UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE APPLICATE E BIOTECNOLOGICHE

Dottorato di Ricerca in MEDICINA SPERIMENTALE

Curriculum - Biotecnologie e scienze biochimiche XXXVI ciclo

Titolo della tesi

Caratterizzazione molecolare ed inibizione del ruolo di protezione mitocondriale indotto dallo stress della proteina *"misfolded"* TrkAIII in cellule di Neuroblastoma SH-SY5Y

SSD MED/04- PATOLOGIA GENERALE

Dottoranda

Marianna Ruggieri

Coordinatore del corso

Prof.ssa Maria Grazia Perilli

Tutor

Prof. Andrew Reay Mackay

Correlatore

Prof.ssa Cappabianca Lucia Anna Maria

a.a.
2022/2023

Indice

1. INTRODUZIONE 4
1.0 TrkA....4
1.1 Le varianti di splicing del TrkA....7
1.2 Varianti di splicing TrkAI/II e TrkAIII: differenze....8
1.3 TrkAI e TrkAII come oncosoppressori....10
1.4 TrkAIII- variante di splicing oncogenica....11
1.5 TrkAIII nella regolazione della progressione tumorale....12
1.6 TrkAIII e ri-localizzazione – meccanismo oncogenico chiave....13
1.7 TrkAIII promuove lo stress del reticolo endoplasmatico (ER) attivando l'unfolded protein response (UPR) 17
1.8 Stress cronico dell'ER e alterazione dell'attività mitocondriale 19
1.9 Mitocondri e Reticolo Endoplasmatico 19
1.10 TrkAIII segnala lo stress dell'ER al mitocondrio - effetto Warburg....21
1.11 Mitocondrio e risposta proteica unfolded mitocondriale mt-UPR....24
1.12 Tirosin chinasi nei mitocondri 25
1.13 Neuroblastoma....27
1.14 Diagnosi, prognosi, terapie convenzionali ed innovative....28
2. SCOPO DEL LAVORO 31
3. MATERIALI E METODI....32
3.0 Linee cellulari e condizioni di coltura 32
3.1 Reagenti per trattamenti cellulari 32
3.2 Anticorpi....32
3.3 Immunofluorescenza indiretta (IF)....33
3.4 Analisi cellulare- saggio di citotossicità IncuCyte® 33
3.5 Estrazione proteica 34
3.6 Estrazione e purificazione mitocondriale 34
3.7 Western Blot 35
3.8 Calmodulina-sefarosio pull down....36
3.9 Co-immunoprecipitazione 36
3.10 Analisi statistica....37
4. RISULTATI....38
4.0 Il DTT induce la rilocalizzazione ed il clivaggio mitocondriale di TrkAIII, aumenta l'ossidazione delle PTPasi mitocondriali e migliora la resistenza alla morte indotta dal DTT. 38
4.1 L'importazione mitocondriale ed il clivaggio di TrkAIII indotti da DTT comportano un ripiegamento errato

ed una complessazione con Grp78 e Ca^{2+}-calmodulina. 41

4.2 L'importazione, il clivaggio e l'attivazione di TrkAIII mitocondriale sono regolati da Grp78, Ca^{2+}-calmodulina e Arf1. 45

.....49

4.3 L'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT dipende da Hsp90, MCU e ROS. 50

4.4 L'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT dipende da CAMKII e Akt. 55

4.5 La fosforilazione di Akt Ser-473 indotta da DTT dipende da CAMKII nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y e da CAMKII, TrkAIII e PI3K nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII 57

4.6 La resistenza di SH-SY5Y TrkAIII alla morte indotta da DTT dipende da PI3K e Akt.....60

Dati supplementari.....64

5. DISCUSSIONI 65

6. CONCLUSIONI 72

BIBLIOGRAFIA 74

SINTESI

Pediatric neuroblastomas (NBs) are heterogeneous, aggressive, therapy-resistant embryonal tumours that originate from cells of neural crest origin committed to the sympathoadrenal progenitor cell lineage. Stress and drug resistance mechanisms drive post therapeutic relapse and metastatic progression, the characterization and inhibition of which are major goals in improving therapeutic responses. Stress and drug resistance mechanisms in NBs include alternative TrkAIII splicing of the NTRK1/TrkA neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase, which correlates with post therapeutic relapse and advanced stage metastatic disease. The TrkAIII receptor variant exerts oncogenic activity in NB models by mechanisms that include stress-induced mitochondrial importation and activation. In this study, we characterize novel targetable and non-targetable participants in this pro-survival mechanism in TrkAIII expressing SH-SY5Y NB cells, using dithiothreitol (DTT) as an activator and a variety of inhibitors by regular and immunoprecipitation Western blotting of purified mitochondria and Incucyte cytotoxicity assays. We report that stress-induced TrkAIII misfolding initiates this mechanism, resulting in Grp78, Ca^{2+}-calmodulin, adenosine ribosylating factor 27 (Arf) and Hsp90-regulated mitochondrial importation. TrkAIII imported into inner mitochondrial membranes is cleaved by OmiHtrA2 then activated by a mechanism dependent upon CaMKII/Akt, mitochondrial Ca^{2+} uniporter and ROS, involving inhibitory mitochondrial PTPase oxidation, resulting in PI3K activation of mitochondrial Akt, which enhances stress resistance. This novel prosurvival function for misfolded TrkAIII mitigates the cytotoxicity of mitochondrial Ca^{2+} homeostasis disrupted during integrated stress responses, and is prevented by clinically approved Trk and Akt inhibitors, and also by inhibitors of Grp78, Hsp90, Ca^{2+}-calmodulin and PI3K. This identifies Grp78, Ca^{2+}-calmodulin, Hsp90, PI3K and Akt as novel targetable participants in this mechanism, in addition to TrkAIII, the inhibition of which has potential to enhance the stress-induced elimination of TrkAIII expressing NB cells, with potential to improve therapeutic outcomes in NBs that exhibit TrkAIII expression and activation.

1. INTRODUZIONE

1.0 TrkA

Il recettore TrkA (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor Type 1-NTRK1) è un membro della famiglia dei recettori tirosin-chinasici delle neurotrofine (NT), insieme ai recettori TrkB e TrkC (Patapoutian and Reichardt, 2001). Il TrkA regola le risposte alle neurotrofine NGF e NT3 in un'ampia varietà di tessuti ed è fondamentale per il normale sviluppo e funzione del sistema nervoso centrale, periferico ed immunologico (Farina et al., 2018). Relativamemte al sistema nervoso periferico, il TrkA è coinvolto nella regolazione della formazione, differenziamento e sopravvivenza dei neuroni simpatici che originano dai progenitori della cresta neurale (Ernsberger, 2009). È importante sottolineare che la segnalazione di Trk non è limitata al sistema nervoso, ma è invece sempre più riconosciuta anche in tessuti non neuronali (Shibayama et al., 1996). Il gene che codifica per il TrkA mappa sul cromosoma 1q 21-22q (Weier et al., 1995) ed è organizzato in 17 esoni per un totale di 25 Kb. Il prodotto di questo gene è una proteina transmembrana di 790 amminoacidi, formata da un dominio **extracellulare**, uno **transmembrana** e uno **intracellulare** (Windisch, Marksteiner et al., 1995).

Nel dominio extracellulare N-terminale, importante per il legame con il ligando, i residui da 1 a 32, prevalentemente basici, costituiscono il peptide segnale necessario per la corretta localizzazione del recettore, mentre la porzione dal residuo 33 al 407 contiene molti siti di glicosilazione ed è formata da due motivi ricchi di cisteina, separati da un motivo ricco in leucina (LRM), e da due motivi IG-like C1 e C2 importanti per il legame con il ligando. I siti di N-glicosilazione sono importanti per la corretta localizzazione del TrkA sulla superficie (Windisch, Auer, et al., 1995). Il dominio transmembrana, di 26

Fig. 1

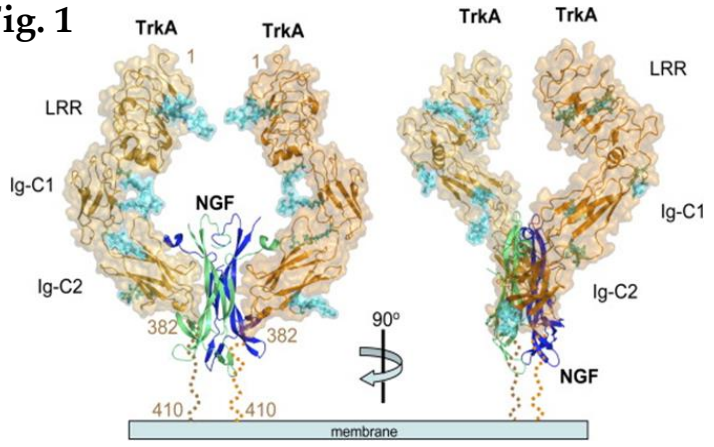


Figura 1- Due viste laterali del complesso come apparirebbe sulla superficie della cellula. I domini extracellulari del TrkA sono in arancione e mostrati come nastri con superficie molecolare trasparente, l'NGF è mostrato in blu/verde e mostrato solo come nastri (Wehrman et al., 2007).

amminoacidi (408-433), contiene tre residui basici conservati e responsabili dell'ancoraggio di TrkA sulla membrana. A valle della regione transmembrana, nel compartimento citosolico, si trova il sito catalitico con attività tirosin-chinasica di circa 266 amminoacidi (510-775) che presenta anche il sito di legame per l'ATP ed il loop per l'autofosforilazione. Inoltre qui troviamo una coda C-terminale responsabile dell'attività chinasica (Windisch, Auer et al., 1995; Kaplan et al., 1991) (Fig.2).

In assenza di ligando, il recettore TrkA è mantenuto sulla superficie in forma monomerica inattiva in caveole contenenti Caveolina-1, associate a Ras. La forma inattiva viene mantenuta tale dalla N-glicosilazione del dominio extracellulare, dalla presenza dei domini IG-like (che prevengono la dimerizzazione spontanea in assenza di ligando per repulsione elettrostatica) e da proteine tirosin-fosfatasi (PTPasi) associate al recettore (Arevalo et al., 2001; Marsh et al., 2003; Watson et al., 1999). Nel momento in cui avviene l'interazione tra recettore e ligando si ha una diminuzione della repulsione elettrostatica tra i monomeri ed una temporanea inattivazione delle PTPasi, questo favorisce la dimerizzazione del recettore, con conseguente autofosforilazione di specifici residui di tirosina (Y490, Y674/675, Y751 e Y785) nei domini citosolici. In particolare:

- il residuo fosforilato di Y490 interagisce con FRS2 e Sch;
- Y674/675 con Grb-2/SOS;
- Y751 lega la subunità p85α del PI3K
- Y785 interagisce con PLCγ (Patapoutian e Reichardt, 2001).

Fig. 2

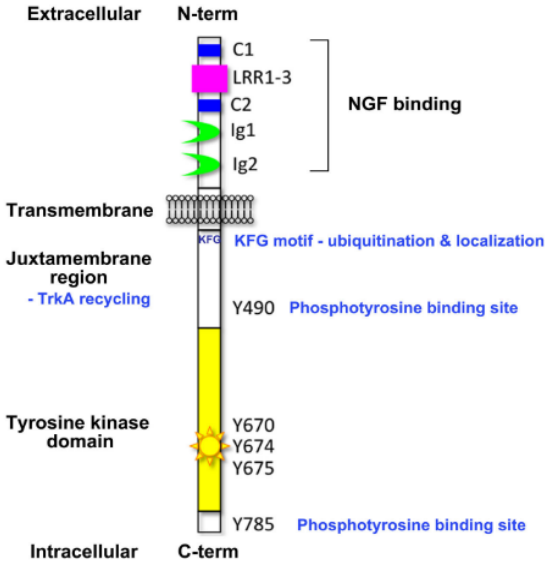


Figura 2- Domini del recettore (Uren and Turnley, 2014).

La trasduzione del segnale intracellulare continua poi mediante le vie Ras/MAPK, PI3K/Akt/NFkB o PKC (Fig.3).

Fig. 3

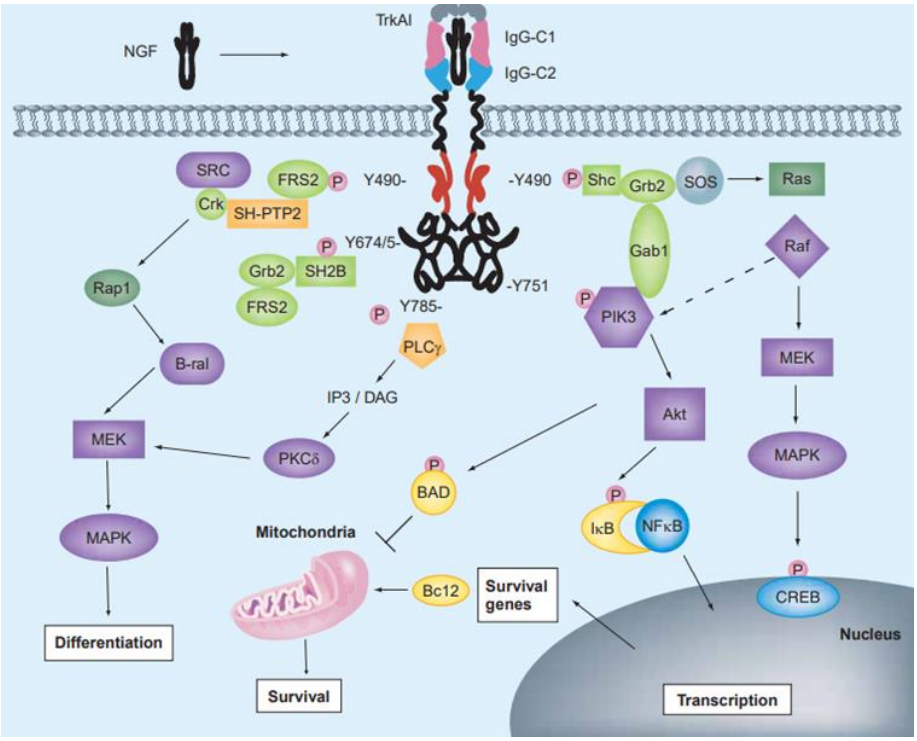


Figura 3- Pathway molecolare del signaling del recettore TrkA (Tacconelli et al., 2005).

Oltre alla forma localizzata a livello della superficie cellulare, sono presenti forme immature del recettore TrkA a livello delle membrane intracellulari dell'apparato del Golgi (Rajagopal et al., 2004). La localizzazione di TrkA a livello di questo compartimento cellulare è attribuibile al transito, nel corso del processo di maturazione, di recettori neosintetizzati, così come pure ad un'alterata N-glicosilazione dei domini extracellulari. Tali forme immature possono essere transattivate tramite il coinvolgimento di recettori associati a proteine G (es. recettore adenosinico A2α), dimostrando che vi sono meccanismi di attivazione intracellulare anche in assenza di legame con le neurotrofine. Questo tipo di attivazione, inoltre, comporta la trasduzione del segnale attraverso la via PI3K/Akt e non la via Ras/MAPK, con induzione del fattore di trascrizione NF-kB e di un fenotipo cellulare maggiormente resistente allo stress (Watson et al., 1999).

L'attivazione oncogenica TrkA per mutazione puntiforme, delezione o nuova formazione di chimere a causa di riarrangiamenti cromosomici provoca dimerizzazione e attivazione spontanea del recettore ligando-indipendente, trasduzione cronica del segnale e trasformazione cellulare (Tacconelli et al., 2004). Il primo oncogene umano derivato da TrkA è stato identificato nel cancro del colon come una nuova

fusione chimerica tra sequenza codificante la tropomiosina e la proteina Trk tirosina chinasi (Martin-Zanca et al., 1986). Ciò ha preceduto la caratterizzazione del protoncogene TrkA come recettore dell'NGF (Klein et al., 1991) e l'identificazione di numerosi oncogeni derivati da TrkA in un'ampia gamma di tumori umani tra cui i carcinomi del colon, della tiroide, della prostata e la leucemia mieloide acuta (Oskam et al., 1988, Martin-Zanza et al., 1986; Coulier et al., 1990; Borrello et al., 1994; George et al., 1998; Greco et al., 1996; Butti et al., 1995; Reuther et al., 2000; Arevalo et al., 2001). Proprio alla luce di queste evidenze sul coinvolgimento dei mutanti del gene NTRK nelle malattie oncologiche, l'attenzione dei ricercatori è rivolta a comprendere al meglio i meccanismi di promozione turmorale guidati da recettori Trk. Ad oggi sono stati compiuti sforzi nello sviluppo di terapie mirate attraverso l'utilizzo di inibitori Trk tra cui Larotrectinib (Vitrakvi ®) ed Entrectinib (Rozlytrek ®), farmaci antitumorali approvati dall'FDA nel 2018 e 2019 (Jiang et al., 2021).

1.1 Le varianti di splicing del TrkA

Lo splicing alternativo è un meccanismo cellullare fondamentale che consente a un singolo gene di codificare per più proteine attraverso l'utilizzo di esoni alternativi; è in gran parte responsabile della complessità proteomica degli organismi superiori (Modrek and Lee, 2002). Tale meccanismo è inoltre implicato nell'insorgenza di vari tipi di tumore in quanto le alterazioni nello splicing possono promuovere la tumorigenesi (Liu et al., 2022).

Il gene TrkA, organizzato in 17 esoni, presenta splicing alternativo ed è espresso come:

• varianti **TrkA L0** (esoni 2-3-4 deleti) o **L1** (esoni 2-3 deleti) originariamente individuati nell'embrione di ratto (timo, testicoli, polmoni e reni) (Dubus et al., 2000) che non sembrano essere coinvolti in patologie tumorali; lo splicing alternativo Δ 2-4 determina una mancanza di motivi ricchi di leucina del dominio extracellulare. Dal momento che questi ultimi modulano l'interazione del ligando con i domini IG-like, è presumibile che i recettori tronchi L0 e L1 abbiano un'alterata capacità di legame con il ligando e quindi un'alterata funzionalità (Windisch et al., 1995).

• varianti **TrkAI** e **TrkAII** che differiscono per la presenza (TrkAII) o assenza (TrkAI) dell'esone 9 (Barker et al., 1993); in base al loro grado di glicosilazione possono avere un diverso peso molecolare di 110kDa o 140kDa, sono associate alla membrana ed agiscono come recettori per le neurotrofine NGF e NT-3. Mostrano un'espressione tessuto-specifica: TrkAI prevale nei tessuti non neuronali come il timo (Parrens et al., 1998) e nel rene; TrkAII è per lo più espressa nei tessuti nervosi (Barker et al., 1993).

• variante **TrkAIII** mancante degli esoni 6, 7 e 9 con conseguente traduzione di una proteina di circa 100 kDa. La mancanza di questi esoni si traduce nella perdita, nel dominio extracellulare, di una sequenza ammoniacidica (compresa fra i residui 192 e 284) corrispondente al dominio IG-like C1 e a quattro siti di N-glicosilazione (Tacconelli et al., 2004), importanti per il corretto traffico intracellulare del recettore, la corretta localizzazione sulla superficie cellulare e per la prevenzione di attivazione spontanea ligando indipendente (Farina et al., 2015).

1.2 Varianti di splicing TrkAI/II e TrkAIII: differenze

Le varianti di splicing TrkAI/II e TrkAIII possiedono numerose differenze, come:

- **Dimensioni molecolari**: il recettore TrkAI è espresso in una forma immatura di 110 kDa ed una matura N-glicosilata di 140 kDa. Il TrkAIII è espresso come una proteina di 100 kDa.
- **Localizzazione cellulare**: la forma matura del recettore TrkA di 140 kDa è per lo più espressa sulla superficie cellulare, mentre la forma immatura di 110 kDa si accumula a livello dell'apparato di Golgi. Il TrkAIII non è rilevabile sulla superficie ma è espresso unicamente a livello intercellulare; esso rimane internalizzato e si accumula nelle membrane intracellulari del reticolo endoplasmatico (ER), del compartimento intermedio tra reticolo endoplasmatico e Golgi (ERGIC), dell'apparato del Golgi, dei compartimenti vescicolari associati e nei centrosomi, all'interno dei quali risulta distribuito in quantità relativamente uguali (Tacconelli et al., 2004, Farina et al., 2009a, 2009b, 2017).
- **Attivazione recettoriale**: a differenza del TrkAI/II, l'isoforma TrkAIII esibisce un'attività ligando-indipendente e non interagisce con le neurotrofine.
- **Trasduzione del segnale**: in risposta al ligando TrkAI attivato lega le proteine adattatrici Shc, Grb2 e FRS2 e media la trasduzione del segnale tramite le vie PI3K/Akt e Ras/MAPK. Il TrkAIII invece è costitutivamente fosforilato in Y490, Y674/675 e Y785 e mostra una trasduzione del segnale che coinvolge unicamente la via PI3K/Akt/NF-Kb (Tacconelli et al., 2004, Farina et al., 2009a, 2009b).

Fig. 4

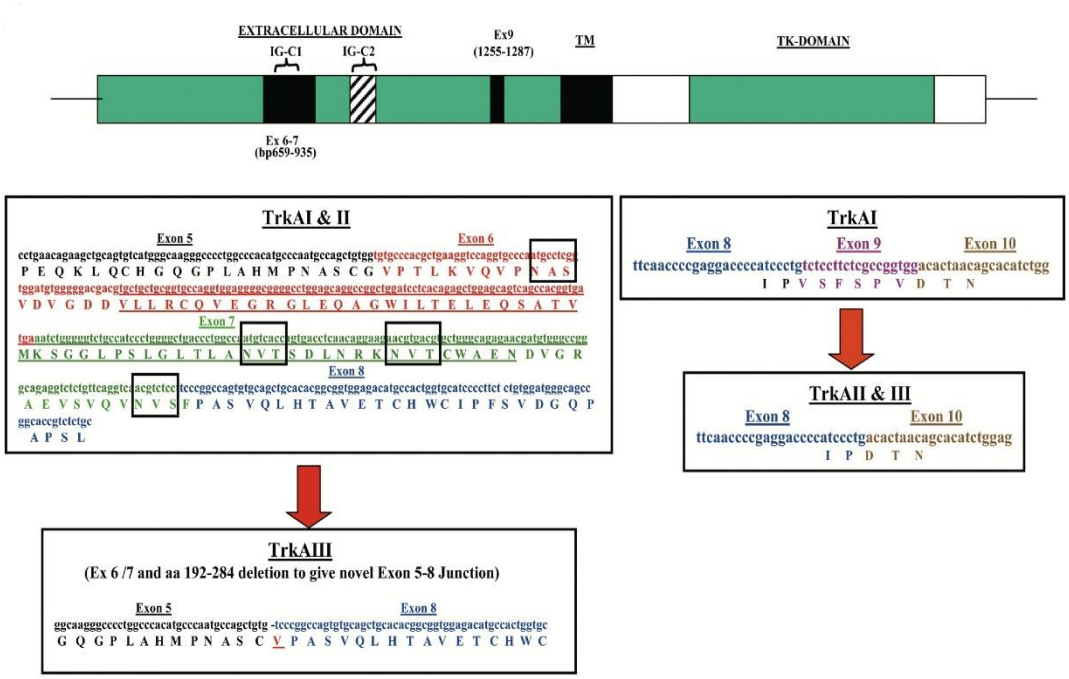


Figura 4- Rappresentazione schimatica delle varianti di splicing di TrkA. Nei riquadri grandi sono riportate le sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche corrispondenti agli esoni 5, 6, 7 e 8. Nei riquadri più piccoli sono evidenziati i potenziali siti di N-glicosilazione. Inoltre è indicata la sequenza amminoacidica corrispondente alla nuova giunzione esone 5-8 presente in TrkAIII. Nei riquadri a destra sono riportate le sequenze nucleotidiche e amminoacidiche relative all'esone 9 presente solo nella variante TrkAIII (Tacconelli et al., 2004).

L'attivazione costitutiva e la diversa distribuzione cellulare del TrkAIII sono attribuibili alla mancanza, in questa isoforma, del dominio IG-like C1 e dei correlati siti di N-glicosilazione, che prevengono la dimerizzazione ed attivazione di TrkA in assenza di ligando e ne regolano l'espressione sulla superficie cellulare (Tacconelli et al., 2004, Arevalo et al., 2000, Watson et al., 1999). Relativamente ai meccanismi di trasduzione del segnale, le differenze tra le due isoforme sono presumibilmente dovute dal fatto che la localizzazione intracellulare di TrkAIII ne comporta la dissociazione dalle caveole associate a Ras/MAPK; inoltre TrkAIII mostra un'alterata attività di interazione con le proteine adattatrici che mediano i processi di segnalazione (Tacconelli et al., 2004).

1.3 TrkAI e TrkAII come oncosoppressori

L'espressione di TrkAI e TrkAII risulta essere inversamente correlata ai comportamenti maligni dei tumori di origine neuronale e in particolare nel Neuroblastoma (NB) e nel Medulloblastoma (MB). Alti livelli di espressione sono associati con tumori meno aggressivi, pertanto la presenza di queste forme di splicing del recettore sembra essere legata ad una prognosi favorevole (Nakagawara, 2001; Shimada et al., 2004). In aggiunta a questa potenziale funzione oncosoppressiva di TrkAI/II, in cellule derivate dal NB e dal MB, è stata osservata una reintegrazione della responsività all'NGF in seguito alla reintroduzione di un'adeguata espressione di TrkA con conseguente induzione di apoptosi, differenziamento, inibizione della proliferazione e inibizione dell'attività tumorigenica nel NB; tutti effetti legati al segnale ligando-dipendente attraverso la via Ras/MAPK (Tacconelli et al., 2004).

Inoltre, è stato dimostrato che l'espressione di TrkA inibisce l'angiogenesi e la crescita tumorale in cellule SH-SY5Y di NB, tramite la down-regolazione di fattori angiogenetici (Nakagawara, 2004; Eggert et al., 2000). L'attivazione del recettore TrkA, in cellule di NB, induce l'apoptosi in maniera p53-dipendente coinvolgendo la proteina CCM2 (cerebral cavernous malformation 2), ERK (extracellular-signal regulated kinases) e la caspasi 7. Inoltre, il TrkA potrebbe agire come un cosiddetto "recettore di morte" reclutando $p75^{NTR}$ per promuovere l'apoptosi anche in assenza di ligando (Nikoletopoulou et al., 2010). Questi dati suggeriscono che le varianti di splicing TrkAI e TrkAII agiscono come oncosoppressori in tumori di origine neuronale come il NB e il MB e che la regressione del NB, sia spontanea che indotta dalla terapia, non potrebbe sussistere in assenza dell'espressione di queste due forme (Nakagawara, 2001). La caratteristica oncosoppressiva delle varianti del recettore tirosin-chinasico sembra avere un ruolo tumore-specifico, infatti essa non si ritrova in altri tumori di origine neuronale e non (come tumore al seno e astrocitomi) in cui pare che la segnalazione dell'NGF attraverso recettori non alterati sia legata alla proliferazione e alla sopravvivenza cellulare (Descamps et al., 2001). Nei NB umani, l'espressione di TrkAIII si associa a malattia metastatica in stadio avanzato, recidiva post-terapeutica e prognosi peggiore, mentre l'espressione di TrkA full spliced si associa a prognosi migliore, regressione spontanea e maggiore sopravvivenza (Ruggeri et al. 2013, Schramm et al. 2012).

1.4 TrkAIII- variante di splicing oncogenica

La variante di splicing TrkAIII è stata identificata per la prima volta nel laboratorio dove ho svolto il mio dottorato di ricerca, come un prodotto TrkA RT-PCR inaspettato in NB umani primari e il cDNA TrkAIII a lunghezza intera è stato successivamente clonato in cellule umane SH-SY5Y NB (Tacconelli et al., 2004). Come descritto nei paragrafi precedenti, la variante TrkAIII manca dell'esone 6, 7 e 9. L'eliminazione di questi esoni produce una proteina di circa 100 kDa. L'eliminazione degli esoni 6 e 7 fa perdere al recettore TrkAIII una importante sequenza amminoacidica (dal 192 al 284) che codifica sia per la sequenza extracellulare IG-C1 che per quattro siti potenziali di N-glicosilazione. La perdita della IG-C1 causa un'attivazione costituzionale del recettore che non ha quindi bisogno del legame dell'NGF per dimerizzare ed essere attivato, in quanto presenta le tirosine del dominio citosolico già fosforilate. Inoltre, in cellule di neuroblastoma SH-SY5Y trasfettate con TrkAIII si ha attivazione della sola via PI3K, la quale non induce il differenziamento neurale, ma aumenta la capacità di crescita substrato-indipendente e la tumorigenicità delle cellule (Tacconelli et al., 2004).

La ridotta N-glicosilazione dei domini extracellulari di TrkA ne induce l'intrappolamento intracellulare (Watson et al., 1999), questo potrebbe spiegare la sua incapacità di legare e di rispondere all'NGF esogeno (Tacconelli et al., 2004) infatti, la delezione di IG-C1 diminuisce, ma non elimina il legame di TrkA all'NGF (in vitro).

Fig. 5

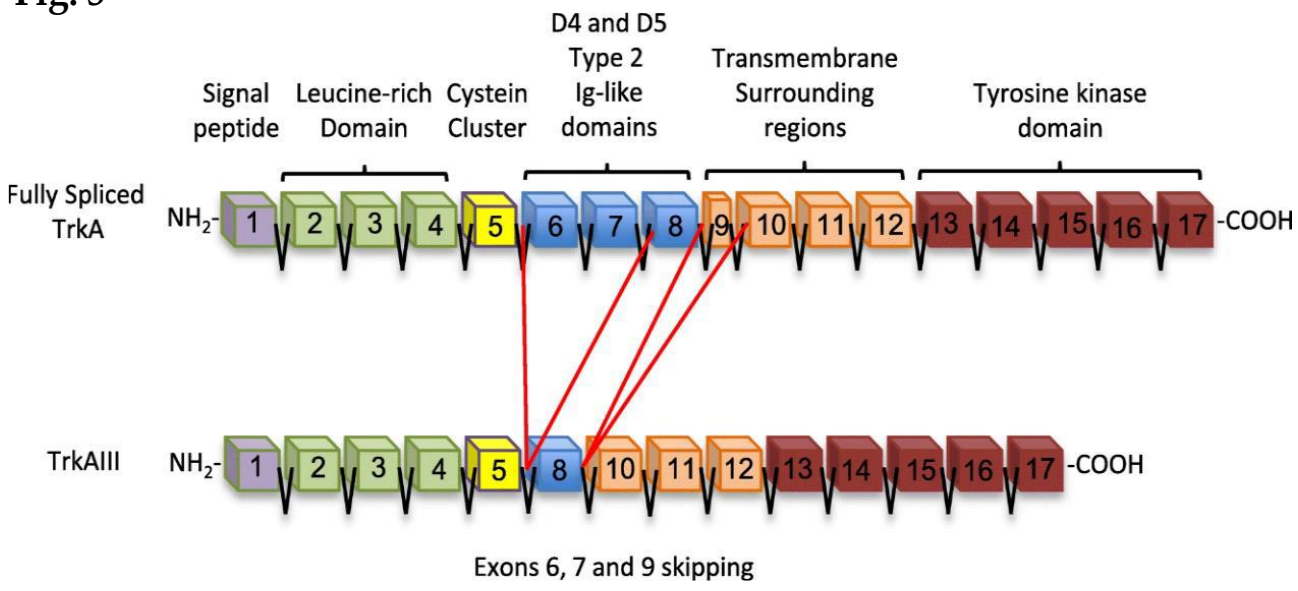


Figura 5 - Struttura del TrkA e della variante di splicing TrkAIII (Farina et al., 2018)

La localizzazione intracellulare spiegherebbe anche le differenze di segnale: poiché il TrkAIII è localizzato sul Golgi/RE risulta dislocato dalle caveole alle quali sarebbe associato a Ras/MAPK. Inoltre, la trasduzione del segnale mediata da TrkAIII è strettamente somigliante al segnale indotto dalle forme immature del recettore TrkA associate al Golgi, ed è attivato dal recettore adenosinico A2α associato ad una proteina G attraverso le pathway della sola via PI3K/Akt e non della via Ras/MAPK (Rajagopal et al., 2004). Questo suggerisce che la presenza di TrkAIII costitutivamente attivo fra le membrane del Golgi può essere determinante nel suo potenziale oncogenico.

Il recettore TrkAIII promuove la trasformazione di fibroblasti murini NIH3T3, conferendo loro attività tumorigenica in topi nudi. Elevati livelli di espressione del TrkAIII accompagnati invece da una diminuita espressione di TrkAI/II sono stati associati a metastatizzazione ossea in Neuroblastomi di stadio avanzato (Tacconelli et al., 2004). L'espressione del recettore TrkAIII è stata rilevata anche in cellule staminali non tumorigeniche e nei progenitori della cresta neurale; ne consegue che la sua capacità di indurre la trasformazione cellulare dipenda da altri fattori.

Un potenziale meccanismo coinvolto nella promozione dello splicing alternativo di TrkAIII è stato individuato nell'ipossia, regolatore positivo dell'angiogenesi e della progressione tumorale (Harris 2002; Jögi et al., 2002). Infatti in linee cellulari di Neuroblastoma è stato promosso lo splicing di TrkAIII mimando, mediante trattamento con $CoCl_2$, condizioni di ipossia fisiologica. È dunque presumibile che l'ipossia costituisca un meccanismo epigenetico attraverso il quale segnali antioncogenici mediati da TrkAI sono convertiti, durante la progressione tumorale, in segnali protumorali mediati da TrkAIII (Tacconelli et al., 2004). L'ipossia promuove l'espressione di TrkAIII anche in cellule staminali neuronali e progenitori della cresta neurale non differenziati, suggerendo per il suddetto recettore anche un importante ruolo fisiologico nella protezione cellulare da condizioni ostili; tale funzione protettiva viene a perdersi in seguito a differenziamento, ma è mantenuta in tumori neuroblastici derivati dalla cresta neurale di cui promuove la progressione tumorale (Tacconelli et al., 2004).

1.5 TrkAIII nella regolazione della progressione tumorale

Sono diversi i livelli in cui il TrkAIII manifesta la sua attività oncogenica, intervenendo nella regolazione di più meccanismi molecolari. Innanzitutto il TrkAIII promuove la sopravvivenza di cellule di Neuroblastoma tramite la via di trasduzione del segnale PI3K/Akt/NF-kB e non segue invece la via di trasduzione NGF/TrkA/Ras/MAPK la cui attivazione invece comporterebbe l'arresto della crescita cellulare e differenziamento (Tacconelli et al., 2004). Una rapida proliferazione tumorale è sostenuta da

un efficiente angiogenesi che ha un ruolo essenziale nell'organizzazione di una fitta rete vascolare, spesso disorganizzata, la cui funzione primaria è quella di garantire ossigenazione e nutrizione della massa tumorale (Folkman, 2006). In linee cellulari di Neuroblastoma, TrkAI e TrkAII, in accordo con un loro ruolo oncosoppressivo, riducono l'espressione di fattori angiogenetici come VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ed inoltre compromettono la tumorigenicità di Neuroblastomi in modelli murini xenograft, riducendo l'espressione di fattori angiogenetici e vascolarizzanti (Eggert et al., 2000). Contrariamente alle isoforme I e II, la variante di splicing TrkAIII promuove la crescita tumorale in vivo di cellule SH-SY5Y e le noe-vascolarizzazione alterando, tramite PI3K, l'importante equilibrio fra la metalloproteinasi MMP-9, VEGF e la trombospondina 1 (Tsp-1) (Tacconelli et al., 2004). Un altro meccenismo oncogenico attraverso il quale TrkAIII esprime il suo potenziale oncogenico è l'amplificazione del centrosoma (dovuta da un'alterazione dell'equilibrio chiasi-fosfatasi), dove viene reclutato tramite l'interazione con la γ-tubulina, promuovendo instabilità genica (aneuploidia e polipoliodia) (Farina et al., 2009a).

Inoltre il TrkAIII promuove l'oncogenesi tramite induzione di un fenopito cellulare più resistente allo stress indotto da agenti citotossici chemioterapici come la doxorubicina e la geldanamicina (Tacconelli et al., 2004, Farina et al., 2009b). Più precisamente, la doxorubicina attiva l'aumento di espressione della variante di splicing TrkAIII in linee cellulari di SH-SY5Y. Questo meccanismo ha il potenziale per selezionare cellule NB resistenti, dormienti, che esprimono TrkAIII, che potrebbero rientrare nel ciclo cellulare con un fenotipo più metastatico. Questo meccanismo è specifico per TrkAIII, non influenza TrkA full spliced, migliorando la resistenza alla doxorubicina attraverso la segnalazione PI3K/Akt causando inoltre una parziale risposta allo stress dell'ER (Cappabianca et al., 2022; Farina et al., 2009b). La variante di splicing alternativa oncogenica TrkAIII è stata individuata anche in associazione con Melanoma Cutaneo Maligno di stadio avanzato (Cappabianca et al., 2023), Carcinoma a cellule di Merkel (Cappabianca et al., 2019) e più recentemente in tumori neuroendocrini ipofisari (Sbaffone et al., 2024).

1.6 TrkAIII e ri-localizzazione – meccanismo oncogenico chiave

La rilocalizzazione intracellulare di TrkAIII e il comportamento oncogenico supportano il concetto crescente secondo cui l'errata localizzazione degli oncogeni derivati da TrkA è alla base della segnalazione oncogenica (Martin-Zanca et al. 1986, Greco et al. 1995, Tacconelli et al., 2004, Farina et al. 2009a). Mutazioni oncogene nei recettori tirosin-chinasici (RTK) possono portare all'attivazione mislocalizzata dei recettori all'interno del citoplasma o nei compartimenti intracellulari, dove possono innescare signalling aberranti. Inoltre la sovraespressione di chinasi oncogene può promuovere l'accumulo di

proteine non ripiegate (unfolding) o mal ripiegate (misfolding). L'aggregazione di quest'ultime può compromettere il loro traffico verso la superficie cellulare (Choudhary et al. 2009). Un esempio è l'oncogene chimerico Trk-T3, recettore coinvolto nel carcinoma tiroideo, il quale viene ri-localizzato nei siti di uscita del reticolo endoplasmatico (ERES), esibisce attivazione spontanea all'interno dell'ERES associato a vescicole COPII e induce un signalling oncogenico attraverso Akt (Tacconelli et al., 2004, Johnson et al., 2015).

È interessante sottolineare come la mera over-espressione del recettore TrkA in alcuni tipi cellulari causa una spontanea e intracellulare attivazione con un alterato signalling. Un esempio è la linea cellulare umana immortalizzata di rene (HEK 293) in cui una over espressione di TrkA risulta in un'attivazione spontanea all'interno del compartimento ERGIC (Reticolo Endoplasmatico Comparto intermedio del Golgi) che causa una mancata maturazione all'interno del Golgi. Questo accumulo intracellulare facilita la spontanea attivazione del recettore e signalling attraverso Akt, in maniera analoga all'oncoproteina TrkAIII (Tacconelli et al., 2004, Schecterson et al., 2010).

Nella linea cellulare di Neuroblastoma SH-SY5Y, il TrkA nascente ancora immaturo N-glicosilato di 100 kDa si muove rapidamente dal reticolo endoplasmatico (ER) al Golgi, dove completa la sua maturazione a recettore di 140 kDa prima di essere trasportato sulla supercifice cellulare, mantenuto in stato inattivo grazie a PTPasi endogene (Farina et al., 2015).

La mancanza del dominio extracellulare D4 IG-like e di molti siti di N-glicosilazione, causati dallo skipping degli esoni 6 e 7 nella variante di splicing TrkAIII, determina una localizzazione intracellulare del recettore. Questi siti sono fondamentali nella corretta coordinazione del traffico intracellulare del TrkAIII; di conseguenza il recettore risulta intrappolato e ri-localizzato nelle membrane intracellulari, dove esibisce un signalling tipico, diverso da TrkA. La marcata differenza nella localizzazione, nel traffico intracellulare e nell'attivazione mostrata da TrkA e TrkAIII nelle cellule SH-SY5Y conferma il ruolo critico svolto dalla sequenza codificata degli esoni 6 e 7. Quest'ultima quindi è fondamentale nell'ottimizzazione del traffico intracellulare dall'ER al Golgi, riducendo il potenziale di attivazione spontanea intracellulare e promuovendo la maturazione dei recettori, un passaggio essenziale per l'espressione sulla superficie cellulare. Tutti questi aspetti suggeriscono come la ri-localizzazione del recettore TrkAIII è fondamentale per la sua attività oncogenica (Farina et al., 2015).

Il meccanismo che determina la ri-localizzazione del TrkAIII è caratterizzato da un trasporto retrogrado del recettore che dall'ERGIC torna indietro all'ER, impedendo quindi il consueto trasporto anterogrado verso il Golgi, dove andrebbe incontro a maturazione. Questo traffico alterato causa un meccanismo auto-

perpetuante in cui il TrkAIII si accumula all'interno del compartimento ERGIC/COPI esibendo un signalling oncogenico attraverso Akt (Farina et al., 2015). L'attivazione di TrkAIII all'interno del compartimento ERGIC/COPI differisce dall'attivazione dell'oncogene TrkT3, che si verifica all'interno del compartimento ERES/COPII. Ciò può essere spiegato da diversi meccanismi di ri-localizzazione. Il TrkT3 è intrappolato all'interno del compartimento ERES/COPII da sequenze chimeriche TFG, non presenti in TrkAIII, che regolano la formazione delle vescicole COPII (Johnson et al., 2015).

Entrambi i meccanismi, tuttavia, determinano un'attivazione spontanea ed una segnalazione oncogenica di Akt dalle rispettive posizioni, confermando che le oncoproteine TrkA, compromesse da mutazioni o splicing alternativo, possono rilocalizzarsi su diverse membrane intracellulari (Farina et al., 2015). Ciò imposta un riciclo autoperpetuo che non solo garantisce un accumulo di TrkAIII all'interno dell'ER per indurre un'attivazione parziale dell'UPR, ma anche per superare la soglia di attivazione spontanea all'interno del compartimento ERGIC/COPI, probabilmente causata anche da livelli più bassi di PTPasi defosforilanti TrkAIII all'interno di questo compartimento (Farina et al., 2017).

Inoltre il trasporto retrogrado facilita il reclutamento del TrkAIII al centrosoma, dove si complessa sia con la γ che con l'α-tubulina, promuovendone la polimerizzazione e contribuendo alla promozione e mantenimento di un fenotipo cellulare proliferante, indifferenziato e anaplastico (Farina et al. 2009a, 2013). Questo meccanismo di trasporto retrogrado del recettore TrkAIII è sovvertito da inibitori del TrkA i quali invece promuovono un corretto traffico anterogrado, che porta il TrkAIII nel Golgi dove va incontro a maturazione in una specie di 120 kDa la quale però non raggiungerà la superficie cellulare ma verrà facilmente indirizzata verso la degradazione proteosomiale. Ciò indica che il riciclo retrogrado di TrkAIII all'ER e il ridotto trasporto verso il GN dipendono dall'attività di TrkAIII (Farina et al., 2015). Nel caso del recettore fully-spliced TrkA, i domini IG-like D4 e D5 consentono un mantenimento dello stato inattivo del recettore ed un completo stato di N-glicosilazione riduce l'accumulo aberrante all'interno delle membrane intracellulari, promuovendo invece la sua traslocazione sulla superficie cellulare (Fig.6).

Fig. 6

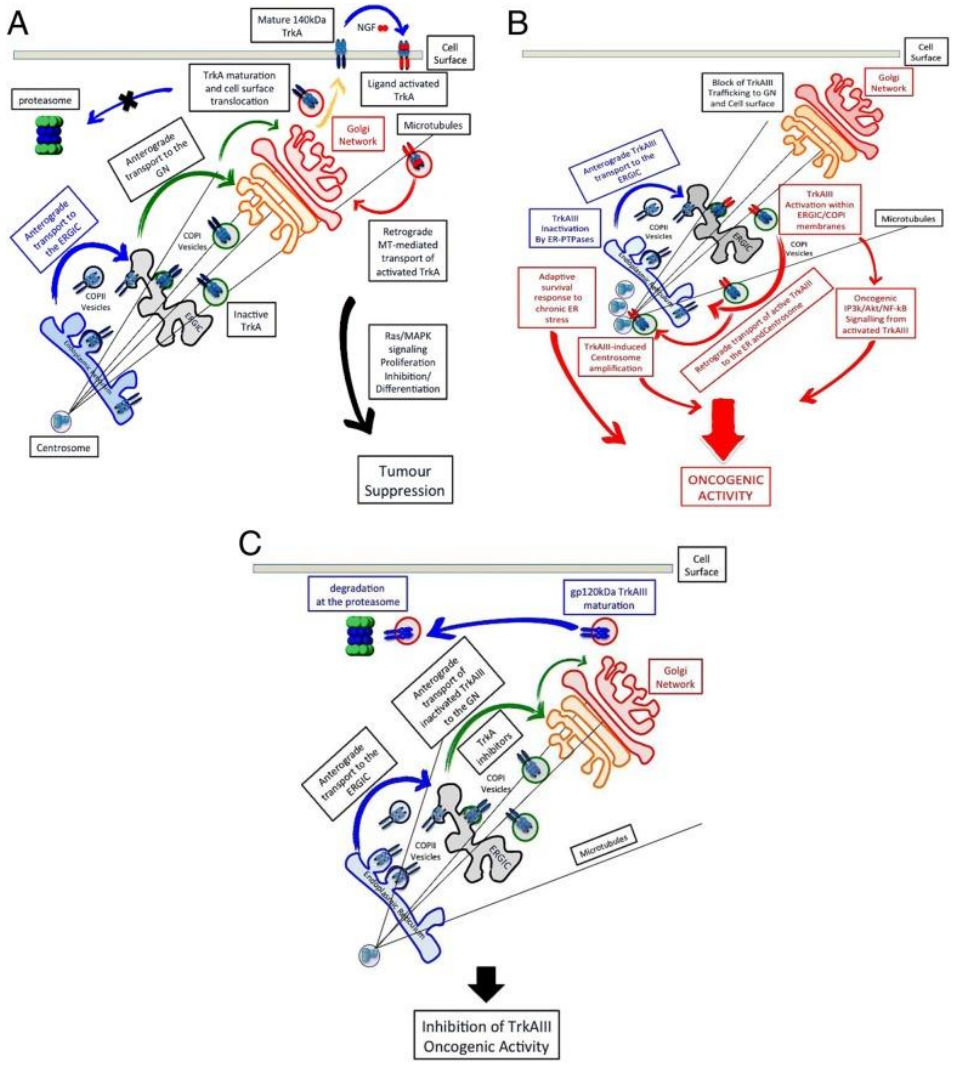


Figura 6 - Rappresentazione schematica di: **a)** traffico di recettori TrkA fully spliced dai compartimenti intracellulari alla superficie cellulare. Trasporto anterogrado di recettori TrkA immaturi inattivi dall'ER all'ERGIC e al GN, dove maturano prima di essere trasportati sulla superficie cellulare, più il destino dei recettori TrkA della superficie cellulare attivati dalle neurotrofine che mostrano un trasporto retrogrado diretto MT minus-end dipendente dalla proteina motrice al GN. **b)** Traffico intracellulare di TrkAIII. Trasporto anterogrado di TrkAIII immaturi inattivi dall'ER all'ERGIC, attivazione spontanea all'interno delle membrane ERGIC/COPI che blocca il trasporto anterogrado al GN e promuove il trasporto retrogrado del TrkAIII attivo all'ER e centrosoma. **c)** Traffico alterato di TrkAIII in presenza dell'inibitore della tirosina chinasi Trk, caratterizzato dal trasporto anterogrado di TrkAIII inattivo dall'ER a ERGIC e GN, con conseguente maturazione di TrkAIII 120kDa associato a GN, degradazione di TrkAIII maturo al proteasoma e inibizione dell'attività oncogenica di TrkAIII (Farina et al., 2018).

1.7 TrkAIII promuove lo stress del reticolo endoplasmatico (ER) attivando l'unfolded protein response (UPR)

Le cellule tumorali utilizzano molteplici percorsi di risposta allo stress per contrastare i fattori di stress esogeni o endogeni e per migliorare la loro sopravvivenza e proliferazione. Questi percorsi includono la risposta integrata allo stress (ISR), la risposta allo shock termico citosolico (HSR) e la risposta proteica unfolded (UPR) mediata da organelli come il Reticolo Endoplasmatico (ER) e il mitocondrio (Quirós et al., 2016; Pakos-Zebrucka et al., 2016; Hetz 2012).

Lo stress del reticolo endoplasmatico è una particolare condizione che si verifica quando, in risposta a diversi stimoli, viene alterato il normale funzionamento di questo organello con conseguente accumulo di proteine non ripiegate (unfolding) o mal ripiegate (misfonding) (Schröder, 2008). Lo stress all'interno del microambiente tumorale promuove la progressione del tumore selezionando cellule tumorali resistenti che sono protette contro la morte indotta dallo stress mediante meccanismi fisiologici conservati di protezione. La risposta allo stress del Reticolo Endoplasmatico (ERSR) rappresenta uno di questi meccanismi che viene conservato dalle cellule tumorali e utilizzato per l'adattamento e la sopravvivenza all'interno del microambiente tumorale stressante (Farina et al., 2017). Ne consegue una risposta cellulare evoutivamente conservata e nota come Unfolded Protein Response (UPR), che provvede al ripristino dell'omeostasi dell'ER promuovendo l'interruzione della sintesi proteica, inducendo un maggior reclutamento di proteine chaperoni e degradazione delle proteine mal ripiegate (Schröder, 2008). Questa risposta cellulare è mediata da tre proteine transmembrana chiamate "sensori di stress": PERK, IRE1α, ATF6. In condizioni fisiologiche queste tre proteine sono mantenute in uno stato inattivo dall'associazione con la proteina chaperone Grp78/BiP. Le proteine danneggiate, mal ripiegate e/o aggregate che si accumulano all'interno dell'ER legano in modo competitivo il chaperone Grp78/Bip dell'ER, che si dissocia dai fattori di risposta ATF6, Ire1α e PERK. Questi fattori vengono successivamente attivati e orchestrano una risposta adattativa che riduce la traduzione delle proteine, aumenta la capacità di stoccaggio dell'ER, elimina le proteine danneggiate, ripiega le proteine mal ripiegate, altera il metabolismo e protegge dalla morte indotta dallo stress del RE (Farina et al., 2017).

IRE1α è una chinasi/endoribonucleasi che, in seguito alla dissociazione con Grp78/Bip, oligomerizza e si attiva. È necessaria per l'attivazione dello splicing XBP-1 (X box protein-1), per produrre il fattore di trascrizione XBP-1s che promuove la trascrizione di diversi geni coinvolti nella risposta UPR (Lee et al., 2003). PERK è una chinasi che, una volta attivata, inibisce la traduzione proteica generale ma promuove quella del fattore di trascrizione ATF4 (Harding et al., 2000a). ATF6, oltre alla trascrizione di proteine

chaperoni, promuove quella di XBP1 collaborando con IRE1α. ATF4, XBP-1 e ATF6 convergono tutti sul promotore del gene codificante il fattore di trascrizione CHOP, associato a morte cellulare apoptotica. Quando lo stress persiste e la risposta cellulare messa in atto non è sufficiente per recuperare la piena funzionalità dell'ER, IRE1α e PERK inviano segnali di morte cellulare al mitocondrio tramite la famiglia di proteine BCL-2 (Harding et al., 2000b).

L'attivazione della risposta UPR è stata proposta come importante meccanismo di tumorigenesi in diversi tumori solidi. Nei campioni di pazienti con glioblastoma multiforme e nella linea cellulare di glioma maligno umano U87, sono stati osservati livelli aumentati di Grp78/Bip e di fattori di trascrizione ER-UPR, associati ad una prognosi peggiore (Epple el al., 2013).

Entrando nel dettaglio di come il TrkAIII induca una parziale risposta URP, è bene sottolineare come nei trasfettanti stabili SH-SY5Y TrkAIII, il TrkAIII associato all'ER risulta complessato con Grp78/Bip, confermando la difficoltà del recettore a superare il controllo di qualità dell'ER (Farina et al., 2009b).

Nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII, l'espressione del recettore determina un aumento dell'attività del fattore di trascrizione ATF-6 e di Grp78/BiP. Gli stessi trasfettanti, tuttavia, non mostrano splicing XBP-1 (Farina et al., 2009b), indicando che lo stress dell'ER è al di sotto della soglia richiesta per l'attivazione completa della risposta allo stress ER (Schröder, 2008).

Il trattamento con agenti che inducono stress acuto dell'ER (ditiotreitolo, tapsigargin e calcio ionoforo) dei trasfettanti stabili SH-SY5Y TrkAIII, determina lo splicing Xbp-1, confermando quindi che i trasfettanti TrkAIII non possiedano difetti nella via di attivazione costitutiva di Ire1α/Xbp-1.

Questa risposta UPR parziale precondiziona i trasfettanti TrkAIII per sopravvivere meglio e risolvere lo stress acuto dell'ER, migliorando la resistenza agli agenti che inducono stress ER (Farina et al., 2018).

Inoltre, è stata rilevata una differenza nella risposta UPR indotta dal ditiotreitolo (DTT) nei trasfettanti stabili TrkA fully spliced, caratterizzata dall'induzione dello splicing Xbp-1 e dall'espressione di CHOP (regolatore positivo dell'apoptosi) che viene mantenuto per tutto il tempo di trattamento con DTT (12 ore). Al contrario, i trasfettanti stabili TrkAIII presentano uno splicing Xbp-1 indotto da DTT e l'espressione di CHOP che viene rapidamente attenuati, tornando ai livelli normali entro 12 ore, in associazione quindi con una maggiore capacità di sopravvivenza.

L'inibitore di Trk Lestaurtinib, chemioterapico clinicamente approvato, prolunga la risposta UPR nei trasfettanti TrkAIII, in associazione con un aumento della mortalità, sottolineando l'importanza del TrkAIII nella resistenza allo stress (Farina et al., 2017).

1.8 Stress cronico dell'ER e alterazione dell'attività mitocondriale

I mitocondri sono coinvolti nei diversi meccanismi di risposta allo stress. Le ragioni principali della compromissione della funzione mitocondriale nelle cellule tumorali includono stress endogeni come l'ipossia, stress metabolici e proliferativi. Lo stress dell'ER influisce sulla funzione mitocondriale attraverso la segnalazione interorganellare. Il reticolo endoplasmatico ed i mitocondri sono altamente dinamici e subiscono una continua riorganizzazione strutturale e spaziale in risposta a specifici segnali cellulari (Rainbolt et al., 2014). Un aspetto interessante di questi organelli è che formano contatti fisici ER-mitocondri. Questi contatti facilitano il trasferimento di metaboliti, inclusi lipidi e Ca^{2+}, tra l'ER e i mitocondri che sono coinvolti nella regolazione delle funzioni biologiche tra cui l'omeostasi dei lipidi, il metabolismo mitocondriale e la regolazione della segnalazione apoptotica (de Brito et al., 2010). Un grave stress dell'ER, tuttavia, induce apoptosi aumentando i livelli di Ca^{2+} e ROS mitocondriali, che aprono direttamente il poro di permeabilità della membrana mitocondriale o promuovono indirettamente la polimerizzazione di BAX. In tali condizioni, la sopravvivenza mitocondriale è regolata anche dai livelli di espressione degli anti-apoptotici della famiglia Bcl-2 e dall'adattamento metabolico alla glicolisi aerobica all'interno del citosol (Tsujimoto et al., 2007).

1.9 Mitocondri e Reticolo Endoplasmatico

I mitocondri ed il reticolo endoplasmatico (ER) sono due organelli cellulari con differenti ruoli che interagiscono fisicamente e funzionalmente. Entrambi sono caratterizzati da elevata dinamicità da attribuirsi per lo più alla presenza di vescicole che continuamente si fondono e gemmano dall'ER (Pizzo e Pozzan, 2007). È noto che i mitocondri e l'ER sono strettamente associati in aree di contatto definite come membrane associate al mitocondrio (MAM) (Vance, 1990); a livello delle MAM i due organelli sono separati da soli 10-25 nm, piccola distanza che consente il contatto diretto fra proteine e lipidi dell'ER con quelli localizzati nella membrana mitocondriale esterna (OMM) (Csordás et al., 2006). Sono diverse le proteine identificate quali le responsabili della diretta associazione fisica tra i due organuli. Un'interazione diretta coinvolge il recettore inositolo 1,4,5-trifosfato (IPR3), presente sull'ER, ed il canale anionico voltaggio dipendente (VDAC), presente sulla membrana mitocondriale esterna. Questo contatto è mediato dalla proteina chaperone Grp75 (Szabadkai et al., 2006). I contatti tra i due organelli sono modulati anche dai processi di fusione e fissione dei mitocondri. La proteina citosolica dinamina-associata (DRP1) interagisce nei siti di fissione con il suo adattatore molecolare hFis1, proteina integrale della membrana

esterna mitocondriale (OMM), inducendo la frammentazione del mitocondrio (Smirnova et al., 2001; James et al., 2003). La mitofusina 2 (Mfn2), regolatrice della fusione mitocondriale, è presente in entrambi gli organelli ed è quindi coinvolta in associazioni omotipiche come proteina di ancoraggio (Chen et al., 2003; de Brito et al., 2008).

Un'altra proteina citoplasmatica che media l'interazione fra i due organelli è PACS-2; sembra essere coinvolta nella regolazione dei processi di fusione-fissione mitocondriale, del metabolismo lipidico e dell'apoptosi (Simmen et al., 2005).

Infine, a seguito di uno studio condotto su *Saccharo-myces cerevisiae,* è stato identificato un complesso proteico, chiamato ERMES (ER-mitochondria encounter structure), costituito da almeno quattro proteine: Mdm10 e Mdm34 sono presenti nella OMM; Mdm1 è localizzata nell'ER; Mdm12 è una proteina citosolica. Questo complesso proteico è importante in diversi processi cellulari quali la motilità mitocondriale, la replicazione del genoma mitocondriale, il trasporto di proteine e omeostasi lipidica del mitocondrio (Kornmann et al., 2009).

Continuo è lo scambio di metaboliti tra mitocondri e l'ER: l'ATP prodotto dalla fosforilazione ossidativa viene utilizzato dalle ATPasi presenti nell'ER; prodotti delle vie metaboliche dell'ER, come i fosfolipidi, vengono trasportati continuamente alle membrane mitocondriali. Ad oggi la connessione funzionale tra i due organelli che è stata meglio caratterizzata è sicuramente quella che coinvolge gli ioni Ca^{2+} (Giorgi et al., 2009; Decuypere et al., 2011). Il rilascio basale di Ca^{2+} dal recettore IPR3 provvede al controllo fisiologico dei meccanismi bioenergetici mitocondriali (Bravo et al., 2012).

Come precedentemente esposto, quando nell'ER si ha un eccessivo accumulo di proteine mal ripiegate, viene attivata l'unfolding protein response (UPR) nel tentativo di ricondurre l'ER al suo normale stato fisiologico (Schröder, 2008). Nel corso di tale risposta allo stress, si verificano diversi cambiamenti metabolici e l'ER sembra influenzare la funzione mitocondriale attraverso meccanismi che coinvolgono il trasferimento di Ca^{2+}, facilitando così l'adattamento cellulare (Bravo er al., 2012). Nella prima fase di risposta allo stress dell'ER è stato osservato nei mitocondri l'incremento di diversi parametri metabolici: produzione di ATP, capacità riduttiva, consumo di ossigeno e potenziale transmembrana. Inoltre vi è un aumento delle interazioni tra i due organelli in maniera microtubulo-dipendente. L'associazione diretta con l'ER ed il trasferimento di ioni Ca^{2+} sono fondamentali per garantire l'aumentata attività metabolica mitocondriale. Quando lo stress persiste, a causa di un eccessivo accumulo di calcio, può verificarsi un collasso del mitocondrio seguito dalla morte cellulare apoptotica. L'eccessivo e prolungato accumulo di Ca^{2+} nel mitocondrio può determinare un'aumentata permeabilità della membrana mitocondriale interna

con conseguente rottura di quella esterna e fuoriuscita di proteine pro-apoptotiche nel citosol (Figura 7) (Bravo et al., 2012).

Fig. 7

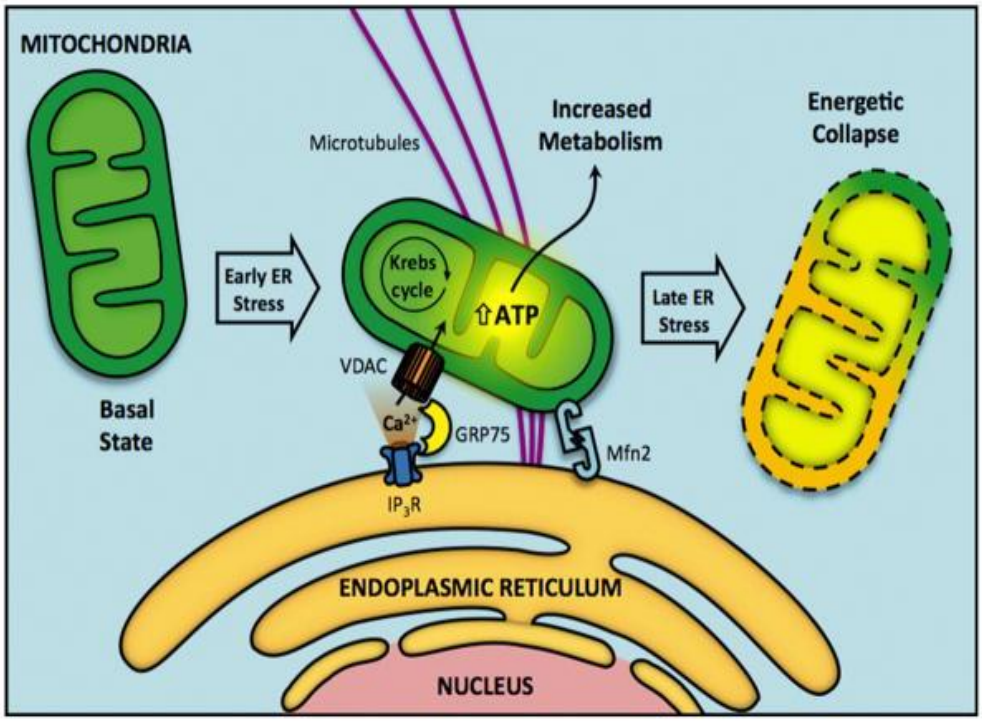


Figura 7- Nelle prime fasi dello stress dell'ER aumenta il metabolismo mitocondriale per effetto del trasferimento di ioni Ca^{2+} garantito dall'associazione diretta fra i due organelli. L'interazione fra ER e mitocondrio è per lo più mediata dalla mitofusina 2 e da Grp75 che media il contatto fra IP3R e VDAC. In risposta ad una condizione di stress prolungata il mitocondrio collassa con conseguente morte cellulare (Bravo et al., 2012).

1.10 TrkAIII segnala lo stress dell'ER al mitocondrio - effetto Warburg

Tra tutti gli organelli, le funzioni mitocondriali sono state implicate nella progressione del cancro, compreso il metabolismo energetico, l'omeostasi del calcio, la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la regolazione dell'apoptosi e la segnalazione oncogenica (Neagu et al., 2019). La glicolisi è il processo metabolico in cui il glucosio viene convertito in piruvato. Nei tessuti differenziati, quando è presente ossigeno, il piruvato entra quindi nel ciclo dell'acido tricarbossilico mitocondriale (TCA) per essere completamente ossidato a CO_2 (fosforilazione ossidativa). Tuttavia, in condizioni ipossiche, il piruvato viene invece convertito in lattato nella glicolisi anaerobica (Zwaans et al 2014) .

Nel 1924, Otto Warburg osservò che le cellule tumorali convertono preferenzialmente il glucosio in lattato, indipendentemente dalla presenza di ossigeno (Warburg, 1956). Questo fenomeno è chiamato effetto

Warburg. La scelta di seguire un metabolismo anaerobico non è energicamente conveniente ed efficace per una cellula, poiché la glicolisi anaerobica fornisce soltanto due molecole di ATP per molecola di glucosio (Vander Heiden et al., 2009). Recenti ricerche dimostrano come in realtà sia vantaggiosa per il tumore la scelta di una glicolisi anaerobica; quest'ultima infatti fornisce velocemente precursori per la sintesi di macromolecole come lipidi, acidi nucleici e proteine che sono essenziali per una rapida divisione (Soga 2013; Vander Heiden et al., 2009; Wu et al., 2013). Inoltre la secrezione di lattato crea un ambiente tossico riduttivo per le cellule immunitarie e stimola le cellule endoteliali nella formazione di nuovi vasi, facilitando i meccanismi di progressione tumorale e selezione di cellule tumorali maggiormente resistenti allo stress. I livelli di lattato sono correlati negativamente con la sopravvivenza in pazienti con diversi tipi di tumore (Hirschhaeuser et al., 2011).

Il riciclo continuo di TrkAIII tra le membrane ER ed ERGIC (Farina et al., 2015) porta anche alla rilocalizzazione di TrkAIII in siti specializzati di membrana (MAM) che collegano l'ER ai mitocondri, con conseguente associazione di TrkAIII con le membrane mitocondriali esterne (OMM) (Farina et al., 2017). In condizioni normali, il TrkAIII associato a OMM non è costitutivamente fosforilato, indicando che l'ambiente mitocondriale ha un'elevata soglia per l'attivazione spontanea di TrkAIII. Tuttavia, in condizioni di stress ER, indotto da DTT, thapsigargin o calcio ionoforo, il TrkAIII associato a OMM viene rapidamente internalizzato nelle membrane mitocondriali interne (IMM), dove è soggetto all'attivazione-clivaggio dipendente da Omi/HtrA2 in frammenti attivi CT di 45-48 kDa, nell'orientamento della matrice mitocondriale (Farina et al., 2017). Poiché TrkAIII non possiede una tipica sequenza di traslocazione mitocondriale, l'importazione mitocondriale in condizioni di stress ER può essere il risultato del meccanismo di importazione mitocondriale regolato dallo stress per l'assorbimento e la degradazione delle proteine danneggiate, fenomeno che fa parte dell'UPR mitocondriale (Ruan et al. 2017). L'attivazione di TrkAIII associato a IMM in condizioni di stress ER è facilitata dall'interazione ROS/Ca^{2+}, fornendo le condizioni necessarie per l'attivazione di Omi/HtrA2 mitocondriale, che è responsabile dell'eliminazione delle rimanenti sequenze N-terminali che impediscono l'attivazione spontanea di TrkAIII, che insieme all'inattivazione delle PTPasi mitocondriali da parte di ROS, facilita l'attivazione del TrkAIII associato all'IMM.

Questo processo dipende da un aumento nella produzione di ROS, indotto dallo stress e sostenuto da cambiamenti nel movimento del Ca^{2+}. L'attivazione del TrkAIII mitocondriale determina la fosforilazione di PDHK1 mitocondriale, portando ad un adattamento metabolico glicolitico.

L'attivazione di PDHK1 determina la fosforilazione delle proteine mitocondriali tra cui la piruvato deidrogenasi chinasi-1, un inibitore del complesso della piruvato deidrogenasi, con conseguente passaggio metabolico alla glicolisi aerobica. Ciò identifica TrkAIII come un nuovo indicatore dello stress ER ai mitocondri che si traduce in un adattamento metabolico, fornendo un meccanismo attraverso il quale lo stress ER aiuta a mantenere l'effetto metabolico "Warburg" che promuove la formazione di metastasi di cellule tumorali che esprimono TrkAIII (Fig.8) (Farina et al., 2017).

In tali condizioni di stress, il destino dei mitocondri è regolato dai sistemi enzimatici redox, dalle superossido dismutasi, dalla serina proteasi dello spazio intermembrana Omi/HtrA2 (Mailloux et al., 2014; Gray et al., 2000) e anche dalla risposta proteica mitocondriale (mt-UPR). La mt-UPR attiva un programma trascrizionale indipendente che migliora la sopravvivenza mitocondriale attraverso l'adattamento metabolico, l'eliminazione proteolitica delle proteine danneggiate e l'eliminazione selettiva dei mitocondri danneggiati (Jovaisaite et al., 2014).

Fig. 8

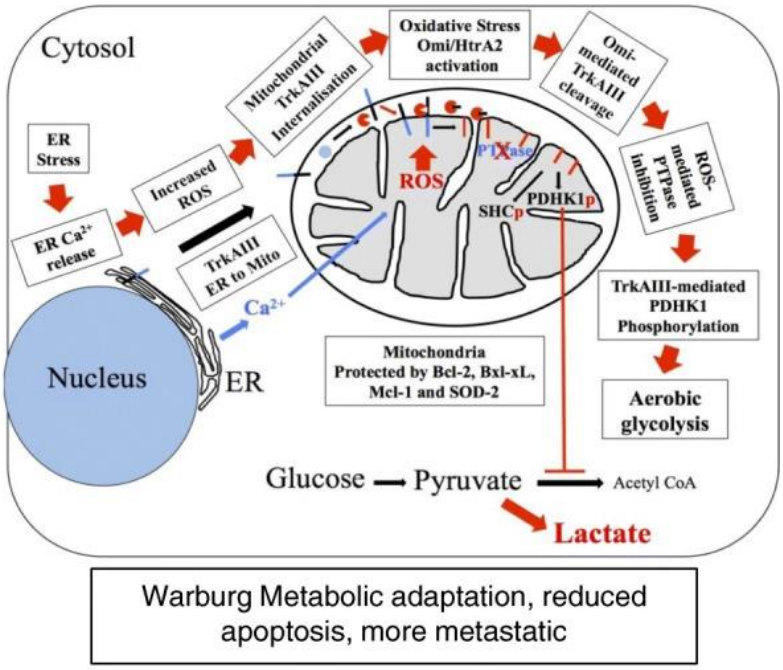


Figure 8- Rappresentazione schematica della traslocazione di TrkAIII indotta dallo stress dell'ER associato nelle membrane interne mitocondriali, con conseguente attivazione del clivaggio di TrkAIII dipendente da Omi/HtrA2, fosforilazione tirosinica di PDHK1 e adattamento metabolico glicolitico aerobico "Warburg", che coinvolge il rilascio e l'assorbimento di Ca^{2+} da parte dei mitocondri e aumento della produzione di ROS. Farina et al., 2017.

1.11 Mitocondrio e risposta proteica unfolded mitocondriale mt-UPR

Mentre la risposta proteica unfolded nel reticolo endoplasmatico (ER-UPR) e la risposta allo shock termico citosolico (HSR) sono state ampiamente studiate (Walter et al., 2011), la risposta proteica unfolded mitocondriale (mtUPR) è stata scoperta più recentemente e fa luce sulle complesse relazioni tra questo organello e il nucleo (Haynes e Ron, 2010). Le cellule tumorali subiscono stress mitocondriale poiché possiedono una proliferazione cellulare incontrollata e generano ROS, che danneggiano inoltre il DNA mitocondriale e le proteine cruciali, come i componenti della famiglia OXPHOS che causano la disfunzione mitocondriale. Le cellule tumorali si affidano ai mitocondri funzionali per generare macromolecole come aminoacidi, nucleotidi e colesterolo per mantenere la loro elevata capacità proliferativa. Pertanto, le cellule tumorali attivano la risposta allo stress mitocondriale per alleviare la disfunzione mitocondriale e l'aggregazione proteica, che successivamente promuove la crescita e la progressione del tumore (O'Malley et al. 2020). I mitocondri hanno sviluppato diversi percorsi di mantenimento e conservazione per attenuare vari stress. Nelle cellule tumorali, questi meccanismi sono deregolamentati a causa di un'alterata segnalazione che porta a vantaggi proliferativi e di sopravvivenza a lungo termine, che sono intrinsecamente legati alla progressione del tumore e alla resistenza terapeutica (O'Malley et al. 2020).

La risposta proteica unfolded mitocondriale (mtUPR) è una via di segnalazione mitocondriale-nucleare, con cui vengono avviati i programmi di attivazione trascrizionale delle proteine chaperoni e proteasi mitocondriali, oltre che i geni coinvolti nella disintossicazione dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), nella via della glicolisi e nel meccanismo di importazione delle proteine mitocondriali, allo scopo di mantenere la proteostasi nei mitocondri. La segnalazione mtUPR aberrante è associata a un ampio spettro di disturbi, comprese malattie congenite, malattie neurodegenerative e tumori dove l'mt UPR migliora la sopravvivenza e la crescita delle cellule tumorali (Anderson et al. 2020; Ye et al. 2010).

Quando nei mitocondri si accumulano proteine mal ripiegate o danneggiate che danno inizio allo stress proteotossico, l'mtUPR agisce per risolvere lo stress, principalmente ripiegando correttamente le proteine tramite chaperoni molecolari o eliminando quelle danneggiate tramite proteasi, come HtrA2/Omi, che sta emergendo sempre di più come un regolatore essenziale della funzione mitocondriale che protegge i mitocondri dallo stress (Weiß et al. 2023). I chaperoni mitocondriali sono in grado di aiutare le proteine mal ripiegate a ritornare alla loro normale conformazione e garantiscono un folding corretto alle proteine appena sintetizzate, mentre le proteasi hanno il compito di degradare le proteine unfolding e aberranti (Angeli et al. 2021). Il proteoma mitocondriale è composto da circa 1500 proteine, codificate sia dal

genoma mitocondriale che da quello nucleare (Pagliarini et al. 2008). Mentre le 13 proteine essenziali della catena di trasporto degli elettroni (ETC) insieme a parte del meccanismo necessario per la loro sintesi sono codificate dal DNA mitocondriale (Anderson et al., 1981), la stragrande maggioranza delle proteine mitocondriali è codificata nel nucleo e devono essere importate dal citoplasma. Una volta sintetizzate nel citosol, le proteine vengono indirizzate ai mitocondri tramite sequenze segnale. Poiché i mitocondri contengono compartimenti separati di matrice e spazio intermembrana (IMS), racchiusi da membrane interne ed esterne, il che complica l'importazione delle proteine, esistono elaborati macchinari di targeting e smistamento per consegnare le proteine alle loro corrette destinazioni mitocondriali (Neupert et al., 2007). L'importazione nei mitocondri richiede i complessi TOM (Translocasi della membrana esterna) e TIM (Translocasi della membrana interna) (Hill et al., 1998; Chacinska et al., 2009). I substrati destinati alla matrice mitocondriale hanno tipicamente una sequenza di targeting mitocondriale (MTS) aminoterminale, che forma un'elica anfipatica. L'MTS interagisce prima con il canale TOM sulla superficie citosolica dei mitocondri e successivamente con il complesso TIM23 per attraversare la membrana interna ed entrare nella matrice. Una volta esposto alla matrice, l'MTS viene tagliato consentendo alla proteina di ripiegarsi o assemblarsi con l'assistenza di chaperoni molecolari specifici dei mitocondri, tra cui Hsp60 e mtHsp70 (Chacinska et al. 2009).

1.12 Tirosin chinasi nei mitocondri

Le tirosin chinasi, importanti mediatori di diverse vie di segnalazione cellulare, rivestono un ruolo chiave in diversi processi biologici quali: crescita, differenziamento, metabolismo ed apoptosi in risposta a stimoli endogeni ed esogeni. Tramite la fosforilazione di specifici residui tirosinici di proteine target, le tirosin-chinasi sono responsabili della modificazione post-traduzionale richiesta per la normale comunicazione cellulare ed il mantenimento dell'omeostasi (Paul et al., 2004). Le tirosin-chinasi sono direttamente implicate anche in diverse funzioni mitocondriali fisiologiche e patologiche. Piedimonte e colleghi furono i primi ad individuare un'associazione tra i mitocondri e l'attività tirosin-chinasica in fibroblasti umani e in cellule tumorali di sarcoma 180 (Piedimonte et al., 1986, 1988). La prima tirosin-chinasi non recettoriale ad essere associata al mitocondrio è stata la proteina Abl, espressa in diversi tipi cellulari e tessuti ed implicata nella patogenesi di alcune leucemie umane (Kumar et al., 2001; Pendergast, 2002). Questa proteina trasloca nel mitocondrio solo quando è attiva, come ad esempio in risposta allo stress dell'ER (Ito et al., 2001). Sono state individuate nel mitocondrio altre tirosin-chinasi non recettoriali come le proteine della famiglia Src: Fyn, c-Src, Lyn, Fgr ed il regolatore dell'attività chinasica Csk (C-terminal

Src kinase) (Salvi et al., 2002; Miyazaki et al., 2003). I membri della famiglia chinasica Src sono implicati, in qualità di regolatori, in diverse vie di segnalazione cellulare, in particolare in quelle che controllano la crescita e l'adesione cellulare (Brown et al, 1996). c-Ser è un proto-oncogene la cui attivazione promuove la crescita cellulare nel corso della tumorigenesi e regola altri processi, come adesione ed invasione, negli stadi tardivi della progressione tumorale (Tsygankov et al., 2004). Nel mitocondrio la chinasi c-Src è richiesta per il corretto funzionamento della catena respiratoria tramite la fosforilazione di componenti chiave (Ogura er al., 2012). Nel mitocondrio sono state identificate anche tirosin-chinasi recettoriali, nonostante la loro espressione sia sempre stata associata esclusivamente alla superficie cellulare. È stato dimostrato che il recettore EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), tipico recettore di membrana con intrinseca attività chinasica, in cellule tumorali trasloca nel mitocondrio dove interagisce con la subunità II della citocromo C ossidasi (COX II) (Boerner et al., 2004). La traslocazione e l'interazione con COXII sembrano dipendere dalla fosforilazione del residuo tirosinico Y845 ad opera di c-Src (Demory et al., 2009). Inoltre la traslocazione mitocondriale di EGFR è strettamente dipendente dalla sua attività tirosin-chinasica (Boerner et al., 2004). In linee cellulari di glioblastoma oltre a EGFR è stato rilevato, a livello mitocondriale, la sua variante recettoriale costitutivamente attiva, EGFRvIII. La traslocazione di entrambi nel mitocondrio aumenta sensibilmente in risposta ad agenti terapeutici che promuovono l'arresto della crescita cellulare e l'apoptosi. In particolare l'accumulo mitocondriale di EGFRvIII rende le cellule maggiormente resistenti agli stimoli apoptotici (Cao et al., 2011). Anche il recettore tirosin-chinasico ErbB2, coinvolto in crescita e differenziamento cellulare, trasloca nei mitocondri di cellule tumorali grazie all'interazione con mtHsp70. L'elevata espressione di ErbB2 nel mitocondrio ne compromette la funzione respiratoria; riveste un ruolo critico nella regolazione del metabolismo, promuovendo la glicolisi cellulare e induce resistenza agli agenti terapeutici nella cellula tumorale (Ding et al., 2012). In cellule tumorali sono presenti, nei diversi compartimenti mitocondriali, diverse tirosin-chinasi oncogeniche. Tra queste sono state in parte caratterizzate FGFR1, FOP2-FGFR1 e FLT3-ITD, presenti a livello della membrana mitocondriale esterna, BCR-ABL e JAK2-V617F, localizzati nella matrice. Questi recettori tirosin-chinasici hanno un'attività costitutiva ligando-indipendente e, nonostante la diversa localizzazione nei compartimenti mitocondriali, sono implicati in egual misura nella regolazione dell'attività del complesso multienzimatico della piruvato deidrogenasi tramite fosforilazione di PDHK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1), promuovendo così proliferazione e crescita tumorale (Hitosugi et al., 2011). Da questi dati si evince per i recettori tirosin-chinasici con attivazione oncogenica un ruolo determinante nella regolazione del metabolismo tumorale.

1.13 Neuroblastoma

Il NB è il tumore solido extra-cranico più comune nell'età pediatrica con un'incidenza complessiva di 1 caso su 10.000 nati vivi (Ishola and Chung, 2007). È stato descritto per la prima volta nel 1910 dal patologo James Homer Wright (Castleberry 1997; Wright, 1910). Nello specifico il NB può essere considerato una malattia dello sviluppo neuronale che origina a partire da cellule della cresta neurale, la quale si configura come una struttura transitoria, presente solo nei vertebrati, che si genera a partire dall'ectoderma embrionale e si sviluppa dal tubo neurale dopo la sua chiusura (Johnsen et al., 2019; Kholodenko et al., 2018). Queste cellule di origine ectodermica, ai margini del tubo neurale, dopo una fase di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) in cui perdono polarità e capacità di adesione, iniziano la loro migrazione per generare cellule di Schwann, neuroni e glia del sistema nervoso periferico, cellule cromaffini secretorie della midollare surrenale, cellule scheletriche cranio-facciali tra cui osteoblasti e condrociti, cellule mesenchimali, cellule muscolari lisce, adipociti, cellule cardiache ed inoltre forma una seconda fonte di progenitori multipotenti, che si associano e migrano lungo le fibre nervose per fornire cellule per l'omeostasi e la riparazione dei tessuti durante la tarda embriogenesi e nell'adulto (Farina et al., 2021). Questi complessi processi biologici sono finemente regolati da programmi trascrizionali ed eventi epigenetici e la deregolazione di questo equilibrio durante i diversi stadi di maturazione della cresta neurale può sicuramente contribuire alla patogenesi del Neuroblastoma (Johnsen et al., 2019). A differenza di quanto si pensasse inizialmente, nell'organismo adulto permangono gruppi di cellule che di fatto conservano profili di espressione trascrizionale sia di cellule staminali embrionali che di progenitori della

Fig. 9

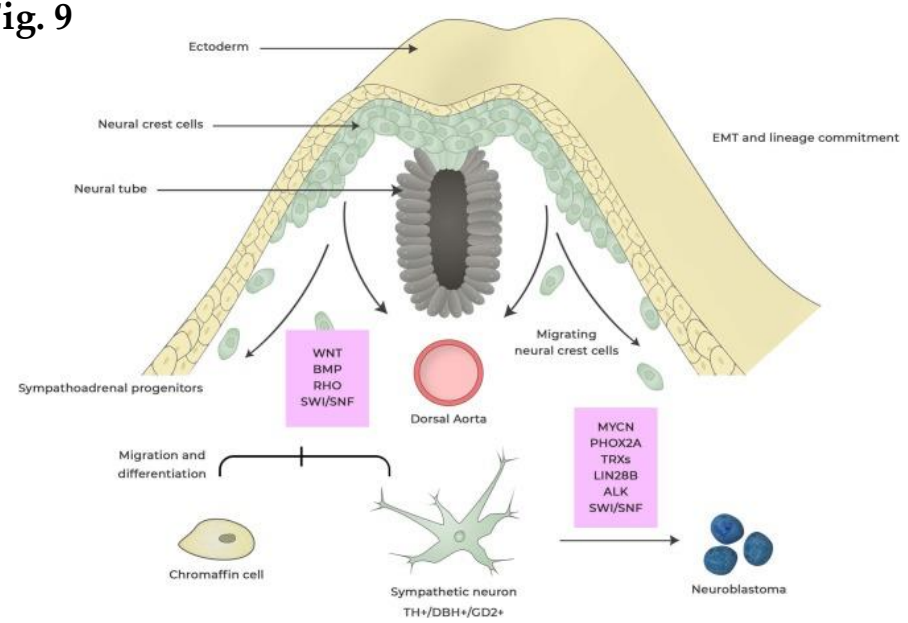


Figure 9. Sviluppo del Neuroblastoma a paritre da cellule della cresta neurale (Johnsen et al. 2019)

cresta neurale. Proprio queste cellule progenitrici multipotenti sono considerate responsabili dell'insorgenza di diversi tumori pediatrici e adulti altamente eterogenei, sia per morfologia che per localizzazione, tra cui compare anche il NB. (Kholodenko et al., 2018). La complessità e l'eterogeneità tipica del NB ha complicato molto la comprensione della comunità scientifica circa lo sviluppo e la patogenesi della malattia. Un'attenta analisi delle tempistiche di insorgenza e delle caratteristiche cliniche hanno portato a concordare che il NB ha origine dalla migrazione delle cellule della cresta neurale che migrano verso l'aorta dorsale dove si differenziano in cellule progenitrici sinaptico-surrenali che infine danno origine al sistema nervoso periferico, compresi i gangli simpatici e la ghiandola surrenale (Matthay et al., 2016; Ponzoni et al., 2022). Proprio a causa delle caratteristiche di autorinnovamento e migrazione proprie ed intrinseche delle cellule della cresta neurale, molti ricercatori suggeriscono che i tumori che hanno origine a partire da quest'ultime siano predisposti alla metastatizzazione e resistenza ai trattamenti chemioterapici, che rappresentano l'ostacolo più importante al miglioramento dei risultati terapeutici nei NB sfavorevoli (Farina et al., 2021).

1.14 Diagnosi, prognosi, terapie convenzionali ed innovative

Il NB è un tumore infantile quasi esclusivamente diagnosticato nei bambini di età media pari a 18 mesi mentre solo il 5% delle diagnosi coinvolge pazienti di età superiore ai 10 anni (Lundberg et al., 2022). Nel 50% dei casi, al momento della diagnosi, il tumore è già presente allo stato di metastasi disseminate nei linfonodi regionali, nel midollo osseo, nel fegato e nella pelle (Nakagawara et al., 2018). Al momento della diagnosi, è chiaramente effettuata la caratterizzazione biologica e molecolare del tumore come anche la stadiazione che consente così di stratificare i pazienti in diversi gruppi di rischio ed è particolarmente importante considerare che l'età della diagnosi appare correlata intimamente con la prognosi (Matthay et al., 2016). Ad oggi, per un'accurata diagnosi della patologia, sono spesso utilizzate diverse combinazioni di metodi istologici, biochimici e di imaging. Dal 1988 i criteri per la diagnosi e la stadiazione sono stati basati sul Sistema Internazionale di stadiazione del neuroblastoma (INSS o International Neuroblastoma Staging System) che classifica questa neoplasia in stadi: 1, 2A, 2B, 3, 4 e 4S. Gli stati da 1 a 3 rappresentano tumori localizzati, classificati in base all'entità della resezione, all'invasione locale e al coinvolgimento dei linfonodi. Lo stadio 4 indica la presenza di metastasi a distanza e lo stadio 4S (4Speciale) caratterizzato da metastasi al fegato, alla cute e/o al midollo nei neonati, di solito è associato a caratteristiche biologiche favorevoli e può andare incontro a regressione spontanea del tumore senza trattamento (Brodeur et al., 1988; Brodeur et al., 1993).

Nel 2009 un gruppo di ricercatori esperti in NB ha sviluppato un nuovo sistema di stadiazione clinica pretrattamento, l'International Neuroblastoma Risk Group Staging System, INRGSS, che non si basa sull'estensione della resezione chirurgica come l'INSS, ma sui risultati dell'imaging del tumore (di solito TC o RM, e scansione MIBG); prevede lo stadio: L1 per le forme localizzate e operabili, lo stadio L2 per quelle localizzate ma inoperabili all'esordio, lo stadio M per la malattia metastatica e lo stadio MS per la malattia metastatica nei bambini di età inferiore ai 18 mesi con localizzazioni epatiche e/o midollari e/o cutanee (Monclair et al. 2009). Inoltre, gli stessi ricercatori hanno anche ideato delle categorie di rischio basate sullo stadio INRG, età, categoria istologica, grado di differenziazione del tumore, amplificazione di MYCN, presenza o assenza di aberrazioni del cromosoma 11q e ploidia delle cellule tumorali. Questo sistema INRG garantisce, ai bambini con diagnosi di NB, una stratificazione in un determinato gruppo valido in tutti i paesi del modo. Le categorie si dividono in: basso, intermedio e alto rischio (Cohn et al., 2009; Monclair et al., 2009) .

Fig. 10

INRG Stage	Age (months)	Histologic Category	Grade of Tumor Differentiation	*MYCN*	11q Aberration	Ploidy	Pretreatment Risk Group
L1/L2		GN maturing; GNB intermixed					A Very low
L1		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA			B Very low
				Amp			K High
L2	< 18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA	No		D Low
					Yes		G Intermediate
	≥ 18	GNB nodular; neuroblastoma	Differentiating	NA	No		E Low
					Yes		H Intermediate
			Poorly differentiated or undifferentiated	NA			
				Amp			N High
M	< 18			NA		Hyperdiploid	F Low
	< 12			NA		Diploid	I Intermediate
	12 to < 18			NA		Diploid	J Intermediate
	< 18			Amp			O High
	≥ 18						P High
MS	< 18			NA	No		C Very low
					Yes		Q High
				Amp			R High

Fig.10- International Neuroblastoma Risk Group System, INRG (Sokol et al., 2019.)

Diverse modalità terapeutiche vengono combinate in base al gruppo di rischio. La chirurgia viene utilizzata in fase di esordio della malattia per eseguire una biopsia, quando le caratteristiche della massa consentono l'asportazione radicale, per rimuovere metastasi o in caso di recidiva. La radioterapia è una tecnica che viene utilizzata sia con scopo adiuvante negli alti rischi, sia come terapia palliativa in caso di disseminazione metastatica, compressione midollare o in corso di recidiva; viene invece evitata nei pazienti a basso rischio a causa dei potenziali effetti tardivi nonostante le nuove tecnologie che offrono la possibilità di minimizzare la dose in un campo da irradiare sempre più specifico e ristretto.

La chemioterapia di induzione comprende vari chemioterapici: doxorubicina, cisplatino, carboplatino, etoposide, ciclofosfamide che vengono somministrati ogni 10 giorni con diverse associazioni e con dosi elevate per interferire con il recupero delle cellule tumorali. La Terapia mieloablativa con trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche (TCSEa), viene utilizzata in pazienti ad alto rischio con regimi di condizionamento contenenti Melfalan o terapia di differenziazione con acido cis-retinoico ma solo nei NB ad alto rischio in quanto il 50% dei pazienti recidiva mesi o anni dopo il trapianto e l'aggiunta di acido cis-retinoico ha mostrato un miglioramento (Matthay et al., 2016). L'immunoterapia con disialoganglioside GD2, un glicosfingolipide altamente espresso in tumori di origine ectodermica quali NB e melanoma, motivo per cui vengono applicati anticorpi monoclonali anti GD2 (Dinutuximab) che mediano la lisi cellulare, è associata o meno a somministrazione di citochine quali IL-2 e/o GMCSF (Vantaku et al., 2019).

Gli oncogeni TrkA sono ora considerati fattori importanti nelle sottopopolazioni di un'ampia varietà di tumori umani e, pertanto, rappresentano importanti bersagli terapeutici. Recentemente, è stato riportato che i tumori sia nei soggetti adulti che in età pediatrica, guidati da nuovi oncogeni chimerici di fusione TrkA, mostrano risposte terapeutiche profonde e di lunga durata all'inibitore Trk Larotrectinib (Drilon et al. 2018). Un successo terapeutico da sottolineare è quello di un bambino di 6 mesi con Neuroblastoma metastatico refrattario che esprime TrkAIII, trattato con Entrectinib, inibitore di Trk (Treis et al., 2022). Questi dati, insieme, evidenziando la necessità di migliorare l'individuazione clinica dei tumori guidati dagli oncogeni TrkA attivati, al fine di sfruttare appieno le nuove terapie inibitorie di Trk (Farina et al. 2018).

2. SCOPO DEL LAVORO

I neuroblastomi pediatrici (NB) sono tumori embrionali eterogenei, aggressivi e resistenti alla terapia che originano da cellule della cresta neurale impegnate nella linea cellulare progenitrice simpaticosurrenale. I meccanismi di stress e resistenza ai farmaci guidano la ricomparsa di recidiva post terapeutica e la progressione metastatica, la cui caratterizzazione e inibizione sono gli obiettivi principali nel miglioramento delle risposte terapeutiche. I meccanismi di resistenza allo stress e ai farmaci nei NB includono lo splicing alternativo (TrkAIII) del recettore chinasico neurotrofico correlato alla tropomiosina NTRK1/TrkA, che è correlato a recidiva post terapeutica e malattia metastatica in stadio avanzato. La variante del recettore TrkAIII esercita attività oncogenica nei modelli NB mediante meccanismi che includono l'importazione e l'attivazione mitocondriale indotta dallo stress.

In questo studio, caratterizziamo nuovi partecipanti target e non target in questo meccanismo pro-sopravvivenza in cellule SH-SY5Y NB che esprimono TrkAIII, utilizzando ditiotreitolo (DTT) come attivatore dello stress ed una varietà di inibitori.

Evidenziamo come il misfolding di TrkAIII indotto dallo stress avvia questo meccanismo, determinando l'importazione mitocondriale regolata da Grp78, Ca^{2+}-calmodulina, fattore di ribosilazione dell'adenosina (Arf) e Hsp90. Il TrkAIII, importato nelle membrane mitocondriali interne, viene tagliato da OmiHtrA2 e quindi attivato da un meccanismo dipendente da CaMKII/Akt, uniporter mitocondriale di Ca^{2+} e ROS, coinvolgendo inoltre l'ossidazione delle PTPasi mitocondriali, con conseguente attivazione di Akt mitocondriale attraverso PI3K, fenomeno che migliora ulteriormente la resistenza allo stress. Questa nuova funzione pro-sopravvivenza di TrkAIII misfolded mitiga la citotossicità causata dalla perdita di omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale, interrotta durante le risposte integrate allo stress, ed è prevenuta dagli inibitori Trk e Akt clinicamente approvati e anche dagli inibitori di Grp78, Hsp90, Ca^{2+}-calmodulina e PI3K.

Tutti insieme questi dati identificano Grp78, Ca^{2+}-calmodulina, Hsp90, PI3K e Akt come nuovi partecipanti target in questo meccanismo, oltre a TrkAIII, la cui inibizione ha il potenziale di migliorare l'eliminazione delle cellule NB che esprimono TrkAIII, con il potenziale per migliorare l'efficacia terapeutica nei NB che mostrano espressione e attivazione di TrkAIII.

3. MATERIALI E METODI

3.0 Linee cellulari e condizioni di coltura

Le linee cellulari di Neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state fornite da DR. U.P. Thorgeirsson (NCI, NIH Bethesda, MD, USA).

Le cellule SH-SY5Y trasfettate stabilmente con il vettore ad espressione eucariotica pcDNA™ 3.1/Zeo (+), contenente il cDNA per il TrkAIII, erano già disponibili nel nostro laboratorio.

La linea cellulare è stata coltivata utilizzando il terreno di crescita RPMI-1640, arricchito con 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% (2 mM) di L-glutammina e 1% degli antibiotici: penicillina (50 IU)/streptomicina (50 μg/mL) e Zeocina per i trasfettanti stabili; mantenute in un incubatore a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO2 e 95% di O2. L' RPMI-1640, la L-glutammina, la penicillina e la streptomicina sono stati forniti da Euroclone, MI, Italia; la Zeocina da ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA.

3.1 Reagenti per trattamenti cellulari

Per i trattamenti cellulari sono stati utilizzati: Ditiotreitolo (DTT), Geldanamicina (GA), Brefeldina A (BfA), PD98059, LY294002, Lestaurtinib, Calmodulina-SepharoseTM 4B e Proteina A Sepharose (Fast Flow) tutti forniti da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). HA15, Honokiol Dichlotoacetate (Honokiol DCA), Capivasertinib e KN-93 forniti da Med Chem Express (Monmouth Junction, NJ, USA). W-7 fornito da Millipore Sigma (Burlington, MA, USA), DS16570511 da Cayman Chemical (Ann Arbour MI, USA), Resveratrolo da ENZO Life Sciences Inc (Farmingdale, NY, USA) ed infine Entrectinib da Selleck Chemicals (Houston, TX, USA).

3.2 Anticorpi

Gli anticorpi monoclonale mouse anti-human TrkA (B3, sc-7268), policlonale rabbit anti-human XIAP (H-202), policlonale rabbit anti-human α-tubulina (H-3000) e rabbit policlinale anti-human calmodulina (sc-137079) sono stati forniti da SantaCruz (Santa Cruz, CA, USA). Gli anticorpi policlonali rabbit anti-human pTrkA Y490 (9141), anti-human Akt (9272), anti-human pAkt Ser473 (4060), anti-human pTrkA Y674/675 (4621) sono stati ottenuti da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). L'anticorpo policlonale rabbit anti-human Grp78/BiP (ET-24) e anti-human Hsp-60 (HPA001523) sono stati forniti da

Sigma-Aldrich (St Louis, MI, USA). Gli anticorpi monoclonali mouse SOD2 (611581) e TOM20 (612278) sono stati forniti da BD Trasduction Laboratories (San Jose, CA). L'anticorpo monoclonale mouse anti-human Calnexina (ab2798) è stato fornito da AbCam (Amersham, UK). L'anticorpo monoclonale mouse anti-PTPasi (MAB2844) è stato fornito da R&D System Inc. (Minneapolis, MN, USA).

Gli anticorpi secondari coniugati con la perossidasi di rafano (HRP, horseradish peroxidase) sono stati ottenuti da Bethyl Laboratories Inc. (Fortis, Waltham, MA, USA) mentre gli anticorpi secondari coniugati ad un fluorocromo, Alexa Fluor® 488 anti-rabbit (verde) e Alexa Fluor® 594 anti-mouse (rosso) sono stati forniti da Life Technologies (Waltham, MA, USA). Per la colorazione mitocondriale è stato utilizzato MitoTracker™ Dyes for Mitochondria Labeling (M7512) fornito da Invitrogen.

3.3 Immunofluorescenza indiretta (IF)

Le cellule sono state piastrate su vetrini con sistema Chamber Slide™ Lab-Tek® Nunc® (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA), sono state lavate con PBS 1X, incubate con il colorante MitoTracker™ Dyes (2,5 μM) per 15 minuti a 37°C. Le cellule successivamente sono state lavate in PBS per 3 volte, fissate in formalina al 10% v/v per 15 minuti e permeabilizzate con metanolo ghiacciato al 100% (-20°C). Le cellule fissate e permeabilizzate sono state incubate per 1 ora con una soluzione bloccante composta da PBS-T (PBS + TritonX-100 0,03%) e BSA (albumina di siero bovino all'1%), successivamente incubate per 2 ore con anticorpi primari anti-TrkA e anti-p TrkA Y490 diluiti 1:100 in soluzione bloccante a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, i vetrini sono stati lavati in PBS-T e incubati per 1 ora con i relativi anticorpi secondari Alexa Fluor® 488 (verde)-anti-rabbit e Alexa Fluor® 594 (rosso) anti-mouse diluiti 1:500 in soluzione bloccante a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, i vetrini sono stati lavati tre volte con PBS-T, ed un'ultima volta con PBS. Infine, è stato aggiunto sui vetrini il montante contente DAPI, ProLongTM fornito da Invitrogen (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e osservati con l'utilizzo del microscopio a fluorescenza Zeiss Axioplan 2 e sono stati fotografati con fotocamera digitale e software Leica M500 Image Manager. Gli esperimenti di IF sono stati ripetuti almeno due volte.

3.4 Analisi cellulare- saggio di citotossicità IncuCyte®

La crescita e la tossicità cellulare sono state osservate in tempo reale mediante l'utilizzo dell'incubatore IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System, sviluppato dal gruppo Sartorius (Goettingen, Germany).

Le cellule sono state piastrate in una piastra a 96 pozzetti (353072, Corning Inc, NY, USA) ad una densità di 1×10^4 cellule per pozzetto e successivamente trattate con diversi inibitori a concentrazioni diverse. Il software di analisi IncuCyte è stato programmato per acquisire immagini ad intervalli di tempo (in time-lapse) di 2 ore e catturare due aree differenti di ogni pozzetto della piastra utilizzando un ingrandimento 10X. Terminata l'acquisizione, le cellule sono state analizzate per mezzo dei video in time-lapse ottenuti, mentre la citotossicità è stata rilevata osservando i nuclei marcati di verde grazie all'utilizzo del colorante Incucyte® Cytotox Green Dye (4633) 150 nM addizionato al terreno di coltura, ed è stata effettuata una conta diretta in contrasto di fase.

In tutti i co-trattamenti con DTT, le cellule sono state preicubate con gli inibitori 30 minuti prima dell'aggiuta del DTT, in presenza continua degli inibitori, per i tempi rispettivamente indicati.

Tutti gli esperimenti sono stati riprodotti in doppio e ripetuti almeno tre volte.

3.5 Estrazione proteica

Gli estratti proteici totali sono stati ottenuti, utilizzando il tampone di lisi (tampone fosfato salino 1X (PBS) contenente 0.5% di deossicolato di sodio, 1% di NP40, 0.1% di SDS, 1 mM di ortovanadato di sodio, 1 mM di PMSF, 1 μg/mL di pepstatina A e Aprotinina). Le cellule sono state lavate con PBS 1X e screpate in ghiaccio con 2–3 ml di tampone di lisi; il lisato ottenuto è stato centrifugato a 15000×g a 4°C per 30 minuti. Gli estratti proteici ottenuti sono stati dosati con il metodo Bredford e risospesi in un tampone riducente per SDS-PAGE (62.5mM di TrisHCl pH6.8, 2.5% di SDS, 0.002% di blu di bromofenolo, 5% di β-mercaptoetanolo e 10% di glicerolo) ed infine sottoposti ad una temperatura di 95°C per 5 minuti.

3.6 Estrazione e purificazione mitocondriale

Per la purificazione mitocondriale, le cellule sono state seminate in piastre di coltura 150mm (Corning 430167, Corning Inc, NY, USA) e lasciate crescere fino ad una confluenza dell'80-90%. I mitocondri sono stati purificati mediante l'utilizzo del kit di isolamento mitocondriale "Focus Sub Cell Mitochondrial isolation kit" (G- 632 Biosciences, St. Louis, MO). Le cellule, in ghiaccio, sono state screpate con PBS e centrifugate a 1200 g e 4°C per 5 minuti. Al pellet cellulare ottenuto, sono stati aggiunti 500 μL di Buffer I, contenente un cocktail di inibitori delle proteasi 1X (Sigma), e con l'aiuto di un ago da 20 gauge, le cellule sono state lisate. A questo punto al lisato sono stati aggiunti 250 μL di Buffer II ed è stato poi centrifugato a 1200g e 4°C per 5 minuti. Il surnatante è stato poi trasferito in una nuova eppendorf e

ricentrifugato a 15000g e 4°C per 10 minuti, il pellet ottenuto, costituito dai mitocondri, è stato risospeso con 500 µL di Buffer III e centrifugato a 15000g e 4°C per 10 minuti. I mitocondri ottenuti sono stati poi risospesi in un buffer costituito da 250mM di mannitolo, 5mM di HEPES pH 7,4 e 0,5mM di EGTA e sottoposti ad ultracentrifugazione (90000g a 4°C per 40 minuti) utilizzando il gradiente di densità Percoll al 30%. A 2/3 dalla sommità del gradiente Percoll i mitocondri purificati sono stati raccolti e diluiti 1:10 con 250mM di mannitolo, 5mM di HEPES pH 7,4 e 0,5mM di EGTA e centrifugati a 15000g e 4°C per 10 minuti. Infine, il pellet di mitocondri è stato lisato con il tampone di lisi di PBS 1X contenente 0.5% di deossicolato di sodio, 1% di NP40, 0.1% di SDS, 1 mM di ortovanadato di sodio, 1 mM di PMSF, 1 µg/mL di pepstatina A e Aprotinina e ricentrifugato a 15000 rpm e 4°C per 2 minuti in modo da rimuovere il materiale insolubile. La concentrazione dei mitocondri è stata ottenuta utilizzando il metodo Bradford per successiva analisi in Western blot.

La purezza degli estratti mitocondriali è stata verificata attraverso la loro positività verso anticorpi specifici come TOM20, SOD2, HSP60, XIAP, rispetto agli estratti impoveriti di mitocondri ed estratti totali ottenuti da cellule SH-SY5Y TrkAIII, testati con anticorpi α-tubulina e calnexina.

3.7 Western Blot

Le proteine, dopo la corsa elettroforetica, sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa Hybond-C Extra fornita da GE Healthcare Life Science, Amersham, (UK). I siti di legame proteici non specifici sono stati bloccati incubando la membrana per 1 ora a 4 °C in una soluzione di bloccaggio costituita da TBS-T (Tris Buffer Saline: 15mM di NaCl, 10 mM di Tris-HCl - 10% di Tween 20, pH 8.0) e latte magro in polvere al 5% fornito da Euroclone, MI, Italia, poi è stato incubato l'anticorpo primario specifico, diluito nella stessa soluzione di bloccaggio, a 4°C in oscillazione per tutta la notte. Le diluizioni usate per gli anticorpi primari sono: 1:250 per l'anti-OxPTPasi, 1:500 per l'anti-TrkA (B3), 1:1000 per l'anti-pTrkA Y490, 1:1000 per l'anti-pTrkA Y674/Y675, 1:1000 per anti-pAkt Ser473, 1:1000 anti-calmodulina, 1:1000 per l'anti Grp78, 1:1000 per l'anti α-tubulina, 1:1000 per l'anti XIAP, 1:2000 per l'anti SOD2, 1:3000 per anti-Akt (9272), 1:4000 per l'anti calnexina, 1:5000 per l'anti TOM20 e per l'anti Hsp60. Gli anticorpi secondari anti-mouse e anti-rabbit HRP-coniugati sono stati diluiti 1:2000.

Terminata l'incubazione, la membrana è stata sottoposta a tre lavaggi in TBS-T di 10 minuti ognuno e incubata con l'anticorpo secondario opportuno diluito 1:2000 anch'esso nella soluzione di bloccaggio per 1 ora a 4°C in oscillazione. In seguito, sono state lavate in TBS-T 3 volte per 10 minuti e le specie immunoreattive sono state rivelate tramite una reazione di chemiluminescenza utilizzando il kit ECL

Western blotting detection fornito da GE Healthcare Life Science, Amersham, (UK), per mezzo dello strumento d'analisi ImageQuant™ LAS 4000 fornito da GE Healthcare Life Science, Amersham, (UK).

Le immagini ottenute sono state salvate come file in .jpeg ed è stata effettuata l'analisi densitometrica usando il software ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/).

Tutti i Western blots riportati nel presente studio sono stati eseguiti in duplicato e ripetuti due volte.

3.8 Calmodulina-sefarosio pull down

Inizialmente le cellule SH-SY5Y TrkAIII e pcDNA-SH-SY5Y sono state seminate e lasciate crescere fino ad una cofluenza dell'80-90% in piastre da coltura 100mm (Corning Inc, NY, USA). La Calmodulina-sefarosio (CaM-sefarosio TM 4B) fornita dalla Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA è stata aggiunta ad una soluzione di PBS 1X e 1% di BSA per 1 ora a 4°C sul rotatore; poi è stata addizionata all'estratto cellulare (500 µg) ed è stata incubata per 2 ore a 4°C sul rotatore in presenza di 100 µM $CaCl_2$ or 2 mM EGTA. Terminata l'incubazione, la Calmodulina-sefarosio legatasi all'estratto è stata centrifugata a 15000 rpm, e sono stati effettuati tre lavaggi con 500 µL di una soluzione contenente: 1% di Triton X-100, 20 mM di Tris HCl pH 7.5 e 150 mM di NaCl. La calmodulina-sefarosio coniugata è stata risospesa nel tampone riducente per SDS-PAGE, sottoposta ad una temperatura di 95°C, 5 minuti per la successiva analisi in Western blot.

3.9 Co-immunoprecipitazione

Le cellule SH-SY5Y TrkAIII e pcDNA-SH-SY5Y lasciate crescere fino ad una cofluenza dell'80-90% in piastre da coltura 100mm (Corning Inc, NY, USA) sono state trattate oer 6 ore con DTT 5mM in terreno di coltura completo. Successivamente le cellule sono state lisate. Gli estratti cellulari totali (1 mg) in tampone di lisi (tampone fosfato salino 1X (PBS) contenente 0.5% di deossicolato di sodio, 1% di NP40, 0.1% di SDS, 1 mM di ortovanadato di sodio, 1 mM di PMSF, 1 µg/mL di pepstatina A e Aprotinina) sono stati sottoposti ad un pre-clearing di 2 ore incubando 1mg di estratto cellulare con pre-immune IgG (1µg/mL) e Proteina A-sefarosio Fast Flow (20µL/mL) a 4°C in rotazione. I coniugati proteina A-sefarosio/IgG sono stati precipitati tramite centrifugazione a 10.000g per 5 minuti, a 4°C. Il surnatante è stato poi incubato tutta notte con anticorpo anti-CaM (calmodulina) diluito 1:200 in tampone di lisi a 4°C in rotazione. In seguito, 20µL di Proteina A-sefarosio sono stati aggiunti al tampone di lisi cellulare e reincubato per 60 minuti a 4°C in rotazione. I coniugati proteina A-sefarosio/IgG sono stati poi raccolti

mediante centrifugazione (15.000 rpm per 5 minuti), lavati 3 volte in 1 mL di tampone di lisi, ricentrifugati, risospesi nel tampone riducente SDS-PAGE (62.5mM di TrisHCl pH6.8, 2.5% di SDS, 0.002% di blu di bromofenolo, 5% di β-mercaptoetanolo e 10% di glicerolo) e sottoposti a riduzione SDS-PAGE/Western blotting. L'immunoreattività della CaM e del TrkA è stata rilevata utilizzando anticorpi anti-CaM (diluizione 1:1000) e anti-TrkA (diluizione 1:500) ed è stata confrontata con appropriati controlli relativi alle pre-immuni IgG. Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione sono stati eseguiti in duplicato e ripetuti due volte.

3.10 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando il test del t-Student.

La significatività statistica è stata calcolata mediante il calcolatore t-test online reperibile all'indirizzo: http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm ed è stata associata ad un p-value $\leq 0,05$.

La valutazione della probabilità della traslocazione mitocondriale è stata calcolata mediante l'utilizzo del calcolatore disponibile al seguente link: http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi.

4. RISULTATI

4.0 Il DTT induce la rilocalizzazione ed il clivaggio mitocondriale di TrkAIII, aumenta l'ossidazione delle PTPasi mitocondriali e migliora la resistenza alla morte indotta dal DTT.

Al fine di valutare gli effetti dello stress indotto dal DTT sul comportamento di TrkAIII, sulla sua traslocazione ed attivazione mitocondriale, le cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattate e trattate con DTT sono state confrontate mediante immunofluorescenza indiretta (IF), utilizzando anticorpi anti-TrkA, anti-pTrkA Y490 ed il colorante mitocondriale MitoTracker.

L'IF indiretta ha rilevato un notevole aumento dell'immunoreattività di TrkAIII e p-TrkAIII in Y490 (visibile in verde) che si sovrappone (visibile in giallo/arancione) all'immunoreattività dei mitocondri marcati con colorazione MitoTracker (visibile in rosso) nei trasfettanti stabili SH-SY5Y TrkAIII, trattati per 6 ore con DTT 5mM, rispetto ai controlli non trattati (Figura 11a). Questi dati mostrano che il DTT altera il comportamento di TrkAIII, aumentando la sua forma fosforilata in associazione con i mitocondri.

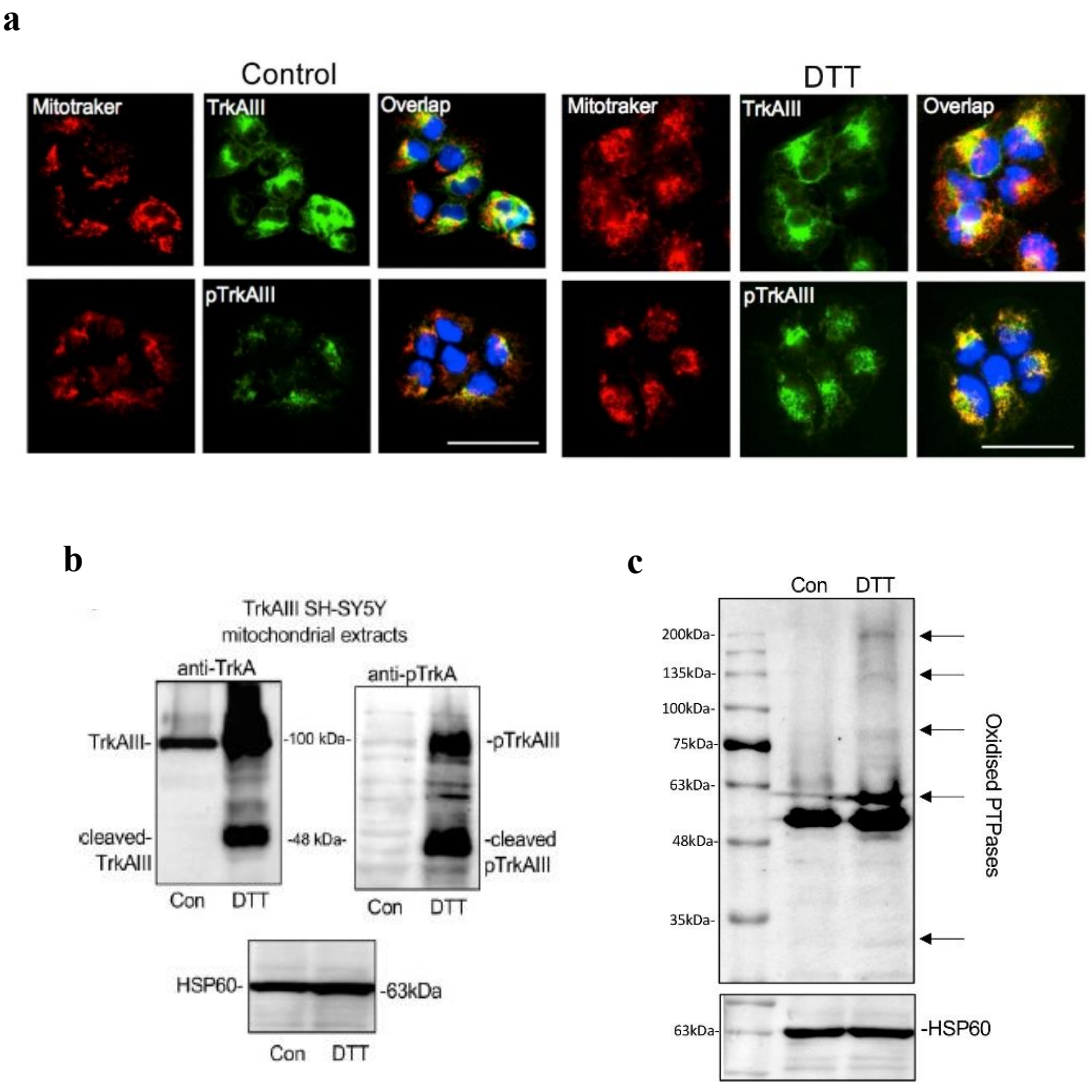
Per valutare l'influenza del DTT sullo stato e sull'attivazione di TrkAIII, sono stati eseguiti Western blot su estratti mitocondriali (50µg) purificati da cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattate e trattate con DTT. I Western blot (Figura 11b), di estratti cellulari SH-SY5Y TrkAIII non trattate (Con), mostrano immunoreattività di TrkAIII non fosforilato a 100 kDa; estratti mitocondri di SH-SY5Y TrkAIII trattate per 6 ore con DTT 5mM, mostrano l'immunoreattività di TrkAIII visibile attraverso un frammento C-terminale clivato e fosforilato in Y674/675 a 48 kDa. Questi dati mostrano che il DTT aumenta l'associazione di TrkAIII con i mitocondri e promuove la scissione e la fosforilazione di TrkAIII mitocondriale, in linea con l'attivazione.

Poiché l'inibizione ossidativa delle PTPasi facilita l'attivazione di TrkAIII (Farina et al., 2017), gli estratti mitocondriali di cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattate e trattate con DTT sono stati esaminati anche per i cambiamenti nei livelli di PTPasi ossidate, mediante Western blotting. È visibile un aumento (indicato dalle frecce) delle PTPasi ossidate in estratti mitocondrali di cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT (5 mM per 6 ore), rispetto ai controlli non trattati (Con) (Figura 11c).

Per valutare la citotossicità del DTT in cellule che esprimono TrkAIII (SH-SY5Y TrkAIII) ed in cellule che non esprimono TrkAIII (pcDNA-SH-SY5Y) sono stati eseguiti test di citotossicità Incucyte, utilizzando Cytotox Green Dye per rilevare la rottura dell'integrità della membrana cellulare in tempo

reale e quantificare la morte cellulare. In test duplicati, ripetuti 3 volte, il trattamento delle cellule pcDNA-SH-SY5Y con DTT ha indotto una morte cellulare percentuale media (± s.d.) del 48,3 (± 4,2%) a 24 ore e del 69,2 (± 4,1%) a 48 ore. Al contrario, il trattamento con DTT delle cellule SH-SY5Y TrkAIII ha indotto una morte cellulare significativamente inferiore del 7,8 (± 1%) a 24 ore e del 19,3 (± 1,8%) a 48 ore ($p < 0,0001$) (Figura 11d). Questi dati confermano ed estendono il nostro precedente rapporto (Farina et al., 2017), secondo cui il DTT induce la traslocazione mitocondriale di TrkAIII e l'attivazione del clivaggio, in associazione con l'aumento dell'ossidazione delle PTPasi mitocondriali, con conseguente maggiore resistenza alla morte indotta dal DTT.

Fig.11



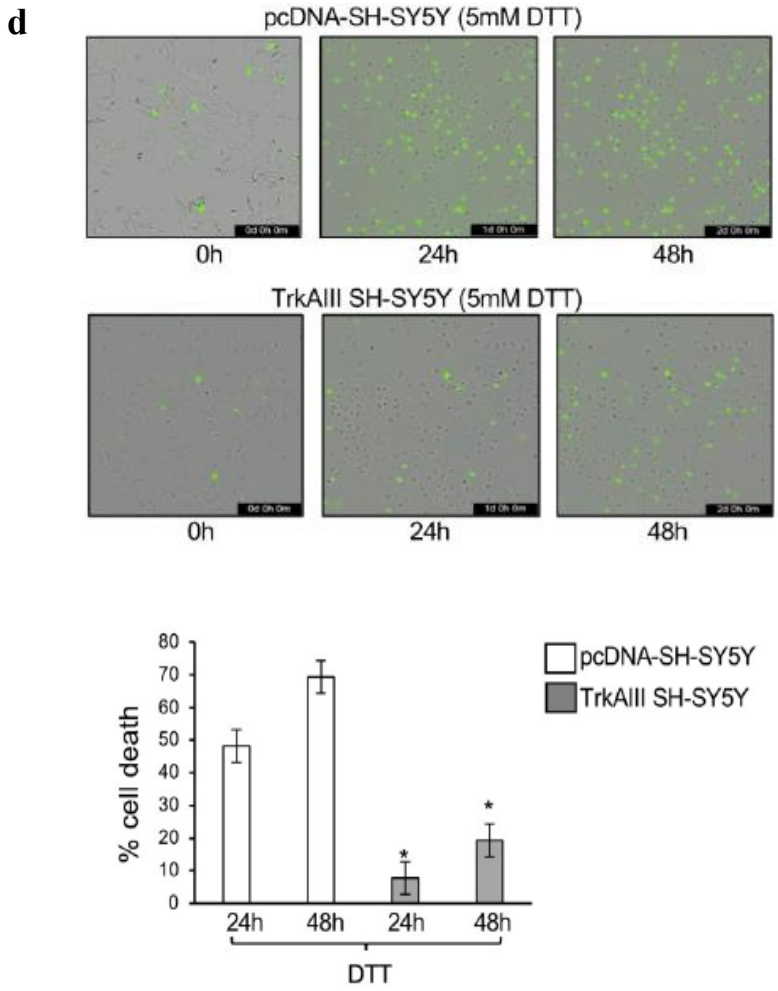


Figura 11. a) IF indiretta mostra una maggiore immunoreattività sovrapposta (giallo/arancione) per TrkA e p-TrkAIII (verde) con l'immunoreattività dei mitocondri marcati con mitotracker (rosso) nei trasfettanti stabili SH-SY5Y TrkAIII trattati con DTT (5 mM per 6 ore) rispetto ai controlli non trattati (controllo) (barra = 50 μm). **b)** Western blot che mostrano il clivaggio mitocondriale di TrkAIII e la fosforilazione in Y674/5 in estratti mitocondriali (50μg) di cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT (5 mM per 6 ore) rispetto ai controlli non trattati. **c)** Western blot che mostrano un aumento dell'ossidazione della PTPasi (frecce) nei mitocondri (50μg) di cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT (5mM per 6 ore) rispetto ai controlli non trattati (Con). **d)** Micrografie a contrasto di fase e relativo istogramma che mostrano differenze significative (* = $p < 0,05$) nella percentuale di morte cellulare pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII indotta da DTT 5mM a 24 ore e 48 ore, espressa come media (± sd).

4.1 L'importazione mitocondriale ed il clivaggio di TrkAIII indotti da DTT comportano un ripiegamento errato ed una complessazione con Grp78 e Ca^{2+}-calmodulina.

Per valutare se il comportamento alterato di TrkAIII, indotto dal trattamento con DTT, coinvolgesse il suo misfolding, l'immunoreattività di TrkAIII in estratti di cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattate e trattate con DTT è stata analizzata e confrontata in Western blot SDS-PAGE in condizioni non riducenti e riducenti.

Utilizzando un anticorpo anti-TrkA generato contro gli ultimi 14 aminoacidi dell'estramità C-terminale di TrkA, il Western blot SDS-PAGE in condizioni non riducenti ha rilevato una specie immunoreattiva TrkAIII predominante da ≈75 kDa. Al contrario, il Western blot SDS-PAGE in condizioni riducenti ha rilevato una specie immunoreattiva TrkAIII predominante da ≈100 kDa (Figura 12a). Questa differenza può essere spiegata da alterazioni nella struttura terziaria del TrkAIII non ridotta e ridotta, che influenzano la migrazione elettroforetica in condizioni SDS-PAGE denaturanti.

A seguito del trattamento con DTT per 1, 2 e 3 ore, è stato rilevato un piccolo cambiamento nelle specie immunoreattive TrkAIII da 100 kDa rilevate in Western blot SDS-PAGE riducenti. Al contrario, l'immunoreattività di TrkAIII da 75 kDa nei Western blot SDS-PAGE non riducenti è stata quasi completamente persa in tutti i tempi di trattamento (Figura 12a).

Questi dati indicano che: 1) il trattamento con DTT delle cellule SH-SY5Y TrkAIII determina un mascheramento dell'estremità C-terminale di TrkAIII, sensibile alla riduzione, riconosciuta dall'anticorpo anti-TrkA nei Western blot non riducenti; 2) il trattamento con DTT non determina una riduzione completa del TrkAIII a 100 kDa, rilevata nei Western blot SDS-PAGE riducenti.

Al fine di studiare ulteriormente l'influenza del DTT sul ripiegamento e sulla complessazione di TrkAIII, sono stati eseguiti esperimenti Western blot di co-immunoprecipitazione per valutare i cambiamenti nella complessazione di TrkAIII con il chaperone legante le proteine mal ripiegate Grp78. Nei Western blot di co-immunoprecipitazione, gli estratti di cellule SH-SY5Y TrkAIII, trattati per 6 ore con DTT 5mM, hanno precipitato in maniera abbondante più Grp78 rispetto agli immunoprecipitati di estratti di cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattati (Figura 12b). Questi dati indicano che il DTT induce un ripiegamento errato di TrkAIII sufficiente a promuovere la complessazione con il chaperone Grp78.

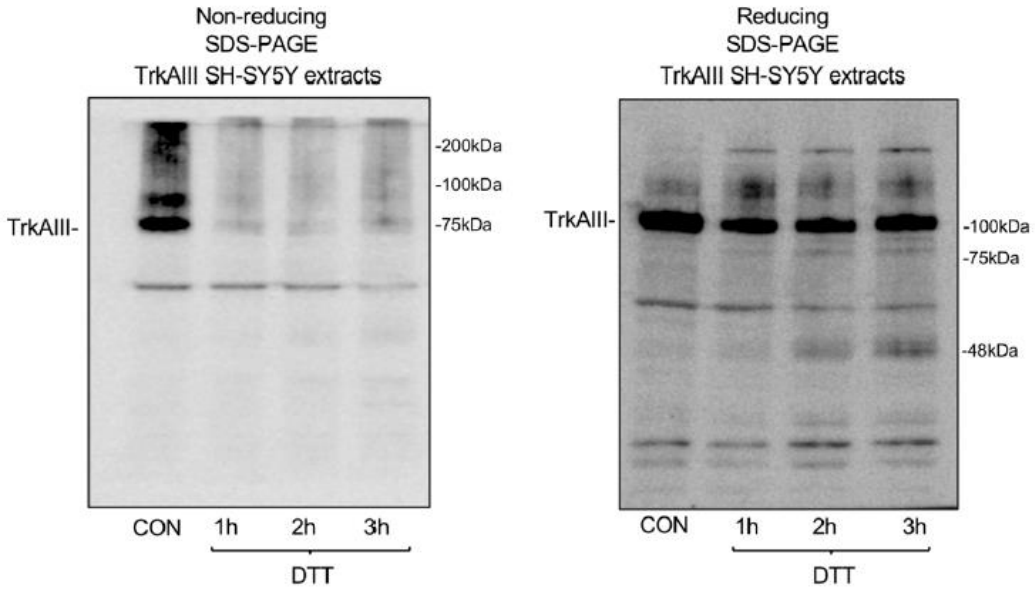
Alla luce di rapporti secondo cui il TrkA fully spliced lega la calmodulina in modo Ca^{2+}-dipendente (Llovera et al., 2004) e il DTT deregola l'omeostasi del Ca^{2+} (Lebeau et al., 2021), abbiamo anche valutato se il TrkAIII legasse la calmodulina e se questa interazione fosse influenzata dal DTT.

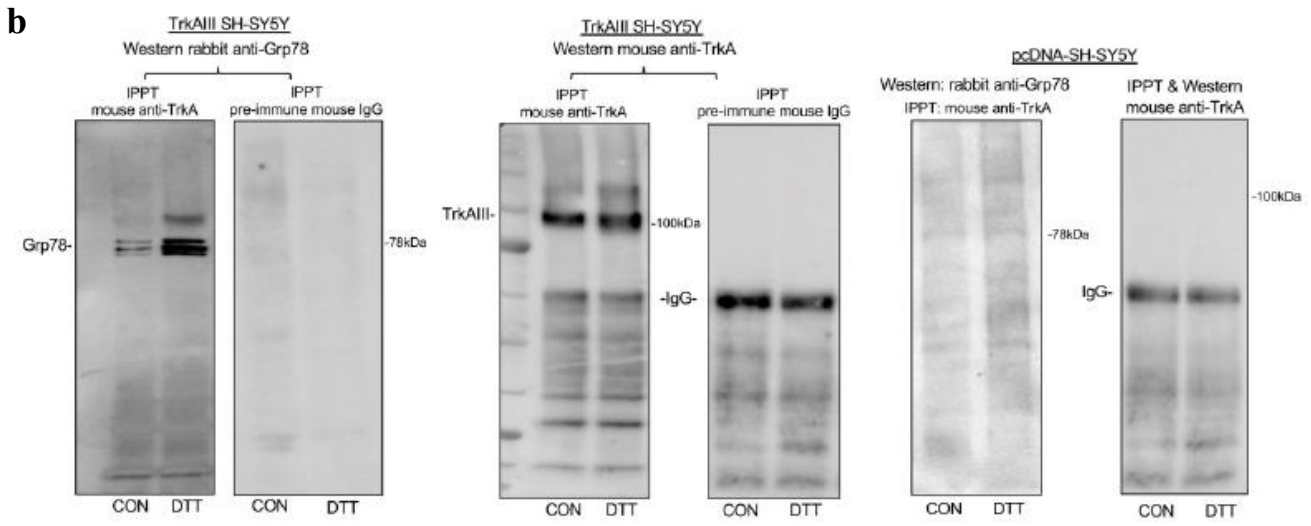
Nei test Western blot pulldown, la calmodulina coniugata con sefarosio, ha precipitato livelli notevolmente più elevati di TrkAIII dagli estratti cellulari SH-SY5Y TrkAIII in presenza di Ca^{2+} esogeno, rispetto ai livelli di TrkAIII precipitati dalla calmodulina coniugata con sefarosio in presenza del chelante EGTA (Figura 12c). Ciò conferma che il TrkAIII mostra anche una complessazione Ca^{2+}-dipendente con la calmodulina. Al contrario la calmodulina Sepharose non ha precipitato TrkAIII in estratti cellulari pcDNA-SH-SY5Y (Figura 12c).

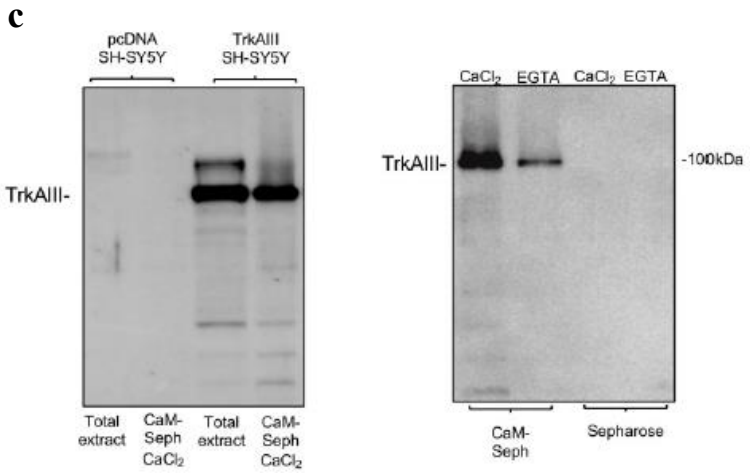
In Western blot di co-immunoprecipitazione, la calmodulina immunoprecipitata dall'anticorpo anti-calmodulina in estratti di cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate per 3 e 6 ore con DTT, ha precipitato con sè molto più TrkAIII rispetto alla calmodulina immunoprecipitata da estratti di cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattati (Figura 12d). Al contrario, l'anticorpo anti-calmodulina non ha precipitato nessuna isoforma TrkA dagli estratti cellulari pcDNA-SH-SY5Y (Figura 12d). Nel complesso, questi dati confermano che il TrkAIII lega la calmodulina in modo Ca^{2+}-dipendente e mostrano che il DTT aumenta la complessazione di TrkAIII con Ca^{2+}-calmodulina nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII .

Fig.12

a




b
TrkAIII SH-SY5Y
Western rabbit anti-Grp78
IPPT mouse anti-TrkA
IPPT pre-immune mouse IgG
Grp78-
-78kDa
CON DTT CON DTT
TrkAIII SH-SY5Y
Western mouse anti-TrkA
IPPT mouse anti-TrkA
IPPT pre-immune mouse IgG
TrkAIII-
-100kDa
-IgG-
CON DTT CON DTT
pcDNA-SH-SY5Y
Western: rabbit anti-Grp78
IPPT: mouse anti-TrkA
IPPT & Western mouse anti-TrkA
-78kDa
IgG-
-100kDa
CON DTT CON DTT


c
pcDNA SH-SY5Y
TrkAIII SH-SY5Y
TrkAIII-
Total extract
CaM-Seph CaCl2
Total extract
CaM-Seph CaCl2
CaCl2 EGTA CaCl2 EGTA
TrkAIII-
-100kDa
CaM-Seph
Sepharose

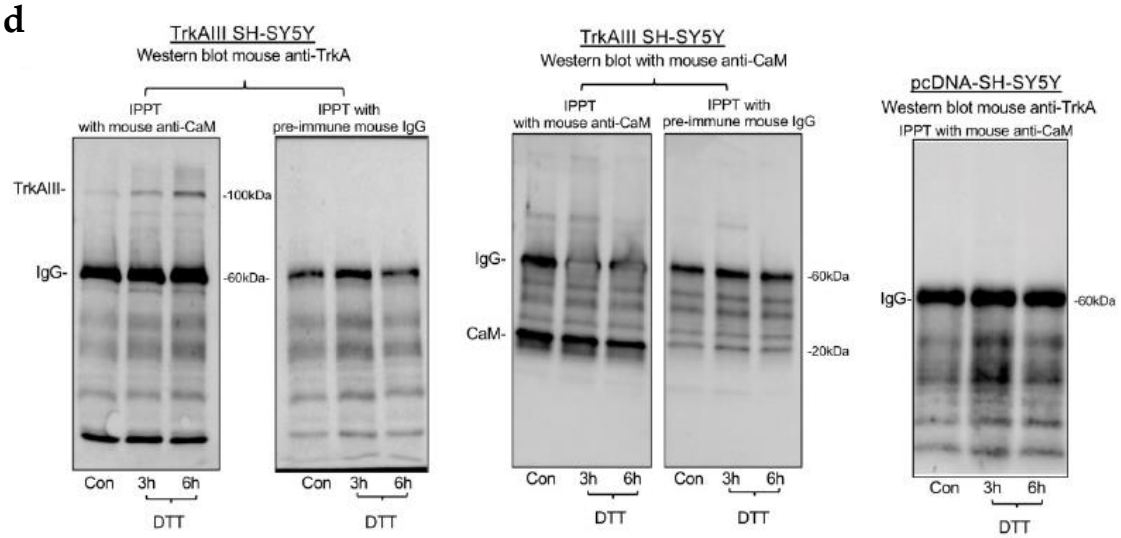

d
TrkAIII SH-SY5Y
Western blot mouse anti-TrkA
IPPT with mouse anti-CaM
IPPT with pre-immune mouse IgG
TrkAIII-
IgG-
-100kDa
-60kDa-
Con 3h 6h DTT
Con 3h 6h DTT
TrkAIII SH-SY5Y
Western blot with mouse anti-CaM
IPPT with mouse anti-CaM
IPPT with pre-immune mouse IgG
IgG-
CaM-
-60kDa
-20kDa
Con 3h 6h DTT
Con 3h 6h DTT
pcDNA-SH-SY5Y
Western blot mouse anti-TrkA
IPPT with mouse anti-CaM
IgG-
-60kDa
Con 3h 6h DTT

Figura 12. a) Western blot che mostra le differenze nell'immunoreattività di TrkAIII in estratti di cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattate (CON) e trattate con DTT (5 mM DTT per 1, 2 e 3 ore) (30μg) in condizioni riducenti e non riducenti. **b)** Western blot di co-immunoprecipitazione mostra un aumento del pulldown di Grp78 negli estratti di cellule SH-SY5Y TrkAIII trattati con DTT (5 mM per 6 ore) rispetto agli estratti non trattati (CON), e livelli simili di TrkAIII immunoprecipito dall'anticorpo anti-TrkA ma non dalle pre-immune IgG mouse in estratti di cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattati (Con) e trattati con DTT (5 mM per 6 ore), più l'assenza di pulldown di GRP78 o isoforme TrkA mediante anticorpo anti-TrkA in estratti cellulari pcDNA-SH-SY5Y (500μg). **c)** Western blot mostra il pulldown di TrkAIII da parte di Calmodulina coniugata con Sepharose (CaM-Seph) in estratti di SH-SY5Y TrkAIII ma non in estratti pcDNA-SH-SY5Y (500μg), in presenza di 150 mM di $CaCl_2$ più aumento del pulldown di TrkAIII mediante Calmodulina coniugata con Sepharose (CaM-Seph) in estratti cellulari SH-SY5Y TrkAIII (500μg), in presenza di 150 μM $CaCl_2$ rispetto a 5mM EGTA, più nessun pulldown di TrkAIII mediante Calmodulina coniugata con Sepharose (CaM-Seph) in estratti cellulari SH-SY5Y TrkAIII in presenza di 150 μM $CaCl_2$ o 5mM EGTA. **d)** Western blot di co-immunoprecipitazione mostra un aumento del pulldown di TrkAIII mediante anticorpo anti-calmodulina (anti-CaM) ma non mediante dalle pre-immune IgG mouse, in estratti di cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT (5 mM per 3 e 6 ore) (500μg), rispetto agli estratti di cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattati (Con), più controlli di immunoprecipitazione (Ippt Pre-Im IgG).

4.2 L'importazione, il clivaggio e l'attivazione di TrkAIII mitocondriale sono regolati da Grp78, Ca^{2+}-calmodulina e Arf1.

Poiché il DTT promuove sia l'importazione mitocondriale di TrkAIII (questo studio e Farina et al., 2017), sia la complessazione con Grp78 e calmodulina, e considerando che il fattore 1 di ribosilazione dell'adenosina (Arf1) regola la formazione e la funzione dei MAM (Hajnòczky et al., 2002) necessarie per trasporto di proteine e Ca^{2+} dall'ER al mitocondrio (Barazzuol et al., 2021; Morciano et al., 2018; Panda et al., 2021), abbiamo esaminato se Grp78, Ca^{2+}-calmodulina e Arf1 partecipano attivamente alla traslocazione, al clivaggio ed attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT, utilizzando l'inibitore di Grp78 (HA-15) (Cerezo et al., 2016), di Ca^{2+}-calmodulina (W7) (Xu et al., 2017) e di Arf1 (brefeldina A- BfA) (Helms et al., 1992). Nei Western blot, il clivaggio e la fosforilazione di TrkAIII mitocondriale indotti dal solo trattamento con DTT, non sono stati rilevati negli estratti mitocondriali di SH-SY5Y TrkAIII co-trattati con DTT e HA-15, DTT e W7 o DTT e BfA (Figura 13a). Poiché le cellule pcDNA-SH-SY5Y non esprimono la proteina TrkAIII (Tacconelli et al., 2004) e il TrkAIII non è stato rilevato nei mitocondri di pcDNA-SH-SY5Y né trattati con DTT né nei controlli non trattati (Figura 13a), non sono stati eseguiti esperimenti paralleli nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y.

Insieme, questi dati confermano la partecipazione attiva di Grp78, Ca^{2+}-calmodulina e Arf-1 nell'importazione, nel clivaggio e nell'attivazione di TrkAIII mitocondriale.

Gli effetti degli inibitori precedentemente esposti, sono stati esaminati anche sulla proliferazione e sulla sensibilità alla morte indotta da DTT di cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII. In test di proliferazione (in duplicato ripetuti due volte) l'aumento medio (± s.d.) della proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII non è stato influenzato da HA-15 da solo, nell'arco di 48 ore, mentre BfA ha bloccato completamente la proliferazione sia pcDNA-SH-SY5Y che SH-SY5Y TrkAIII nell'arco di 48 ore, ma non ha indotto una morte cellulare significativa, valutata mediante incorporazione nucleare del colorante IncuCyte Green (Figura 13b). Al contrario, W7 ha inibito la proliferazione sia di pcDNA-SH-SY5Y che di SH-SY5Y TrkAIII in associazione con una significativa citotossicità. Nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y W7 ha indotto il 97,7 (± 1%) di morte cellulare a 24 ore e il 98,25 (± 0,64%) a 48 ore, e nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII, ha indotto il 25,9 (± 2,5%) di morte cellulare a 24 ore e 36,9 (± 1,8%) a 48 ore. I livelli di morte cellulare SH-SY5Y TrkAIII indotta da W7 erano significativamente inferiori sia a 24 che a 48 ore rispetto a quelli osservati nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y (Figura 13b, c).

Nel complesso, questi dati identificano Arf1, ma non Grp78 e Ca^{2+}-calmodulina, coinvolto nella proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII; ciò è il linea con il ruolo essenziale di Arf1 nella proliferazione cellulare (Xu et al., 2017). Inoltre i dati confermano come l'inibizione da parte di W7 della Ca^{2+}-calmodulina sia citotossica per entrambe le cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII, in linea con precedenti report che sottolineano come la perdita di omeostasi del Ca^{2+} causi apoptosi (Frankfurt et al., 1995; Yokokura et al., 2014). La resistenza significativamente aumentata delle cellule SH-SY5Y TrkAIII alla morte indotta da W7 rispetto alle cellule pcDNA-SH-SY5Y, si è verificata in assenza di attivazione mitocondriale di TrkAIII e, sebbene non direttamente affrontata in questo studio, è coerente con l'aumentata espressione costitutiva degli inibitori dell'apoptosi Bcl2, Bcl-xL e Mcl-1 che caratterizza le cellule SH-SY5Y TrkAIII (Farina et al., 2017 e 2018).

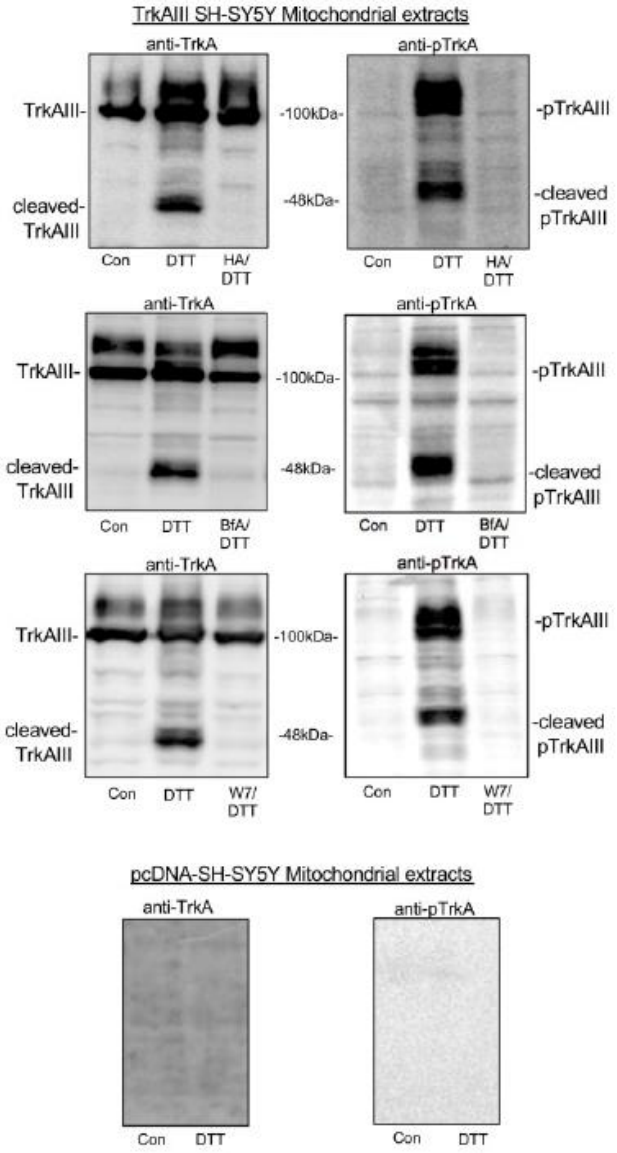
Nei test di citotossicità IncuCyte, ripetuti almeno due volte in duplicato, la morte cellulare media (± s.d.) di pcDNA-SH-SY5Y indotta dal solo DTT a 24 e 48 ore, non è stata alterata in modo significativo a seguito di co-trattatamento con DTT e HA-15 (Figura 13c). Al contrario, la morte delle cellule SH-SY5Y TrkAIII era significativamente aumentata a 48 ore a seguito di co-trattatamento con DTT più HA-15 al 39,5 (± 2,8%) ($p < 0,0001$, rispetto alle cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate per 48 ore con il solo DTT), ed è significativamente aumentata nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII co-trattate con DTT più W7 al 69,6 (± 2,6%) a 24 ore ($p < 0,0001$, rispetto alle cellule TrkAIII SH-SY5Y trattate per 24 ore con il solo DTT) e 89,9 (± 3,9%) a 48 ore ($p <0,0001$, rispetto alle cellule TrkAIII SH-SY5Y trattate per 48 ore con il solo DTT) (Figura 13c).

Questi dati identificano Grp78 e Ca^{2+}-calmodulina come partecipanti target nell'attivazione di TrkAIII mitocondriale indotta da DTT, la cui inibizione aumenta la sensibilità alla morte indotta da DTT nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII. Questi dati dimostrano anche che il DTT combinato con W7 induce i più alti livelli di morte cellulare SH-SY5Y TrkAIII, indicando che lo stress, combinato con l'inibizione di TrkAIII e deregolazione dell'omeostasi del Ca^{2+}, è altamente citotossico per le cellule di NB che esprimono TrkAIII. A differenza di HA-15 e W7, la morte cellulare pcDNA-SH-SY5Y indotta dal solo DTT è stata significativamente ridotta nelle cellule co-trattate con DTT più BfA a 24 ore al 17,2 (± 1,6%) e a 48 ore al 22,3 (± 3,6%) ($p < 0,0001$, per entrambi rispetto alle cellule pcDNA-SH-SY5Y trattate con il solo DTT in ciascun punto temporale, rispettivamente), ed è stato anche significativamente ridotto nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII co-trattate con DTT più BfA a 2,1 (± 0,2%) a 24 ore ($p < 0,0001$, rispetto alle cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con solo DTT per 24 ore) e 13,6 (± 2,5%) a 48 ore ($p = 0,006$, rispetto a TrkAIII SH-SY5Y cellule trattate solo con DTT per 48 ore) (Figura 13 c). Insieme, questi dati confermano un ruolo diretto per Arf1 nella morte indotta dal DTT, nonostante il suo coinvolgimento nell'attivazione di TrkAIII

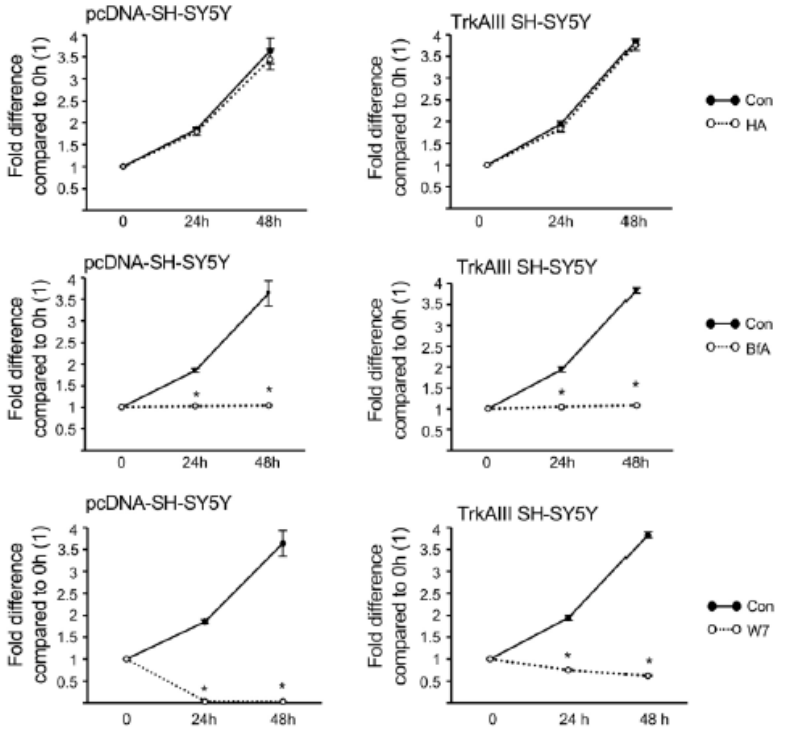
mitocondriale indotta dal DTT. Inoltre i dati identificano Grp78 e Ca^{2+}-calmodulina come nuovi partecipanti target nel clivaggio ed attivazione di TrkAIII mitocondriale e nella resistenza alla morte cellulare SH-SY5Y TrkAIII, indotti da DTT, e caratterizzano Arf1 come un partecipante non target nel clivaggio ed attivazione di TrkAIII indotti da DTT, a causa del suo coinvolgimento diretto nella morte indotta dal DTT.

Fig.13

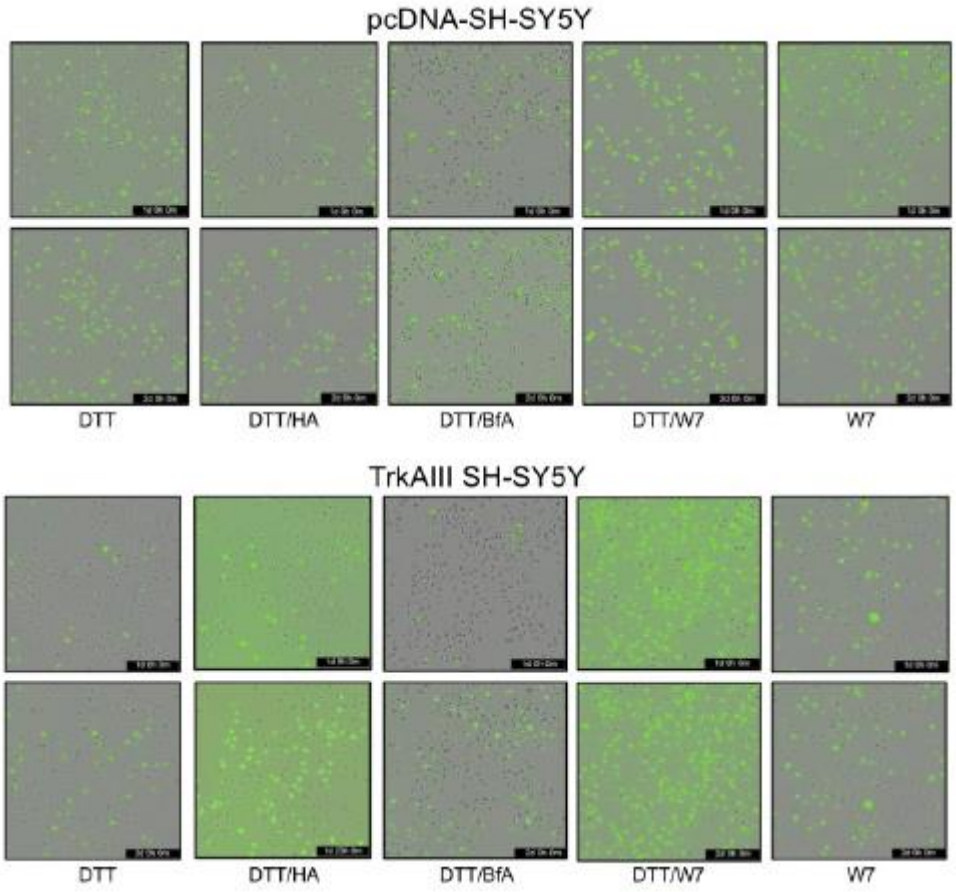
a



b


pcDNA-SH-SY5Y
TrkAIII SH-SY5Y
Fold difference compared to 0h (1)
0
24h
48h
Con
HA
BfA
W7

c


pcDNA-SH-SY5Y
TrkAIII SH-SY5Y
DTT
DTT/HA
DTT/BfA
DTT/W7
W7

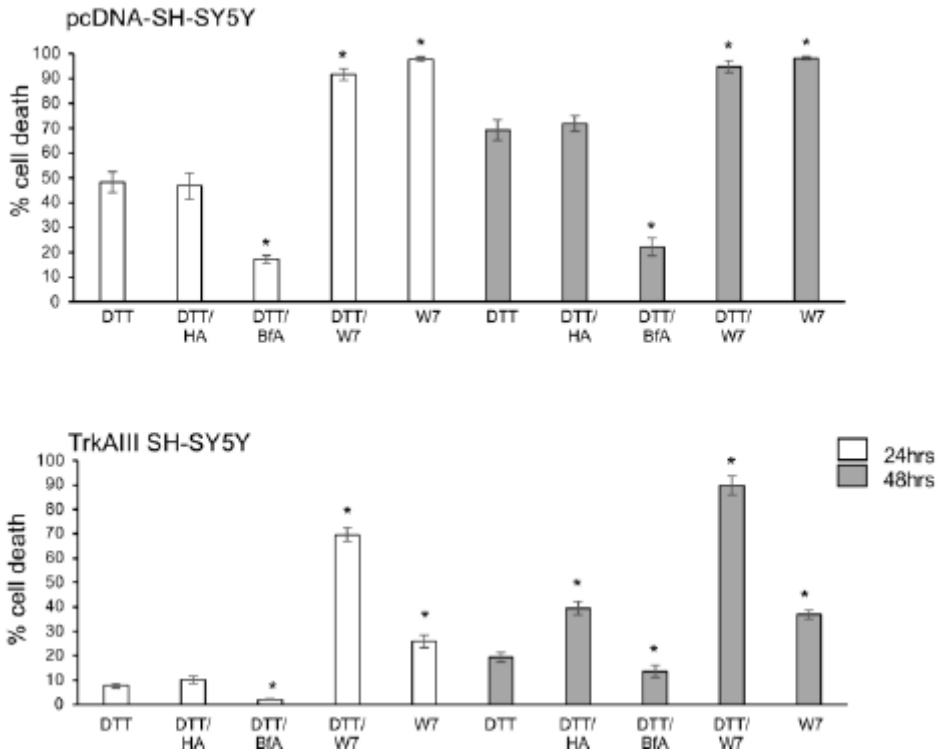


Figura 13. a) I Western blot mostrano il clivaggio e la fosforilazione di TrkAIII nei mitocondri (50 µg) di cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT da solo (5 mM) e co-trattate con DTT più HA-15 (20 µM) (DTT/HA), DTT più brefeldina A (5µg/ml) (DTT/BFA) e DTT più W7 (60µM) (DTT/W7), più TrkAIII non fosforilato nei mitocondri di cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattate (Con). Perdita di immunoreattività di TrkA e p-TrkA nei mitocondri (50 µg) di pcDNA-SH-SY5Y non trattate e trattate con DTT da solo (5 mM 6h). **b)** Grafici a linee che dimostrano una significativa inibizione (*) della proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII da parte di brefeldina A (5µg/ml) e W7 (60µM) ma non di HA-15 (20µM), a 24 e 48 ore. **c)** Micrografie rappresentative a contrasto di fase più istogrammi dimostrano la percentuale di morte cellulare pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII indotta da 5 mM DTT da solo (DTT), DTT più HA-15 (20µM) (DTT/HA), DTT più BfA (5µg/ml) (DTT/BFA) e DTT più W7 (60µM) (DTT/W7), più morte cellulare pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII indotta dal solo W7 (60µM) a 24 e 48 ore.

4.3 L'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT dipende da Hsp90, MCU e ROS.

L'attivazione citoplasmatica di TrkAIII dipende da Hsp90 (Farina et al., 2009) e l'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT richiede il clivaggio intramitocondriale da parte della serin proteasi IMS Omi/HtrA2 (Farina et al., 2017; Chakraborty et al., 2022). Inoltre, l'assorbimento mitocondriale di Ca^{2+} durante le risposte integrate allo stress può attivare l'Uniporter mitocondriale (MCU) (Groten et al., 2022) influenzando la produzione metabolica di ROS (Wang et al., 2021; Zhao et al., 2019). Pertanto, abbiamo approfontito se Hsp90 (analogo mitocondriale di TRAP-1), MCU e ROS possano essere richiesti anche per l'importazione, il clivaggio e l'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT.

I Western blot, confrontati rispetto ad estratti mitocondriali di SH-SY5Y TrkAIII che mostrano il clivaggio e fosforilazione di TrkAIII dopo trattamento con solo DTT, rivelano come la fosforilazione di TrkAIII (ma non il clivaggio) è stata prevenuta nei mitocondri di cellule SH-SY5Y TrkAIII co-trattate con DTT più l'inibitore dell'uniporter mitocondriale MCU (DS1657051) (Kon et al., 2017) (Figura 14a). Ciò implica l'MCU nella fosforilazione di TrkAIII indotta da DTT, ma non nel clivaggio. Nei mitocondri di cellule SH-SY5Y TrkAIII co-trattate con DTT più lo scavenger di ROS, il resveratrolo (Leonard et al., 2003), e con l'inibitore Hsp90 geldanamicina (GA) (Ochel et al., 2001), la fosforilazione di TrkAIII è stata completamente prevenuta ed il clivaggio è stato solo parzialmente prevenuto (Figura 14a).

Questi dati implicano sia ROS che Hsp90 nel clivaggio e nella fosforilazione di TrkAIII mitocondriale indotta da DTT. Al contrario, il clivaggio e la fosforilazione di TrkAIII indotti da DTT non sono stati prevenuti nei mitocondri di cellule SH-SY5Y TrkAIII co-trattate con DTT e l'inibitore TRAP1 (Honokiol-DCA- 10 μM) (Sanchez-Martin et al., 2021) (Figura 14a). Poiché le cellule pcDNA-SH-SY5Y non esprimono la proteina TrkAIII e il TrkAIII non è stato rilevato nei mitocondri di pcDNA-SH-SY5Y non trattati (Con) e trattati con DTT (Figura 13a), non sono stati eseguiti esperimenti paralleli nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y. Nel complesso, questi dati implicano l'MCU nella fosforilazione indotta da DTT di TrkAIII ma escludono il coinvolgimento di TRAP-1 in questo meccanismo.

Questi inibitori sono stati testati anche per valutare il loro effetto sulla proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII e sulla sensibilità alla morte indotta da DTT. In test di proliferazione, ripetuti 3 volte in duplicato, il DS16570511 e resveratrolo hanno completamente bloccato la proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII per 48 ore, in linea con l'occorrenza sia di MCU che ROS per il completamento della divisione mitotica (Zhao et al., 2019). La Geldanamicina ha anche inibito

significativamente la proliferazione di pcDNA-SHSY5Y e SH-SY5Y TrkAIII nell'arco di 48 ore, mentre Honokiol-DCA non ha avuto alcun effetto né sulla proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y né di SH-SY5Y TrkAIII (Figura 14b). Questi dati confermano il ruolo significativo per MCU e Hsp90 ma non per TRAP-1 nella proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII.

Il trattamento con DS1657051, resveratrolo e GA da soli non hanno indotto una morte significativa delle cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII, valutata mediante assorbimento nucleare di IncuCyte Green Dye.

Nei test di citotossicità Incucyte, ripetuti almeno due volte in duplicato, la morte cellulare media (± s.d.) pcDNA-SH-SY5Y, è stata significativamente ridotta nelle cellule co-trattate con DTT più DS16570511 al 16,82 (± 1,37%) a 24 ore e 43,8 (± 3,59%) a 48 ore ($p < 0,0001$, se confrontato con cellule pcDNA-SH-SY5Y trattate con solo DTT a 24 e 48 ore, rispettivamente).

Nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII, la morte cellulare è stata significativamente ridotta anche nelle cellule co-trattate con DTT più DS16570511 al 5,3 (± 1,78%) a 24 ore ($p = 0,01$, rispetto alle cellule TrkAIII trattate con solo DTT, a 24 ore) e al 15 (± 2,53%) a 48 ore ($p = 0,006$, rispetto alle cellule TrkAIII trattate con il solo DTT, a 48 ore) (Figura 14c). Questi dati implicano direttamente l'MCU direttamente nella morte cellulare pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII indotta da DTT.

Anche la morte cellulare pcDNA-SH-SY5Y è stata significativamente ridotta nelle cellule co-trattate con DTT più resveratrolo al 20,4 (± 1,3%) a 24 ore e al 30,4 (± 3,8%) a 48 ore ($p < 0,0001$, se confrontato alle cellule pcDNA-SH-SY5Y trattate con il solo DTT rispettivamente per 24 ore e 48 ore). La morte cellulare SH-SY5Y TrkAIII è stata significativamente ridotta nelle cellule co-trattate con DTT e resveratrolo all'1,5 (± 0,4%) a 24 ore ($p = 0,01$, rispetto alla morte indotta dal solo DTT, a 24 ore) e 13,05 (± 2,6%) a 48 ore ($p = 0,006$, rispetto alla morte cellulare TrkAIII SH-SY5Y indotta dal solo DTT a 48 ore) (Figura 14c).

Questi dati implicano i ROS direttamente nella morte cellulare pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII indotta da DTT.

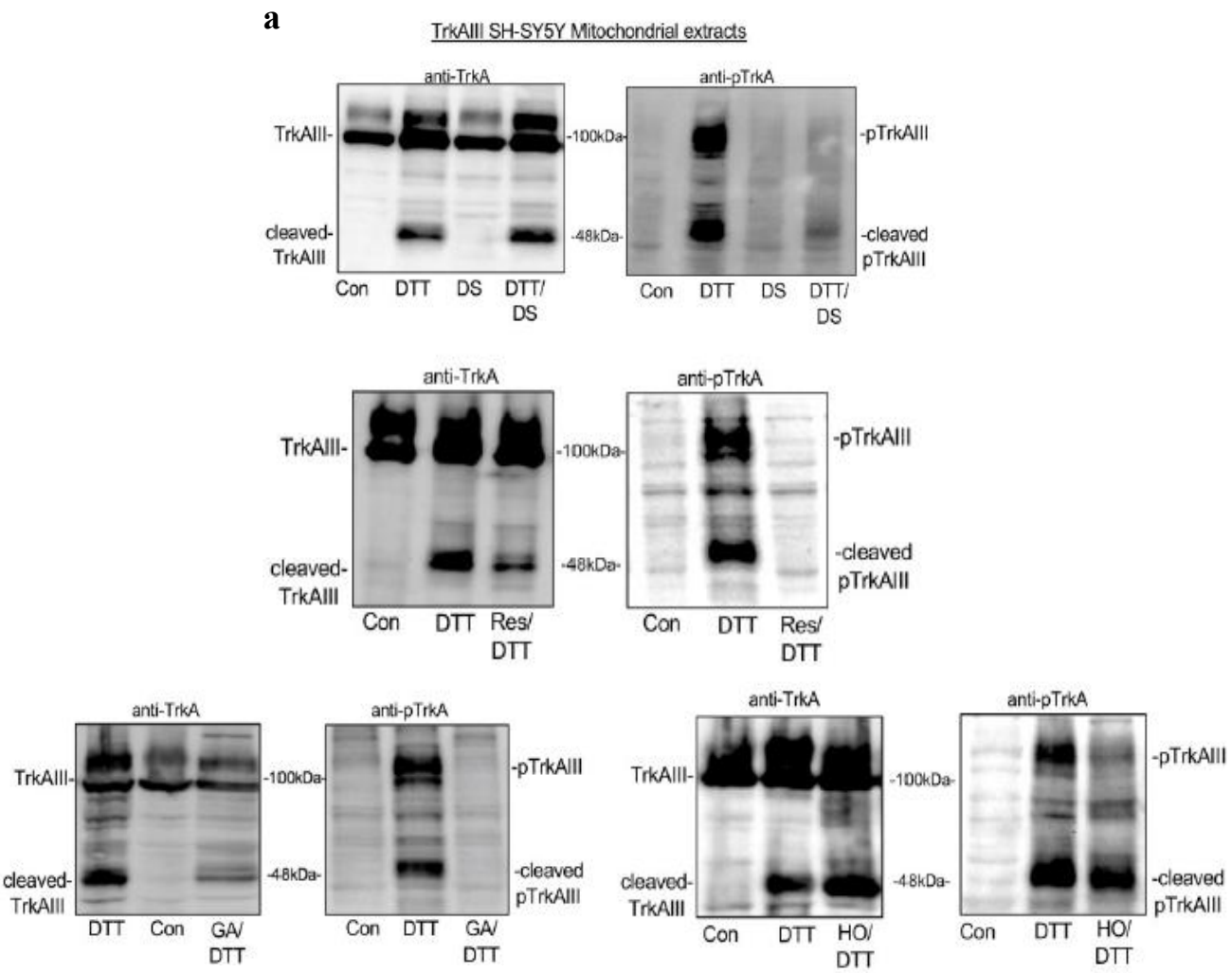
La morte cellulare pcDNA-SH-SY5Y non è stata significativamente alterata nelle cellule co-trattate con DTT più GA a 24 o 48 ore (Figura 14b), ma invece è significativamente aumentata nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII co-trattate con DTT e GA al 16,4 (± 1,4%) a 24 ore e al 39,3 (± 2,3%) a 48 ore ($p < 0,0001$ rispetto alle cellule TrkAIII SH-SY5Y trattate con solo DTT rispettivamente per 24 ore e 48 ore).

Al contrario, il co-trattamento delle cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII con DTT più Honokiol-DCA non ha avuto effetti significativi sulla morte cellulare indotta da DTT (Figura 14c). Questi

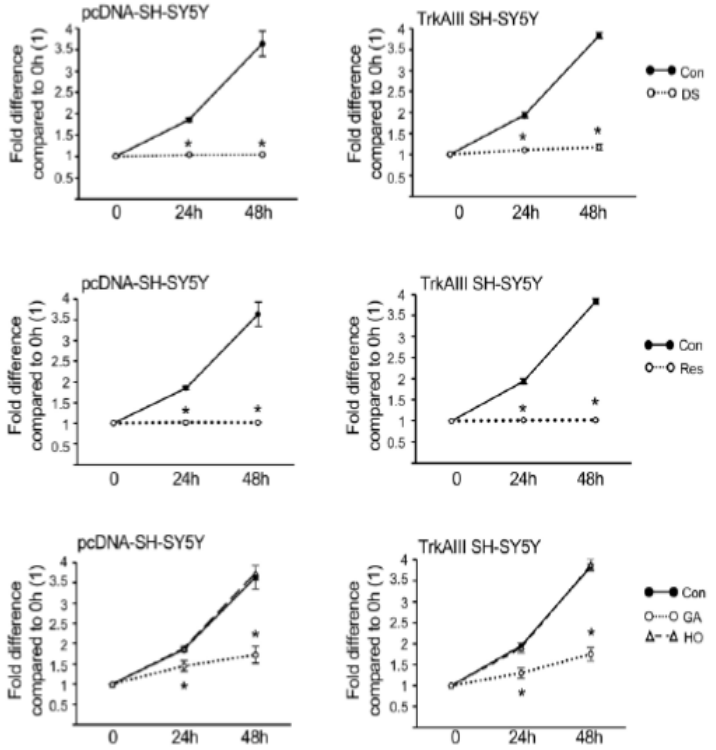
dati confermano un ruolo di Hsp90 nella resistenza alla morte indotta da DTT in SH-SY5Y TrkAIII ma non in pcDNA-SH-SY5Y, ed escludono il coinvolgimento di TRAP-1.

Nel complesso, questi dati identificano Hsp90 come un partecipante target nell'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT, la cui inibizione ha migliorato la morte delle cellule SH-SY5Y TrkAIII indotta da DTT e identificano MCU e ROS come partecipanti non target nell'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT, a causa del loro coinvolgimento diretto nella morte cellulare indotta dal DTT.

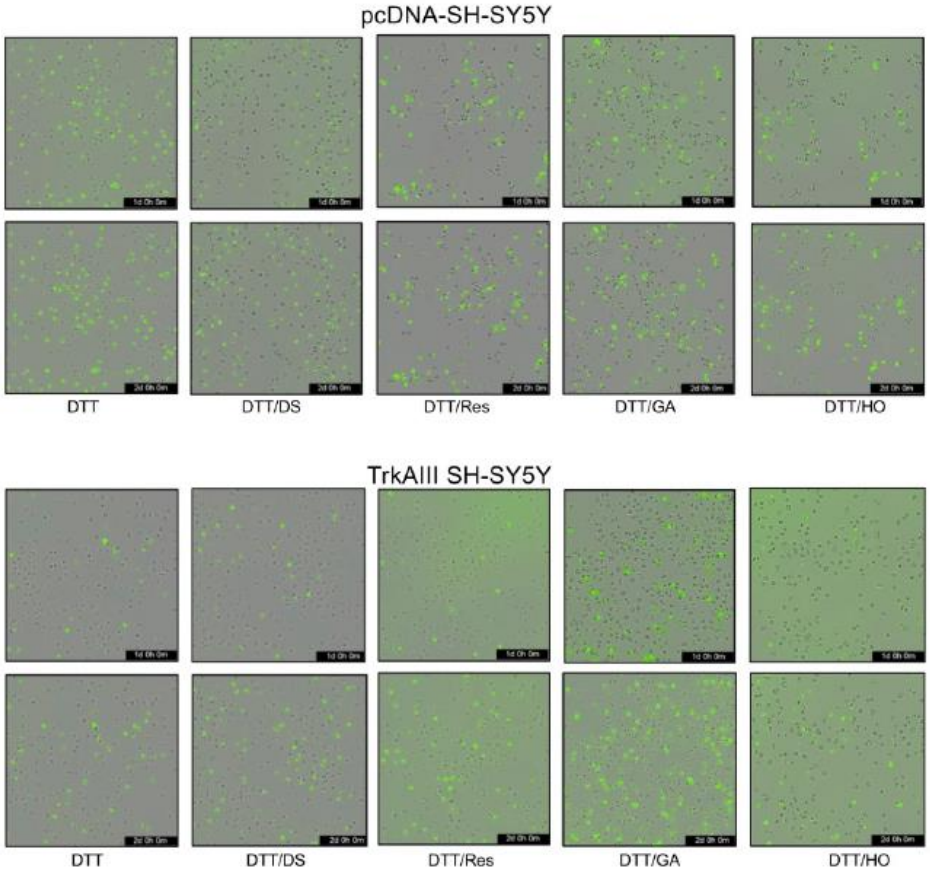
Fig.14



b


pcDNA-SH-SY5Y
TrkAIII SH-SY5Y
Fold difference compared to 0h (1)
0
24h
48h
Con
DS
Res
GA
HO

c


pcDNA-SH-SY5Y
TrkAIII SH-SY5Y
DTT
DTT/DS
DTT/Res
DTT/GA
DTT/HO

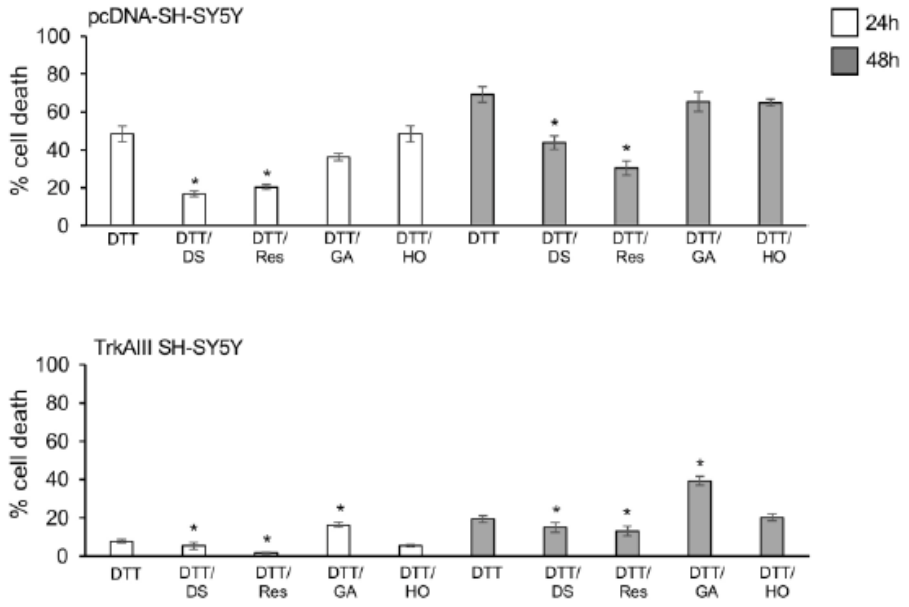


Figura 14. a) Western blot mostra il clivaggio e fosforilazione di TrkAIII nei mitocondri (50 µg) di SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT 5 mM per 6 ore (DTT) e co-trattate con DTT 5mM e DS16570511 (40µM) (DTT/DS); resveratrolo (100µM) (DTT/Res); geldanamicina (100µM) (GA/DTT) o Honokiol-DCA (10µM) (DTT/HON), più TrkAIII non clivato e non fosforilato nei mitocondri di cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattate (Con). **b)** Grafici lineari che dimostrano gli effetti di DS16570511 (DS) (40 µM), resveratrolo (Res) (100 µM), geldanamicina (GA) (100 µM) e Honokiol-DCA (HO) (10 µM) sul tasso di proliferazione in pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII nell'arco di 48 ore. **c)** Immagini rappresentative di contrasto di fase unite con fluorescenza verde e istogrammi che confrontano la morte cellulare di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII indotta da DTT 5mM con la morte cellulare indotta dal co-trattamento con DTT 5mM e DS16570511 (40□M) (DTT/DS), resveratrolo (100µM) (DTT/Res), geldanamicina (100µM) (DTT/GA) o Honokiol-DCA(10µM) (DTT/ HO) (* $p < 0,0001$).

4.4 L'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT dipende da CAMKII e Akt.

Sono stati utilizzati anche gli inibitori di Trk clinicamente approvati Entrectinib (Rolfo et al., 2015) e Lestaurtinib (Ruggeri et al., 1999) per valutare se l'attivazione di TrkAIII fosse necessaria per l'importazione e il clivaggio di TrkAIII mitocondriale indotti da DTT.

In Western blot, confrontati rispetto ad estratti mitocondriali di SH-SY5Y TrkAIII che mostrano il clivaggio e fosforilazione di TrkAIII dopo trattamento con solo DTT, il co-trattamento delle cellule con DTT più Entrectinib (Ent/DTT) e con DTT più Lestaurtinib (Les/DTT) ha completamente impedito la fosforilazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT, ma non il clivaggio (Figura 15a). Insieme questi dati confermano che Entrectinib e Lestaurtinib inibiscono l'attivazione mitocondriale di TrkAIII e che l'importazione e il clivaggio mitocondriale di TrkAIII indotti dal DTT sono indipendenti dall'attività di TrkAIII.

L'attivazione citoplasmatica di TrkAIII induce la segnalazione PI3K/Akt (Tacconelli et al., 2004), l'attivazione di PI3K/Akt regola la funzione mitocondriale e la sopravvivenza (Xie et al., 2022; Uchiyama et al., 2004) e Akt può essere attivato dalle vie MAPK (Carne et al., 2019), PI3K (Brugge et al., 2007) e CAMK-CAMKK (Kim et al.,2016; Schmitt et al., 2012). Abbiamo quindi studiato la relazione tra l'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT, le vie MAPK, PI3K e CAMK e la fosforilazione mitocondriale di Akt-S473, utilizzando l'inibitore di MAPK (PD090859) (Alessi et al., 1995), l'inibitore di PI3K (LY290042) (Vlahos et al., 1994), l'inibitore di CaMKI, II e IV (KN-93) (Wong et al., 2019), l'inibitore di CAMKKα/β, CaMKI e IV (STO-609) (Tokumitsu et al., 2002) e l'inibitore di Akt Capivasertib (Davies et al., 2012).

Nei Western blot, il clivaggio e la fosforilazione di TrkAIII negli estratti mitocondriali di cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate per 6 ore con il solo DTT, non erano alterati a seguito di co-trattatamento con DTT e PD090859 (PD/DTT) e LY290042 (LY/DTT) (Figura 15a), escludendo il coinvolgimento delle vie PI3K e MAPK.

Al contrario, nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII co-trattate con DTT e KN-93 (KN/DTT) o Capivasertib (Cap/DTT), la fosforilazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT, ma non il clivaggio, è stata prevenuta da entrambi i co-trattamenti, mentre il co-trattamento con DTT più STO-609 (STO/DTT) non ha alcun effetto (Figura 15b). Poiché le cellule pcDNA-SH-SY5Y non esprimono la proteina TrkAIII e TrkAIII non è stato rilevato nei mitocondri pcDNA-SH-SY5Y né trattati né trattati con DTT (Figura 13a), non sono stati eseguiti esperimenti paralleli nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y .

Insieme, questi dati svelano ruoli inaspettati per CAMKII e Akt nella fosforilazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT ma non nel clivaggio, ed escludono il coinvolgimento della cascata CAMKK.

Fig. 15

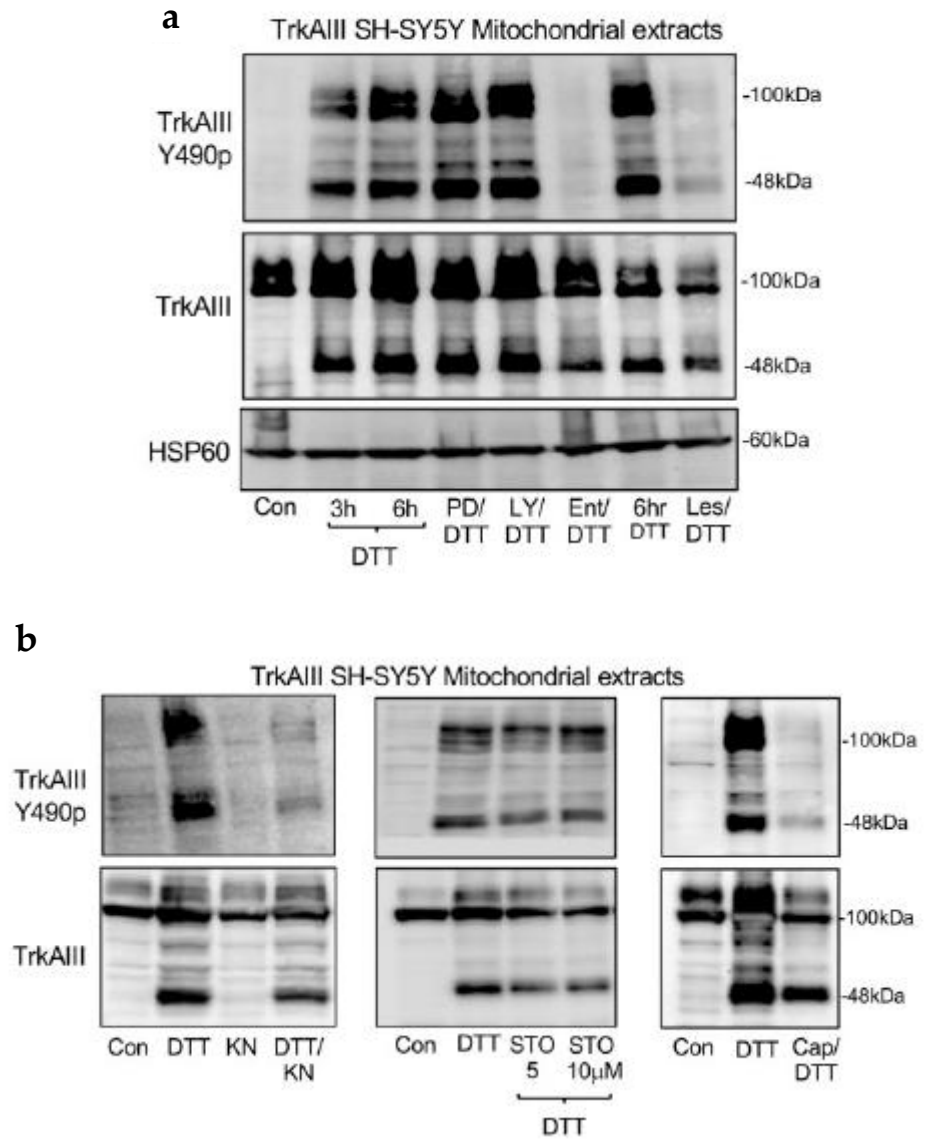


Figura 15. a) Western blot del clivaggio e fosforilazione di TrkAIII nei mitocondri (50 μg) da cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate per 3 e 6 ore con DTT 5mM e cellule SH-SY5Y TrkAIII cotrattate per 6 ore con DTT 5mM e PD098059 (10μ\M) (DTT/PD), LY294002 (25μM) (DTT/LY), Entrectinib (1μM) (DTT/Ent) e Lestaurtinib (1μM) (DTT/Les); **b)** Western blot del clivaggio e fosforilazione di TrkAIII nei mitocondri (50 μg) di cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate per 6 ore con DTT 5mM e di cellule SH-SY5Y TrkAIII co-trattate per 6 ore con DTT 5mM più KN-93 (10μM) (DTT/KN), STO-609 (5μM e 10μM) (STO/DTT) o Capivasertib (20μM) (DTT/Cap) più TrkAIII non fosforilato e non clivato nei mitocondri di cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattate (Con).

4.5 La fosforilazione di Akt Ser-473 indotta da DTT dipende da CAMKII nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y e da CAMKII, TrkAIII e PI3K nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII .

Il ruolo inaspettato di Akt nella fosforilazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT ed il potenziale di TrkAIII mitocondriale di attivare un asse PI3K/Akt pro-sopravvivenza, hanno spinto verso ulteriori analisi per approfondire il coinvolgimento di Akt in questo meccanismo. Nel Western blot, il trattamento con DTT, sia nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y che nelle SH-SY5Y TrkAIII, ha indotto la fosforilazione di Akt-Ser473 mitocondriale. Nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT l'aumento percentuale medio (± sd) della fosforilazione di Akt-S473 era significativamente più elevato rispetto alle cellule pcDNA-SH-SY5Y ($p = 0,0221$) (Figura 16a).

Questi dati indicano che l'attivazione di Akt mitocondriale indotta da DTT nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y è indipendente da TrkAIII, ma TrkAIII aumenta l'attivazione di Akt indotta da DTT nelle cellule TrkAIII SH-SY5Y. Per confermare il coinvolgimento di TrkAIII nell'attivazione di Akt mitocondriale, la fosforilazione di Akt-S473 nei mitocondri di cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII non trattate (Con) è stata confrontata con i livelli di fosforilazione di Akt-S473 nei mitocondri di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT da solo (DTT), Entrectinib da solo (Ent) o co-trattate con DTT più Entrectinib (Ent/DTT).

In Western blot, la fosforilazione di Akt-S473 mitocondriale in pcDNA-SH-SY5Y non è stata ridotta a seguito di co-trattamento con DTT più Entrectinib (Figura 16b e istogramma). Al contrario, la fosforilazione di Akt-S473 mitocondriale in SH-SY5Y TrkAIII è stata significativamente ridotta a seguito di co-trattatamento con DTT ed Entrectinib (Figura16b e istogramma) ($p < 0,0009$, rispetto a SH-SY5Y TrkAIII cellule trattate con il solo trattamento DTT).

Il trattamento delle cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII con Entrectinib da solo non ha alterato la fosforilazione di Akt-S473mitocondriale. Questi dati confermano che l'aumento indotto dal DTT nella fosforilazione di Akt-S473 mitocondriale in SH-SY5Y TrkAIII, ma non in pcDNA-SH-SY5Y, dipende dall'attività di TrkAIII, inibita da Entrectinib.

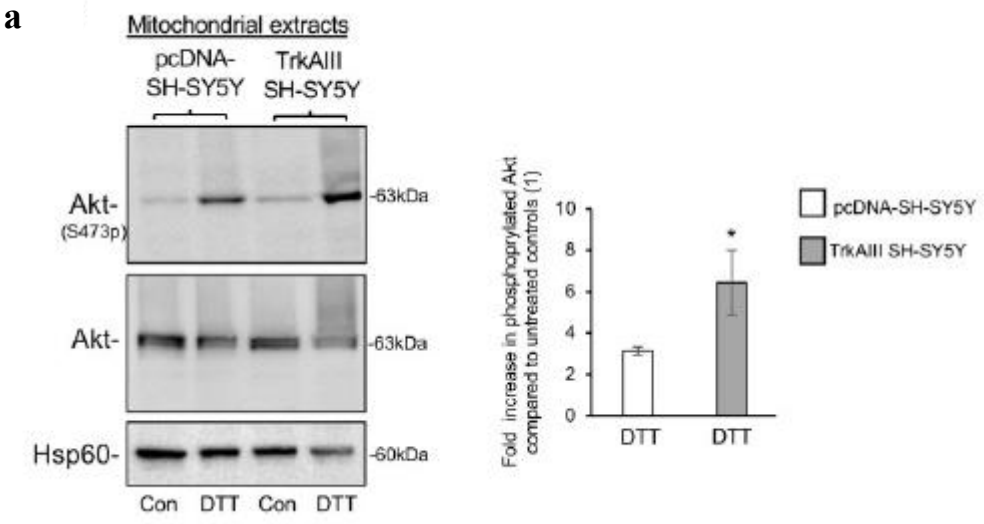
In ulteriori esperimenti, la fosforilazione di Akt-S473 mitocondriale in cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII non trattate (Con) è stata confrontata con la forforilazione delle stesse cellule co-trattate con DDT e PD-090859 (PD/DTT), (LY/DTT), (KN/DTT), STO-609 (STO/DTT) e Capivasertib (Cap/DTT).

Nei Western blot, la fosforilazione di Akt-S473 mitocondriale nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y non è stata significativamente ridotta a seguito di co-trattatamento con DTT e PD-090859 (PD/DTT), LY290042 (LY/DTT) e STO-522 (STO/DTT) ma è stata significativamente ridotta nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y co-trattate con DTT e KN-93 (KN/DTT) (p=0,03, rispetto a pcDNA-SH -SY5Y trattate solo con DTT) (Figura 15c e istogramma).

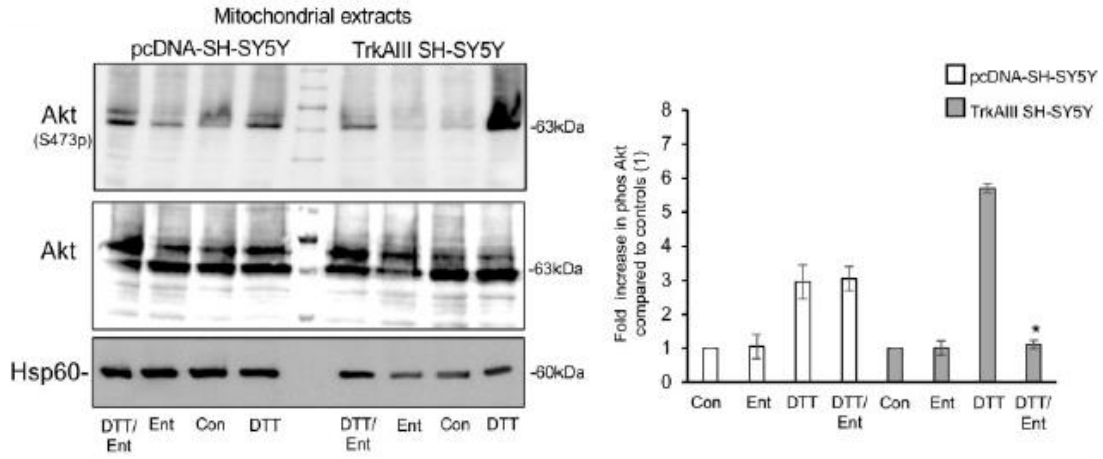
Al contrario, la fosforilazione di Akt-S473 mitocondriale nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII è stata significativamente ridotta a seguito di co-trattamento del DTT con LY290042 (LY/DTT) (*p =0,013) e KN-93 (KN/DTT) (*p=0,011, rispetto alle cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con solo DTT). La fosforilazione di Akt-S473 mitocondriale non è stata alterata in modo significativo nelle cellule co-trattate con PD-090859 e STO-609 (STO/DTT) (Figura 15c e istogramma).

Questi dati implicano CAMKII ed escludono CAMKKα/β, CaMKI, CaMKIV e la via MAPK, nella fosforilazione di Akt-S473 mitocondriale indotta da DTT in entrambe le cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII, ed inoltre implicano PI3K nell'aumento di fosforilazione di Akt mitocondriale indotto da DTT in cellule SH-SY5Y TrkAIII. Da notare che il co-trattamento SH-SY5Y TrkAIII con DTT e Capivasertib ha notevolmente aumentato la fosforilazione mitocondriale di Akt-S473 (Figura 16c), in linea con un rapporto precedente (Davies et al., 2012).

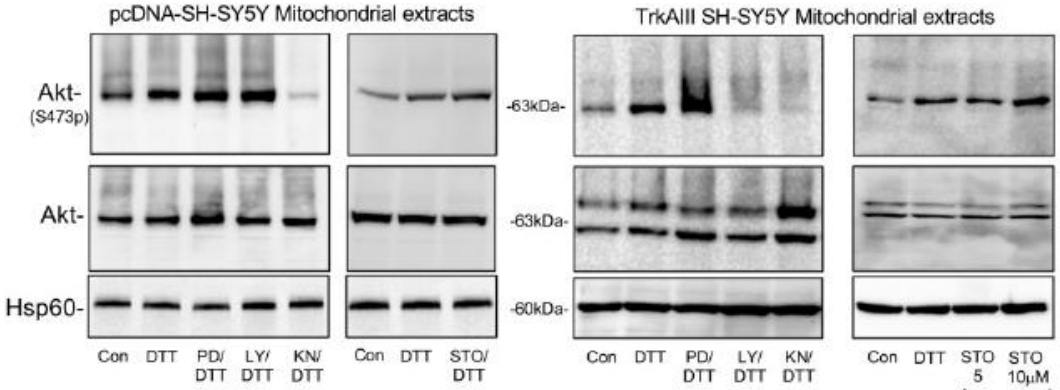
Fig. 16

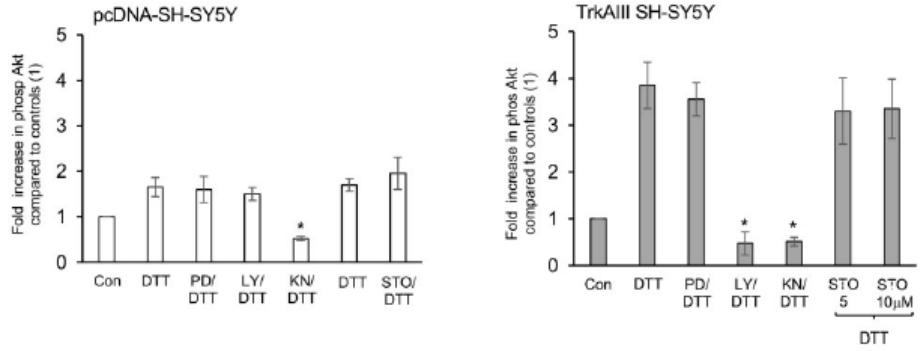


b


Mitochondrial extracts
pcDNA-SH-SY5Y
TrkAIII SH-SY5Y
Akt (S473p)
Akt
Hsp60-
-63kDa
-63kDa
-60kDa
DTT/ Ent
Ent
Con
DTT
DTT/ Ent
Ent
Con
DTT
pcDNA-SH-SY5Y
TrkAIII SH-SY5Y
Fold increase in phos Akt compared to controls (1)
Con
Ent
DTT
DTT/ Ent
Con
Ent
DTT
DTT/ Ent

c


pcDNA-SH-SY5Y Mitochondrial extracts
TrkAIII SH-SY5Y Mitochondrial extracts
Akt- (S473p)
Akt-
Hsp60-
-63kDa-
-63kDa-
-60kDa-
Con
DTT
PD/ DTT
LY/ DTT
KN/ DTT
Con
DTT
STO/ DTT
Con
DTT
PD/ DTT
LY/ DTT
KN/ DTT
Con
DTT
STO 5
STO 10μM
DTT
DTT


pcDNA-SH-SY5Y
Fold increase in phosp Akt compared to controls (1)
Con
DTT
PD/ DTT
LY/ DTT
KN/ DTT
DTT
STO/ DTT
TrkAIII SH-SY5Y
Fold increase in phos Akt compared to controls (1)
Con
DTT
PD/ DTT
LY/ DTT
KN/ DTT
STO 5
STO 10μM
DTT

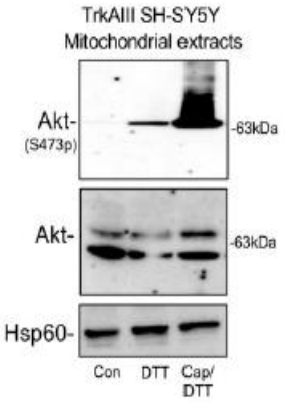

TrkAIII SH-SY5Y
Mitochondrial extracts
Akt- (S473p)
Akt-
Hsp60-
-63kDa
-63kDa
Con
DTT
Cap/ DTT

Figura 16. a) Western blot che dimostra Akt-Ser473 fosforilato e Akt totale nei mitocondri (50 μg) di cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII trattate per 6 ore con DTT 5mM rispetto ai controlli non trattati (Con) e istogramma che confronta la media (± s.d.) dell'aumento di fosforilazione di Akt S473 mitocondriale rispetto ai controlli non trattati; **b)** Western blot che dimostrano fosforilazione di Akt-Ser473 e Akt totale nei mitocondri (50μg) di cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII trattate per 6 ore con 5mM di DTT da solo (DTT) e 1μM di Entrectinib da solo (Ent) , e co-trattate per 6 ore con DTT 5mM più Entrectinib (1μM) (DTT Ent), rispetto ai livelli nei mitocondri dei controlli pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII non trattati (Con), e relativo istogramma che mostra un confronto dell'aumento medio (± s.d.) della fosforilazione mitocondriale di Akt-S473 rispetto ai controlli non trattati, dimostrando un'inibizione significativa della fosforilazione mitocondriale di Akt S473 indotta da DTT in cellule SH-SY5Y TrkAIII ma non in cellule pcDNA-SH-571 SY5Y co-trattate con DTT più Entrectinib 1μM (*p < 0,0009, rispetto ai livelli di fosforilazione di Akt S473 nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con solo DTT). **c)** Western blot dei livelli di Akt-Ser473 fosforilati e non fosforilati nei mitocondri (50 μg) di cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII trattate per 6 ore con 5mM DTT da solo (DTT), o controparti co-trattate per 6 ore con DTT da 5 mm e PD098059 (10μM) (DTT/PD), KN-93 (10μM) (DTT/KN), LY294002 (25μM) (DTT/LY) e STO-609 (5μM e 10μM) (DTT/STO) più un istogramma che dimostra una significativa inibizione dell'aumento medio (± s.d.) indotto dal DTT nella fosforilazione di Akt-S473 indotta nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y in cellule co-trattate con DTT -e KN-93 (* p = 0,03 rispetto al solo DTT) ma non con LY294002, e riduzioni significative della fosforilazione mitocondriale di Akt-S473 indotta da DTT nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII co-trattate con DTT e KN-93 (* p = 0,011) e LY294002 (* p = 0,013). Il pannello inferiore mostra l'aumento della fosforilazione mitocondriale Akt S473 indotta da DTT causata da Capivasertib (20μM) nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII (DTT/Cap).

4.6 La resistenza di SH-SY5Y TrkAIII alla morte indotta da DTT dipende da PI3K e Akt

Per valutare l'influenza dell'attivazione mitocondriale di Akt (TrkAIII e PI3K dipendente) sulla resistenza alla morte indotta da DTT, le cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII sono state confrontate nei test di proliferazione e di citotossicità IncuCyte in presenza di DTT e PD-090859, LY290042, Entrectinib, Lestaurtinib e Capivasertib. Nei test di proliferazione, Lestaurtinib e Capivasertib hanno inibito quasi completamente la proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII nell'arco di 48 ore. LY294002 ha inoltre ridotto significativamente la proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII sia a 24 che a 48 ore, mentre PD098059 ed Entrectinib non hanno avuto alcun effetto sulla proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII nell'arco di 48 ore (Figura 17a).

Questi dati implicano PI3K, Akt e tirosin chinasi inibite da Lestaurtinib, ma non da Entrectinib, nella proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII, ed escludono anche un ruolo diretto per TrkAIII nella proliferazione di SH-SY5Y TrkAIII. Questi inibitori non hanno indotto da soli una morte cellulare significativa, valutata attraverso l'assorbimento del colorante Incucyte Green. Nei test di citotossicità Incucyte, gli alti livelli di morte cellulare pcDNA-SH-SY5Y indotta dal solo DTT a 24 e 48 ore, non erano significativamente aumentati nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y co-trattate con DTT e LY294002, PD098059, Entrectinib, Lestaurtinib e Capivasertib (Figura 17b).

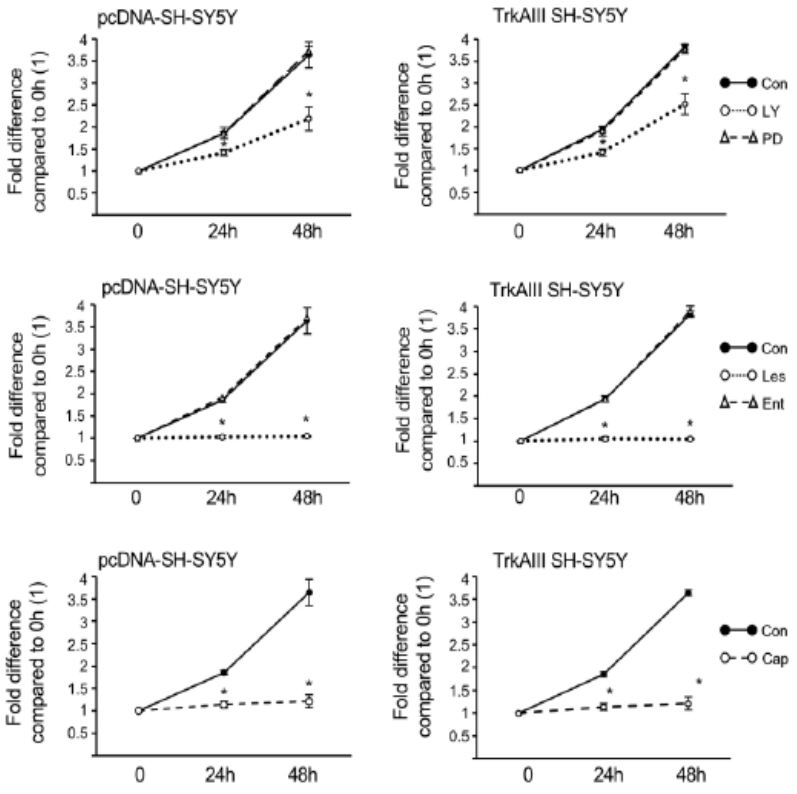
Al contrario, i bassi livelli di morte delle cellule SH-SY5Y TrkAIII indotta da DTT erano significativamente aumentati nelle cellule trattate con:

- DTT e LY294002 (media ± s.d.) al 14,5 (± 0,5%) a 24 ore e al 43,4 (± 3,8%) a 48 ore (p <0,001 rispetto alle cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT rispettivamente a 24 ore e 48 ore);
- DTT ed Entrectinib al 14,3 (± 1,6%) a 24 ore e al 50,2 (± 1,9%) a 48 ore (p < 0,001, rispetto alle cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT a 24 ore e 48 ore, rispettivamente)
- DTT e Lestaurtinib al 19,5 (± 4,3%) a 24 ore e al 51,4 (± 6,9%) a 48 ore (p < 0,001, rispetto alle cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT a 24 ore e 48 ore, rispettivamente);
- DTT e Capivasertib al 26,1 (± 2,1%) a 24.617 ore e al 45,8 (± 1,6%) a 48 ore (p < 0,001, rispetto alle cellule SH-SY5Y TrkAIII trattate con DTT rispettivamente a 24 ore e 48 ore).

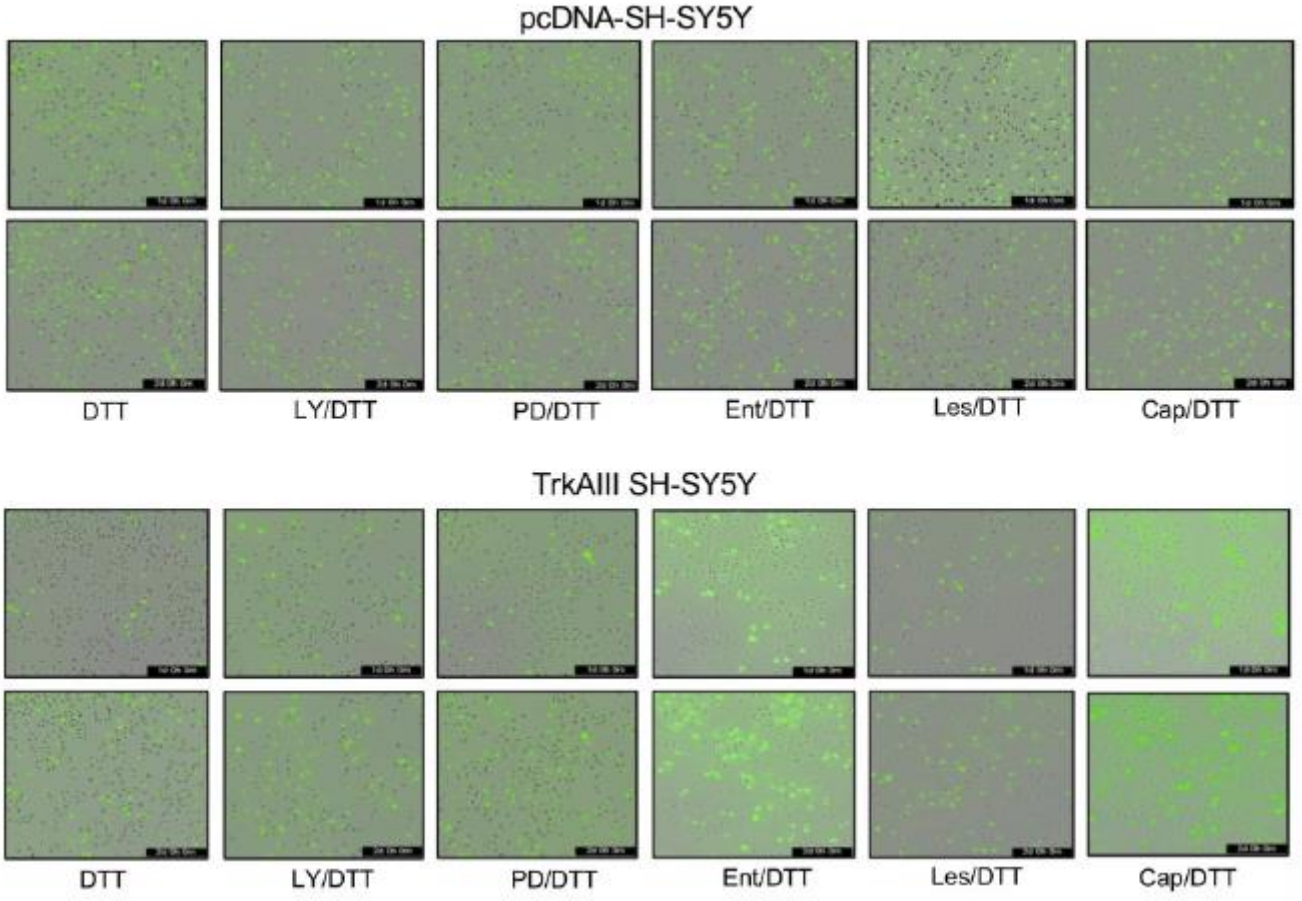
I livelli di morte cellulare invece non sono stati alterati in modo significativo dal co-trattamento DTT con PD098059 (Figura 17b). Questi dati implicano PI3K e Akt, ma non la via MAPK, nella resistenza delle cellule SH-SY5Y TrkAIII alla morte indotta da DTT e confermano che gli inibitori Trk (Entrectinib e Lestaurtinib) e Akt (Capivasertib) clinicamente approvati, e l'inibitore PI3K (LY294002), aumentano significativamente la sensibilità delle cellule SH-SY5Y che esprimono TrkAIII alla morte indotta da DTT. Gli effetti di tutti gli inibitori utilizzati sperimentalmente sono riassunti nella Tabella 1.

Fig. 17

a



b


pcDNA-SH-SY5Y
DTT
LY/DTT
PD/DTT
Ent/DTT
Les/DTT
Cap/DTT
TrkAIII SH-SY5Y
DTT
LY/DTT
PD/DTT
Ent/DTT
Les/DTT
Cap/DTT

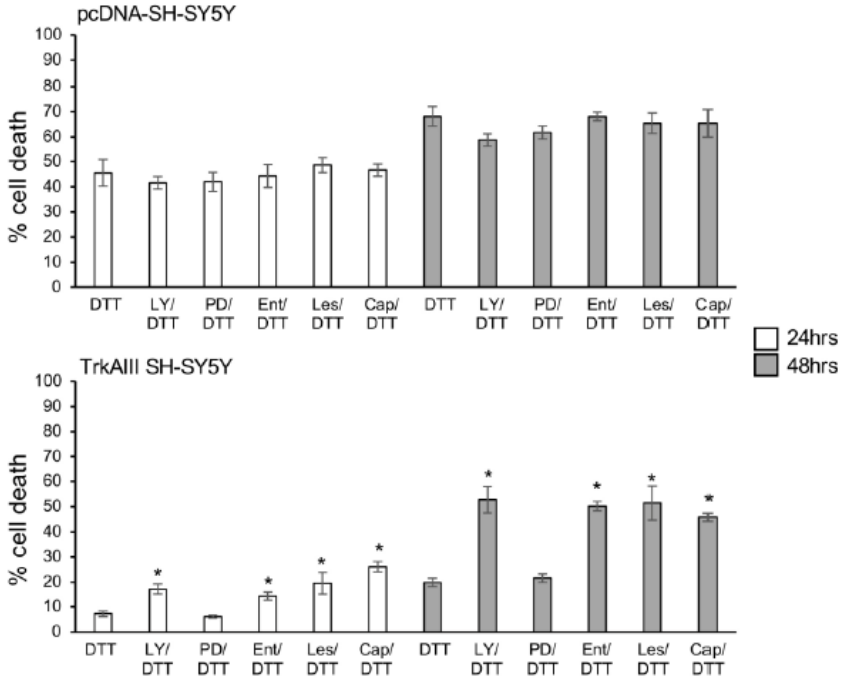

pcDNA-SH-SY5Y
% cell death
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
DTT
LY/ DTT
PD/ DTT
Ent/ DTT
Les/ DTT
Cap/ DTT
24hrs
48hrs
TrkAIII SH-SY5Y
% cell death
*

Fig.17. a) Grafici a linee che mostrano gli effetti di PD098059 (10μM), LY294002 (25μM) (LY), Entrectinib (1μM), Lestaurtinib (1μM) (Les) e Capivasertib (20μM) (Cap) sulla proliferazione di pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII nell'arco di 48 ore. **b)** Immagini rappresentative di contrasto di fase fuse con fluorescenza verde e istogrammi della percentuale media (± sd) di pcDNA-SH-SY5Y e morte cellulare SH-SY5Y TrkAIII a 24 e 48 ore, indotta dal solo DTT 5 mM (DTT) o dal DTT co-trattamento con LY294002 (25μM) (DTT/LY), PD098059 (10μM) (DTT/PD), Entrectinib (1μM) (DTT/Ent), Lestaurtinib (1μM) (DTT/ Les) e Capivasertib (20μM) (DTT/Cap) (* p < 0,0001).

Tabella 1: effetti degli inibitori sul clivaggio di TrkAIII mitocondriale, fosforilazione di TrkAIII e Akt mitocondriali, proliferazione e morta indotta da DTT in cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII.

Inibitore	Target	Inibizione Clivaggio TrkAIII	Inibizione Fosforilazione TrkAIII	Inibizione Fosforilazione Akt in pcDNA SH-SY5Y	Inibizione Fosforilazione Akt in SH-SY5Y TrkAIII	Proliferazione di pcDNA SH-SY5Y	Proliferazione di SH-SY5Y TrkAIII	Morte cellulare indotta da DTT in pcDNA SH-SY5Y	Morte cellulare indotta da DTT in SH-SY5Y TrkAIII
HA-15	**Grp78**	**Y**	**Y**	**nd**	**nd**	**N**	**N**	**N**	**>**
W7	**CaM**	**Y**	**Y**	**nd**	**nd**	**Y**	**Y**	**N**	**>**
Bref. A	**Arf1**	**Y**	**Y**	**nd**	**nd**	**Y**	**Y**	**N**	**<**
Geld.	**Hsp90**	**y**	**Y**	**nd**	**nd**	**Y**	**Y**	**N**	**>**
Hono DCA	**TRAP1**	**N**	**N**	**nd**	**nd**	**N**	**N**	**N**	**N**
DS.	**MCU**	**N**	**Y**	**nd**	**nd**	**Y**	**Y**	**N**	**<**
Resv.	**ROS**	**Y**	**Y**	**nd**	**nd**	**Y**	**Y**	**N**	**<**
Entr.	**Trk**	**N**	**Y**	**nd**	**Y**	**N**	**N**	**N**	**>**
Lest.	**Trk**	**N**	**Y**	**nd**	**nd**	**Y**	**Y**	**N**	**>**
Capiv.	**Akt**	**N**	**Y**	**nd**	**nd**	**Y**	**Y**	**N**	**>**
LY.	**PI3K**	**N**	**N**	**N**	**Y**	**Y**	**Y**	**N**	**>**
PD.	**MAPK**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
KN-93	**CAMK**	**N**	**Y**	**Y**	**Y**	**nd**	**nd**	**nd**	**nd**
STO-609	**CAMKK**	**N**	**N**	**N**	**N**	**nd**	**nd**	**nd**	**nd**

Y=completa inibizione; y= parziale inibizione; N= nessun effetto; <= diminuzione; >= aumento, nd=non dimostrato

Dati supplementari

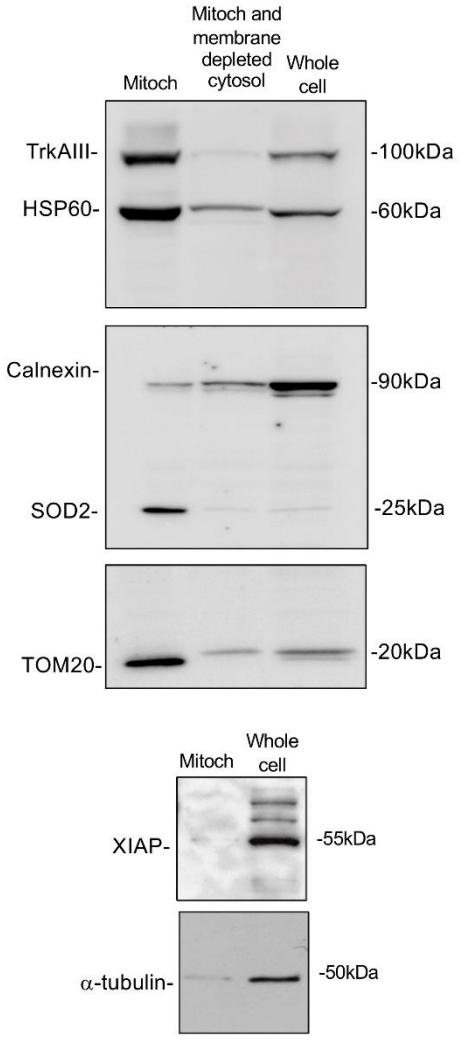


Immagine S1: Wester blot che mostrano l'effettivo isolamento ed arricchimento nella frazione mitocondriale degli estratti proteici totali, ottenuti utilizzando kit di estrazione ed isolamento Focus Sub Cell Mitochondrial isolation kit (G-Biosciences, St. Louis, MO)

5. DISCUSSIONI

In questa indagine sui partecipanti molecolari all'adattamento pro-sopravvivenza, indotto dallo stress, in cellule NB SH-SY5Y che esprimono TrkAIII, caratterizziamo il misfolding come prerequisito per l'importazione mitocondriale e per il clivaggio dell'oncoproteina TrkAIII. Identifichiamo Grp-78, Ca^{2+}-calmodulina, Hsp90 e Akt, oltre a TrkAIII, come nuovi partecipanti target in questo meccanismo, la cui inibizione migliora la sensibilità alla morte indotta da DTT delle cellule SH-SY5Y che esprimono TrkAIII e caratterizziamo Arf-1, MCU e ROS come partecipanti non target in questo meccanismo, a causa del coinvolgimento diretto nella morte indotta dalla DTT.

Lo stress induce il misfolding e la complessazione di TrkAIII con Grp78, che combinato con l'aumento della complessazione di TrkAIII con Ca^{2+}-calmodulina, determina l'importazione di Grp78, Ca^{2+}-calmodulina, Hsp90 e TrkAIII misfolded, regolato da Arf1, nelle IMM mitocondriali.

Le estremità N-terminali di TrkAIII misfolded, associate all'IMM, vengono quindi degradate da Omi/HtrA2 (Drilon et al., 2019), con conseguente accumulo di estremità C-terminali TrkAIII correttamente ripiegate, che vengono successivamente attivate da un meccanismo dipendente da CAMKII, Akt, MCU e ROS, in associazione con l'ossidazione inibitoria delle PTPasi mitocondriali. L'attivazione intramitocondriale di TrkAIII aumenta a sua volta l'attivazione di Akt mitocondriale tramite PI3K, migliorando la sopravvivenza cellulare, prendendo parte ad un asse mitocondriale TrkAIII/PI3K/Akt regolato dallo stress.

La prevenzione di questo meccanismo da parte degli inibitori di Trk (Entrectinib e Lestaurtinib), Akt (Capivasertib), Grp78 (HA-15) (Liu et al., 2024), Ca^{2+}-calmodulina (W7) (Spinazzi et al., 2016), Hsp90 (GA) (Panel et al., 2017), Arf1 (BfA) (Danese et al., 2017), inibitore dell'MCU (DS1657051) (Waldeck-Weiernaur et al., 2013) e dei ROS (resveratrolo) (Wulf et al., 1977), ne conferma la loro partecipazione.

Di questi inibitori, HA-15, W7, GA, Capivasertib, Entrectinib e Lestaurtinib aumentano significativamente la sensibilità delle cellule SH-SY5Y TrkAIII alla morte indotta da DTT, identificando Grp78, Ca^{2+}-calmodulina, Hsp90 e Akt come nuovi partecipanti target, oltre a TrkAIII. L'inibitore di PI3K (LY294002) (Panda et al., 2021) ha anche migliorato la sensibilità delle cellule SH-SY5Y TrkAIII alla morte indotta da DTT, ma non ha impedito l'attivazione mitocondriale di TrkAIII, confermando il coinvolgimento di PI3K a valle dell'attivazione mitocondriale di TrkAIII. Al contrario, BfA, DS1657051 e resveratrolo hanno tutti migliorato significativamente la resistenza delle SH-SY5Y TrkAIII alla morte indotta da DTT, confermando che Arf1, MCU e ROS partecipano direttamente alla morte indotta da DTT e sono, quindi, bersagli inadatti in questo meccanismo.

Il DTT è stato selezionato come molecola attivatrice di questo meccanismo di stress con lo scopo di approfondire i requisiti molecolari e i partecipanti nell'importazione mitocondriale di TrkAIII e nell'attivazione del clivaggio. Questo agente riepiloga diversi stress cellulari (ER, Ca^{2+}, stress redox e ipossico) sperimentati dalle cellule tumorali all'interno del microambiente tumorale (Farina et al., 2018, 2015, 2017; Haarmann et al. 1999; Ravi et al., 2023). Un requisito per l'importazione mitocondriale del TrkAIII misfolded è la complessazione di TrkAIII con il chaperone ER che lega le proteine mal ripiegate ovvero Grp78 (Ibrahim et al., 2019); la scissione dell'estremità N-terminale di TrkAIII associate alle IMM avviene da parte della serina proteasi OMI/HtrA2, che degrada le proteine mal ripiegate all'interno dell'IMS (Liu et al. 2024), fenomeno coerente con i domini ricchi di cisteina sensibili al redox all'interno dell'N-terminale di TrkAIII (Franco et al., 2020).

Il DTT ha anche causato la perdita di immunoreattività di TrkAIII nei Western blot SDS-PAGE in condizioni non riducenti, fenomeno in linea con il mascheramento dell'epitopo antigenico C-terminale di TrkAIII, sensibile alla riduzione. Ciò può essere spiegato dalla complessazione indotta dal DTT tra TrkAIII e Ca^{2+}-calmodulina, che estende un precedente rapporto secondo cui Ca^{2+}-calmodulina lega il C-terminale di TrkA fully spliced (Llovera et al., 2004), che contiene anch'esso questo dominio (Tacconelli et al., 2004) .

HA-15, W7, GA e BfA hanno tutti prevenuto il clivaggio e l'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT, confermando il ruolo di Grp78, Ca^{2+}-calmodulina, Hsp90 e Arf1, rispettivamente, nell'importazione e nell'attivazione del clivaggio di TrkAIII mitocondriale misfolded indotta da DTT.

Ciò è in linea con i rapporti secondo cui:

- gli agenti che causano l'attivazione del clivaggio di TrkAIII mitocondriale (Farina et al., 2017) promuovono anche la rilocalizzazione di Grp78 dall'ER allo spazio interno della membrana mitocondriale (Sun et al., 2006);
- i canali Ca^{2+} RyR espressi dalle cellule SH-SY5Y (Nguyen et al., 2002), sono attivati dal DTT (Haarmann et al., 1999) ed inibiti dal Dantrolene che blocca l'attivazione di TrkAIII mitocondriale indotta dal DTT, implicando il Ca^{2+} nel movimento di TrkAIII dall'ER ai mitocondri (Farina et al., 2017);
- Hsp90 regola il trasporto ed il rilascio di proteine nel mitocondrio (Young et al. 2003), è necessario per l'attivazione di TrkAIII (Farina et al., 2009b) e si accumula all'interno dei mitocondri durante condizioni di stress (Boucherat et al., 2018);

- TrkAIII si localizza nei MAM (Farina et al., 2017), la formazione e la funzione dei MAM sono regolate da Arf1 (Ackema et al., 2014) e i MAM sono coinvolti nell'importazione mitocondriale indotta dallo stress di proteine mal ripiegate e Ca^{2+} (Barazzuol et al., 2021; Morciano et al., 2018; Panda et al., 2021).

Al contrario, l'inibitore di TRAP1, analogo mitocondriale di Hsp90, Honokiol-DCA (Sanchez-Martin et al., 2021; Kang 2012) non ha impedito il clivaggio mitocondriale di TrkAIII indotta da DTT, escludendo il coinvolgimento di TRAP1, supportato da rapporti secondo cui TrkAIII è un cliente HSP90 (Farina et al., 2009b) e TRAP1 non si lega clienti di Hsp90 (Altieri et al., 2012).

HA-15, W7 e GA hanno anche aumentato significativamente la sensibilità di SH-SY5Y TrkAIII alla morte indotta da DTT, identificando Grp78, Ca^{2+}-calmodulina e Hsp90 come nuovi bersagli in questo adattamento prosopravvivenza. Al contrario, e nonostante prevenga l'attivazione mitocondriale di TrkAIII, BfA ha migliorato la resistenza delle cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII alla morte indotta dal DTT, identificando Arf1 come un partecipante diretto alla morte indotta dal DTT e, quindi, un bersaglio inadatto.

Il coinvolgimento di Ca^{2+}-calmodulina nell'importazione di TrkAIII mitocondriale misfolded ricorda il suo ruolo nell'importazione mitocondriale della Triparedossina perossidasi nell'eucariota unicellulare *Leishmania donovani* e può rappresentare il primo esempio di un simile meccanismo di traslocazione della proteina mitocondriale Ca^{2+}-calmodulina-dipendente negli eucarioti multicellulari (Aich et al., 2013). Inoltre, l'attivazione intramitocondriale di TrkAIII dipende dalla Ca^{2+}-calmodulina, suggerendo che il TrkAIII misfolding può agire come una nuova tirosina chinasi mitocondriale Ca^{2+}-calmodulina-dipendente regolata dallo stress. TrkAIII, tuttavia, non possiede sequenze di targeting mitocondriale classiche e non è internalizzato nei mitocondri in condizioni normali (Farina et al., 2017), identificando i siti di legame di Grp78, Ca^{2+}-calmodulina e/o Hsp90 all'interno di TrkAIII misfolding come efficaci segnali di importazione regolati dallo stress.

W7 è stato anche l'unico a provocare da solo un'efficace ed abbondante morte cellulare delle pcDNA-SH-SY5Y, in linea con i rapporti secondo cui gli antagonisti della calmodulina, incluso W7, alterano l'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale in modo calmodulina-dipendente, innescano l'apertura di mptp e causano la morte mitocondriale (Frankfurt et al., 1995; Yokokura et al. 2014). Le cellule SH-SY5Y TrkAIII, tuttavia, sono risultate significativamente più resistenti alla citotossicità di W7. Ciò non è stato associato all'attivazione mitocondriale di TrkAIII e presumiamo si riferisca all'elevata espressione di Bcl-xL, Mcl1 e SOD2 che caratterizza la linea cellulare SH-SY5Y TrkAIII (Farina et al., 2012, 2017).

All'interno dei mitocondri, il TrkAIII misfolded associato all'IMM viene tagliato dalla serin-proteasi Omi/HtrA2 dell'IMS (Dagda et al., 2009; Deshwal et al., 2020; Liu et al., 2024) in un frammento C-terminale di 48 kDa. Questo frammento contiene domini tirosin chinasi e transmembrana ed è separato dall'N-terminale dall'IMM (Farina et al., 2017). Omi/HtrA2, combinato con altri membri che fungono da controllo qualità mitocondriali e proteostasi nell'IMS, nell'IMM e nella matrice, degradano le proteine misfolding che entrano nei mitocondri in condizioni di stress (Dagda et al., 2009; Deshwal et al., 2020; Liu et al., 2024; Danese et al., 2017; Chakraborty et al., 2022; Zhang et al., 2007). La degradazione da parte di Omi/HtrA2 dell'estremità N-terminale di TrkAIII associata all'IMM, ma non del C-terminale, pertanto, conferma il misfolding del primo ma non del secondo, e suggerisce anche un orientamento, per l'estremità C-terminale associata all'IMM, verso la matrice mitocondriale.

La dipendenza al clivaggio per l'attivazione mitocondriale di TrkAIII, inoltre, supporta il ruolo di prevenzione del frammento N-terminale dell'attivazione spontanea del recettore all'interno dei mitocondri, analoga alla funzione dell'N-terminale di TrkA fully spliced (Arevalo et al., 2000; Watson et al., 1999). Dopo il clivaggio, tuttavia, le estremità C-terminali attivate sembrano inoltre transattivare TrkAIII non clivato all'interno dei mitocondri, aumentando ulteriormente i livelli di attivazione mitocondriale di TrkAIII (questo studio; Farina et al., 2015). Ciò evidenzia il ruolo critico di Omi/HtrA2 in questo processo di attivazione, che potrebbe estendersi all'attivazione di altre tirosin chinasi oncogeniche misfldong che si rilocalizzano negli IMM mitocondriali in condizioni di stress (Cao et al., 2011).

KN-93 (Wong et al., 2019), Capivasertib (Davies et al., 2012) e DS1657051 (Kon et al., 2017) hanno tutti prevenuto la fosforilazione di TrkAIII mitocondriale indotta da DTT, ma non il clivaggio, confermando il ruolo di CaMK, Akt e MCU, rispettivamente, nell'attivazione delle estremità C-terminali TrkAIII. Il Resveratrolo, scavenger dei ROS, ha anche prevenuto la fosforilazione di TrkAIII mitocondriale indotta dal DTT e ha parzialmente inibito il clivaggio di TrkAIII, implicando i ROS sia nell'attivazione che nel clivaggio di TrkAIII. L'inaspettato ruolo di Akt nell'attivazione di TrkAIII è stato supportato anche dall'inibizione della fosforilazione di Akt-Ser473 da parte di KN-93 nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII, collegando le CAMK all'attivazione di Akt mitocondriale e successivamente all'attivazione di TrkAIII.

Akt, tuttavia, è una serina/treonina chinasi, il che indica un ruolo indiretto nell'attivazione della tirosin-chinasi TrkAIII. Considerando il coinvolgimento di MCU e ROS nell'attivazione di TrkAIII mitocondriale, questo ruolo indiretto può dipendere dalla fosforilazione della subunità regolatrice di MCU (MICU1) da parte di Akt (Marchi et al., 2019), che causa una deregolazione della funzione MCU e

determinando quindi un aumento dell'afflusso di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale e della produzione di ROS (Marchi et al., 2019; Carreras-Sureda et al., 2017; Wang et al., 2021).

Il coinvolgimento delle PTPasi mitocondriali nella promozione dell'attivazione del TrkAIII (Farina et al., 2015) è rafforzato da evidenze che dimostrano come l'utilizzo di inibitori delle PTPasi e l'H_2O_2 determinino un aumento dell'attivazione di TrkAIII associato alle OMMs in cellule SH-SY5Y non ulteriormente esposte ad altri trattamenti (Farina et al., 2017). Inoltre nel presente studio sottolineiamo ulteriormente come il trattamento con il DTT determini un'inibizone ossidativa delle PTPasi mitocondriali, che è correlata ad un aumento della produzione di ROS (Meng et al., 2002), confermando il coinvolgimento delle PTPasi nell'attivazione del TrkAIII mitocondriale .

Il DTT ha indotto livelli significativamente più elevati di Akt-Ser473 fosforilato in cellule SH-SY5Y TrkAIII rispetto alle pcDNA-SH-SY5Y. Inoltre, KN-93, un inibitore di CaMKI, II e IV (Wong et al., 2019; Means 2008) ha prevenuto la fosforilazione di Akt nelle cellule pcDNA-SH-SY5Y e SH-SY5Y TrkAIII, mentre gli inibitori di Trk (Entrectinib) (Rolfo et al., 2015) e PI3K (LY29004) (Vlahos et al., 1994) hanno impedito la fosforilazione di Akt indotta da DTT solo nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII.

A differenza di KN-93, STO-609, un inibitore di CaMKKαβ che previene l'attivazione di CaMKI e IV ma non di CaMKII (Tokumitsu et al., 2002; Means 2008), non ha impedito la fosforilazione di Akt indotta da DTT in cellule pcDNA-SH-SY5Y né in SH-SY5Y TrkAIII, implicando CaMKII, piuttosto che la cascata CaMKK, nell'attivazione di Akt indotta da DTT. Questo è in linea con report secondo cui CAMKII attiva Akt (Yano et al., 1998; Fujii et al., 2020) e suggerisce che la fosforilazione iniziale di Akt-Ser473 CaMKII-dipendente causata dal DTT, è seguita dall'attivazione di TrkAIII mitocondriale in maniera Akt-dipendente. TrkAIII clivato e attivo a sua volta aumenta ulteriormente la fosforilazione di Akt-Ser473 attraverso l'attivazione di PIP3K mitocondriale (Tacconelli et al., 2004; Hemmings et al., 2012; Tsuchiya et al., 2014).

Gli inibitori di Trk (Entrectinib e Lestaurtinib), PI3K (LY29004) e Akt (Capivasertib) hanno tutti aumentato significativamente la sensibilità delle cellule SH-SY5Y TrkAIII alla morte indotta da DTT, confermando una funzione prosopravvivenza per l'asse mitocondriale TrkAIII/PI3K/Akt indotto dallo stress, identificando PI3K mitocondriale e Akt come nuovi bersagli.

Ciò è in linea con i rapporti secondo cui TrkAIII induce la segnalazione PI3K/Akt e aumenta l'espressione mitocondriale di Bcl2, Bcl-xL e Mcl1 nelle cellule SH-SY5Y (Tacconelli et al., 2004; Farina et al., 2015), Mcl-1 previene l'apertura di mptp e Akt migliora l'attività anti-apoptotica di Bcl2, Bcl-xL e Mcl1 (Bonora et al., 2014; Asnaghi et al., 2004; Plas et al., 2001).

La dimostrazione che i farmaci approvati Entrectinib e Capivasertib prevengono l'attivazione mitocondriale di TrkAIII indotta dal DTT e migliorano la sensibilità delle cellule SH-SY5Y che esprimono TrkAIII alla morte cellulare indotta dal DTT, è di rilevanza clinica. Ciò è accertato per Entrectinib, che è stato segnalato per mostrare un'efficacia profonda e duratura in un bambino con NB metastatico refrattario in stadio avanzato, che mostrava espressione ed attivazione di TrkAIII (Treis et al., 2022). L'uso di Entrectinib è attualmente limitato ai tumori guidati dagli oncogeni di fusione Trk, per i quali mostra una profonda efficacia duratura (Drilon et al., 2019), supportando la richiesta di estendere l'approvazione clinica di Entrectinib ai NB metastatici refrattari e in stadio avanzato che mostrano espressione e attivazione di TrkAIII, rafforzate anche da prove che TrkAIII si comporta come un equivalente oncogenico dell'oncogene di fusione TrkT3 nei modelli NB (Tacconellli et al., 2004) e che lo splicing alternativo è un meccanismo di attivazione frequente delle vie oncogeniche nei tumori, come gli NB, che presentano bassi tassi di mutazione genetica (Farina et al., 2020; Siddaway et al., 2022; Bonomi et al., 2013; Hwang et al., 2019).

Vale la pena notare che HA-15, GA, W7, LY29004, Capivasertib, Lestaurtinib ed Entrectinib hanno tutti potenziato l'uccisione indotta dal DTT delle cellule SH-SY5Y TrkAIII, inibite nella proliferazione dal DTT, svelando il loro potenziale nell'eliminazione di cellule di NB " dormienti", simili a cellule staminali, che esprimono TrkAIII (Ruggeri et al., 2014), rimuovendo una potenziale fonte di progressione della malattia e di recidiva post-terapeutica (Tacconelli et al., 2004; Farina et al., 2018; Schramm et al., 2012).

Ciò può aiutare a spiegare la notevole risposta terapeutica duratura a Entrectinib riportata in un bambino con TrkAIII metastatico refrattario che esprime NB (Treis et al., 2022), e anche le risposte durature ad altri inibitori di Trk riportate nei tumori guidati dagli oncogeni di fusione TrkA (Drilon et al., 2019). È inoltre degno di nota che il DTT combinato con W7 ha indotto i livelli più alti di morte cellulare SH-SY5Y TrkAIII (≈90% a 48 ore), suggerendo che lo stress, quando combinato con l'inibizione di TrkAIII e l'interruzione dell'omeostasi mitocondriale del Ca^{2+} dipendente dalla calmodulina, può avere il maggiore potenziale per eliminare le cellule NB che esprimono TrkAIII.

Fig. 18

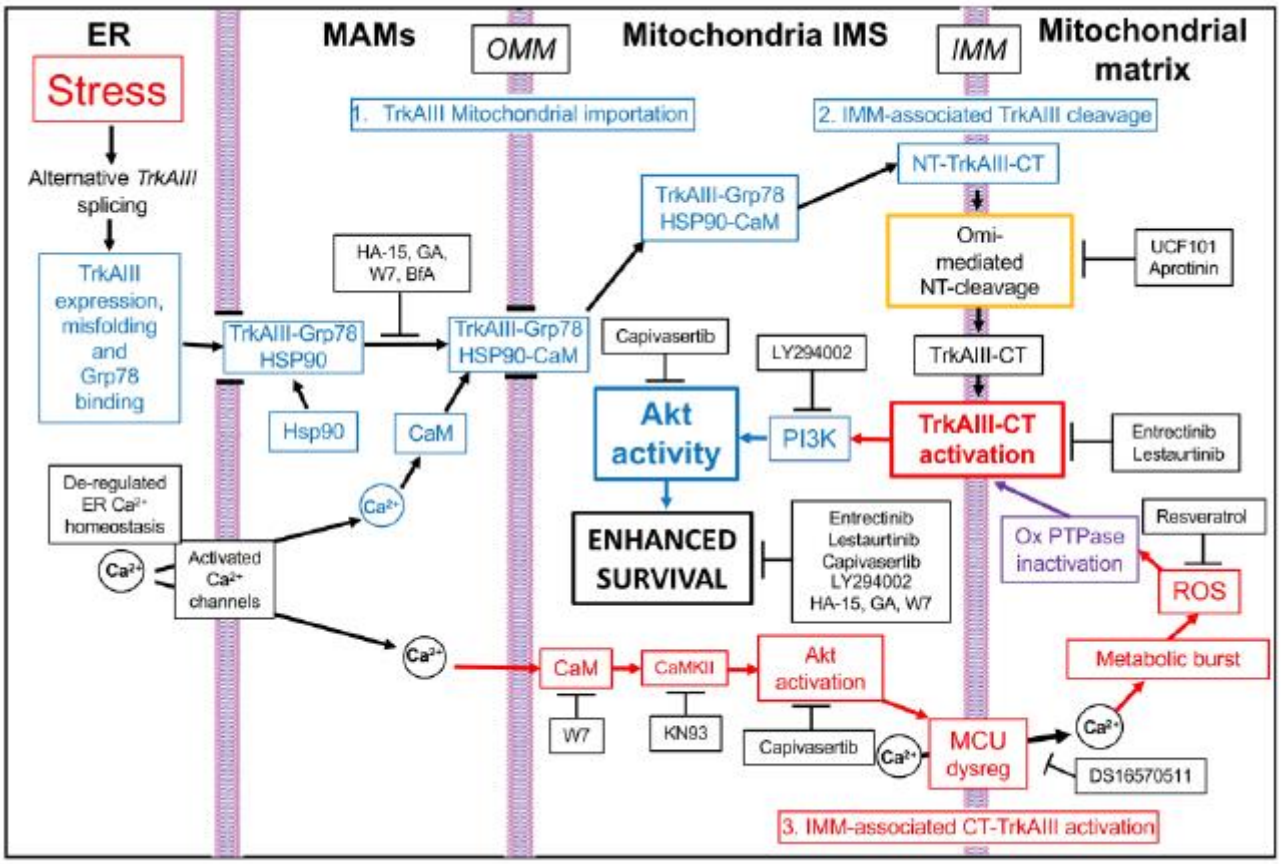


Figura 18: rappresentazione schematica del meccanismo pro-sopravvivenza indagato in questo studio. Grp78, Hsp90, Ca^{2+}-calmodulina e ARF1 regolano l'importazione di TrkAIII misfolding dal reticolo endoplasmatico (ER) alla membrana mitocondriale interna (IMM) tramite MAM. Clivaggio da parte di Omi dell'N-terminale di TrkAIII misfolding associato all'IMM, richiesto per la successiva attivazione del terminale C TrkAIII associato all'IMM. Attivazione dipendente da Ca^{2+}-calmodulina (CaM), CaMK II, Akt, MCU e ROS dell'estremità C-terminale di TrkAIII associato a IMM, associato all'ossidazione inibitoria delle PTPasi mitocondriali. Gli inibitori utilizzati in questo studio sono localizzati nei loro punti di azione.

6. CONCLUSIONI

Questo adattamento di prosopravvivenza, che mitiga la citotossicità indotta dallo stress dell'omeostasi di Ca^{2+} mitocondriale in cellule di NB SH-SY5Y TrkAIII, è rilevante per la selezione di cellule all'interno del microambiente tumorale stressante e aiuta a spiegare la correlazione riportata tra lo splicing TrkAIII alternativo, la malattia metastatica in stadio avanzato e la ricaduta post-terapeutica riportata nei NB umani. Ciò che sostiene questo meccanismo è il comportamento alterato di TrkAIII, che a causa del suo misfolding e dalla complessazione con Grp78 e Ca^{2+}-calmodulina, unito con Hsp90 e Arf-1, regolano l'importazione di TrkAIII nel mitocondrio. Le estremità N-terminali di TrkAIII sono poi degradate dalla proteasi IMS Omi/HtrA2, con conseguente accumulo di estremità C-terminali funzionali e correttamente ripiegate, con orientamento nella matrice mitocondriale. Queste vengono poi attivate da un meccanismo CaMKII/Akt-dipendente, che coinvolge il MCU e ROS, in associazione con l'ossidazione delle PTPasi mitocondriali. TrkAIII potenzia l'attivazione mitocondriale di Akt tramite PI3K, confermando un asse mitocondriale TrkAIII/PI3K/Akt indotto da stress.

Proponiamo inoltre che TrkAIII misfolded rappresenti una nuova chinasi mitocondriale stress-indotta regolata da Ca^{2+}-calmodulina e CaMK, e una nuova componente pro-sopravvivenza nella risposta integrata allo stress ER-mitocondriale coinvolta nella mitigazione della citotossicità causata dall'interruzione dell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale, indotta dallo stress. Identifichiamo anche Grp78, Ca^{2+}-calmodulina, Hsp90, PI3K e Akt come nuovi partecipanti target in questo meccanismo, la cui inibizione migliora l'uccisione di cellule di NB che esprimono TrkAIII e caratterizziamo Arf1, MCU e ROS come partecipanti non target, a causa del loro coinvolgimento diretto nella morte indotta dalla DTT. Proponiamo che questi nuovi bersagli abbiano una potenziale rilevanza terapeutica per migliorare l'eliminazione delle cellule NB che esprimono TrkAIII coinvolte nella progressione della malattia e nella recidiva post-terapeutica.

BIBLIOGRAFIA

Ackema, K. B., Hench, J., Böckler, S., Wang, S. C., Sauder, U., Mergentaler, H., Westermann, B., Bard, F., Frank, S., & Spang, A. (2014). The small GTPase Arf1 modulates mitochondrial morphology and function. The EMBO Journal, 33(22), 2659–2675. https://doi.org/10.15252/embj.201489039.

Aich, A., & Shaha, C. (2013). Novel Role of Calmodulin in Regulating Protein Transport to Mitochondria in a Unicellular Eukaryote. Molecular and Cellular Biology, 33(22), 4579–4593. https://doi.org/10.1128/MCB.00829-13.

Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., & Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase in Vitro and in Vivo. Journal of Biological Chemistry, 270(46), 27489–27494. https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27489.

Altieri, D. C., Stein, G. S., Lian, J. B., & Languino, L. R. (2012). TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1823(3), 767–773. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.08.007.

Anderson, N. S., & Haynes, C. M. (2020). Folding the Mitochondrial UPR into the Integrated Stress Response. Trends in Cell Biology, 30(6), 428–439. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.001.

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature, 290(5806), 457–465. https://doi.org/10.1038/290457a0.

Angeli, S., Foulger, A., Chamoli, M., Peiris, T. H., Gerencser, A., Shahmirzadi, A. A., Andersen, J., & Lithgow, G. (2021). The mitochondrial permeability transition pore activates the mitochondrial unfolded protein response and promotes aging. ELife, 10. https://doi.org/10.7554/eLife.63453.

Arevalo, J. C., Conde, B., Hempstead, B. I., Chao, M. v, Martín-Zanca, D., & Pérez, P. (2001). A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. Oncogene, 20(10), 1229–1234. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204215.

Arevalo, J. C., Conde, B., Hempstead, B. L., Chao, M. v., Martin-Zanca, D., & Perez, P. (2000). TrkA Immunoglobulin-Like Ligand Binding Domains Inhibit Spontaneous Activation of the Receptor. Molecular and Cellular Biology, 20(16), 5908–5916. https://doi.org/10.1128/MCB.20.

Asnaghi, L., Calastretti, A., Bevilacqua, A., D'Agnano, I., Gatti, G., Canti, G., Delia, D., Capaccioli, S., & Nicolin, A. (2004). Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. Oncogene, 23(34), 5781–5791. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207698.

Barazzuol, L., Giamogante, F., & Calì, T. (2021). Mitochondria Associated Membranes (MAMs): Architecture and physiopathological role. Cell Calcium, 94, 102343. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102343.

Barker, P. A. et al. (1993) 'Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor', Journal of Biological Chemistry, 268(20), pp. 15150–15157.

Boerner, J. L., Demory, M. L., Silva, C., & Parsons, S. J. (2004). Phosphorylation of Y845 on the Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Binding to the Mitochondrial Protein Cytochrome c Oxidase Subunit II. Molecular and Cellular Biology, 24(16), 7059–7071. https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7059-7071.2004.

Bonomi, S., Gallo, S., Catillo, M., Pignataro, D., Biamonti, G., & Ghigna, C. (2013). Oncogenic Alternative Splicing Switches: Role in Cancer Progression and Prospects for Therapy. International Journal of Cell Biology, 2013, 1–17. https://doi.org/10.1155/2013/962038.

Bonora, M., & Pinton, P. (2014). The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Cancer: Molecular Mechanisms Involved in Cell Death. Frontiers in Oncology, 4. https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00302.

Borrello, M. G., Pelicci, G., Arighi, E., de Filippis, L., Greco, A., Bongarzone, I., Rizzetti, M., Pelicci, P. G., & Pierotti, M. A. (1994). The oncogenic versions of the Ret and Trk tyrosine kinases bind Shc and Grb2 adaptor proteins. Oncogene, 9(6), 1661–1668.

Boucherat, O., Peterlini, T., Bourgeois, A., Nadeau, V., Breuils-Bonnet, S., Boilet-Molez, S., Potus, F., Meloche, J., Chabot, S., Lambert, C., Tremblay, E., Chae, Y. C., Altieri, D. C., Sutendra, G., Michelakis, E. D., Paulin, R., Provencher, S., & Bonnet, S. (2018). Mitochondrial HSP90 Accumulation Promotes Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 198(1), 90–103. https://doi.org/10.1164/rccm.201708-1751OC.

Bravo, R., Gutierrez, T., Paredes, F., Gatica, D., Rodriguez, A. E., Pedrozo, Z., Chiong, M., Parra, V., Quest, A. F. G., Rothermel, B. A., & Lavandero, S. (2012). Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 44(1), 16–20. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.012.

Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castelberry, R. P., de Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M., & Hedborg, F. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. Journal of Clinical Oncology, 11(8), 1466–1477. https://doi.org/10.1200/JCO.1993.11.8.1466.

Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Barrett, A., Berthold, F., Castleberry, R. P., D'Angio, G., de Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M., & Freeman, A. I. (1988). International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. Journal of Clinical Oncology, 6(12), 1874–1881. https://doi.org/10.1200/JCO.1988.6.12.1874.

Brown, M. T., & Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1287(2–3), 121–149. https://doi.org/10.1016/0304-419X(96)00003-0.

Brugge, J., Hung, M.-C., & Mills, G. B. (2007). A New Mutational aktivation in the PI3K Pathway. Cancer Cell, 12(2), 104–107. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.014.

Butti, M. G., Bongarzone, I., Ferraresi, G., Mondellini, P., Borrello, M. G., & Pierotti, M. A. (1995). A Sequence Analysis of the Genomic Regions Involved in the Rearrangements between TPM3 and NTRK1

Genes Producing TRK Oncogenes in Papillary Thyroid Carcinomas. Genomics, 28(1), 15–24. https://doi.org/10.1006/geno.1995.1100.

Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F., & Lo, H.-W. (2011). EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocalization: A potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis. Molecular Cancer, 10(1), 26. https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-26.

Cappabianca, L., Guadagni, S., Maccarone, R., Sebastiano, M., Chiominto, A., Farina, A. R., & Mackay, A. R. (2019). A pilot study of alternative TrkAIII splicing in Merkel cell carcinoma: a potential oncogenic mechanism and novel therapeutic target. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 38(1), 424. https://doi.org/10.1186/s13046-019-1425-3.

Cappabianca, L., Sebastiano, M., Ruggieri, M., Sbaffone, M., Zelli, V., Farina, A. R., & Mackay, A. R. (2022). Doxorubicin-Induced TrkAIII Activation: A Selection Mechanism for Resistant Dormant Neuroblastoma Cells. International Journal of Molecular Sciences, 23(18), 10895. https://doi.org/10.3390/ijms231810895.

Cappabianca, L., Zelli, V., Pellegrini, C., Sebastiano, M., Maccarone, R., Clementi, M., Chiominto, A., Ruggeri, P., Cardelli, L., Ruggieri, M., Sbaffone, M., Fargnoli, M.-C., Guadagni, S., Farina, A. R., & Mackay, A. R. (2023). The Alternative TrkAIII Splice Variant, a Targetable Oncogenic Participant in Human Cutaneous Malignant Melanoma. Cells, 12(2), 237. https://doi.org/10.3390/cells12020237.

Carne, N. A., Bell, S., Brown, A. P., Määttä, A., Flagler, M. J., & Benham, A. M. (2019). Reductive Stress Selectively Disrupts Collagen Homeostasis and Modifies Growth Factor-independent Signaling Through the MAPK/Akt Pathway in Human Dermal Fibroblasts. Molecular & Cellular Proteomics, 18(6), 1123–1137. https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001140.

Carreras-Sureda, A., Pihán, P., & Hetz, C. (2017). The Unfolded Protein Response: At the Intersection between Endoplasmic Reticulum Function and Mitochondrial Bioenergetics. Frontiers in Oncology, 7. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00055.

Castleberry, R. P. (1997). Neuroblastoma. European Journal of Cancer, 33(9), 1430–1437. https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00308-0.

Cerezo, M., Lehraiki, A., Millet, A., Rouaud, F., Plaisant, M., Jaune, E., Botton, T., Ronco, C., Abbe, P., Amdouni, H., Passeron, T., Hofman, V., Mograbi, B., Dabert-Gay, A.-S., Debayle, D., Alcor, D., Rabhi, N., Annicotte, J.-S., Héliot, L., Rocchi, S. (2016). Compounds Triggering ER Stress Exert Anti-Melanoma Effects and Overcome BRAF Inhibitor Resistance. Cancer Cell, 30(1), 183. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.007.

Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., & Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. Cell, 138(4), 628–644. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005.

Chakraborty, A., Bose, R., & Bose, K. (2022). Unraveling the Dichotomy of Enigmatic Serine Protease HtrA2. Frontiers in Molecular Biosciences, 9. https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.824846.

Chen, J., & Zhe, X. (2003). Cotransfection of TrkA and p75(NTR) in neuroblastoma cell line (IMR-32) promotes differentiation and apoptosis of tumor cells. Chinese Medical Journal, 116(6), 906–912.

Choudhary, C., Olsen, J. v., Brandts, C., Cox, J., Reddy, P. N. G., Böhmer, F. D., Gerke, V., Schmidt-Arras, D.-E., Berdel, W. E., Müller-Tidow, C., Mann, M., & Serve, H. (2009). Mislocalized Activation of Oncogenic RTKs Switches Downstream Signaling Outcomes. Molecular Cell, 36(2), 326–339. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.019.

Cohn, S. L., Pearson, A. D. J., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., Faldum, A., Hero, B., Iehara, T., Machin, D., Mosseri, V., Simon, T., Garaventa, A., Castel, V., & Matthay, K. K. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. Journal of Clinical Oncology, 27(2), 289–297. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.6785.

Coulier, F., Kumar, R., Ernst, M., Klein, R., Martin-Zanca, D., & Barbacid, M. (1990). Human Trk Oncogenes Activated by Point Mutation, In-Frame Deletion, and Duplication of the Tyrosine Kinase Domain. Molecular and Cellular Biology, 10(8), 4202–4210. https://doi.org/10.1128/mcb.10.8.4202-4210.1990.

Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla, T., Mannella, C. A., & Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. The Journal of Cell Biology, 174(7), 915–921. https://doi.org/10.1083/jcb.200604016.

Dagda, R. K., & Chu, C. T. (2009). Mitochondrial quality control: insights on how Parkinson's disease related genes PINK1, parkin, and Omi/HtrA2 interact to maintain mitochondrial homeostasis. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 41(6), 473–479. https://doi.org/10.1007/s10863-009-9255-1.

Danese, A., Patergnani, S., Bonora, M., Wieckowski, M. R., Previati, M., Giorgi, C., & Pinton, P. (2017). Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs). Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1858(8), 615–627. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2017.01.003.

Davies, B. R., Greenwood, H., Dudley, P., Crafter, C., Yu, D.-H., Zhang, J., Li, J., Gao, B., Ji, Q., Maynard, J., Ricketts, S.-A., Cross, D., Cosulich, S., Chresta, C. C., Page, K., Yates, J., Lane, C., Watson, R., Luke, R., … Pass, M. (2012). Preclinical Pharmacology of AZD5363, an Inhibitor of AKT: Pharmacodynamics, Antitumor Activity, and Correlation of Monotherapy Activity with Genetic Background. Molecular Cancer Therapeutics, 11(4), 873–887. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0824-T.

de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. Nature, 456(7222), 605–610. https://doi.org/10.1038/nature07534.

de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2010). An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum–mitochondria relationship. The EMBO Journal, 29(16), 2715–2723. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.177.

Decuypere, J.-P., Monaco, G., Bultynck, G., Missiaen, L., de Smedt, H., & Parys, J. B. (2011). The IP3 receptor–mitochondria connection in apoptosis and autophagy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1813(5), 1003–1013. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.023.

Demory, M. L., Boerner, J. L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Hüttemann, M., Douglas, R., Haddad, G., & Parsons, S. J. (2009). Epidermal Growth Factor Receptor Translocation to the Mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 284(52), 36592–36604. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000760.

Descamps, S., Toillon, R.-A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S. M., Nurcombe, V., le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J.-P., & Hondermarck, H. (2001). Nerve Growth Factor Stimulates Proliferation and Survival of Human Breast Cancer Cells through Two Distinct Signaling Pathways. Journal of Biological Chemistry, 276(21), 17864–17870. https://doi.org/10.1074/jbc.M010499200.

Deshwal, S., Fiedler, K. U., & Langer, T. (2020). Mitochondrial Proteases: Multifaceted Regulators of Mitochondrial Plasticity. Annual Review of Biochemistry, 89(1), 501–528. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012739.

Ding, Y., Liu, Z., Desai, S., Zhao, Y., Liu, H., Pannell, L. K., Yi, H., Wright, E. R., Owen, L. B., Dean-Colomb, W., Fodstad, O., Lu, J., LeDoux, S. P., Wilson, G. L., & Tan, M. (2012). Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into mitochondria and regulates cellular metabolism. Nature Communications, 3(1), 1271. https://doi.org/10.1038/ncomms2236.

Drilon, A. (2019). TRK inhibitors in TRK fusion-positive cancers. Annals of Oncology, 30, viii23–viii30. https://doi.org/10.1093/annonc/mdz282.

Drilon, A., Laetsch, T. W., Kummar, S., DuBois, S. G., Lassen, U. N., Demetri, G. D., Nathenson, M., Doebele, R. C., Farago, A. F., Pappo, A. S., Turpin, B., Dowlati, A., Brose, M. S., Mascarenhas, L., Federman, N., Berlin, J., El-Deiry, W. S., Baik, C., Deeken, J., … Hyman, D. M. (2018). Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion–Positive Cancers in Adults and Children. New England Journal of Medicine, 378(8), 731–739. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714448.

Dubus, P. et al. (2000) 'Identification of novel trkA variants with deletions in leucine-rich motifs of the extracellular domain', Journal of Neuroimmunology, 107(1), pp. 42–49. doi: 10.1016/S0165-5728(00)00257-5.

Eggert, A., Grotzer, M. A., Ikegaki, N., Liu, X., Evans, A. E., & Brodeur, G. M. (2000). Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in neuroblastoma. Medical and Pediatric Oncology, 35(6), 569–572. https://doi.org/10.1002/1096-911X(20001201)35:6<569::AID-MPO16>3.0.CO;2-A.

Epple, L. M., Dodd, R. D., Merz, A. L., Dechkovskaia, A. M., Herring, M., Winston, B. A., Lencioni, A. M., Russell, R. L., Madsen, H., Nega, M., Dusto, N. L., White, J., Bigner, D. D., Nicchitta, C. v., Serkova, N. J., & Graner, M. W. (2013). Induction of the Unfolded Protein Response Drives Enhanced Metabolism and Chemoresistance in Glioma Cells. PLoS ONE, 8(8), e73267. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073267.

Ernsberger, U. (2009). Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. Cell and Tissue Research, 336(3), 349–384. https://doi.org/10.1007/s00441-009-0784-z.

Farina, A. R., Cappabianca, L. A., Zelli, V., Sebastiano, M., & Mackay, A. R. (2021). Mechanisms involved in selecting and maintaining neuroblastoma cancer stem cell populations, and perspectives for therapeutic targeting. World Journal of Stem Cells, 13(7), 685–736. https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i7.685.

Farina, A. R., Cappabianca, L., Gneo, L., Ruggeri, P., & Mackay, A. R. (2017). TrkAIII signals endoplasmic reticulum stress to the mitochondria in neuroblastoma cells, resulting in glycolytic metabolic adaptation. Oncotarget, 9(9), 8368–8390. https://doi.org/10.18632/oncotarget.23618.

Farina, A. R., Cappabianca, L., Ruggeri, P., Gneo, L., Maccarone, R., & Mackay, A. R. (2015). Retrograde TrkAIII transport from ERGIC to ER: a re-localisation mechanism for oncogenic activity. Oncotarget, 6(34), 35636–35651. https://doi.org/10.18632/oncotarget.5802.

Farina, A. R., Cappabianca, L., Ruggeri, P., Gneo, L., Pellegrini, C., Fargnoli, M.-C., & Mackay, A. R. (2018). The oncogenic neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase variant, TrkAIII. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 37(1), 119. https://doi.org/10.1186/s13046-018-0786-3.

Farina, A. R., di Ianni, N., Cappabianca, L., Ruggeri, P., Ragone, M., Ianni, G., Gulino, A., & Mackay, A. R. (2013). TrkAIII Promotes Microtubule Nucleation and Assembly at the Centrosome in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells, Contributing to an Undifferentiated Anaplastic Phenotype. BioMed Research International, 2013, 1–10. https://doi.org/10.1155/2013/740187.

Farina, A. R., Tacconelli, A., Cappabianca, L., Cea, G., Chioda, A., Romanelli, A., Pensato, S., Pedone, C., Gulino, A., & Mackay, A. R. (2009b). The neuroblastoma tumour-suppressor TrkAI and its oncogenic alternative TrkAIII splice variant exhibit geldanamycin-sensitive interactions with Hsp90 in human neuroblastoma cells. Oncogene, 28(46), 4075–4094. https://doi.org/10.1038/onc.2009.256.

Farina, A. R., Tacconelli, A., Cappabianca, L., Cea, G., Panella, S., Chioda, A., Romanelli, A., Pedone, C., Gulino, A., & Mackay, A. R. (2009a). The Alternative TrkAIII Splice Variant Targets the Centrosome and Promotes Genetic Instability. Molecular and Cellular Biology, 29(17), 4812–4830. https://doi.org/10.1128/MCB.00352-09.

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. Annual Review of Medicine, 57(1), 1–18. https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131306.

Franco, M. L., Nadezhdin, K. D., Goncharuk, S. A., Mineev, K. S., Arseniev, A. S., & Vilar, M. (2020). Structural basis of the transmembrane domain dimerization and rotation in the activation mechanism of the TRKA receptor by nerve growth factor. Journal of Biological Chemistry, 295(1), 275–286. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011312.

Frankfurt, O. S., Sugarbaker, E. v., Robb, J. A., & Villa, L. (1995). Synergistic induction of apoptosis in breast cancer cells by tamoxifen and calmodulin inhibitors. Cancer Letters, 97(2), 149–154. https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)03970-8.

Fujii, S., Tajiri, Y., Hasegawa, K., Matsumoto, S., Yoshimoto, R. U., Wada, H., Kishida, S., Kido, M. A., Yoshikawa, H., Ozeki, S., & Kiyoshima, T. (2020). The TRPV4-AKT axis promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation via CaMKII activation. Laboratory Investigation, 100(2), 311–323. https://doi.org/10.1038/s41374-019-0357-z.

George, D. J., Suzuki, H., Bova, G. S., & Isaacs, J. T. (1998). Mutational analysis of the TrkA gene in prostate cancer. The Prostate, 36(3), 172–180. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19980801)36:3<172::AID-PROS5>3.0.CO;2-J.

Giorgi, C., de Stefani, D., Bononi, A., Rizzuto, R., & Pinton, P. (2009). Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 41(10), 1817–1827. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.04.010.

Gray, C. W., Ward, R. v., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K. G., West, A., Savopoulos, J., Hassan, N. J., Clinkenbeard, H., Hanning, C., Amegadzie, B., Davis, J. B., Dingwall, C., Livi, G. P., & Creasy, C. L. (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. European Journal of Biochemistry, 267(18), 5699–5710. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01589.x.

Greco, A., Mariani, C., Miranda, C., Lupas, A., Pagliardini, S., Pomati, M., & Pierotti, M. A. (1995). The DNA Rearrangement That Generates the TRK-T3 Oncogene Involves a Novel Gene on Chromosome 3 Whose Product Has a Potential Coiled-Coil Domain. Molecular and Cellular Biology, 15(11), 6118–6127. https://doi.org/10.1128/MCB.15.11.6118.

Greco, A., Villa, R., & Pierotti, M. A. (1996). Genomic organization of the human NTRK1 gene. Oncogene, 13(11), 2463–2466.

Groten, C. J., & MacVicar, B. A. (2022). Mitochondrial Ca2+ uptake by the MCU facilitates pyramidal neuron excitability and metabolism during action potential firing. Communications Biology, 5(1), 900. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03848-1.

Haarmann, C. S., Fink, R. H. A., & Dulhunty, A. F. (1999). Oxidation and Reduction of Pig Skeletal Muscle Ryanodine Receptors. Biophysical Journal, 77(6), 3010–3022. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77132-8.

Hajnóczky, G., Csordás, G., & Yi, M. (2002). Old players in a new role: mitochondria-associated membranes, VDAC, and ryanodine receptors as contributors to calcium signal propagation from endoplasmic reticulum to the mitochondria. Cell Calcium, 32(5–6), 363–377. https://doi.org/10.1016/S0143416002001872.

Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000b). Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. Molecular Cell, 6(5), 1099–1108. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00108-8.

Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., & Ron, D. (2000a). Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. Molecular Cell, 5(5), 897–904. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80330-5.

Harris, A. L. (2002). Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. Nature Reviews Cancer, 2(1), 38–47. https://doi.org/10.1038/nrc704.

Haynes, C. M., & Ron, D. (2010). The mitochondrial UPR – protecting organelle protein homeostasis. Journal of Cell Science, 123(22), 3849–3855. https://doi.org/10.1242/jcs.075119.

Helms, J. B., & Rothman, J. E. (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. Nature, 360(6402), 352–354. https://doi.org/10.1038/360352a0.

Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt Pathway. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(9), a011189–a011189. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189.

Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 13(2), 89–102. https://doi.org/10.1038/nrm3270.

Hill, K., Model, K., Ryan, M. T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., & Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. Nature, 395(6701), 516–521. https://doi.org/10.1038/26780.

Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G. A., & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate: A Metabolic Key Player in Cancer. Cancer Research, 71(22), 6921–6925. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1457.

Hitosugi, T., Fan, J., Chung, T.-W., Lythgoe, K., Wang, X., Xie, J., Ge, Q., Gu, T.-L., Polakiewicz, R. D., Roesel, J. L., Chen, G. Z., Boggon, T. J., Lonial, S., Fu, H., Khuri, F. R., Kang, S., & Chen, J. (2011). Tyrosine Phosphorylation of Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Is Important for Cancer Metabolism. Molecular Cell, 44(6), 864–877. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.015.

Hwang, W. L., Wolfson, R. L., Niemierko, A., Marcus, K. J., DuBois, S. G., & Haas-Kogan, D. (2019). Clinical Impact of Tumor Mutational Burden in Neuroblastoma. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 111(7), 695–699. https://doi.org/10.1093/jnci/djy157.

Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., & Elfiky, A. A. (2019). GRP78: A cell's response to stress. Life Sciences, 226, 156–163. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.022.

Ishola, T. A., & Chung, D. H. (2007). Neuroblastoma. Surgical Oncology, 16(3), 149–156. https://doi.org/10.1016/j.suronc.2007.09.005.

Ito, Y., Pandey, P., Mishra, N., Kumar, S., Narula, N., Kharbanda, S., Saxena, S., & Kufe, D. (2001). Targeting of the c-Abl Tyrosine Kinase to Mitochondria in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis. Molecular and Cellular Biology, 21(18), 6233–6242. https://doi.org/10.1128/MCB.21.18.6233-6242.2001.

James, D. I., Parone, P. A., Mattenberger, Y., & Martinou, J.-C. (2003). hFis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery. Journal of Biological Chemistry, 278(38), 36373–36379. https://doi.org/10.1074/jbc.M303758200.

Jiang, T., Wang, G., Liu, Y., Feng, L., Wang, M., Liu, J., Chen, Y., & Ouyang, L. (2021). Development of small-molecule tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitors for NTRK fusion cancers. Acta Pharmaceutica Sinica B, 11(2), 355–372. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.05.004.

Jögi, A., Øra, I., Nilsson, H., Lindeheim, Åsa, Makino, Y., Poellinger, L., Axelson, H., & Påhlman, S. (2002). Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(10), 7021–7026. https://doi.org/10.1073/pnas.102660199.

Johnsen, J. I., Dyberg, C., & Wickström, M. (2019). Neuroblastoma—A Neural Crest Derived Embryonal Malignancy. Frontiers in Molecular Neuroscience, 12. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00009.

Johnson, A., Bhattacharya, N., Hanna, M., Pennington, J. G., Schuh, A. L., Wang, L., Otegui, M. S., Stagg, S. M., & Audhya, A. (2015). TFG clusters COPII-coated transport carriers and promotes early secretory pathway organization. The EMBO Journal, 34(6), 811–827. https://doi.org/10.15252/embj.201489032.

Jovaisaite, V., Mouchiroud, L., & Auwerx, J. (2014). The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. Journal of Experimental Biology, 217(1), 137–143. https://doi.org/10.1242/jeb.090738.

Kang, B.-H. (2012). TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mitochondria-targeted TRAP1 inhibitors. BMB Reports, 45(1), 1–6. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.1.1.

Kaplan, D. R., Martin-Zanca, D., & Parada, L. F. (1991). Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. Nature, 350(6314), 158–160. https://doi.org/10.1038/350158a0.

Kholodenko, I. v., Kalinovsky, D. v., Doronin, I. I., Deyev, S. M., & Kholodenko, R. v. (2018). Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. Journal of Immunology Research, 2018, 1–25. https://doi.org/10.1155/2018/7394268.

Kim, D. I., Lee, K. H., Gabr, A. A., Choi, G. E., Kim, J. S., Ko, S. H., & Han, H. J. (2016). Aβ-Induced Drp1 phosphorylation through Akt activation promotes excessive mitochondrial fission leading to neuronal apoptosis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1863(11), 2820–2834. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.003.

Klein, R., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E., & Barbacid, M. (1991). The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. Cell, 65(1), 189–197. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90419-Y.

Kon, N., Murakoshi, M., Isobe, A., Kagechika, K., Miyoshi, N., & Nagayama, T. (2017). DS16570511 is a small-molecule inhibitor of the mitochondrial calcium uniporter. Cell Death Discovery, 3(1), 17045. https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.45.

Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S., & Walter, P. (2009). An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen. Science, 325(5939), 477–481. https://doi.org/10.1126/science.1175088.

Kumar, S., Bharti, A., Mishra, N. C., Raina, D., Kharbanda, S., Saxena, S., & Kufe, D. (2001). Targeting of the c-Abl Tyrosine Kinase to Mitochondria in the Necrotic Cell Death Response to Oxidative Stress. Journal of Biological Chemistry, 276(20), 17281–17285. https://doi.org/10.1074/jbc.M101414200.

Lebeau, P. F., Platko, K., Byun, J. H., & Austin, R. C. (2021). Calcium as a reliable marker for the quantitative assessment of endoplasmic reticulum stress in live cells. Journal of Biological Chemistry, 296, 100779. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100779.

Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., & Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. Molecular and Cellular Biology, 23(21), 7448–7459. https://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003.

Leonard, S. S., Xia, C., Jiang, B.-H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G. K., & Shi, X. (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. Biochemical and Biophysical Research Communications, 309(4), 1017–1026. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.105.

Liu, Q., Fang, L., & Wu, C. (2022). Alternative Splicing and Isoforms: From Mechanisms to Diseases. Genes, 13(3), 401. https://doi.org/10.3390/genes13030401.

Liu, Q., Yan, X., Yuan, Y., Li, R., Zhao, Y., Fu, J., Wang, J., & Su, J. (2024). HTRA2/OMI-Mediated Mitochondrial Quality Control Alters Macrophage Polarization Affecting Systemic Chronic Inflammation. International Journal of Molecular Sciences, 25(3), 1577. https://doi.org/10.3390/ijms25031577.

Llovera, M., de Pablo, Y., Egea, J., Encinas, M., Peiró, S., Martín-Zanca, D., Rocamora, N., & Comella, J. X. (2004). Trk is a calmodulin-binding protein: implications for receptor processing. Journal of Neurochemistry, 88(2), 422–433. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02178.x.

Lundberg, K. I., Treis, D., & Johnsen, J. I. (2022). Neuroblastoma Heterogeneity, Plasticity, and Emerging Therapies. Current Oncology Reports, 24(8), 1053–1062. https://doi.org/10.1007/s11912-022-01270-8.

Mailloux, R. J., Jin, X., & Willmore, W. G. (2014). Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. Redox Biology, 2, 123–139. https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.011.

Marchi, S., Corricelli, M., Branchini, A., Vitto, V. A. M., Missiroli, S., Morciano, G., Perrone, M., Ferrarese, M., Giorgi, C., Pinotti, M., Galluzzi, L., Kroemer, G., & Pinton, P. (2019). Akt-mediated phosphorylation of MICU1 regulates mitochondrial Ca2+ levels and tumor growth. The EMBO Journal, 38(2). https://doi.org/10.15252/embj.201899435.16.5908-5916.2000.

Marsh, H. N., Dubreuil, C. I., Quevedo, C., Lee, A., Majdan, M., Walsh, G. S., Hausdorff, S., Said, F. A., Zoueva, O., Kozlowski, M., Siminovitch, K., Neel, B. G., Miller, F. D., & Kaplan, D. R. (2003). SHP-1 negatively regulates neuronal survival by functioning as a TrkA phosphatase. The Journal of Cell Biology, 163(5), 999–1010. https://doi.org/10.1083/jcb.200309036.

Martin-Zanca, D., Hughes, S. H., & Barbacid, M. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. Nature, 319(6056), 743–748. https://doi.org/10.1038/319743a0.

Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L., & Weiss, W. A. (2016). Neuroblastoma. Nature Reviews Disease Primers, 2(1), 16078. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.78.

Means, A. R. (2008). Commentary: The Year in Basic Science: Calmodulin Kinase Cascades. Molecular Endocrinology, 22(12), 2759–2765. https://doi.org/10.1210/me.2008-0312.

Meng, T.-C., Fukada, T., & Tonks, N. K. (2002). Reversible Oxidation and Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases In Vivo. Molecular Cell, 9(2), 387–399. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00445-8.

Miyazaki, T., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W. C., & Baron, R. (2003). Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. The Journal of Cell Biology, 160(5), 709–718. https://doi.org/10.1083/jcb.200209098.

Modrek, B., & Lee, C. (2002). A genomic view of alternative splicing. Nature Genetics, 30(1), 13–19. https://doi.org/10.1038/ng0102-13.

Monclair, T., Brodeur, G. M., Ambros, P. F., Brisse, H. J., Cecchetto, G., Holmes, K., Kaneko, M., London, W. B., Matthay, K. K., Nuchtern, J. G., von Schweinitz, D., Simon, T., Cohn, S. L., & Pearson, A. D. J. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. Journal of Clinical Oncology, 27(2), 298–303. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.6876.

Morciano, G., Marchi, S., Morganti, C., Sbano, L., Bittremieux, M., Kerkhofs, M., Corricelli, M., Danese, A., Karkucinska-Wieckowska, A., Wieckowski, M. R., Bultynck, G., Giorgi, C., & Pinton, P. (2018). Role of Mitochondria-Associated ER Membranes in Calcium Regulation in Cancer-Specific Settings. Neoplasia, 20(5), 510–523. https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.03.005.

Nakagawara, A. (2001). Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development. Cancer Letters, 169(2), 107–114. https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00530-4.

Nakagawara, A. (2004). Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model. Cancer Letters, 204(2), 213–224. https://doi.org/10.1016/S0304-3835(03)00457-9.

Nakagawara, A., Li, Y., Izumi, H., Muramori, K., Inada, H., & Nishi, M. (2018). Neuroblastoma. Japanese Journal of Clinical Oncology, 48(3), 214–241. https://doi.org/10.1093/jjco/hyx176.

Neagu, M., Constantin, C., Popescu, I. D., Zipeto, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Fenga, C., Stratakis, C. A., Spandidos, D. A., & Tsatsakis, A. M. (2019). Inflammation and Metabolism in Cancer Cell—Mitochondria Key Player. Frontiers in Oncology, 9. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00348.

Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2007). Translocation of Proteins into Mitochondria. Annual Review of Biochemistry, 76(1), 723–749. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409.

Nguyen, H. N., Wang, C., & Perry, D. C. (2002). Depletion of intracellular calcium stores is toxic to SH-SY5Y neuronal cells. Brain Research, 924(2), 159–166. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03229-2.

Nikoletopoulou, V., Lickert, H., Frade, J. M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., Bibel, M., & Barde, Y.-A. (2010). Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. Nature, 467(7311), 59–63. https://doi.org/10.1038/nature09336.

O'Malley, J., Kumar, R., Inigo, J., Yadava, N., & Chandra, D. (2020). Mitochondrial Stress Response and Cancer. Trends in Cancer, 6(8), 688–701. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.04.009.

Ochel, H.-J., Eichhorn, K., & Gademann, G. (2001). Geldanamycin: the prototype of a class of antitumor drugs targeting the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. Cell Stress & Chaperones, 6(2), 105. https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006<0105:GTPOAC>2.0.CO;2.

Ogura, M., Yamaki, J., Homma, M. K., & Homma, Y. (2012). Mitochondrial c-Src regulates cell survival through phosphorylation of respiratory chain components. Biochemical Journal, 447(2), 281–289. https://doi.org/10.1042/BJ20120509.

Oskam, R., Coulier, F., Ernst, M., Martin-Zanca, D., & Barbacid, M. (1988). Frequent generation of oncogenes by in vitro recombination of TRK protooncogene sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences, 85(9), 2964–2968. https://doi.org/10.1073/pnas.85.9.2964.

Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S.-E., Walford, G. A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., Hill, D. E., Vidal, M., Evans, J. G., Thorburn, D. R., Carr, S. A., & Mootha, V. K. (2008). A Mitochondrial Protein Compendium Elucidates Complex I Disease Biology. Cell, 134(1), 112–123. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.016.

Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016). The integrated stress response. EMBO Reports, 17(10), 1374–1395. https://doi.org/10.15252/embr.201642195.

Panda, S., Behera, S., Alam, M. F., & Syed, G. H. (2021). Endoplasmic reticulum & mitochondrial calcium homeostasis: The interplay with viruses. Mitochondrion, 58, 227–242. https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.03.008.

Parrens, M., Labouyrie, E., Groppi, A., Dubus, P., Carles, D., Velly, J.-F., de Mascarel, A., & Merlio, J.-P. (1998). Expression of NGF receptors in normal and pathological human thymus. Journal of Neuroimmunology, 85(1), 11–21. https://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00242-7.

Patapoutian, A., & Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. Current Opinion in Neurobiology, 11(3), 272–280. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00208-7.

Paul, M. K., & Mukhopadhyay, A. K. (2004). Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. International Journal of Medical Sciences, 101–115. https://doi.org/10.7150/ijms.1.101.

Pendergast, A. M. (2002). The Abl family kinases: Mechanisms of regulation and signaling (pp. 51–100). https://doi.org/10.1016/S0065-230X(02)85003-5.

Panel, M., Ghaleh, B., & Morin, D. (2017). Ca2+ ionophores are not suitable for inducing mPTP opening in murine isolated adult cardiac myocytes. Scientific Reports, 7(1), 4283. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04618-4.

Piedimonte, G., Chamaret, S., Dauguet, C., Borghetti, A. F., & Montagnier, L. (1988). Identification and characterization of tyrosine kinase activity associated with mitochondrial outer membrane in sarcoma 180 cells. Journal of Cellular Biochemistry, 36(1), 91–102. https://doi.org/10.1002/jcb.240360110.

Piedimonte, G., Silvotti, L., Borghetti, A. F., Chamaret, S., & Montagnier, L. (1986). Association of tyrosine protein kinase activity with mitochondria in human fibroblasts. Journal of Cellular Biochemistry, 32(2), 113–123. https://doi.org/10.1002/jcb.240320204.

Pizzo, P., & Pozzan, T. (2007). Mitochondria–endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. Trends in Cell Biology, 17(10), 511–517. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.011.

Plas, D. R., Talapatra, S., Edinger, A. L., Rathmell, J. C., & Thompson, C. B. (2001). Akt and Bcl-xL Promote Growth Factor-independent Survival through Distinct Effects on Mitochondrial Physiology. Journal of Biological Chemistry, 276(15), 12041–12048. https://doi.org/10.1074/jbc.M010551200.

Ponzoni, M., Bachetti, T., Corrias, M. V., Brignole, C., Pastorino, F., Calarco, E., Bensa, V., Giusto, E., Ceccherini, I., & Perri, P. (2022). Recent advances in the developmental origin of neuroblastoma: an overview. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 41(1), 92. https://doi.org/10.1186/s13046-022-02281-w.

Quirós, P. M., Mottis, A., & Auwerx, J. (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 17(4), 213–226. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.23.

Rainbolt, T. K., Saunders, J. M., & Wiseman, R. L. (2014). Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response. Trends in Endocrinology & Metabolism, 25(10), 528–537. https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.007.

Rajagopal, R., Chen, Z.-Y., Lee, F. S., & Chao, M. v. (2004). Transactivation of Trk Neurotrophin Receptors by G-Protein-Coupled Receptor Ligands Occurs on Intracellular Membranes. The Journal of Neuroscience, 24(30), 6650–6658. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0010-04.2004.

Ravi, Kumar, A., Bhattacharyya, S., & Singh, J. (2023). Thiol reductive stress activates the hypoxia response pathway. The EMBO Journal, 42(22). https://doi.org/10.15252/embj.2023114093.

Reuther, G. W., Lambert, Q. T., Caligiuri, M. A., & Der, C. J. (2000). Identification and Characterization of an Activating TrkA Deletion Mutation in Acute Myeloid Leukemia. Molecular and Cellular Biology, 20(23), 8655–8666. https://doi.org/10.1128/MCB.20.23.8655-8666.2000.

Rolfo, C., Ruiz, R., Giovannetti, E., Gil-Bazo, I., Russo, A., Passiglia, F., Giallombardo, M., Peeters, M., & Raez, L. (2015). Entrectinib: a potent new TRK, ROS1, and ALK inhibitor. Expert Opinion on Investigational Drugs, 24(11), 1493–1500. https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1096344.

Ruan, L., Zhou, C., Jin, E., Kucharavy, A., Zhang, Y., Wen, Z., Florens, L., & Li, R. (2017). Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. Nature, 543(7645), 443–446. https://doi.org/10.1038/nature21695.

Ruggeri, B. A., Miknyoczki, S. J., Singh, J., & Hudkins, R. L. (1999). Role of neurotrophin-trk interactions in oncology: the anti-tumor efficacy of potent and selective trk tyrosine kinase inhibitors in pre-clinical tumor models. Current Medicinal Chemistry, 6(9), 845–857.

Ruggeri, P., Farina, A. R., di Ianni, N., Cappabianca, L., Ragone, M., Ianni, G., Gulino, A., & Mackay, A. R. (2014). The TrkAIII Oncoprotein Inhibits Mitochondrial Free Radical ROS-Induced Death of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Augmenting SOD2 Expression and Activity at the Mitochondria, within the Context of a Tumour Stem Cell-like Phenotype. PLoS ONE, 9(4), e94568. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094568.

Ruggeri, P., R., A., Cappabianca, L., Di, N., Ragone, M., Merolle, S., Gulino, A., & R., A. (2013). Neurotrophin and Neurotrophin Receptor Involvement in Human Neuroblastoma. In Neuroblastoma. InTech. https://doi.org/10.5772/55536

Salvi, M., Brunati, A. M., Bordin, L., la Rocca, N., Clari, G., & Toninello, A. (2002). Characterization and location of Src-dependent tyrosine phosphorylation in rat brain mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1589(2), 181–195. https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00174-X.

Sanchez-Martin, C., Menon, D., Moroni, E., Ferraro, M., Masgras, I., Elsey, J., Arbiser, J. L., Colombo, G., & Rasola, A. (2021). Honokiol Bis-Dichloroacetate Is a Selective Allosteric Inhibitor of the Mitochondrial Chaperone TRAP1. Antioxidants & Redox Signaling, 34(7), 505–516. https://doi.org/10.1089/ars.2019.7972.

Sbaffone, M., Jaffrain-Rea, M.-L., Cappabianca, L., Carbonara, F., Gianno, F., Feola, T., Ruggieri, M., Zelli, V., Maccarone, R., Guadagni, S., Clementi, M., Arcella, A., Esposito, V., Carozza, G., Martelli, I., Farina, A. R., & Mackay, A. R. (2024). A Study of Alternative TrkA Splicing Identifies TrkAIII as a Novel Potentially Targetable Participant in PitNET Progression. Biology, 13(3), 171. https://doi.org/10.3390/biology13030171.

Schecterson, L. C., Hudson, M. P., Ko, M., Philippidou, P., Akmentin, W., Wiley, J., Rosenblum, E., Chao, M. v., Halegoua, S., & Bothwell, M. (2010). Trk activation in the secretory pathway promotes Golgi fragmentation. Molecular and Cellular Neuroscience, 43(4), 403–413. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.01.007.

Schmitt, J. M., Smith, S., Hart, B., & Fletcher, L. (2012). CaM kinase control of AKT and LNCaP cell survival. Journal of Cellular Biochemistry, 113(5), 1514–1526. https://doi.org/10.1002/jcb.24020.

Schramm, A., Schowe, B., Fielitz, K., Heilmann, M., Martin, M., Marschall, T., Köster, J., Vandesompele, J., Vermeulen, J., de Preter, K., Koster, J., Versteeg, R., Noguera, R., Speleman, F., Rahmann, S., Eggert, A., Morik, K., & Schulte, J. H. (2012). Exon-level expression analyses identify MYCN and NTRK1 as major determinants of alternative exon usage and robustly predict primary neuroblastoma outcome. British Journal of Cancer, 107(8), 1409–1417. https://doi.org/10.1038/bjc.2012.391.

Schröder, M. (2008). Endoplasmic reticulum stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences, 65(6), 862–894. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7383-5.

Shibayama, E., & Koizumi, H. (1996). Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. The American Journal of Pathology, 148(6), 1807–1818.

Shimada, H., Nakagawa, A., Peters, J., Wang, H., Wakamatsu, P. K., Lukens, J. N., Matthay, K. K., Siegel, S. E., & Seeger, R. C. (2004). TrkA expression in peripheral neuroblastic tumors. Cancer, 101(8), 1873–1881. https://doi.org/10.1002/cncr.20557.

Siddaway, R., Milos, S., Vadivel, A. K. A., Dobson, T. H. W., Swaminathan, J., Ryall, S., Pajovic, S., Patel, P. G., Nazarian, J., Becher, O., Brudno, M., Ramani, A., Gopalakrishnan, V., & Hawkins, C. (2022). Splicing is an alternate oncogenic pathway activation mechanism in glioma. Nature Communications, 13(1), 588. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28253-4.

Simmen, T., Aslan, J. E., Blagoveshchenskaya, A. D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S. F., Hung, C.-H., Crump, C. M., & Thomas, G. (2005). PACS-2 controls endoplasmic reticulum–mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. The EMBO Journal, 24(4), 717–729. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600559.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L., & van der Bliek, A. M. (2001). Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. Molecular Biology of the Cell, 12(8), 2245–2256. https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245.

Soga, T. (2013). Cancer metabolism: Key players in metabolic reprogramming. Cancer Science, 104(3), 275–281. https://doi.org/10.1111/cas.12085.

Sokol, E., & Desai, A. (2019). The Evolution of Risk Classification for Neuroblastoma. Children, 6(2), 27. https://doi.org/10.3390/children6020027.

Spinazzi, M., & de Strooper, B. (2016). PARL: The mitochondrial rhomboid protease. Seminars in Cell & Developmental Biology, 60, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.034.

Sun, F.-C., Wei, S., Li, C.-W., Chang, Y.-S., Chao, C.-C., & Lai, Y.-K. (2006). Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. Biochemical Journal, 396(1), 31–39. https://doi.org/10.1042/BJ20051916.

Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., de Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., Balla, T., & Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca2+ channels. The Journal of Cell Biology, 175(6), 901–911. https://doi.org/10.1083/jcb.200608073.

Tacconelli, A. et al. (2004) 'TrkA alternative splicing: A regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma', Cancer Cell, 6(4), pp. 347–360. doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.011.

Tacconelli, A., Farina, A. R., Cappabianca, L., Gulino, A., & Mackay, A. R. (2005). TrkAIII: A Novel Hypoxia-regulated Alternative TrkA Splice Variant of Potential Physiological and Pathological Importance. Cell Cycle, 4(1), 8–9. https://doi.org/10.4161/cc.4.1.1349.

Tokumitsu, H., Inuzuka, H., Ishikawa, Y., Ikeda, M., Saji, I., & Kobayashi, R. (2002). STO-609, a Specific Inhibitor of the Ca2+/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase. Journal of Biological Chemistry, 277(18), 15813–15818. https://doi.org/10.1074/jbc.M201075200.

Treis, D., Umapathy, G., Fransson, S., Guan, J., Mendoza-García, P., Siaw, J. T., Wessman, S., Gordon Murkes, L., Stenman, J. J. E., Djos, A., Elfman, L. H. M., Johnsen, J. I., Hallberg, B., Palmer, R. H., Martinsson, T., & Kogner, P. (2022). Sustained Response to Entrectinib in an Infant With a Germline ALKAL2 Variant and Refractory Metastatic Neuroblastoma With Chromosomal 2p Gain and Anaplastic Lymphoma Kinase and Tropomyosin Receptor Kinase Activation. JCO Precision Oncology, 6. https://doi.org/10.1200/PO.21.00271.

Tsuchiya, A., Kanno, T., & Nishizaki, T. (2014). PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway. Journal of Endocrinology, 220(1), 49–59. https://doi.org/10.1530/JOE-13-0172.

Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2007). Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. Apoptosis, 12(5), 835–840. https://doi.org/10.1007/s10495-006-0525-7.

Tsygankov, A., & Shore, S. (2004). SRC: Regulation, Role in Human Carcinogenesis and Pharmacological Inhibitors. Current Pharmaceutical Design, 10(15), 1745–1756. https://doi.org/10.2174/1381612043384457.

Uchiyama, T., Engelman, R. M., Maulik, N., & Das, D. K. (2004). Role of Akt Signaling in Mitochondrial Survival Pathway Triggered by Hypoxic Preconditioning. Circulation, 109(24), 3042–3049. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000130647.29030.90.

Uren, R. T., & Turnley, A. M. (2014). Regulation of neurotrophin receptor (Trk) signaling: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) is a new player. Frontiers in Molecular Neuroscience, 7. https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00039.

Vance, J. E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. The Journal of Biological Chemistry, 265(13), 7248–7256.

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Science, 324(5930), 1029–1033. https://doi.org/10.1126/science.1160809.

Vantaku, V., Donepudi, S. R., Ambati, C. R., Jin, F., Putluri, V., Nguyen, K., Rajapakshe, K., Coarfa, C., Battula, V. L., Lotan, Y., & Putluri, N. (2019). Correction: Expression of ganglioside GD2, reprogram the lipid metabolism and EMT phenotype in bladder cancer. Oncotarget, 10(63), 6843–6844. https://doi.org/10.18632/oncotarget.27311.

Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., & Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). The Journal of Biological Chemistry, 269(7), 5241–5248.

Waldeck-Weiermair, M., Deak, A. T., Groschner, L. N., Alam, M. R., Jean-Quartier, C., Malli, R., & Graier, W. F. (2013). Molecularly Distinct Routes of Mitochondrial Ca2+ Uptake Are Activated

Depending on the Activity of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca2+ ATPase (SERCA). Journal of Biological Chemistry, 288(21), 15367–15379. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462259.

Walter, P., & Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. Science, 334(6059), 1081–1086. https://doi.org/10.1126/science.1209038.

Wang, Y., Li, X., & Zhao, F. (2021). MCU-Dependent mROS Generation Regulates Cell Metabolism and Cell Death Modulated by the AMPK/PGC-1α/SIRT3 Signaling Pathway. Frontiers in Medicine, 8. https://doi.org/10.3389/fmed.2021.674986.

Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. Science, 123(3191), 309–314. https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309.

Watson, F. L., Porcionatto, M. A., Bhattacharyya, A., Stiles, C. D., & Segal, R. A. (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. Journal of Neurobiology, 39(2), 323–336. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199905)39:2<323::AID-NEU15>3.0.CO;2-4.

Wehrman, T., He, X., Raab, B., Dukipatti, A., Blau, H., & Garcia, K. C. (2007). Structural and Mechanistic Insights into Nerve Growth Factor Interactions with the TrkA and p75 Receptors. Neuron, 53(1), 25–38. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.034.

Weier, H.-U. G., Rhein, A. P., Shadravan, F., Collins, C., & Polikoff, D. (1995). Rapid physical mapping of the human trk protooncogene (NTRK1) to human chromosome 1q21–q22 by P1 clone selection, fluorescence in situ hybridization (FISH), and computer-assisted microscopy. Genomics, 26(2), 390–393. https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80226-C.

Weiß, J., Heib, M., Korn, T., Hoyer, J., Fuchslocher Chico, J., Voigt, S., Koudelka, T., Tholey, A., & Adam, D. (2023). Protease-independent control of parthanatos by HtrA2/Omi. Cellular and Molecular Life Sciences, 80(9), 258. https://doi.org/10.1007/s00018-023-04904-7.

Windisch, J. M., Auer, B., Marksteiner, R., Lang, M. E., & Schneider, R. (1995). Specific neurotrophin binding to leucine-rich motif peptides of TrkA and TrkB. FEBS Letters, 374(1), 125–129. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01047-I.

Windisch, J. M., Marksteiner, R., & Schneider, R. (1995). Nerve Growth Factor Binding Site on TrkA Mapped to a Single 24-Amino Acid Leucine-rich Motif. Journal of Biological Chemistry, 270(47), 28133–28138. https://doi.org/10.1074/jbc.270.47.28133.

Wong, M. H., Samal, A. B., Lee, M., Vlach, J., Novikov, N., Niedziela-Majka, A., Feng, J. Y., Koltun, D. O., Brendza, K. M., Kwon, H. J., Schultz, B. E., Sakowicz, R., Saad, J. S., & Papalia, G. A. (2019). The KN-93 Molecule Inhibits Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) Activity by Binding to Ca2+/CaM. Journal of Molecular Biology, 431(7), 1440–1459. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.001.

Wright, J. H. (1910). Neurocytoma or neuroblastoma, a kind of tumor not generally recognized. Journal of Experimental Medicine, 12(4), 556–561. https://doi.org/10.1084/jem.12.4.556.

Wu, W., & Zhao, S. (2013). Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 45(1), 18–26. https://doi.org/10.1093/abbs/gms104.

Wulf, J., & Pohl, W. G. (1977). Calcium ion-flux across phosphatidylcholine membranes mediated by ionophore A23187. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 465(3), 471–485. https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90266-8.

Xie, X., Shu, R., Yu, C., Fu, Z., & Li, Z. (2022). Mammalian AKT, the Emerging Roles on Mitochondrial Function in Diseases. Aging and Disease, 13(1), 157. https://doi.org/10.14336/AD.2021.0729.

Xu, X., Wang, Q., He, Y., Ding, L., Zhong, F., Ou, Y., Shen, Y., Liu, H., & He, S. (2017). ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) takes part in cell proliferation and cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR). Annals of Hematology, 96(5), 847–858. https://doi.org/10.1007/s00277-017-2949-2.

Yano, S., Tokumitsu, H., & Soderling, T. R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. Nature, 396(6711), 584–587. https://doi.org/10.1038/25147.

Ye, J., Kumanova, M., Hart, L. S., Sloane, K., Zhang, H., de Panis, D. N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J. A., Ron, D., & Koumenis, C. (2010). The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. The EMBO Journal, 29(12), 2082–2096. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.81.

Yokokura, S., Yurimoto, S., Matsuoka, A., Imataki, O., Dobashi, H., Bandoh, S., & Matsunaga, T. (2014). Calmodulin antagonists induce cell cycle arrest and apoptosis in vitro and inhibit tumor growth in vivo in human multiple myeloma. BMC Cancer, 14(1), 882. https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-882.

Young, J. C., Hoogenraad, N. J., & Hartl, F. U. (2003). Molecular Chaperones Hsp90 and Hsp70 Deliver Preproteins to the Mitochondrial Import Receptor Tom70. Cell, 112(1), 41–50. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01250-3.

Zhang, Y., Appleton, B. A., Wu, P., Wiesmann, C., & Sidhu, S. S. (2007). Structural and functional analysis of the ligand specificity of the HtrA2/Omi PDZ domain. Protein Science, 16(8), 1738–1750. https://doi.org/10.1110/ps.072833207.

Zhao, H., Li, T., Wang, K., Zhao, F., Chen, J., Xu, G., Zhao, J., Li, T., Chen, L., Li, L., Xia, Q., Zhou, T., Li, H.-Y., Li, A.-L., Finkel, T., Zhang, X.-M., & Pan, X. (2019). AMPK-mediated activation of MCU stimulates mitochondrial Ca2+ entry to promote mitotic progression. Nature Cell Biology, 21(4), 476–486. https://doi.org/10.1038/s41556-019-0296-3.

Zwaans, B. M. M., & Lombard, D. B. (2014). Interplay between sirtuins, MYC and hypoxia-inducible factor in cancer-associated metabolic reprogramming. Disease Models & Mechanisms. https://doi.org/10.1242/dmm.016287.