiple physiological functions.* Cytokine Growth Factor Rev. **24**(5): p. 433-42.

52. Raffaelli, N., et al., *Identification of a novel human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(4): p. 835-40.
53. Garavaglia, S., et al., *Structure of human NMN adenylyltransferase. A key nuclear enzyme for NAD homeostasis.* J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8524-30.
54. Magni, G., et al., *Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase.* Curr Med Chem, 2004. **11**(7): p. 873-85.
55. Kurnasov, O.V., et al., *Ribosylnicotinamide kinase domain of NadR protein: identification and implications in NAD biosynthesis.* J Bacteriol, 2002. **184**(24): p. 6906-17.
56. Galeazzi, L., et al., *Identification of nicotinamide mononucleotide deamidase of the bacterial pyridine nucleotide cycle reveals a novel broadly conserved amidohydrolase family.* J Biol Chem. **286**(46): p. 40365-75.
57. De Ingeniis, J., et al., *Glutamine versus ammonia utilization in the NAD synthetase family.* PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39115.
58. Sorci L, K.O., Rodionov DA, Osterman AL., *Genomics and enzymology of NAD biosynthesis.* Comprehensive natural products II, 2010: p. 213–257.
59. Rodionova, I.A., et al., *Metabolic and bactericidal effects of targeted suppression of NadD and NadE enzymes in mycobacteria.* MBio. **5**(1).
60. J.G.LeBlanc, C.M., G.S. de Giori, F.Sesma, D.van Sinderen, M. Ventura, *Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective.* Curr. Opin. Biotechnol., 2013. **24**: p. 160-168.
61. Belenky, P., et al., *Nrt1 and Tna1-independent export of NAD+ precursor vitamins promotes NAD+ homeostasis and allows engineering of vitamin production.* PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19710.
62. Yang, T. and A.A. Sauve, *NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity.* AAPS J, 2006. **8**(4): p. E632-43.
63. Canto, C., et al., *The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity.* Cell Metab, 2012. **15**(6): p. 838-47.

64. Liu, Y., et al., *Oxidative damage associated with obesity is prevented by overexpression of CuZn- or Mn-superoxide dismutase.* Biochem Biophys Res Commun, 2013. **438**(1): p. 78-83.
65. Houtkooper, R.H., et al., *The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways.* Endocr Rev. **31**(2): p. 194-223.
66. Khan, N.A., et al., *Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3.* EMBO Mol Med. **6**(6): p. 721-31.
67. Mouchiroud, L., et al., *The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling.* Cell. **154**(2): p. 430-41.
68. Gong, B., et al., *Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha regulated beta-secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models.* Neurobiol Aging. **34**(6): p. 1581-8.
69. Brown, K.D., et al., *Activation of SIRT3 by the NAD(+) precursor nicotinamide riboside protects from noise-induced hearing loss.* Cell Metab. **20**(6): p. 1059-68.
70. Spoendlin, H., *Retrograde degeneration of the cochlear nerve.* Acta Otolaryngol, 1975. **79**(3-4): p. 266-75.
71. Kujawa, S.G. and M.C. Liberman, *Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss.* J Neurosci, 2009. **29**(45): p. 14077-85.
72. Ohlemiller, K.K., J.S. Wright, and L.L. Dugan, *Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure.* Audiol Neurootol, 1999. **4**(5): p. 229-36.
73. Haigis, M.C. and L.P. Guarente, *Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction.* Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 2913-21.
74. Lu, S.P., M. Kato, and S.J. Lin, *Assimilation of endogenous nicotinamide riboside is essential for calorie restriction-mediated life span extension in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 2009. **284**(25): p. 17110-9.
75. Guarente*, D.A.S.a.L., *Extrachromosomal rDNA Circles—A Cause of Aging in Yeast.* Cell., 1997. **91**(7): p. 033–1042.

76. Zhang, H., et al., *NAD(+) repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice.* Science. **352**(6292): p. 1436-43.
77. Ryall, J.G., et al., *The NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells.* Cell Stem Cell. **16**(2): p. 171-83.
78. Stein, L.R. and S. Imai, *Specific ablation of Nampt in adult neural stem cells recapitulates their functional defects during aging.* EMBO J. **33**(12): p. 1321-40.
79. Quinn, K.P., et al., *Quantitative metabolic imaging using endogenous fluorescence to detect stem cell differentiation.* Sci Rep. **3**: p. 3432.
80. Bogan, K.L. and C. Brenner, *Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD+ precursor vitamins in human nutrition.* Annu Rev Nutr, 2008. **28**: p. 115-30.
81. Evans, C., et al., *NAD+ metabolite levels as a function of vitamins and calorie restriction: evidence for different mechanisms of longevity.* BMC Chem Biol. **10**: p. 2.
82. Bogan, K.L., et al., *Identification of Isn1 and Sdt1 as glucose- and vitamin-regulated nicotinamide mononucleotide and nicotinic acid mononucleotide [corrected] 5'-nucleotidases responsible for production of nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside.* J Biol Chem, 2009. **284**(50): p. 34861-9.
83. Magalhaes, K.T., et al., *Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir.* World J Microbiol Biotechnol. **26**(7): p. 1241-50.
84. Ferreira, I.M.P.L.V.O., Mendes, E., Gomes, A. M. P., Faria, M. A., & Ferreira, M. A. , *The determination and distribution of nucleotides in dairy products using HPLC and diode array detection.* Food Chemistry,, 2001. **74**(2): p. 239-244.