UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE APPLICATE E BIOTECNOLOGICHE

Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale

Curriculum Biotecnologie e Scienze Biochimiche

XXXVII ciclo

Il ruolo delle varianti di *splicing* di TrkA nei tumori

MEDS-02/A

Dottoranda

Maddalena Sbaffone

Coordinatore del corso

Prof.ssa Mariagrazia Perilli

Tutor

Prof.ssa Antonietta Rosella Farina

a.a. 2023/2024

Indice

ABSTRACT *3*

1. INTRODUZIONE *5*

1.1. Il recettore TrkA e la variante di splicing TrkAIII **5**

1.2. Il neuroblastoma (NB) **9**

1.3. Il melanoma cutaneo maligno (CMM) **12**

1.4. I tumori neuroendocrini ipofisari (PitNET) **15**

1.5. Il checkpoint immunitario PD-1/PD-L1 ..... **17**

2. SCOPO DEL LAVORO *19*

3. MATERIALI E METODI *21*

3.1. Reagenti e anticorpi **21**

3.2. Linee cellulari **21**

3.3. Pazienti e tessuti **22**

3.4. Estrazione di RNA, RT-PCR e qRT-PCR **23**

3.5. Sequenziamento del DNA **23**

3.6. Estrazione proteica e Western Blotting **24**

3.7. Immunofluorescenza (IF) indiretta **24**

3.8. Saggio ELISA per la rilevazione di IL-2 ..... **25**

3.9. Test di tossicità cellulare **25**

3.10. Analisi dei dati **25**

4. RISULTATI *27*

4.1. Caratterizzazione dell'espressione e del ruolo di TrkAIII nel CMM **27**

4.2. Caratterizzazione dell'espressione e del ruolo di TrkAIII nei PitNET **35**

4.3. Valutazione del ruolo di TrkAIII nell'espressione di PD-L1 in linee cellulari di NB **42**

5. DISCUSSIONE *46*

6. CONCLUSIONI.....50

7. BIBLIOGRAFIA 51

ABSTRACT

Alternative splicing of the neurotrophin receptor gene NTRK1/TrkA, resulting in expression of the oncogenic TrkAIII variant, originally discovered in human pediatric neuroblastoma in positive association with post-therapeutic relapse and metastatic progression is also pronounced in subsets of prostate medullary thyroid and glioblastoma multiforme tumors. TrkAIII mRNA exhibits skipping of cassette exons 6 and 7, which encode the D4 domain required for cell surface receptor expression and prevention of spontaneous activation. The TrkAIII protein, as a consequence, does not exhibit cell surface expression but accumulates within pre-Golgi membranes, centrosomes and mitochondria, within which it exhibits cell cycle and stress-regulated, ligand-independent activation. TrkAIII intracellular expression and activation transforms NIH3T3 cells, promotes primary and metastatic activity in NB models and exhibits similar oncogenic activity to TrkT3 fused oncogene. TrkAIII oncogenic activity involves the induction of pro-survival and pro-angiogenic PI3K-AKT signaling, centrosome amplification leading to chromosomal instability, promotion and maintenance of a more stem cell like phenotype and stress-regulated metabolic adaptation and mitochondrial protection. Furthermore, TrkAIII activation is prevented by clinically approved Trk inhibitors, such as Entrectinib and Lestaurtinib, characterizing TrkAIII as a potentially actionable equivalent of both engineered D4 domain-deleted TrkA and Trk-fused oncogenes. In tumor cell lines, alternative TrkAIII splicing is promoted by oncogenic SV40 poliomavirus large T antigen, and by hypoxia, nutrient deprivation and ER stress which characterize the tumor microenvironment (TME), implicating potential roles for oncogenic poliomaviruses and TME conditions in promoting and maintaining pronounced oncogenic alternative TrkAIII splicing in tumors. Consistent with these observations and dependent upon availability, alternative TrkAIII splicing was evaluated and confirmed to be a potential oncogenic mechanism in Merkel cell poliomavirus (MCPyV) positive and negative Merkel cell carcinomas (MCCs), implicating the oncogenic MCPyV polyomavirus. These preliminary observations concerning alternative TrkAIII splicing in cancer, have now been extended in this thesis to include human cutaneous malignant melanomas (CMMs) linked to NTRK1/TrkA gene amplification and intracellular TrkA activation, and pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs) linked to John Cunningham poliomavirus (JCPyV), de-regulated splicing and TrkA expression. In CMMs, pronounced alternative TrkAIII splicing, with occasional exclusive TrkAIII mRNA expression, was significantly more frequent in

metastatic tumors and was also associated with intracellular TrkA isoform phosphorylation, as an index of activation. In CMMs, alternative NTRK1/TrkA splicing was restricted to exons 1 through 8, did not involve exons 8 through 17, TrkAIII was the only in-frame splice variant with oncogenic tyrosine kinase potential and TrkAIII mRNA expression was associated with unconventional Xbp-1 splicing, implicating ER stress. At the cellular level, in BRAF(V600E)-mutated A375 melanoma cells, DTT activation of the unfolded protein/ER stress response promoted alternative TrkAIII splicing, transient TrkAIII expression resulted in ligand-independent TrkAIII and Akt phosphorylation, and TrkAIII expression enhanced resistance to DTT-induced cytotoxicity, with sensitivity restored by the Trk inhibitors Lestaurtinib and Entrectinib. In PitNETs, pronounced alternative TrkAIII splicing was particularly prominent in invasive tumors and in particular invasive PIT1 PitNETs, which exhibited the highest levels of alternative TrkAIII splicing. TrkAIII mRNA expression in PitNETs was also associated with elevated HIF-2α mRNA expression, consistent with hypoxia response activation, and with intracellular TrkA isoform phosphorylation but did not associate with hotspot mutations in SF3B1splice factor. In separate studies, TrkAIII involvement in regulating PD-L1-mediated immune evasion was also evaluated. In an SH-SY5Y NB cell model, compared to control transfected and fully spliced TrkA transfected counterparts, TrkAIII expressing SH-SY5Y cells exhibited significantly enhanced PD-L1 mRNA and protein expression. In comparative analyses, enhanced PD-L1 mRNA and protein expression in TrkAIII-expressing but not fully spliced TrkA expressing or control SH-SY5Y cells was reduced by the Trk inhibitor Entrectinib and the PI3K inhibitor LY-294002, consistent with a TrkAIII-mediated PI3K-dependent mechanism. In functional Jurkat IL-2 production co-culture assays, IL-2 production by PMA/PHA-activated Jurkat cells was abrogated by control, TrkA and TrkAIII expressing SH-SY5Y cells, and was restored in TrkAIII expressing SH-SY5Y cells by anti-PD-L1 neutralizing antibody, confirming PD-L1-mediated suppression of Jurkat IL-2 production, presumably via PD-1. Collectively, these studies identify alternative TrkAIII splicing and TrkAIII expression as a potentially important actionable oncogenic mechanism in CMM and PitNETs, in addition to NBs and MCCs, add promotion of PD-L1 expression as a further mechanism through which TrkAIII exerts oncogenic activity and support a rationale for extending clinical approval for Trk inhibitors to therapy-resistant, advanced stage, metastatic CMM and PitNETs driven by TrkAIII, in addition to NBs and MCCs.

1. INTRODUZIONE

1.1. Il recettore TrkA e la variante di splicing TrkAIII

Il recettore delle neurotrofine tirosin chinasi di tipo 1 (TrkA) è un recettore transmembrana, identificato per la prima volta nel 1986. Questo fa parte della famiglia delle chinasi Trk, che include TrkA, TrkB e TrkC, codificate rispettivamente dai geni *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3* [1]. Il gene *NTRK1* umano è localizzato sul cromosoma 1q23.1, è organizzato in 19 esoni e codifica per un recettore transmembrana di 140 kDa [2], [3].

Le proteine Trk condividono un alto grado di omologia strutturale: sono infatti costituite da regioni intracellulari ed extracellulari separate da un singolo dominio transmembrana (**Figura 1**) [1].

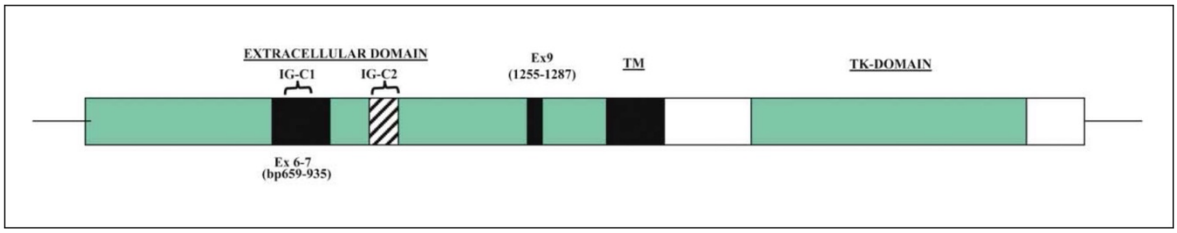


Figura 1. *Rappresentazione schematica del recettore TrkA [22].*

I loro domini extracellulari sono fortemente glicosilati e ciascuno contiene tre ripetizioni ricche di leucina affiancate da due ripetizioni di cisteina e domini IgG-like prossimali alla regione transmembrana. Il dominio intracellulare è di tipo tirosin-chinasico: il legame della neurotrofina ai recettori Trk determina la dimerizzazione e la successiva attivazione del recettore. La fosforilazione dei residui di tirosina del dominio chinasi avvia i percorsi di segnalazione a valle [4].

TrkA è espresso in vari organi e tessuti, e la sua attivazione è dipendente dalla neurotrofina Nerve Growth Factor (NGF). Quest'ultima si lega al dominio extracellulare del recettore, che in sua assenza è bloccato in uno stato inattivo a causa della N-glicosilazione del dominio extracellulare; la presenza dei domini Ig-like, inoltre, previene la dimerizzazione ligando-indipendente [5]. Quando NGF lega TrkA, il cambio conformazionale del sito attivo innesca l'autofosforilazione dei residui di tirosina (Y490, 674/675, Y751, Y785) e la conseguente attivazione del recettore [6]. Questa forma attivata di TrkA fosforila diverse altre proteine citosoliche, tra cui Shc e Grb2, con conseguente attivazione della fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K) e della chinasi Akt. In alternativa, la fosforilazione di TrkA determina

l'attivazione di Ras, che tramite ulteriore fosforilazione di Raf attiva la cascata delle MAPK (mitogen-activated protein kinases) (**Figura 2**) [7], [8].

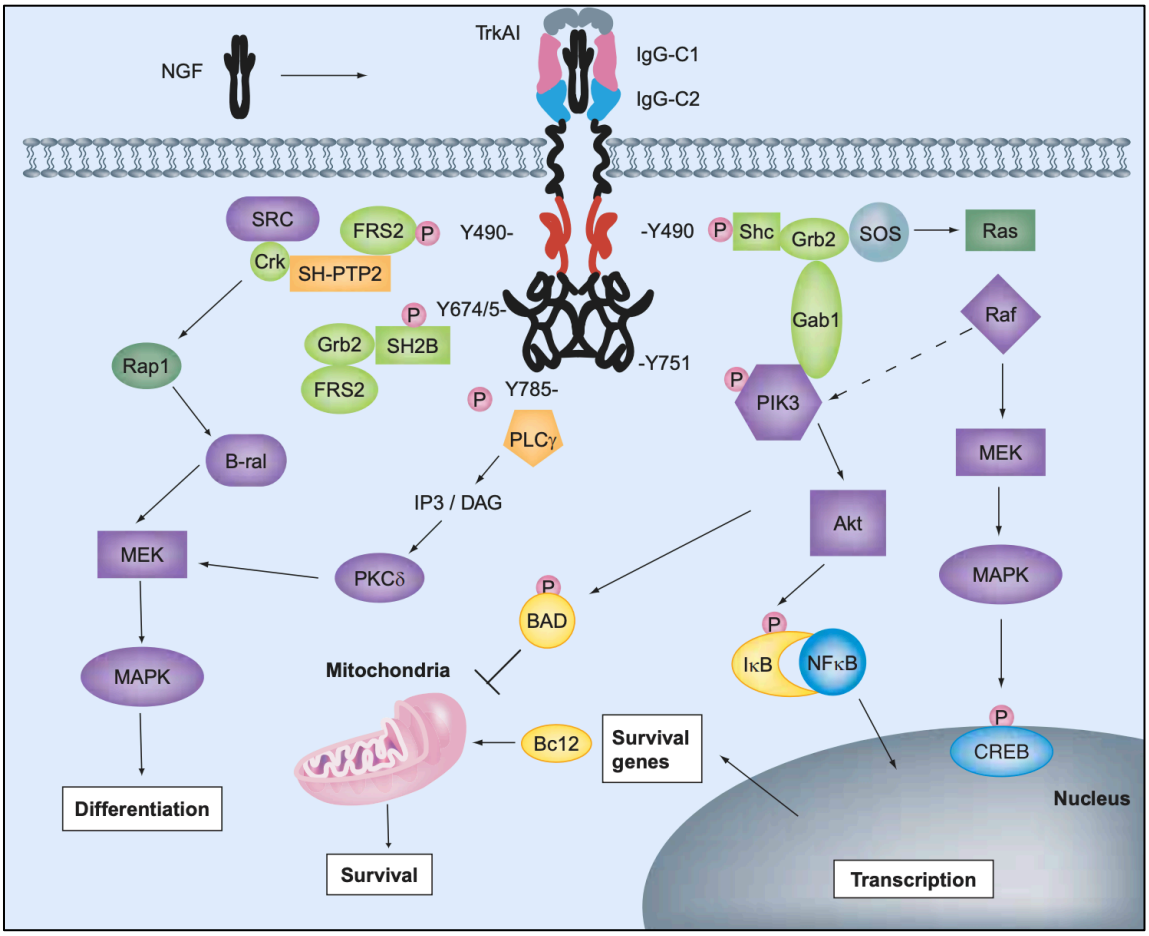


Figura 2. *Le vie di segnalazione di TrkA [8].*

Entrambe le vie PI3K e MAPK determinano la fosforilazione del fattore di trascrizione della proteina legante l'elemento di risposta all'AMP ciclico (CREB) che poi trasloca nel nucleo e media gli effetti trofici e anti-apoptotici dell'NGF [7], [9].

1.1.1. Le varianti oncogeniche del recettore TrkA: oncogeni di fusione NTRK1

In alcuni tumori sono state identificate mutazioni con guadagno di funzione a carico del gene *NTRK1*, che portano all'attivazione ligando-indipendente del recettore. Tra queste, gli oncogeni di fusione sono particolarmente rilevanti [10]. Il primo oncogene di fusione di TrkA è stato identificato in un carcinoma umano del colon, nel quale si osservò una fusione in frame tra il 3' del gene *NTRK1* e il 5' di una tropomiosina non muscolare [11]. Di conseguenza, il prodotto di questo riarrangiamento genico presenta il dominio chinasico di

TrkA, ma non possiede il sito di legame per la neurotrofina, il dominio transmembrana e i domini regolatori **(Figura 3)**.

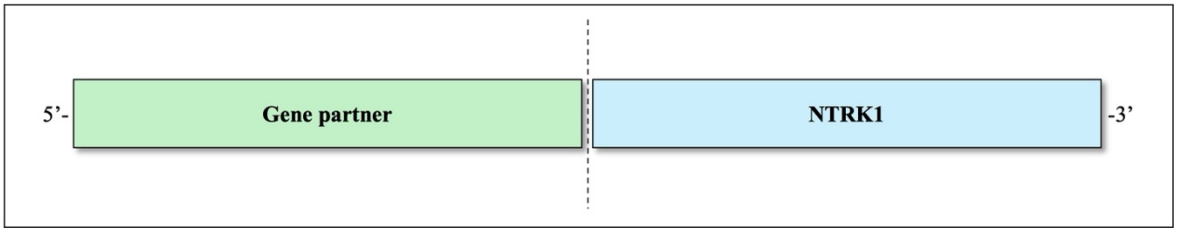


Figura 3. *Schematizzazione della struttura degli oncogeni di fusione NTRK1.*

Da allora sono state scoperte diverse proteine di fusione NTRK [12], tra cui Trk-T1, Trk-T2 e Trk-T3, tutte originate da riarrangiamenti cromosomici [13]. In generale, negli oncogeni di fusione NTRK1, il recettore promuove la tumorigenesi tramite attivazione intracellulare costitutiva delle vie proliferative [14]. Nonostante la rilevanza medica dei geni di fusione NTRK1, questi ultimi sono presenti in circa l'1% dei tumori [15].

1.1.2. Farmaci inibitori per gli oncogeni di fusione Trk

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi inibitori per gli oncogeni di fusione Trk, che bersagliano diverse chinasi o che agiscono selettivamente contro i recettori Trk. Il gruppo degli inibitori multi-chinasi include farmaci come Entrectinib e Lestaurtinib. Tra gli inibitori specifici, degno di menzione è Larotrectinib [14].

Entrectinib, chiamato anche RXDX-101, è un inibitore di TrkA, TrkB, TrkC e ALK, progettato per penetrare il sistema nervoso centrale (SNC) e attualmente, oltre a Larotrectinib, è l'unico inibitore per le proteine di fusione Trk approvato dalla Food and Drug Administration (FDA). La sua efficacia è stata testata e dimostrata in numerosi modelli preclinici e in diversi studi clinici [16].

Lestaurtinib è stato uno dei primi inibitori multi-chinasi ad essere valutato clinicamente per il suo ruolo inibitorio sui recettori Trk. Diversi studi clinici hanno confermato la sua efficacia in pazienti con neuroblastoma (NB) recidivante ad alto rischio, ma risultati contrastanti in altre malattie hanno portato alla sua esclusione da ulteriori sviluppi clinici [17].

Larotrectinib (LOXO-101) è stato approvato nel 2018 per pazienti adulti e pediatrici con tumori solidi che presentano una fusione dei geni NTRK [18]. Uno studio del 2020 ha confermato l'attività di Larotrectinib e il suo potenziale per somministrazioni a lungo termine nei tumori che presentano gli oncogeni di fusione Trk [19].

1.1.3. Le varianti di splicing alternativo del gene NTRK1

Il gene *NTRK1* è caratterizzato da frequenti fenomeni di splicing alternativo, tra cui si annoverano le varianti L0 (skipping degli esoni 2, 3 e 4) e L1 (skipping degli esoni 2 e 3) che sono espresse durante lo sviluppo del ratto [20]. Inoltre, lo skipping dell'esone 9 genera una variante di splicing tessuto-specifica (TrkAI) la cui espressione è predominante nel sistema nervoso; al contrario, la forma TrkAII è espressa principalmente nel timo [21]. Infine, nel 2004 è stata identificata la variante oncogenica TrkAIII (GeneBank OP866787) come prodotto inaspettato di amplificazione di TrkA in un modello cellulare di NB umano. TrkAIII è caratterizzato dallo skipping degli esoni 6, 7 e 9 **(Figura 4)**, il quale porta all'eliminazione del dominio D4 Ig-like extracellulare e di numerosi siti di N-glicosilazione che prevengono l'attivazione spontanea del recettore [22].

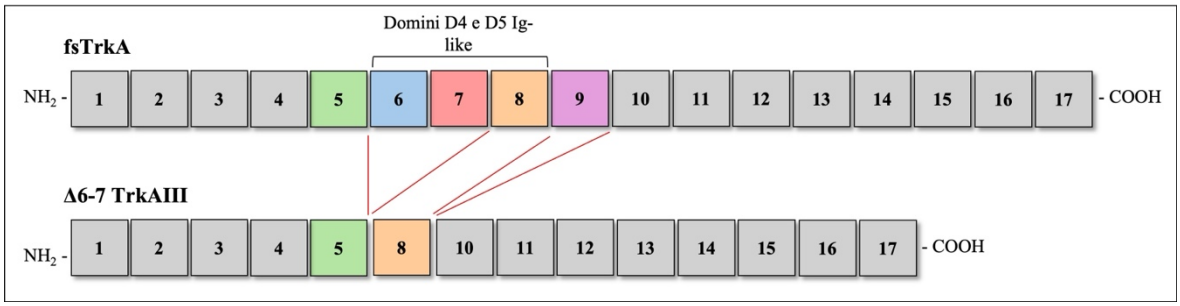


Figura 4. *Lo skipping degli esoni 6, 7 e 9 nel trascritto di TrkA full spliced (fsTrkA) porta alla delezione dei domini D4 e D5 Ig-like con formazione della variante di splicing alternativo, TrkAIII (Δ 6-7 TrkAIII).*

Di conseguenza, il recettore perde la sua componente extracellulare e i suoi domini regolatori. Questo porta all'attivazione costitutiva e ligando-indipendente e alla segnalazione esclusiva attraverso la via PI3K/Akt, con conseguenti stimoli di sopravvivenza e proliferazione cellulare continui. Nel NB, TrkAIII è associato a malattia in stadio avanzato, recidiva post-terapeutica e prognosi infausta [22], [23].

Oltre al NB, TrkAIII è stato identificato anche in altri tipi tumorali, come il carcinoma a cellule di Merkel (MCC) positive al Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) [24], [25], glioblastoma multiforme e in linee cellulari di melanoma, glioblastoma, feocromocitoma, carcinoma epatico, leucemia mieloide acuta e linfoma di Burkitt [23].

Il ruolo di TrkAIII nel NB umano è stato piuttosto ben caratterizzato: studi precedenti indicano che la sua espressione è promossa dall'ipossia e da agenti che provocano stress redox, stress del reticolo endoplasmatico (RE) e dal Large T antigen del poliomavirus SV40. Inoltre, in condizioni di stress del RE, TrkAIII viene traslocato nelle membrane mitocondriali interne, dove viene scisso in un frammento carbossi-terminale di 48kDa e attivato, con conseguente adattamento glicolitico e resistenza ad apoptosi stress-dipendente. Alcune evidenze suggeriscono in aggiunta che, in condizioni cicliche di ipossia e riossigenazione, TrkAIII sia coinvolto in meccanismi di resistenza a farmaci come la

Doxorubicina, suggerendo l'utilizzo in terapia di quest'ultima in combinazione con farmaci inibitori di Trk [22], [23], [26].

Infatti, poiché TrkAIII condivide parzialmente la struttura e le vie di attivazione degli oncogeni di fusione Trk, in numerosi studi sono stati testati i principali farmaci inibitori di Trk, dimostrando efficacia anche sulla variante di splicing [26]. Inoltre, in un recente studio clinico, l'inibitore Entrectinib è stato somministrato con successo a un bambino di 4 anni con NB metastatico avanzato resistente a terapia, positivo all'espressione di un recettore Trk intracellulare riconducibile alla variante TrkAIII [27]. Infine, considerando diverse evidenze secondo le quali lo splicing sembra essere un evento oncogenico più frequente rispetto alle proteine di fusione [28], TrkAIII mostra tutte le caratteristiche per essere considerato un target diagnostico, prognostico e terapeutico in differenti tipologie di tumori.

1.2. Il neuroblastoma (NB)

Il NB è il tumore solido extracranico più comune nell'infanzia; origina dalle cellule della cresta neurale e viene generalmente diagnosticato entro i 5 anni di età, con un'età media alla diagnosi di 17 mesi (**Figura 5**) [29], [30].

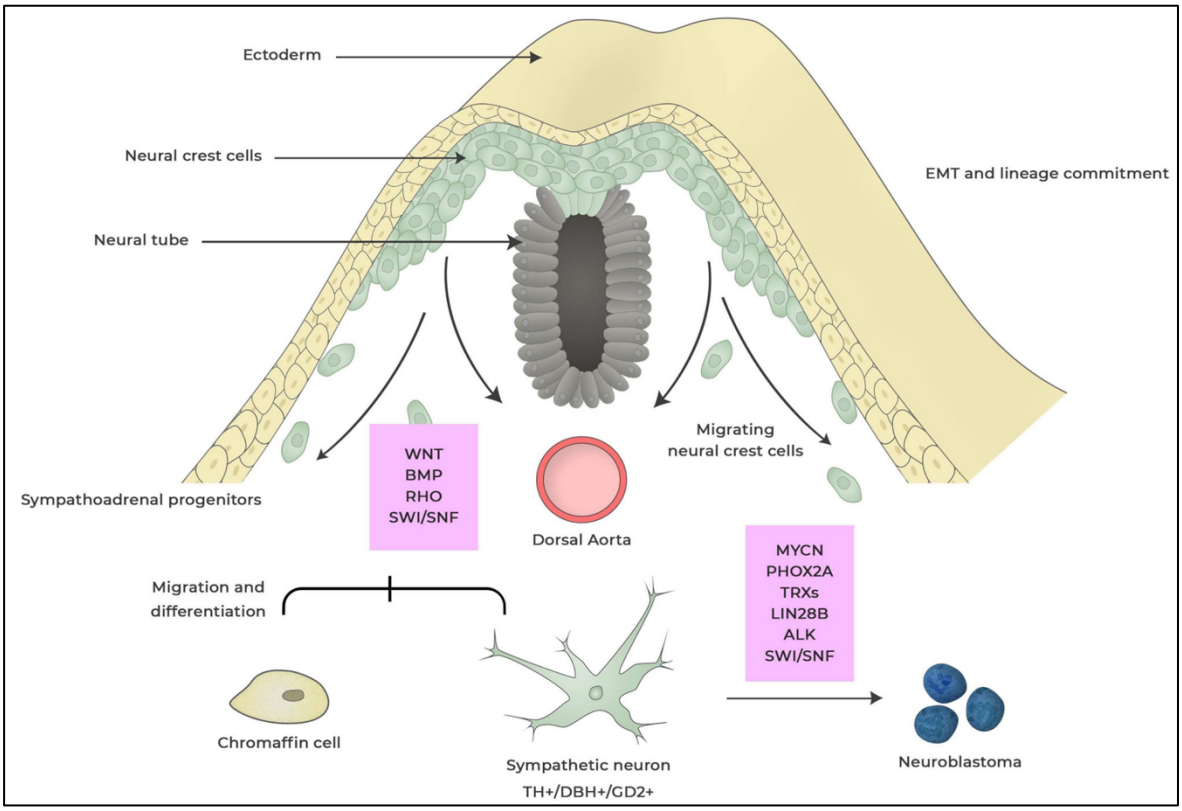


***Figura 5**. Sviluppo del NB a partire dalle cellule della cresta neurale [30].*

Esso può originare da qualsiasi sito del sistema nervoso simpatico, localizzandosi prevalentemente nella midollare surrenale [31]. Il NB si localizza più frequentemente

nell'addome, dove rappresenta il 35% dei casi; la massa tumorale deriva generalmente dalle cellule della midollare del surrene, responsabili della produzione di ormoni adrenergici [32]. Un'altra sede comune è la regione paraspinale, dove il tumore può espandersi attraverso gli spazi intraforaminali, comprimendo il midollo spinale e causando paralisi [31]. Circa il 20% dei NB si sviluppa nel mediastino posteriore, mentre il 5% interessa altre aree come il collo e le pelvi [32]. Le forme che si originano nel collo o nel torace possono determinare la sindrome di Horner, caratterizzata da segni come il restringimento della pupilla (miosi), l'abbassamento della palpebra (ptosi) e l'assenza di sudorazione sul lato interessato (anidrosi) [31]. Il NB può rimanere confinato al sito di origine oppure infiltrare i tessuti circostanti, coinvolgendo strutture cruciali come i nervi e i principali vasi sanguigni, ad esempio il tronco celiaco [33] (**Figura 6**).

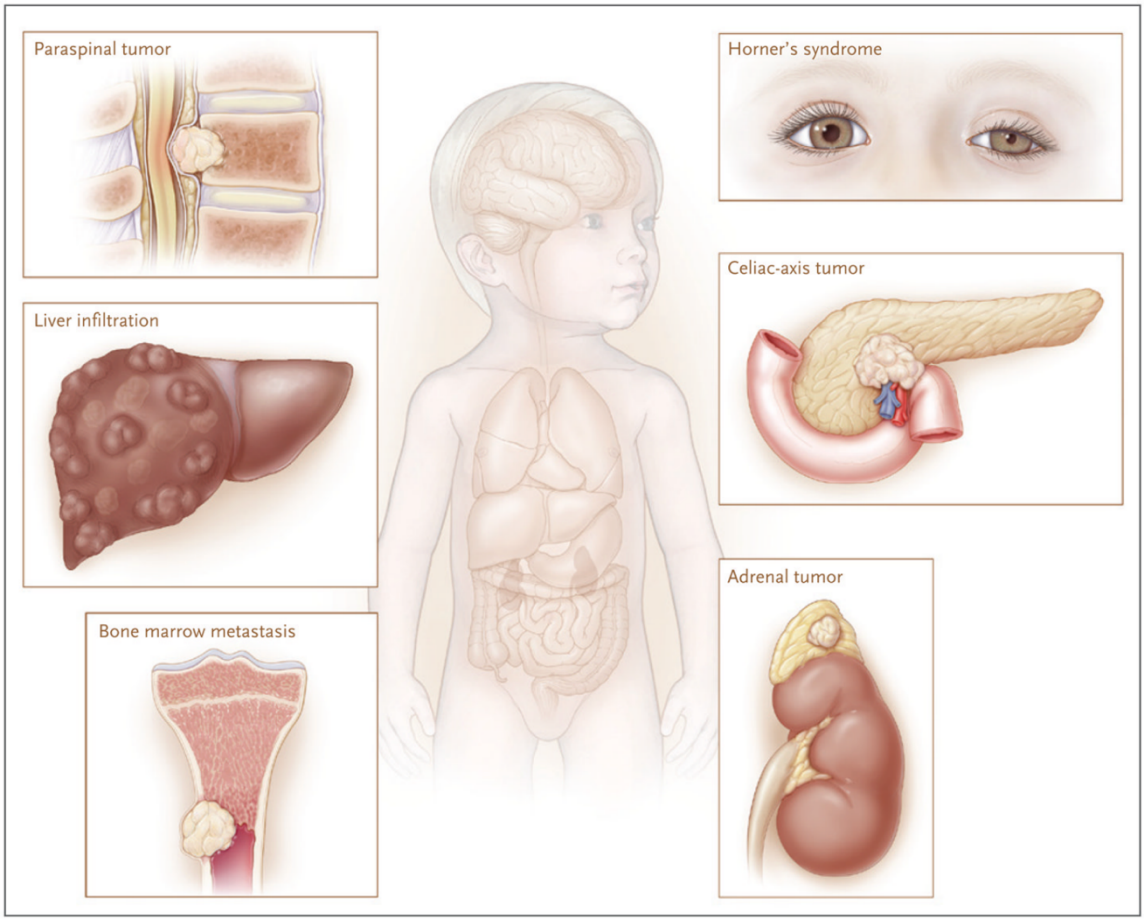


Figura 6. *Quadro clinico del NB [33].*

La presentazione clinica è altamente eterogenea: può infatti oscillare da regressione spontanea a malattia metastatica resistente a terapia. Per questo motivo, i tassi di sopravvivenza variano significativamente, dal 90% (NB a basso rischio) a meno del 50% (NB ad alto rischio) [34].

1.2.1. Epidemiologia e fattori di rischio

Il NB rappresenta l'8-10% dei tumori infantili ed è associato a circa il 15% dei decessi tumorali in età pediatrica. L'incidenza non mostra significative variazioni in base all'etnia [35], [36]. L'età media alla diagnosi è inferiore ai 5 anni, con un picco nei primi 12 mesi di vita (65 casi per milione). La prognosi è influenzata dall'età al momento della diagnosi: i pazienti di età inferiore a 18 mesi presentano tassi di sopravvivenza a 3 e 5 anni significativamente più elevati (sopravvivenza complessiva a 3 anni dell'86,0% e sopravvivenza complessiva a 5 anni dell'84,6%) rispetto ai pazienti di età superiore (sopravvivenza complessiva a 3 anni del 45,9% e sopravvivenza complessiva a 5 anni del 36,3%) [34], [37].

A differenza di altri tumori a carico del sistema nervoso, i casi familiari di NB sono estremamente rari e si riscontrano nell'1-2% dei casi. Il principale fattore che predispone al NB familiare è rappresentato da mutazioni con guadagno di funzione a carico del gene *ALK*. Inoltre, molti casi di NB presentano mutazioni con perdita di funzione del gene *PHOX2B*, che codifica per un regolatore dello sviluppo della cresta neurale [38]. Come sottolineato in precedenza, una percentuale significativa di NB esprime la variante di splicing TrkAIII che, a differenza di TrkA full spliced, in questo tumore si associa a malattia in stadio avanzato, metastasi e recidive [22], [23]. Infine, recentemente, sono stati condotti diversi studi sul possibile ruolo dell'evasione immunitaria nei tumori infantili [39].

1.2.2. Classificazione e terapie

Istologicamente, il NB mostra cellule piccole, rotonde e relativamente indifferenziate [40]. Poiché l'eterogeneità clinica è un segno distintivo del NB, i sistemi di classificazione di questo tumore erano estremamente variabili e basati su combinazioni di marcatori prognostici sia clinici che biologici. Per sopperire a questo problema, la task force dell'International Neuroblastoma Risk Group (INRG) ha progettato un sistema di stadiazione basato su criteri ben definiti, che dipendono da fattori di rischio definiti dall'imaging (**Figura 7**) [41].

A seconda della classificazione di rischio del paziente, il trattamento può variare considerevolmente: per i pazienti con malattia a basso rischio, le strategie variano dalla semplice osservazione alla chirurgia, da sola o associata a chemioterapia a bassa intensità. Per pazienti ad alto rischio, invece, si opta spesso per terapie multimodali intensive.

L'ottimizzazione della terapia adattata al rischio è essenziale per ridurre l'incidenza di effetti avversi della terapia mantenendo al contempo l'efficacia oncologica [42].

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)
				Amplified			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			H (intermediate)
				Amplified			N (high)
M	< 18			NA		Hyperdiploid	F (low)
	< 12			NA		Diploid	I (intermediate)
	12 to < 18			NA		Diploid	J (intermediate)
	< 18			Amplified			O (high)
	≥ 18						P (high)
MS	< 18			NA	No		C (very low)
					Yes		Q (high)
				Amplified			R (high)

Abbreviations: GN, ganglioneuroma; GNB, ganglioneuroblastoma; INRG, International Neuroblastoma Risk Group; NA, not amplified.

Figura 7. *International Neuroblastoma Risk Group System, INRG [41].*

1.3. Il melanoma cutaneo maligno (CMM)

Il melanoma cutaneo maligno (CMM) è un tumore estremamente aggressivo originato dai melanociti, cellule specializzate nella sintesi di melanina. Queste derivano dalle cellule della cresta neurale le quali, durante lo sviluppo embrionale, migrano verso diversi tessuti, tra cui pelle, mucose e occhi [43]. Pur rappresentando solo una piccola percentuale dei tumori dermatologici, il melanoma è responsabile di circa l'80% dei decessi per neoplasie cutanee; la sua progressione è caratterizzata da un cambiamento dei melanociti, a partire dalla formazione di nevi fino all'invasione e alla metastasi (**Figura 8**) [44].

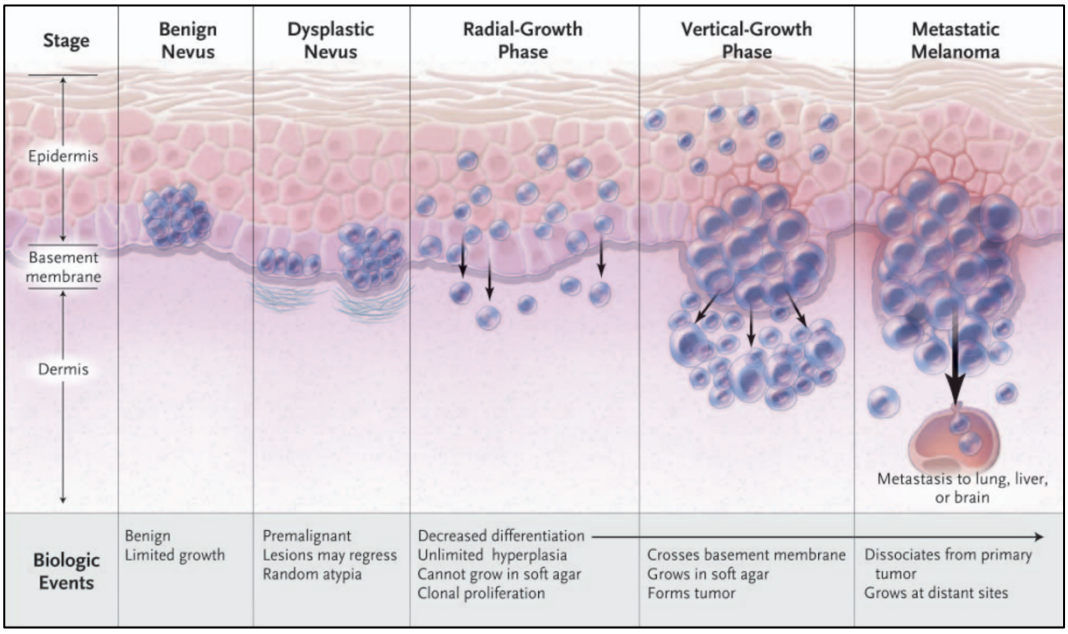


Figura 8. *Eventi biologici nella progressione del CMM [44].*

Diversi studi hanno identificato i principali eventi molecolari coinvolti nella trasformazione neoplastica, ma i meccanismi responsabili dell'invasività non sono ancora del tutto chiari [45].

1.3.1. Epidemiologia e fattori di rischio

A partire dagli anni ’50, l'incidenza del CMM è aumentata costantemente in tutto il mondo, presumibilmente a causa della maggiore esposizione ai raggi UV della luce solare e all'abbronzatura indoor [43]. In Italia, nel 2019, sono stati circa 160.000 i cittadini italiani con pregressa diagnosi di CMM a fronte dei circa 80.000 casi nel 2006 (AIOM, linee guida melanoma 2020). L'incidenza è di circa 25 nuovi casi ogni 100.000 abitanti in Europa, 30 casi ogni 100.000 abitanti negli Stati Uniti e 60 casi ogni 100.000 abitanti in Australia e Nuova Zelanda [43]. Grazie ai programmi di prevenzione e all’aumento delle terapie disponibili, i tassi di mortalità sono diminuiti notevolmente nelle popolazioni dei paesi ad alto reddito. Tuttavia, nelle popolazioni dei paesi a basso reddito, si è riscontrato un aumento dei casi di CMM con prognosi sfavorevole [43], [46].

Il CMM è influenzato da diversi fattori di rischio, sia ambientali che genetici. Tra i fattori ambientali si ricordano l’esposizione ai raggi UV già menzionata in precedenza associata a caratteristiche fisiche come la presenza di numerosi nevi e carnagione chiara [47]. Circa il 5-10% dei casi di melanoma è legato a una predisposizione genetica ereditaria: il tasso di mutazioni genetiche è particolarmente elevato in questo tumore. Tra le mutazioni più comuni, si ricordano soprattutto quelle nei geni *BRAF* (presente in circa il 60% dei casi), *NRAS* (presente in circa il 15-20% dei casi), *CDKN2A* e *CDK4* (sebbene meno frequenti, sono associate a un rischio molto alto di sviluppare la malattia) [48].

Infine, uno studio di Pasini et al. ha evidenziato un'amplificazione frequente del gene *NTRK1* nei melanomi primari, suggerendo un ruolo potenzialmente oncogenico del recettore TrkA nella fase iniziale dell'invasione tumorale. Esperimenti su linee cellulari hanno mostrato risultati contrastanti sul ruolo di TrkA: mentre l'attivazione della via MAPK sembrava avere un effetto protettivo, la via Akt stimolava la proliferazione [49]. Successivamente, l'espressione di TrkA è stata confermata in una significativa percentuale di CMM e si è osservata una correlazione tra l'espressione di TrkA e fattori prognostici negativi, suggerendo un ruolo potenzialmente sfavorevole di TrkA nella progressione del melanoma [50]. Questo paradosso era stato precedentemente osservato anche nei NB, dove poi è stata identificata la variante di splicing alternativo TrkAIII [22], [51].

1.3.2. Classificazione e terapie

La stadiazione del melanoma viene effettuata secondo il sistema di classificazione TNM, che valuta tre parametri fondamentali: T (tumor: descrive le dimensioni e le caratteristiche del tumore primario, considerando lo spessore e la presenza di ulcerazione), N (nodes: indica il coinvolgimento dei linfonodi regionali), M (metastasis: valuta la presenza di metastasi a distanza) (**Figura 9**) (AIOM, linee guida melanoma 2023), [52].

Tumor Classification	Thickness (mm)	Ulceration Status
T1	≤1.0	T1a, <0.8 mm without ulceration T1b, 0.8 mm to 1 mm without ulceration Or ≤1.0 mm with ulceration
T2	1.1–2.0	T2a, without ulceration T2b, with ulceration
T3	2.1–4.0	T3a, without ulceration T3b, with ulceration
T4	>4.0	T4a, without ulceration T4b, with ulceration
Nodal Classification	**Number of Nodes**	**Clinical Detectability/ Microsatellite Metastases Status**
N1	1	NX, reginonal nodes not accessed N0, no regional metastases detected N1a, clinically occult; no MSI N1b, clinically detected; no MSI N1c, 0 nodes; MSI present
N2	2–3	N2a, clinically occult; no MSI N2b, clinically detected; no MSI N2c, 1 node; MSI present
N3	>4	N3a, clinically occult; no MSI N3b, clinically detected or presence of any number of matted nodes; no MSI N3c, >2 nodes or any number of matted nodes; MSI present
Metastases Classification	**Site**	**Serum Lactate Dehydrogenase**
M1a–d	Skin/subcutaneous/nodule (M1a); lung (M1b); visceral (M1c); CNS (M1d)	Not assessed
M1a–d(0)	Skin/subcutaneous/nodule (M1a); lung (M1b); visceral (M1c); CNS (M1d)	Normal
M1a–d(1)	Skin/subcutaneous/nodule (M1a); lung (M1b); visceral (M1c); CNS (M1d)	Elevated

Figura 9. *Classificazione TNM [52].*

Nei casi di melanoma localizzato il trattamento di prima linea è l'asportazione chirurgica, seguita dalla biopsia del linfonodo sentinella. In caso di metastasi, alla chirurgia vengono abbinati trattamenti farmacologici; tra questi, la dacarbazina è stata per molti anni l'unico chemioterapico approvato per il melanoma, ma la sua scarsa efficacia ha portato alla ricerca di nuove terapie mirate [53]. Di queste, tra le più promettenti si ricordano gli inibitori di BRAF, approvati per il trattamento di melanomi metastatici e non resecabili con mutazione di *BRAF* [54]. Nonostante i risultati promettenti in pazienti positivi a mutazioni di *BRAF*, è

stato riscontrato un alto tasso di resistenza a questi farmaci, il che rende urgente l'individuazione di nuovi target diagnostici, prognostici e terapeutici per il CMM [53].

1.4. I tumori neuroendocrini ipofisari (PitNET)

Gli adenomi ipofisari, recentemente rinominati "tumori neuroendocrini ipofisari" (PitNET) sono un gruppo eterogeneo di neoplasie derivanti dalle cellule neuroendocrine dell'adenoipofisi e rappresentano il 15% di tutti i tumori intracranici [55], [56]. Generalmente i PitNET sono di natura benigna, ma fino al 40% dei casi presenta un fenotipo aggressivo, con un'evoluzione estremamente rapida (**Figura 10**) [55], [57].

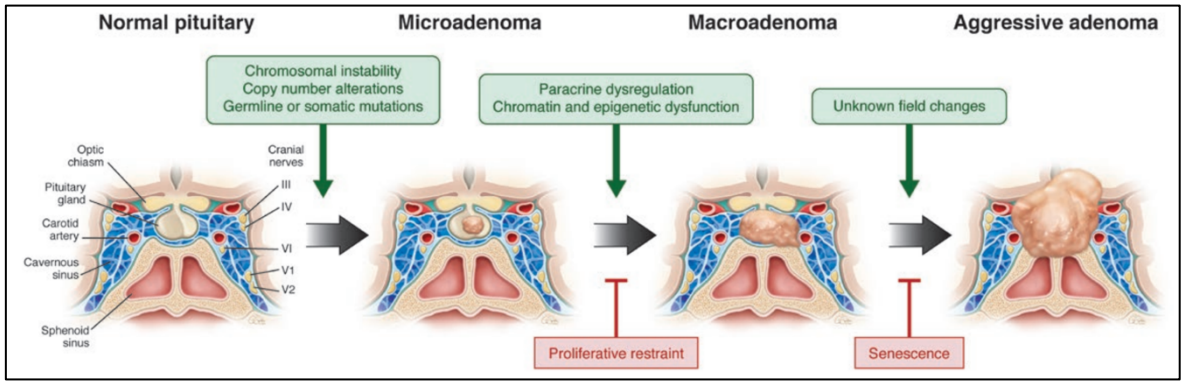


Figura 10. *Patogenesi dei PitNET [57].*

Questo sottogruppo di tumori, tipicamente sporadico e con basse frequenze di mutazioni geniche e alterazioni epigenetiche, è associato a condizioni come ipossia [58], stress ossidativo [59] e alterazioni nello splicing, tra cui mutazioni nel gene *SF3B1* [60], nonché alla presenza del John Cunningham Polyomavirus (JCPyV) in modelli animali [61], [62].

1.4.1. Epidemiologia

I dati epidemiologici sull'incidenza dei tumori pituitari hanno subito una significativa revisione negli ultimi decenni. Mentre studi precedenti stimavano un'incidenza annuale di 1,85 casi ogni 100.000 abitanti [63], le più recenti meta-analisi indicano una prevalenza di circa 1/1000. Questa discrepanza è in gran parte attribuibile a una maggiore accuratezza diagnostica, resa possibile dall'avvento di nuove tecniche di imaging [64]. I PitNET risultano essere più frequenti nelle donne e rappresentano il tipo più comune di tumore pituitario tra bambini, adolescenti e giovani adulti. La prevalenza media dei PitNET clinicamente rilevanti è di circa 90 casi ogni 100.000 persone, con una predominanza di prolattinomi (PRLomi) (53%) e una maggiore prevalenza nelle donne, spesso diagnosticati in giovane età a causa di microprolattinomi sintomatici [65].

1.4.2. Classificazione e terapie

Con la nuova denominazione dei PitNET, è stata rivisitata la sua intera classificazione. In particolare, la nuova classificazione OMS introduce un sistema più dettagliato e preciso, basato sull'istogenesi e sulle caratteristiche molecolari dei tumori. La classificazione enfatizza l'origine cellulare dei tumori, correlandoli ai loro omologhi normali. I PitNET vengono così suddivisi in sottotipi sulla base dei fattori di trascrizione e delle caratteristiche morfologiche, riflettendo la loro derivazione dalle diverse linee dell'adenoipofisi (**Figura 11**) [66]. In particolare, questi sottotipi includono: PitNET lattotropi, somatotropi e tireotropi funzionanti, positivi per il fattore di trascrizione PIT1; PitNET corticotropi, positivi per il fattore di trascrizione TPIT; PitNET gonadotropi, positivi per il fattore SF1; sottotipi di PitNET non funzionanti [67].

PitNET Type	Subtype	Transcription factors	Hormones	LMWK
PIT1-lineage PitNETs				
Somatotroph tumors	Densely granulated somatotroph tumor	PIT1	GH, α-subunit	Perinuclear
	Sparsely granulated somatotroph tumor	PIT1	GH	Fibrous bodies (> 70%)
Lactotroph tumors	Sparsely granulated lactotroph tumor	PIT1, ERα	PRL (paranuclear dot-like)	Weak or negative
	Densely granulated lactotroph tumor		PRL (diffuse cytoplasmic)	Weak or negative
Mammosomatotroph tumor		PIT1, ERα	GH (predominant), PRL, α-subunit	Perinuclear
Thyrotroph tumor		PIT1, GATA3	α-subunit, βTSH	Weak or negative
Mature plurihormonal PIT1-lineage tumor		PIT1, ERα, GATA3	Monomorphic tumor cells with predominant GH expression and variable PRL, βTSH, and α-subunit	Perinuclear
Immature PIT1-lineage tumor		PIT1 (ERα, GATA3)	Monomorphic tumor cells with focal/variable staining for no hormones, or one or more of GH, PRL, βTSH, and/or α-subunit	Focal/variable
Acidophil stem cell tumor		PIT1, ERα	Monomorphic tumor cells with PRL (predominant) and GH (focal/variable)	Scattered fibrous bodies
Mixed somatotroph and lactotroph tumor*		PIT1, ERα**	Somatotroph tumor component: GH ± α-subunit depending on tumor subtype; lactotroph tumor component: PRL (diffuse or paranuclear depending on the subtype)	Tumor subtype characteristics
TPIT-lineage PitNETs				
Corticotroph tumors	Densely granulated corticotroph tumor	TPIT	ACTH and other POMC derivates	Strong, always diffuse
	Sparsely granulated corticotroph tumor			Variable (often diffuse)
	Crooke cell tumor			Perinuclear ring–like cytoplasmic
SF1-lineage PitNETs				
Gonadotroph tumor		SF1, ERα, GATA3	α-subunit, βFSH, βLH, or none	Variable or negative
PitNETs with no distinct cell lineage				
Plurihormonal tumor		Multiple combinations	Multiple combinations in a monomorphous tumor population	Variable
Null cell tumor		None	None	Variable

Figura 11. *Classificazione OMS 2022 dei tumori neuroendocrini ipofisari (PitNET) [66].*

La terapia di prima linea per i PitNET, eccezion fatta per i lattotropi che sono generalmente trattati con esclusiva terapia farmacologica, è la chirurgia ipofisaria transfenoidale (TSS) [68]. La temozolomide è stata per molto tempo la terapia chemioterapica capostipite, impiegata in monoterapia o in associazione con radioterapia o 5-fluorouracile. Negli ultimi

anni sono state investigate numerose pathways molecolari e biomarcatori prognostici con l'obiettivo di selezionare sottopopolazioni di pazienti potenzialmente responsive a specifici trattamenti. Il panorama terapeutico per i PitNET aggressivi si è notevolmente ampliato grazie ai progressi della ricerca traslazionale. Nonostante ciò, emerge sempre di più la necessità di identificare target terapeutici e trattamenti efficaci per la gestione dei PitNET aggressivi [55].

1.5. Il checkpoint immunitario PD-1/PD-L1

Uno dei meccanismi più studiati nei diversi tumori è l'asse programmed death 1 receptor/programmed death ligand 1 (PD-1/PD-L1), su cui si basano diverse strategie di immunoterapia [69]. PD-1 umano (CD279), codificato dal gene *PDCD1*, appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline. Il suo nome deriva dall'osservazione che la sua espressione aumenta in risposta a stimoli apoptotici in specifiche linee cellulari, suggerendo un ruolo nell'apoptosi [70]. A livello strutturale, PD-1 è una glicoproteina transmembrana con un peso molecolare di 50-55 kDa, composta da un singolo dominio extracellulare, una regione transmembrana e una coda citoplasmatica [71]. L'espressione di PD-1 è stata osservata in linfociti T, B, natural killer (NK) e macrofagi, e si comporta come inibitore dell'immunità sia adattativa che innata. Il suo ligando PD-L1 (B7-H1) è una glicoproteina generalmente espressa su cellule tumorali e immunitarie, che è responsabile di numerosi meccanismi di evasione immunitaria [72].

1.5.1. Via di segnalazione di PD-1/PD-L1

Durante l'attivazione delle cellule T, PD-1 subisce un cambiamento conformazionale quando interagisce con PD-L1, il quale consente lo spostamento di PD-1 verso i recettori dei linfociti T (TCR). Qui, PD-1 si accumula e la coda citoplasmatica viene fosforilata da chinasi della famiglia Src [73], [74]. I motivi tirosinici fosforilati fungono da siti di ancoraggio per la fosfatasi tirosinica SHP-2 [74], [75], la cui associazione attenua i principali eventi di segnalazione del recettore. Questo processo influisce anche su vie di segnalazione a valle, tra cui quelle che coinvolgono PI3K-Akt e RAS-MAPK (**Figura 12**) [74], [76].

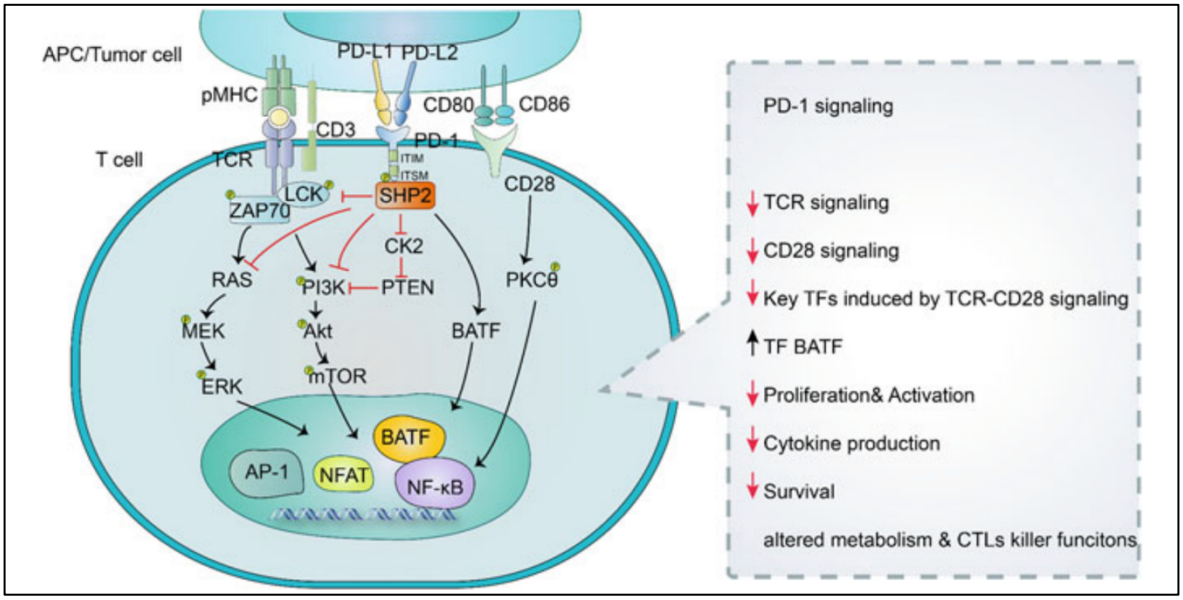


Figura 12. *Meccanismo di inibizione delle cellule T mediata da PD-L1 [74].*

1.5.2. L'asse PD-1/PD-L1 nei tumori pediatrici

PD-L1 è stato identificato in diversi tumori pediatrici, sia nelle cellule tumorali che nel loro microambiente. In particolare, è stata rilevata una frequente espressione di PD-L1 nel linfoma di Burkitt, glioblastoma multiforme e NB, suggerendo possibili applicazioni delle terapie anti-PD-1 in queste patologie difficili da trattare [77]. Recenti studi hanno mostrato come l'espressione di PD-L1 nel NB sia associata a prognosi infausta, suggerendo che l'evasione immunitaria da parte delle cellule tumorali possa rappresentare un meccanismo chiave nella progressione del NB. Nonostante il ruolo dell'asse PD-1/PD-L1 sia ancora poco conosciuto nel NB, i dati finora pubblicati suggeriscono che PD-L1 possa rappresentare un marker diagnostico e prognostico promettente in questo tumore [39].

2. SCOPO DEL LAVORO

Il ruolo oncogenico della variante di splicing alternativo TrkAIII nel NB è ormai ben noto. Lo skipping degli esoni 6 e 7, responsabili della prevenzione dell'attivazione spontanea del recettore, porta a una forma costitutivamente attiva e ligando-indipendente del recettore. Nel NB, TrkAIII è associato a malattia in stadio avanzato, recidive post-terapeutiche e prognosi infausta. La sua espressione è indotta da condizioni di stress cellulare, come ipossia, stress redox e stress del RE. Inoltre, TrkAIII è implicato nei meccanismi di resistenza a chemioterapici, come la doxorubicina. Grazie alla parziale condivisione strutturale e funzionale con le proteine di fusione Trk, TrkAIII può essere bersagliato con farmaci inibitori come Entrectinib e Larotrectinib. Studi clinici recenti hanno dimostrato l'efficacia di Entrectinib in un caso di NB metastatico avanzato, resistente alle terapie convenzionali, che esprimeva TrkAIII. Questi risultati sottolineano l'importanza di TrkAIII come potenziale target diagnostico, prognostico e terapeutico, non solo nel NB, ma anche in altre neoplasie.
Nel CMM, l'apparente paradosso tra l'amplificazione del gene *NTRK1* nei pazienti e l'effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare dovuto alla sovraespressione di TrkA full spliced in linee cellulari di melanoma solleva interrogativi sulla complessità del ruolo del recettore in questa patologia. Questo fenomeno, simile a quanto osservato precedentemente nei NB, suggerisce che lo splicing alternativo di TrkA possa avere un ruolo nella progressione tumorale, considerando che entrambi i tessuti derivano dalle cellule della cresta neurale.
I PitNET, tumori generalmente benigni ma che possono evolvere in fenotipi estremamente aggressivi e resistenti a terapie, presentano in generale poche mutazioni genetiche, ma sfruttano meccanismi alternativi per promuovere la crescita tumorale. In particolare, lo splicing alternativo è un meccanismo recentemente riscontrato in diversi tumori che presentano bassi tassi di mutazione e l'espressione genica regolata dall'ipossia (promotrice dello splicing alternativo di TrkAIII nel NB) favorisce il comportamento aggressivo dei PitNET.
L'evasione immunitaria è un ulteriore segno distintivo della progressione tumorale e l'attivazione del checkpoint immunitario PD-1/PD-L1 è stata identificata come un potenziale bersaglio in molteplici tumori pediatrici, incluso il NB.
Sulla base di queste osservazioni, lo scopo della presente tesi di Dottorato è di caratterizzare il profilo di espressione di TrkAIII in diversi tessuti di PitNET e CMM, nonché di valutare il potenziale ruolo della variante nella regolazione della proliferazione, della sopravvivenza

e dell'invasività in linee cellulari di melanoma. Ciò potrebbe aprire le porte all'eventuale utilizzo degli inibitori Trk su pazienti affetti da CMM e PitNET refrattari che presentano la variante di splicing TrkAIII ma non gli oncogeni di fusione Trk.

Inoltre, questo studio si propone di valutare l'eventuale implicazione di TrkAIII nella regolazione dell'asse PD-1/PD-L1 in modelli cellulari di NB, e di porre le basi per l'utilizzo di eventuali terapie farmacologiche combinate per il NB.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Reagenti e anticorpi

I reagenti Ditiotreitolo (DTT), Nerve Growth Factor (NGF), inibitore di PI3K LY-294,002, inibitore di MEK PD98059, fitoemoagglutinina (PHA), 12-O-tetradecanoil-forbol-D-acetato (TPA) e l'inibitore pan Trk Lestaurtinib sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Entrectinib è stato acquistato da Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). Gli anticorpi monoclonali mouse anti-TrkA (B3, sc-7268) e gli anticorpi monoclonali mouse anti-PD-L1 (1C10, sc-293425) sono stati forniti da SantaCruz (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorpo policlonale rabbit anti-TrkA fosforilato (pTrkA) Y490 (9141), l'anticorpo monoclonale rabbit anti-β-actina (4970), l'anticorpo policlonale rabbit anti-Akt (9272, 31 µg/mL) e l'anticorpo rabbit anti-Akt fosforilato (pAkt) Ser473 (4060, 91 µg/mL) sono stati acquistati da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). L'anticorpo monoclonale ricombinante neutralizzante rabbit anti-PD-L1 è stato fornito da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Gli anticorpi secondari anti-mouse e anti-rabbit coniugati con perossidasi di rafano (HRP) sono stati acquistati da Bethyl Laboratories Inc. (Fortis, Waltham, MA, USA). Gli anticorpi secondari anti-rabbit Alexa Flour 488 e anti-mouse Alexa Fluor 594 sono stati forniti da Life Technologies (1 mg/mL) (Fortis, Waltham, MA, USA). Il reagente ProlongTM Gold anti-fade con DAPI è stato fornito da Invitrogen (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2. Linee cellulari

La linea cellulare parentale di NB SH-SY5Y è stata utilizzata per ottenere trasfettanti stabili per pcDNA 3.1, TrkA e TrkAIII, come precedentemente descritto [22]. La linea cellulare SH-SY5Y proveniva da DR. U.P. Thorgeirsson (NCI, NIH Bethesda, MD, USA). Le linee cellulari di melanoma A375, *BRAF* V600E mutata e *NRAS* wildtype e di linfociti T Jurkat sono state acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VI, USA). Le cellule sono state coltivate in terreno di coltura RPMI 1640 o DMEM, integrato con 10% di siero bovino fetale, 1% di glutammina, 1% di penicillina/streptomicina (Euroclone, Milano, Italia) e zeocina (Thermo Fischer, Milano, Italia) per i trasfettanti stabili.

Le linee cellulari sono state coltivate fino al 70-80% di confluenza in piastre per colture cellulari Corning da 100 mm (Merk, Milano, Italia) per l'estrazione di proteine e RNA, e in

piastre da 96 pozzetti Corning (Merck, Milano, Italia) per l'analisi automatizzata di live cell imaging Incucyte (Sartorius, Goettigen, Germania). Il plasmide superavvolto pcDNA3.1 TrkA o pcDNA3.1 TrkAIII (6 µg) è stato trasfettato nelle cellule di melanoma A375 utilizzando mezzo di trasfezione TransIT-X2^{TM} (Mirus Bio, Madison, WI, USA). Il reagente di trasfezione TransIT-X2 e il plasmide (pcDNA3.1-TrkA o pcDNA3.1-TrkAIII) sono stati miscelati in un mezzo Opti-MEM privo di siero e incubati a temperatura ambiente per 15 minuti. Dopo l'incubazione, la miscela TransIT-plasmide è stata aggiunta alle cellule, che sono state coltivate per ulteriori 48 ore in mezzo completo per garantire un'espressione proteica sufficiente. Per le analisi di RNA e proteine, le cellule sono state incubate in presenza o assenza di DTT (5 mM), Lestaurtinib (100 nM) o Entrectinib (100 nM) per i tempi indicati.

3.3. Pazienti e tessuti

Sono stati valutati tessuti di pazienti affetti da CMM provenienti dai Dipartimenti di Dermatologia e Chirurgia dell'Università degli Studi dell'Aquila, di età compresa tra 35 e 92 anni. È stato ottenuto il consenso scritto da tutti i pazienti e lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Università dell'Aquila. Gli RNA sono stati purificati da 8 CMM primari freschi (pazienti 1–8), 19 CMM metastatici freschi (pazienti 9–27), tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) corrispondenti ai CMM freschi (pazienti 1–7, 9–15, 18–24, 26 e 27), tessuti CMM primari e metastatici FFPE provenienti da 3 pazienti (pazienti 28–30), per i quali non erano disponibili tessuti freschi, e 2 campioni di cute sana. Gli estratti proteici per Western blotting sono stati preparati da 3 CMM metastatici freschi (pazienti 9, 18 e 19). Per l'immunofluorescenza confocale, sono state analizzate sezioni di tessuto FFPE da 5 µm di 26 pazienti con CMM, comprendenti 7 CMM primari e 19 metastasi di CMM (pazienti 1–7, 9–15, 18–24 e 26–30). I tessuti FFPE dei pazienti 8, 16, 17 e 25 non erano disponibili per l'IF indiretta.

I PitNET di 53 pazienti sono stati rimossi chirurgicamente presso l'istituto Neuromed (Pozzili, Italia), 26 dei quali (49%) erano invasivi. I PitNETs esaminati in questo studio sono stati classificati in base alla loro linea di origine come segue: 24 PIT1-positivi, 24 SF1-positivi e 5 TPIT-positivi. Per alcuni pazienti, sono state fornite anche sezioni di tessuto FFPE da 4 µm per l'analisi di immunofluorescenza confocale. Questo studio è stato approvato dal Neuromed Institute Internal Review Board ed eseguito secondo le

dichiarazioni di Helsinki. È stato ottenuto il consenso informato scritto dai pazienti, ad eccezione di una minoranza di RNA archiviati da pazienti persi al follow-up.

3.4. Estrazione di RNA, RT-PCR e qRT-PCR

L'RNA totale a partire da linee cellulari e tessuti freschi di CMM è stato purificato utilizzando il kit di purificazione dell'RNA Quick-RNA™ Miniprep Kit (Zymo Research, Freiberg im Breisgau, GE). L'RNA totale a partire da FFPE di CMM è stato purificato da sezioni da 50 μm, utilizzando il kit di purificazione dell'RNA totale per tessuti FFPE Quick-RNA™ FFPE Miniprep (Zymo Research, Freiberg im Breisgau, GE). La purezza e la concentrazione dell'RNA sono state valutate utilizzando uno spettrofotometro Nanodrop, (Thermo Fisher Scientific, CA) e retrotrascritto con SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). L'RNA totale dei tessuti freschi di PitNETs è stato estratto utilizzando Trizol (Life Technologies, Monza, Italia) e retrotrascritto con il kit di trascrizione Wonder RT (Euroclone, Pero, Italia).

Le RT-PCR sono state eseguite utilizzando set di primer specifici per 18s rRNA, TrkA esoni 1–8, TrkA exoni 8-17, fsTrkA, TrkAIII, PD-L1, TrkA esoni 5-8, SRSF2, SF3B1, U2AF1, HIF-1α, HIF-2α, Xbp-1, JCV poliomavirus (**Tabella 1**). Gli amplificati sono stati corsi su gel di agarosio all'1.5% in TBE 1X (89 mM Tris Base, 89 mM Acido Borico, 2 mM EDTA pH 8.0) con bromuro di etidio ad una concentrazione finale di 0,5 μg/mL.

Le linee cellulari di NB sono state sottoposte a qRT-PCR SYBR green utilizzando Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA) con sistema Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Il cDNA è stato amplificato per l'analisi di espressione genica utilizzando set di primer specifici per PD-L1 e GAPDH. Tutte le RT-PCR e le qRT-PCR sono state eseguite in triplicato e ripetute almeno due volte.

3.5. Sequenziamento del DNA

Per il sequenziamento del DNA, i prodotti di RT-PCR TrkA esoni 1-8, TrkA esoni 8-17 e SF3B1 sono stati purificati da gel di agarosio, utilizzando il kit di estrazione da gel Jet Quick (Genomed, Harrow, Regno Unito) oppure il kit EuroSAP PCR enzymatic Clean-Up (Euroclone, Milano, Italia), ed analizzati mediante sequenziamento Sanger utilizzando il kit BigDye Terminator V.2.1. Cycle Sequencing (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA,

USA) ed il sequenziatore di DNA monocapillare Genetic Analyzer 3500 (Thermo-Fischer Scientific, CA, USA).

3.6. Estrazione proteica e Western Blotting

I tessuti freschi di CMM sono stati omogenizzati in un Tissue Lyser LT (Quiagen, Milano, Italia), a 5 oscillazioni al secondo per 3 minuti. Successivamente, i tessuti freschi di CMM e le linee cellulari sono stati lisati con tampone RIPA (1X PBS, 0,5% sodio desossicolato, 1% NP40, 0,1% SDS, 1 mM sodio ortovanadato, 1 mM PMSF, 1 µg/mL pepstatina A e aprotinina) per l'estrazione proteica totale. La concentrazione proteica è stata determinata dal saggio Bradford (Sigma-Aldrich), successivamente il campione completo di Reducing Buffer 1X è stato denaturato a 95°C per 5 minuti e sottoposto a SDS-PAGE. Le proteine sono state trasferite tramite elettroforesi su membrana di nitrocellulosa Hybond C+ (Amersham Int.UK). I siti di legame non specifici sulla membrana sono stati incubati per 1 ora in una soluzione TBS-T (15 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10% Tween 20) contenente il 5% di latte scremato in polvere (EuroClone) e incubati overnight in soluzione bloccante con gli anticorpi primari specifici a 4°C. Le membrane sono state quindi lavate con soluzione TBS-T e incubate in soluzione bloccante con gli anticorpi secondari appropriati coniugati con perossidasi di rafano (HRP) (Bethyl Laboratories Inc.). Le specie immunoreattive sono state rilevate tramite chemiluminescenza utilizzando ECL (Amersham Int, Bedford, Regno Unito) in un analizzatore di immagini ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare). Le immagini sono state analizzate mediante densitometria utilizzando il software ImageJ.

3.7. Immunofluorescenza (IF) indiretta

Le sezioni FFPE (5 µm per i CMM, 4 µm per i PitNET) sono state deparaffinate, reidratate e processate per il recupero dell'antigene mediante incubazione in tampone citrato di sodio 0,01 M (pH 6,0) per 20 minuti a 98°C. Le sezioni sono state bloccate in soluzione bloccante (1x PBS, BSA 1%, Tx100 0,03%), incubate overnight a 4°C con anticorpi primari anti-TrkA o anti-pTrkA, lavate in PBS e quindi incubate con gli appropriati anticorpi secondari Alexa Fluor per 2 ore a temperatura ambiente. I vetrini sono stati quindi lavati, montati nel reagente ProlongTM Gold anti-fade con DAPI e valutati mediante microscopia confocale a scansione (Leica TCS SP5 II). Le cellule SH-SY5Y parentali, TrkA e TrkAIII e le linee cellulari di melanoma A375 sono state coltivate su chamber slides in vetro Lab-Tek (MERK, Darmstadt

GE), fissate per 15 min in formaldeide al 4% a 37°C e permeabilizzate per 20 minuti in metanolo a -20°C. Le cellule sono state reidratate, bloccate in soluzione bloccante (1x PBS, BSA 1%, Tx100 0,03%) e incubate per 2 ore con gli anticorpi anti-PD-L1, anti-TrkA o anti-pTrkA. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate in PBS e incubate con l'appropriato anticorpo secondario Alexa Fluor per 2 ore a temperatura ambiente, montate con ProlongTM Gold anti-fade con DAPI (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e analizzate mediante microscopia confocale a scansione (Leica TCS SP5 II).

3.8. Saggio ELISA per la rilevazione di IL-2

Le linee cellulari SH-SY5Y parentali e trasfettate stabilmente con TrkAIII e TrkA (trattate o meno con 100 ng/ml di NGF overnight) sono state co-coltivate con le cellule T Jurkat in presenza di PHA (1 μg/ml) e TPA (60 ng/ml) in rapporto 8:1 per 48 ore in presenza degli inibitori Trk Lestaurtinib (100 nM) ed Entrectinib (1 μM) e dell'anticorpo neutralizzante anti-PD-L1 ricombinante (10 μg/ml). Le cellule di NB sono state pre-incubate con Lestaurtinib ed Entrectinib per 96 ore. Le concentrazioni di IL-2 nel surnatante cellulare sono state valutate mediante saggio ELISA (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). La quantità di IL-2 è stata misurata a 450 nm utilizzando il lettore di piastre ELISA Infinite M Plex (Tecan, Männedorf, Swiss). Il test è stato eseguito in triplicato e ripetuto almeno due volte.

3.9. Test di tossicità cellulare

La citotossicità nella linea cellulare di melanoma A375 è stata valutata in un arco temporale di 48 ore utilizzando Incucyte® Cytotox Green Dye (4633) per rilevare la mortalità cellulare. Le cellule trasfettate sono state trattate in presenza di Incucyte® Cytotox Green Dye (150 nM) e in presenza o assenza di DTT (5 mM), Lestaurtinib (100 nM) o Entrectinib (100 nM). Il software di analisi IncuCyte è stato programmato per acquisire immagini ad intervalli di tempo di 2 ore utilizzando un ingrandimento 10X. Il comportamento cellulare è stato analizzato mediante video e la morte cellulare è stata valutata come la media di cellule che presentavano assorbimento nucleare del colorante.

3.10. Analisi dei dati

Per l'analisi densitometrica delle RT-PCR, i gel di agarosio sono stati fotografati digitalmente e le immagini sono state analizzate dal software Image J utilizzando l'rRNA 18S come

controllo endogeno. I dati sono stati analizzati tramite test t-Student. I dati delle qRT-PCR sono stati acquisiti e analizzati utilizzando il software 7500 v2.3 (Thermo Fisher Scientific). La quantificazione relativa è stata eseguita con il metodo 2^-ΔΔCt utilizzando GAPDH come controllo endogeno per la normalizzazione. I dati sono stati analizzati tramite test One Way ANOVA. I dati dei saggi ELISA sono stati analizzati tramite test One Way ANOVA.
Le diverse analisi statistiche ed i relativi grafici sono stati effettuati utilizzando GraphPad Prism 10 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Valori di p-value ≤0,05 sono stati considerati statisticamente significati.

Target		Sequenza	Amplicone
18S rRNA	F	5′-AAACGGCTACCACATCCAAG-3′	100bp
	R	5′-CCTCGAAAGAGTCCTGTATTG-3′	
GAPDH	F	5’-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3’	96bp
	R	5’-GCAGTGATGGCATGGACTGT-3'	
PD-L1	F	5’-GTGGCATCCAAGATACAAACTCAA-3'	147bp
	R	5’-TCCTTCCTCTTGTCACGCTCA-3’	
TrkA ex1-8	F	5′-ATGCTGCGAGGCGGACGGCGC-3′	1114bp TrkA, 838bp TrkAIII
	R	5′-GGAGGCCTGGCCGAAGGGGTT-3′	
TrkA ex8-17	F	5′-AACCCCTTCGGCCAGGCCTCC-3′	1298bp
	R	5′-CTAGCCCAGGACATCCAGGTA-3′	
TrkA ex5-8	F	5′-AGAAGCTGCAGTGTCATGGG-3′	452bp TrkA, 176bp TrkAIII
	R	5′-ATTGAGCACGGAGCCATTGA-3′	
fsTrkA	F	5′-GGTGATGAAATCTGGGGGTCT-3′	132bp
	R	5′-TTGACCTGAACAGAGACCTCTGC-3′	
TrkAIII	F	5′-AATGCCAGCTGTGTCCCG-3′	139bp
	R	5'-TGGTCTCATTGAGCACGGAG-3′	
SRSF2	F	5′-CTCCCGATGTGGAGGGTATG-3	408bp
	R	5′-GAGATCGGCTGCGAGACC-3′	
SF3B1	F	5′-TGTGCATAAGATCCTCGTGGT-3′	693bp
	R	5′-ACACCATCTGTCCCACAACA-3′	
U2AF1	F	5′-CGGAGTATCTGGCCTCCATC-3′	606bp
	R	5′-GCAGCTCTCTGGAAATGGGCT-3′	
JCPyV T-Ag	F	5′-ATATTATGACCCCCAAAACCATG-3′	189bp
	R	5′-GGTAGAAGACCCTAAGGACTTTCC-3′	
HIF-1a	F	5′-TTCACCTGAGCCTAATAGTCC-3′	150bp
	R	5′-AAGTCTAAATCTGTGTCCTG-3′	
HIF-2a	F	5′-AGCCTCCATCTGCCATCAGTC-3′	121bp
	R	5′-CTTGCCATGCCTGACACCTTG-3′	
Xbp-1	F	5′-TTACGAGAGAAAACTCATGGC-3′	282bp
	R	5′-CGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC-3′	

Tabella 1. *Primer set e ampliconi per le RT-PCR e qRT-PCR.*

4. RISULTATI

4.1. Caratterizzazione dell'espressione e del ruolo di TrkAIII nel CMM

4.1.1. mRNA delle varianti di splicing alternativo di TrkA nei CMM

Le RT-PCR effettuate con il set di primer che amplificano TrkA dall'esone 1 all'esone 8 hanno rilevato prodotti corrispondenti a TrkA full spliced (1114 bp) e a 5 varianti di splicing (tra cui TrkAIII, con amplicone 838 bp) in campioni di RNA da 8 CMM primari e 19 CMM metastatici freschi. TrkA full spliced è stato rilevato nel 100% dei CMM primari e nel 7,9% dei CMM metastatici, così come in 2 campioni di cute sana. TrkAIII è stato rilevato nel 37,5% dei CMM primari e nel 63,2% dei CMM metastatici (**Figura 13A**). Lo splicing non convenzionale di Xbp-1, indicatore dell'attivazione del sistema di risposta al misfolding proteico (UPR) è stato rilevato nell'80% dei CMM primari freschi e nel 100% dei CMM metastatici, ma non nei campioni di cute sana (**Figura 13A**). La RT-PCR effettuata con il set di primer che amplificano TrkA dall'esone 8 all'esone 17 ha rilevato una singola banda di 1298 bp corrispondente a TrkA in tutti i CMM risultati positivi con l'RT-PCR di TrkA esoni 1-8 (**Figura 13B**). Tutte le varianti di splicing alternativo rilevate sono state sequenziate e caratterizzate come segue: 981 bp (TrkA Δ-esone 7), 838 bp (TrkAIII), 692 bp (TrkA Δ-esoni 5–7), 612 bp (TrkA Δ esoni 2–7(int7), con inclusione parziale dell'introne 7), 475 bp (TrkA Δ-esoni 2–7) (**Figura 13C**). Il sequenziamento dell'unica variante rilevata in RT-PCR TrkA esoni 8-17 mostra lo skipping dell'esone 9, coerente con l'isoforma TrkAI (**Figura 13D**). L'analisi *in silico* delle sequenze online (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) ha confermato che TrkAIII è l'unica variante di splicing in frame con il modulo di lettura espressa nei tessuti. Tutte le altre varianti contengono frameshift che determinano codoni di stop prematuri.

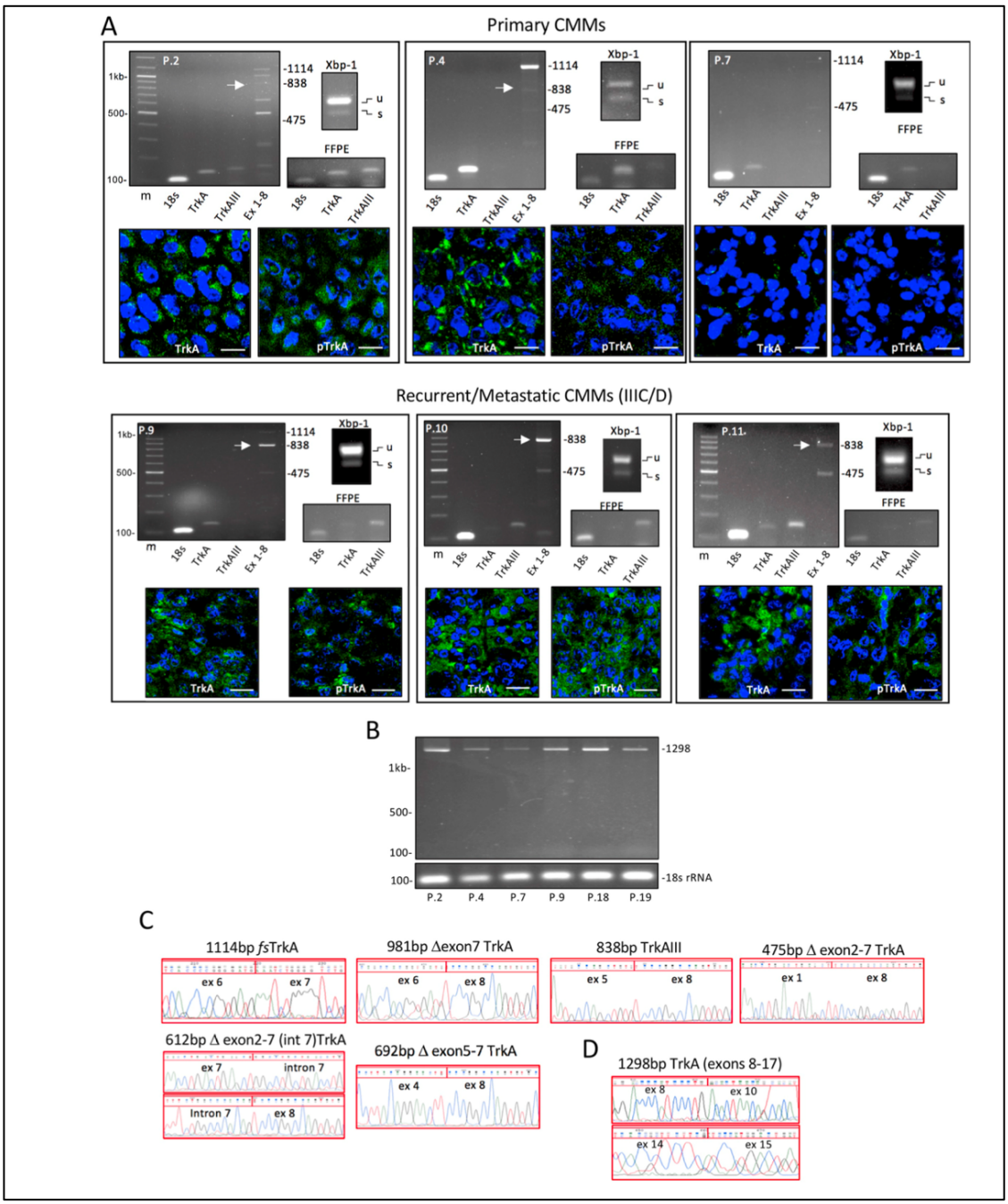
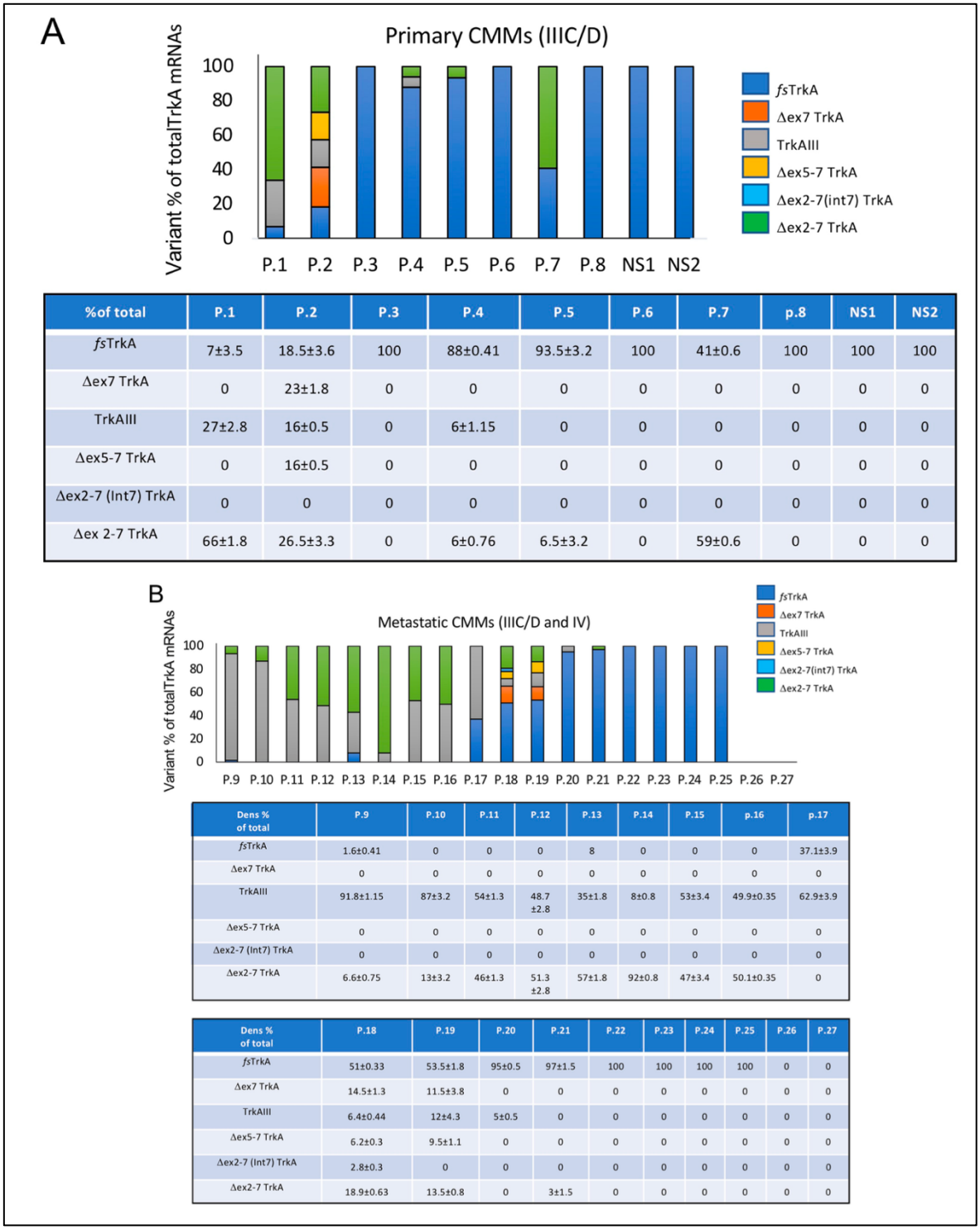


Figura 13. A) *RT-PCR rappresentative di rRNA 18S, TrkA, TrkAIII, TrkA esoni 1–8, Xbp-1 e IF indirette con anticorpi anti-TrkA e anti-pTrkA (verde) con nuclei colorati con DAPI (blu).* ***B)*** *RT-PCR di rRNA 18S e TrkA esoni 8-17 in una selezione rappresentativa di CMM.* ***C)*** *Elettroferogrammi del sequenziamento a partire da prodotti di RT-PCR TrkA esoni 1-8.* ***D)*** *Elettroferogrammi del sequenziamento a partire dal singolo prodotto di RT-PCR TrkA esoni 8-17.*

I rapporti densitometrici di TrkA full spliced rispetto a TrkAIII hanno rilevato un'espressione predominante di TrkAIII rispetto a quella di TrkA full spliced nel 12,5% dei CMM primari (**Figura 14A**) e nel 47,4% dei CMM metastatici (**Figura 14B**).



%of total	P.1	P.2	P.3	P.4	P.5	P.6	P.7	p.8	NS1	NS2
*fs*TrkA	7±3.5	18.5±3.6	100	88±0.41	93.5±3.2	100	41±0.6	100	100	100
Δex7 TrkA	0	23±1.8	0	0	0	0	0	0	0	0
TrkAIII	27±2.8	16±0.5	0	6±1.15	0	0	0	0	0	0
Δex5-7 TrkA	0	16±0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
Δex2-7 (Int7) TrkA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Δex 2-7 TrkA	66±1.8	26.5±3.3	0	6±0.76	6.5±3.2	0	59±0.6	0	0	0

Dens % of total	P.9	P.10	P.11	P.12	P.13	P.14	P.15	p.16	p.17
*fs*TrkA	1.6±0.41	0	0	0	8	0	0	0	37.1±3.9
Δex7 TrkA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TrkAIII	91.8±1.15	87±3.2	54±1.3	48.7 ±2.8	35±1.8	8±0.8	53±3.4	49.9±0.35	62.9±3.9
Δex5-7 TrkA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Δex2-7 (Int7) TrkA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Δex2-7 TrkA	6.6±0.75	13±3.2	46±1.3	51.3 ±2.8	57±1.8	92±0.8	47±3.4	50.1±0.35	0

Dens % of total	P.18	P.19	P.20	P.21	P.22	P.23	P.24	P.25	P.26	P.27
*fs*TrkA	51±0.33	53.5±1.8	95±0.5	97±1.5	100	100	100	100	0	0
Δex7 TrkA	14.5±1.3	11.5±3.8	0	0	0	0	0	0	0	0
TrkAIII	6.4±0.44	12±4.3	5±0.5	0	0	0	0	0	0	0
Δex5-7 TrkA	6.2±0.3	9.5±1.1	0	0	0	0	0	0	0	0
Δex2-7 (Int7) TrkA	2.8±0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Δex2-7 TrkA	18.9±0.63	13.5±0.8	0	3±1.5	0	0	0	0	0	0

Figura 14. *Istogrammi e tabelle che mostrano le differenze nei prodotti RT-PCR di TrkA esoni 1-8 in* ***A)*** *8 CMM primari freschi e* ***B)*** *19 CMM metastatici freschi.*

TrkA full spliced risultava predominante su TrkAIII nell'87,5% dei CMM primari e nel 42,1% dei CMM metastatici. I prodotti di RT-PCR specifici per TrkA full spliced (132 bp) e per TrkAIII (139 bp) hanno mostrato risultati concordanti rispetto a quanto precedentemente descritto con il precedente set di primer in tutti i CMM freschi primari e metastatici, nei

corrispondenti tessuti FFPE e nei tessuti FFPE primari e metastatici per i quali non erano disponibili tessuti freschi.

4.1.2. Espressione proteica delle varianti di TrkA in campioni di CMM

In Western Blotting, le specie immunoreattive specifiche per TrkA e pTrkA da 100 kDa, riconducibili a TrkAIII, sono state rilevate in estratti proteici di tre CMM metastatici, che esibiscono l'espressione del trascritto di TrkAIII. Sono state inoltre rilevate specie immunoreattive più piccole (<48 kDa) negli stessi CMM metastatici (**Figura 15**).

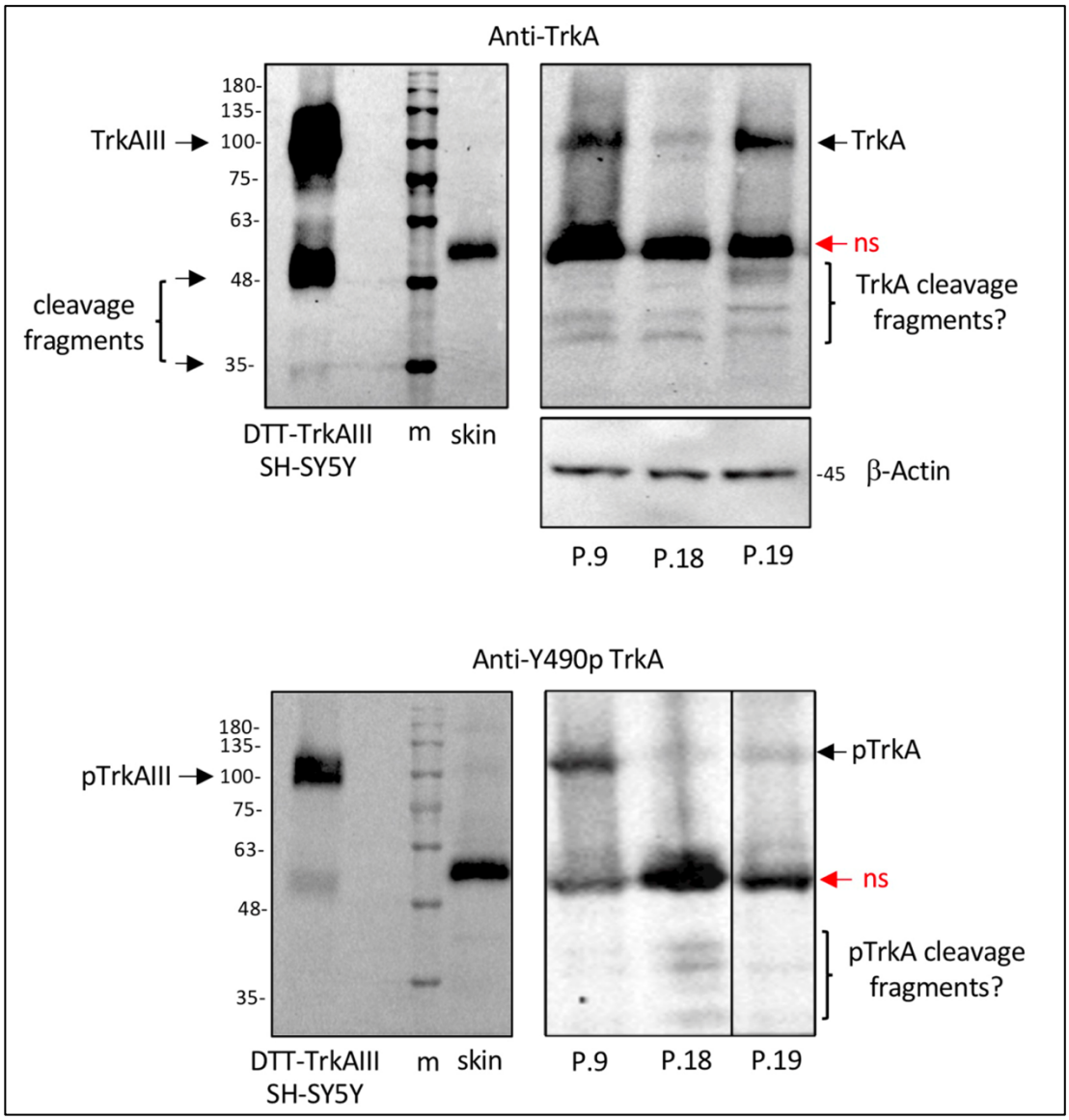


Figura 15. *Western Blotting che mostrano le specie immunoreattive specifiche per TrkA e e pTrkA e specie non specifiche (ns), in estratti proteici di cellule di NB SH-SY5Y trasfettate stabilmente con TrkAIII trattate con DTT, in un estratto di cute sana e in estratti da 3 CMM metastatici. Sono inoltre indicati i potenziali prodotti di clivaggio di TrkA e pTrkA.*

In IF indiretta, l'immunoreattività per le isoforme di TrkA è stata rilevata nel 90% dei CMM primari e nell'84,2% dei CMM metastatici. L'immunoreattività per le isoforme di pTrkA

intracellulare è stata rilevata nel 50% dei CMM primari e nel 79% dei CMM metastatici (**Figura 13A**).

4.1.3. Espressione di TrkAIII nella linea cellulare di melanoma A375

Le cellule di melanoma A375 con mutazione *BRAF* (V600E) sono state trattate con l'agente riducente DTT, che ha incrementato significativamente l'espressione genica di TrkAIII a 6 e 12 ore (**Figura 16A**) e ha determinato lo splicing non convenzionale di Xbp-1 (**Figura 16B**). Nelle analisi di IF indiretta, il TrkA endogeno espresso nelle cellule A375 è stato fosforilato in seguito a un trattamento di 6 ore con DTT in assenza ma non in presenza di Lestaurtinib (**Figura 16C**). In Western Blotting, il TrkA non fosforilato da 130–140 kDa, rilevato negli estratti cellulari A375 non trattati, è stato convertito in un'isoforma di pTrkA di circa 100 kDa, in seguito a un trattamento di 6 ore con DTT in assenza ma non in presenza di Lestaurtinib (**Figura 16D**).

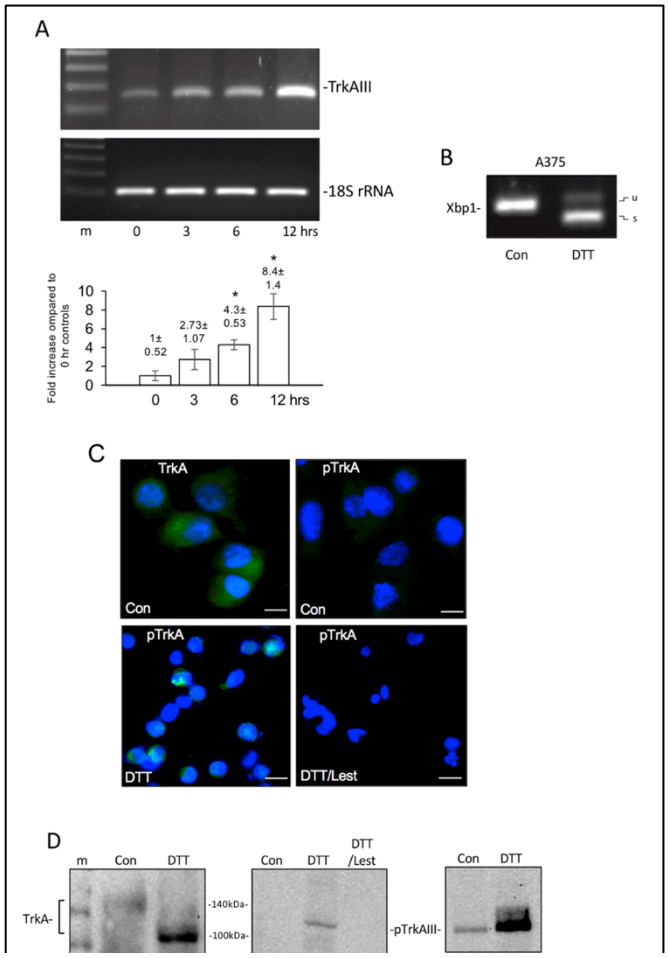


Figura 136. ***A****) RT-PCR con un set di primer specifici per TrkAIII e relativo istogramma. I risultati dell'istogramma sono espressi come aumento medio di fold densitometrici ± SE nell'espressione di TrkAIII, rispetto ai controlli a 0 ore in 3 esperimenti indipendenti.* ***B****) RT-PCR di Xbp-1 in cellule A375 dopo trattamento con DTT per 6 ore.* ***C****) IF che mostra immunoreattività per TrkA e pTrkA dopo trattamento con DTT in assenza e in presenza di Lestaurtinib.* ***D****) Western Blotting di estratti totali della linea cellulare A375 dopo trattamento con DTT per 6 ore in assenza e in presenza di Lestaurtinib.*

4.1.4. Trasfezioni in transient di TrkA full spliced e TrkAIII nella linea cellulare di melanoma A375

Il comportamento delle A375 trasfettate in transient con TrkA full spliced e di TrkAIII è stato confrontato in condizioni di controllo e successivamente a trattamento con DTT. In Western Blotting, TrkA full spliced ha mostrato una compromissione della maturazione della proteina glicosilata da 140 kDa senza attivazione da NGF esogeno. Al contrario, TrkAIII è espresso come proteina costitutivamente fosforilata da 100 kDa, la cui fosforilazione è significativamente aumentata dal trattamento con DTT. L'inibitore di Trk Lestaurtinib ha ridotto la fosforilazione di TrkAIII aumentata dal DTT al di sotto dei livelli di fosforilazione costitutiva di TrkAIII. Sono stati inoltre valutati gli effetti del trattamento con DTT sulla fosforilazione di Akt. In Western Blotting, il DTT ha aumentato significativamente la fosforilazione costitutiva di Akt nelle A375 TrkAIII ma non nelle A375 TrkA full spliced. Lestaurtinib ha ridotto la fosforilazione costitutiva di Akt aumentata dal DTT nei trasfettanti TrkAIII ma non nei trasfettanti TrkA full spliced (**Figura 17**).

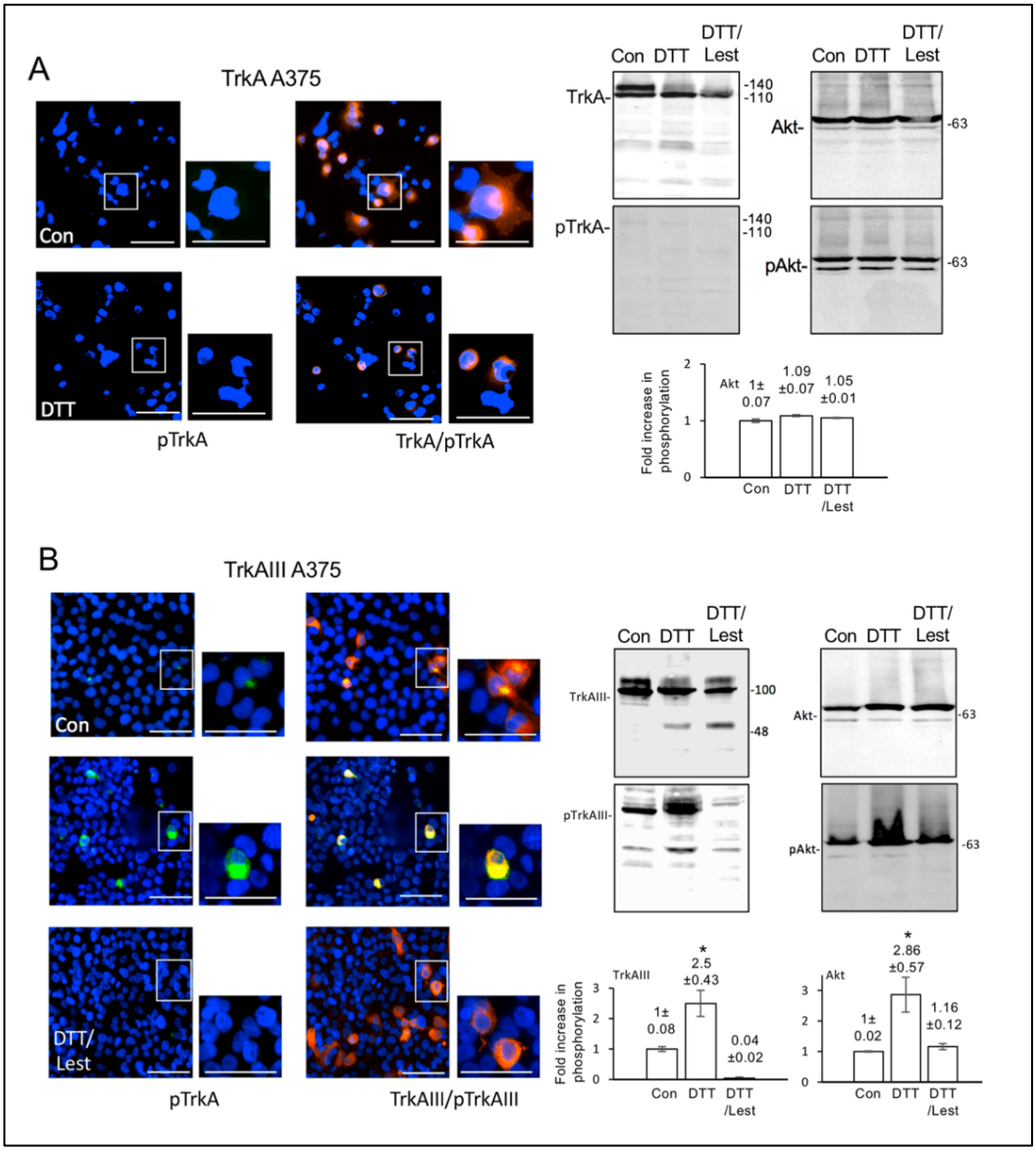


Figura 17. A) *IF che mostrano TrkA e pTrkA (arancione) nei trasfettanti in transient A375 TrkA full spliced non trattati e trattati con DTT, e WB che mostra l'immunoreattività per TrkA, pTrkA, Akt, pAkt in assenza e in presenza di DTT/Lestaurtinib.* ***B)*** *IF che mostrano TrkAIII (arancione) e pTrkAIII (verde), con sovrapposizione delle due (giallo) nei trasfettanti in transient A375 TrkAIII non trattati e trattati con DTT in assenza e in presenza di Lestaurtinib e WB che mostra l'immunoreattività per TrkA, pTrkA, Akt, pAkt in assenza e in presenza di DTT/Lestaurtinib.*

4.1.5. Test di citotossicità

Nei test di citotossicità Incucyte, la percentuale di cellule che presentavano accumulo nucleare di Cytotox Green Dye, come indice di morte cellulare, è stata confrontata nelle cellule A375 trasfettate in transient con TrkA full spliced o TrkAIII, in un arco temporale di 48 ore di trattamento con DTT. Il DTT non ha indotto un assorbimento significativo del colorante nucleare prima di 24 ore. A 24 ore, il 7,25% dei trasfettanti TrkA full spliced ha mostrato assorbimento del colorante, che è aumentato al 31,18% entro 36 ore e al 64,6% entro 48 ore. Nei trasfettanti TrkAIII, l'assorbimento del colorante è stato ridotto

significativamente al 5,48% dopo 24 ore, al 18,46% a 36 ore e al 35,68% entro 48 ore rispetto ai trasfettanti TrkA full spliced. Il co-trattamento del DTT con Lestaurtinib o Entrectinib non ha alterato significativamente l'assorbimento del colorante nei trasfettanti TrkA full spliced, ma ha incrementato l'assorbimento del colorante nei trasfettanti TrkAIII a 24, 36 e 48 ore (**Figura 18**).

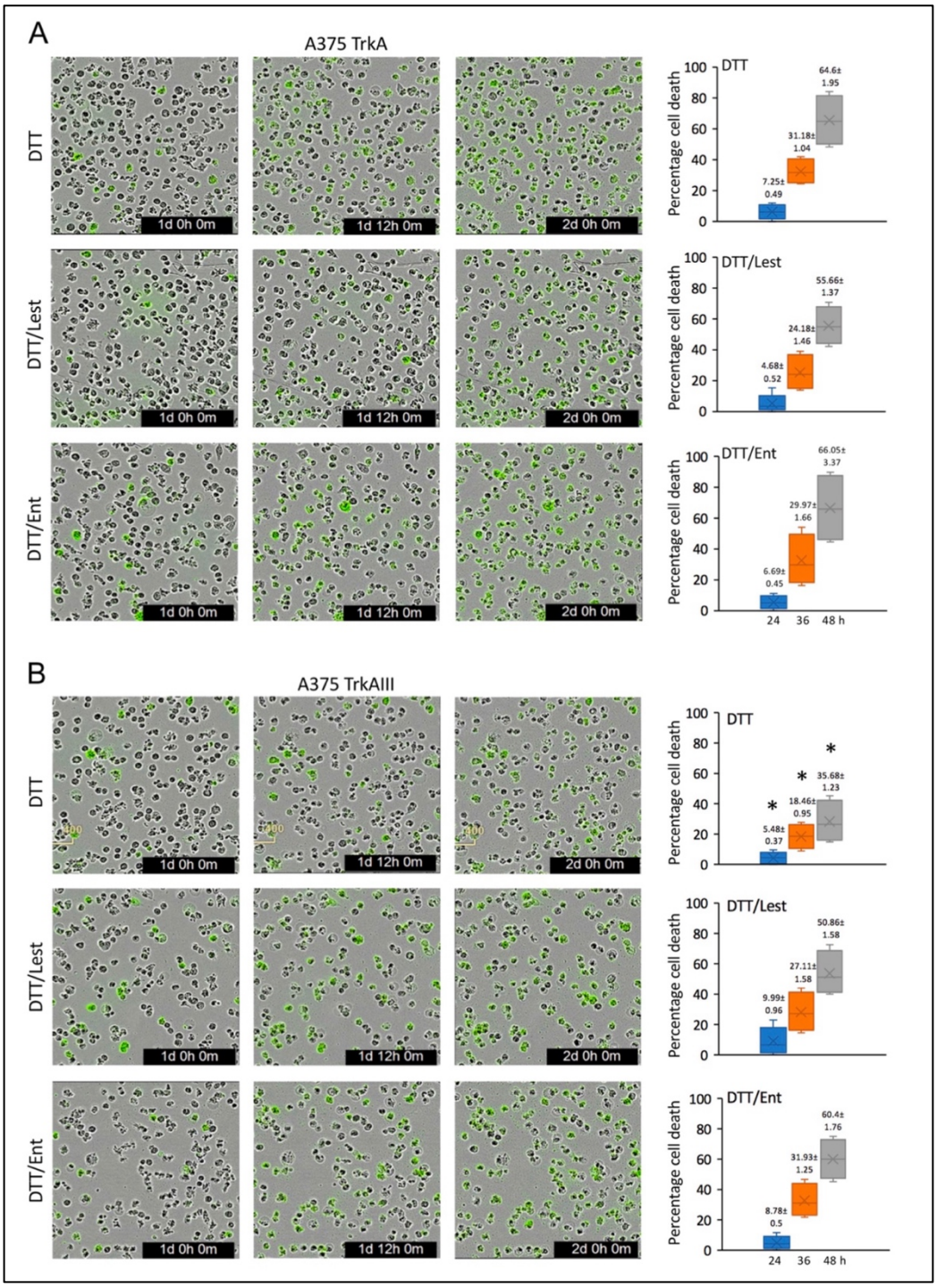


Figura 18. A) *Test di citotossicità che mostra l'assorbimento del colorante nucleare nei trasfettanti A375 TrkA full spliced e* ***B)*** *nei trasfettanti A375 TrkAIII, dopo trattamento con DTT per 24, 36 e 48 ore, in assenza e in presenza di Lestaurtinib ed Entrectinib con relativi box plot. (I dati sono espressi come media percentuale ± SE in 3 esperimenti indipendenti. *p<0,05).*

4.2. Caratterizzazione dell'espressione e del ruolo di TrkAIII nei PitNET

4.2.1. mRNA delle varianti di splicing alternativo di TrkA nei PitNET

Le RT-PCR effettuate con il set di primer che amplificano TrkA dall'esone 1 all'esone 8 hanno rilevato tre varianti di splicing che sono state caratterizzate mediante sequenziamento come TrkA full spliced, TrkAIII e TrkA Δ-esoni 2–7. La RT-PCR effettuata con il set di primer che amplificano TrkA dall'esone 8 all'esone 17 ha rilevato una singola sequenza di 1298 bp corrispondente a TrkA. TrkA full spliced e TrkAIII sono stati identificati come gli unici trascritti in frame espressi nei PitNET (**Figura 19**).

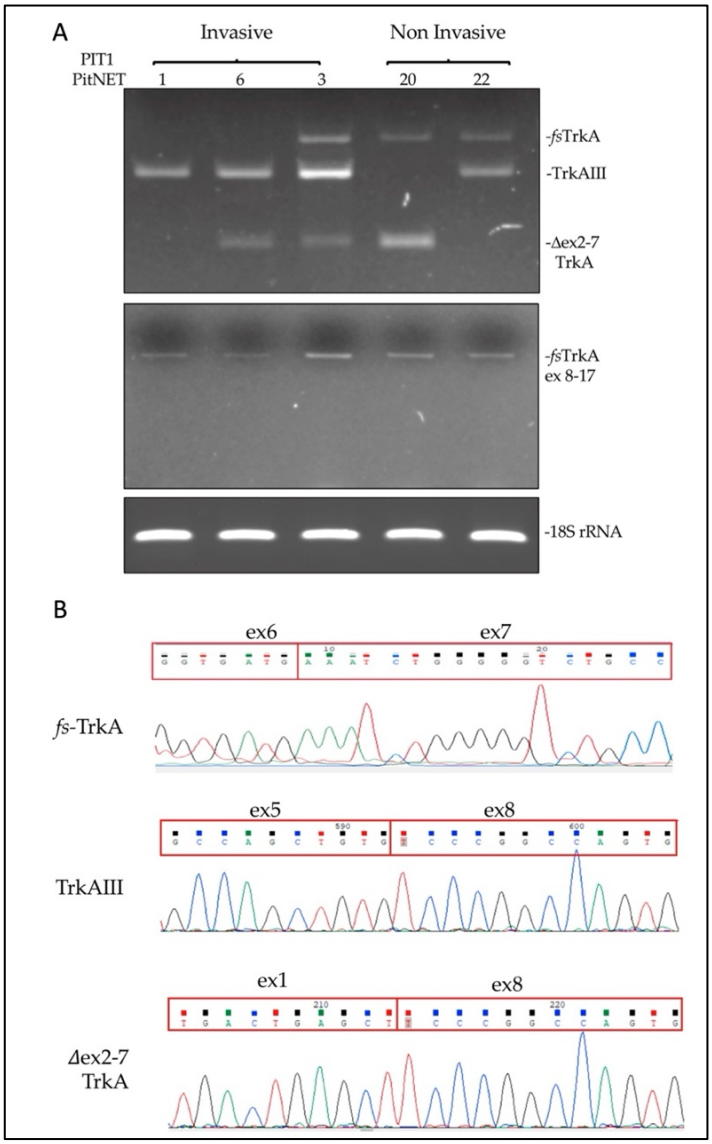


Figura 19. A) *RT-PCR rappresentative che mostrano i prodotti TrkA full spliced, TrkAIII e TrkA Δ-esoni 2-7 generati utilizzando il set di primer TrkA esoni 1-8 e il prodotto singolo utilizzando il set di primer TrkA esoni 8-17.* ***B)*** *Elettroferogrammi che mostrano le giunzioni di splicing degli esoni 6–7 di TrkA, 5–8 di TrkAIII e 1–8 di TrkA Δ-esoni 2-7 nei prodotti di RT-PCR purificati in un PitNET PIT1 invasivo.*

Sono state successivamente effettuate delle RT-PCR con il set di primer che amplifica TrkA dall'esone 5 all'esone 8, che producono un amplicone di 452 bp per TrkA full spliced e di 176 bp per TrkAIII. Queste hanno rilevato l'espressione di TrkAIII in tutti i PitNET invasivi e in circa l'86% dei PitNET non invasivi. Questo set di primer ha anche confermato l'espressione esclusiva del trascritto TrkAIII in due PitNET invasivi PIT1 e in un PitNET invasivo SF1, così come in tre PitNET invasivi e un PitNET non invasivo TPIT. Al contrario, l'espressione esclusiva di TrkA full spliced è stata rilevata solo in tre PitNET non invasivi PIT1 e un PitNET non invasivo SF1, ma in nessun PitNET invasivo. Nelle analisi densitometriche, i rapporti RT-PCR TrkAIII/TrkA nei singoli PitNET invasivi variavano dal 21,7% al 100% e nei PitNET non invasivi variavano dallo 0% al 91,8%. I rapporti TrkAIII/TrkA erano significativamente più alti nei PitNET invasivi rispetto a quelli non invasivi. Quando raggruppati in sottotipi, i rapporti TrkAIII/TrkA erano significativamente più alti nei PitNET invasivi PIT1 rispetto ai PitNET non invasivi PIT1. Al contrario, i rapporti erano simili nei PitNET SF1 invasivi e non invasivi. I PitNET TPIT invasivi mostravano tutti un'espressione esclusiva (100%) di TrkAIII, ma il numero limitato ha impedito un confronto statistico. I rapporti TrkAIII/TrkA erano significativamente diversi tra i tre sottotipi PIT1, SF1 e TPIT (**Figura 20**).

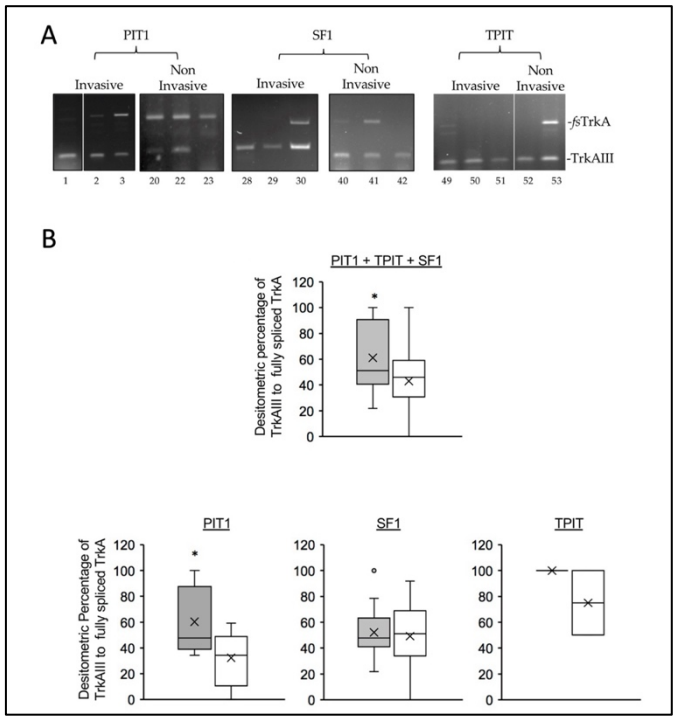


Figura 20. A) *RT-PCR che mostrano i livelli di espressione genica di TrkAIII e TrkA full spliced nei cDNA di PitNET PIT1, SF1 e TPIT rappresentativi invasivi e non invasivi.* ***B)*** *Box plot che mostrano i confronti densitometrici dei rapporti TrkAIII/TrkA full spliced in tutti i PitNET invasivi (grigio) e non invasivi (bianco) (PIT1 + TPIT + SF1), così come nei PitNET raggruppati nei sottotipi PIT1, SF1 e TPIT. (*p < 0,05).*

4.2.2. Espressione proteica delle varianti di TrkA mediante IF

A causa della limitata disponibilità dei tessuti, l'immunoreattività delle isoforme TrkA non fosforilate e fosforilate è stata valutata in un sottogruppo rappresentativo di quattro PitNET invasivi e tre non invasivi e confrontata con i rapporti individuali di TrkA full spliced e TrkAIII ottenuti in RT-PCR. I livelli più elevati di immunoreattività delle isoforme TrkA e pTrkA e sono stati rilevati in un PitNET TPIT invasivo che esibiva espressione esclusiva di TrkAIII e in un PitNET TPIT non invasivo che esibiva espressione approssimativamente uguale di TrkA full spliced e TrkAIII in RT-PCR. Sono stati inoltre osservati livelli inferiori di immunoreattività in tre PitNET SF1 invasivi che esibivano diversi rapporti TrkAIII/TrkA in RT-PCR (**Figura 21**).

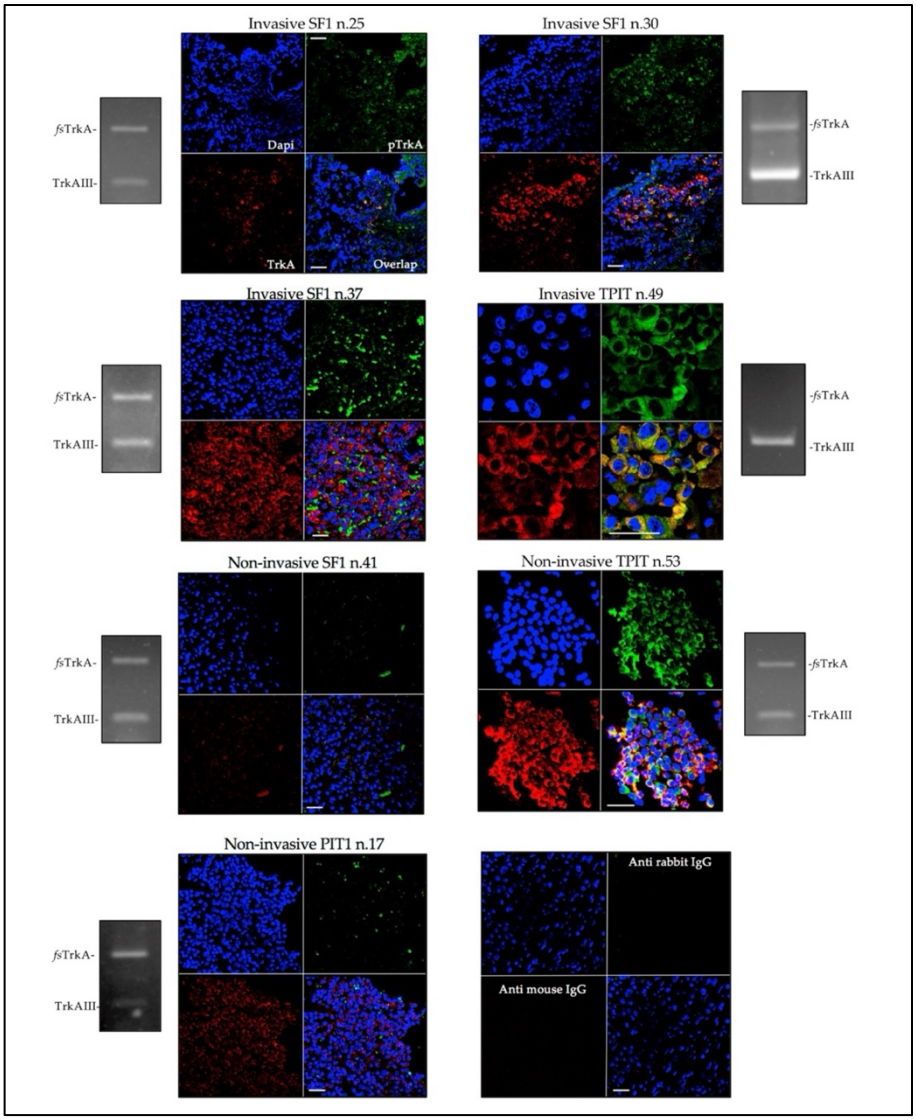


Figura 21. *IF confocale che mostra immunoreattività per TrkA (rosso) e pTrkA (verde) in 3 PitNET SF1 invasivi, 1 PitNET TPIT invasivo, 1 PitNET SF1 non invasivo, 1 PitNET TPIT non invasivo e 1 PitNET PIT1 non invasivo. I nuclei sono colorati con DAPI (blu).*

4.2.3. Confronto dell'espressione genica tra le varianti di TrkA e i fattori di ipossia

Il potenziale coinvolgimento dell'ipossia nello splicing alternativo di TrkAIII nei PitNET è stato valutato mediante RT-PCR dell'espressione di HIF-2α e HIF-1α nei cDNA che esprimevano TrkAIII, per i quali erano disponibili gli RNA. L'analisi densitometrica ha rilevato che i PitNET invasivi esprimevano livelli di HIF-2α significativamente più alti rispetto ai PitNET non invasivi. Inoltre, i livelli di HIF-2α erano significativamente più alti nei PitNET PIT1 invasivi rispetto a quelli non invasivi ma non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa tra PitNET SF1 invasivi e non invasivi.

I PitNET TPIT invasivi, sebbene in numero non sufficiente per confronti statistici limitati al sottotipo, mostravano elevati livelli di espressione di HIF-2α rispetto alle controparti non invasive (**Figura 22A**). Non è stata rilevata una differenza significativa tra l'espressione di HIF-2α nei sottotipi combinati invasivi e non invasivi di PIT1, SF1 e TPIT. Sebbene TrkAIII e HIF-2α fossero significativamente elevati nei PitNET invasivi PIT1, non è stata confermata una correlazione diretta tra i livelli di HIF-2α e i rapporti di RT-PCR TrkAIII/TrkA full spliced nei singoli PitNET invasivi o non invasivi. I livelli di HIF-1α non erano presentavano differenze significative nei PitNET invasivi rispetto a quelli non invasivi (**Figura 22B**).

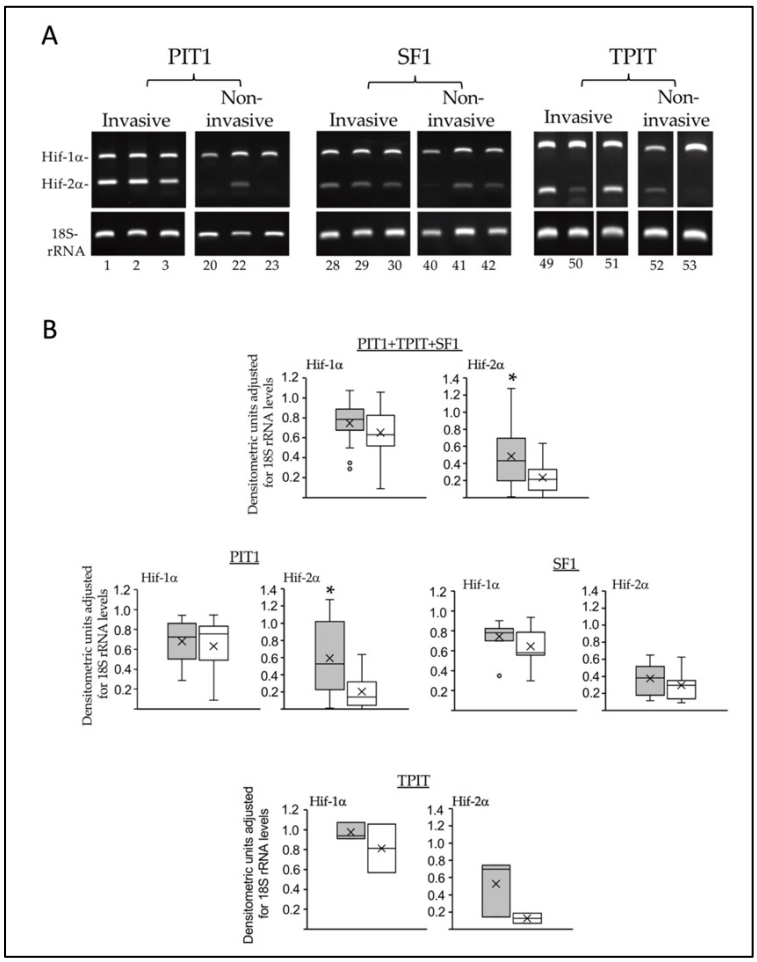


Figura 22. A) *RT-PCR che mostra l'espressione genica relativa di HIF-1α e HIF-2α in PitNET PIT1, SF1 e TPIT invasivi e non invasivi rappresentativi.* ***B)*** *Box plot che confrontano l'espressione genica di HIF-1α e HIF-2α in tutti i PitNET invasivi (grigio) e non invasivi (bianco) e nei PitNET raggruppati nei diversi sottotipi (* p < 0,05).*

4.2.4. Valutazione della correlazione tra l'espressione di TrkAIII e la presenza mutazioni/espressione deregolata dei fattori di splicing

Considerando che i PitNET lattotropi si associano a mutazioni hotspot somatiche del gene SF3B1 [60], sono stati esaminati i cDNA di 22 PitNET lattotropi positivi a TrkAIII in RT-PCR per la presenza delle seguenti mutazioni a carico di SF3B1: c.1866 G > T; c.1873 C > T; c.1874 G > A; c.1986 C > G; c.1996 A > C; c.2098 A > G e c.2225 G > A. Nessuno dei campioni analizzati presentava le mutazioni prese in esame (**Figura 23**).

Considerando evidenze di un rapporto tra l'espressione deregolata dei fattori di splicing e la patogenesi dei PitNET [78], sono state inoltre valutate eventuali alterazioni nell'espressione genica dei fattori di splicing SF3B1, U2AF1 e SRSF2 mediante RT-PCR. Non sono state rilevate variazioni significative nei livelli di espressione di SF3B1, U2AF1 o SRSF2 confrontando PitNET invasivi e non invasivi o i singoli sottotipi (**Figura 24**).

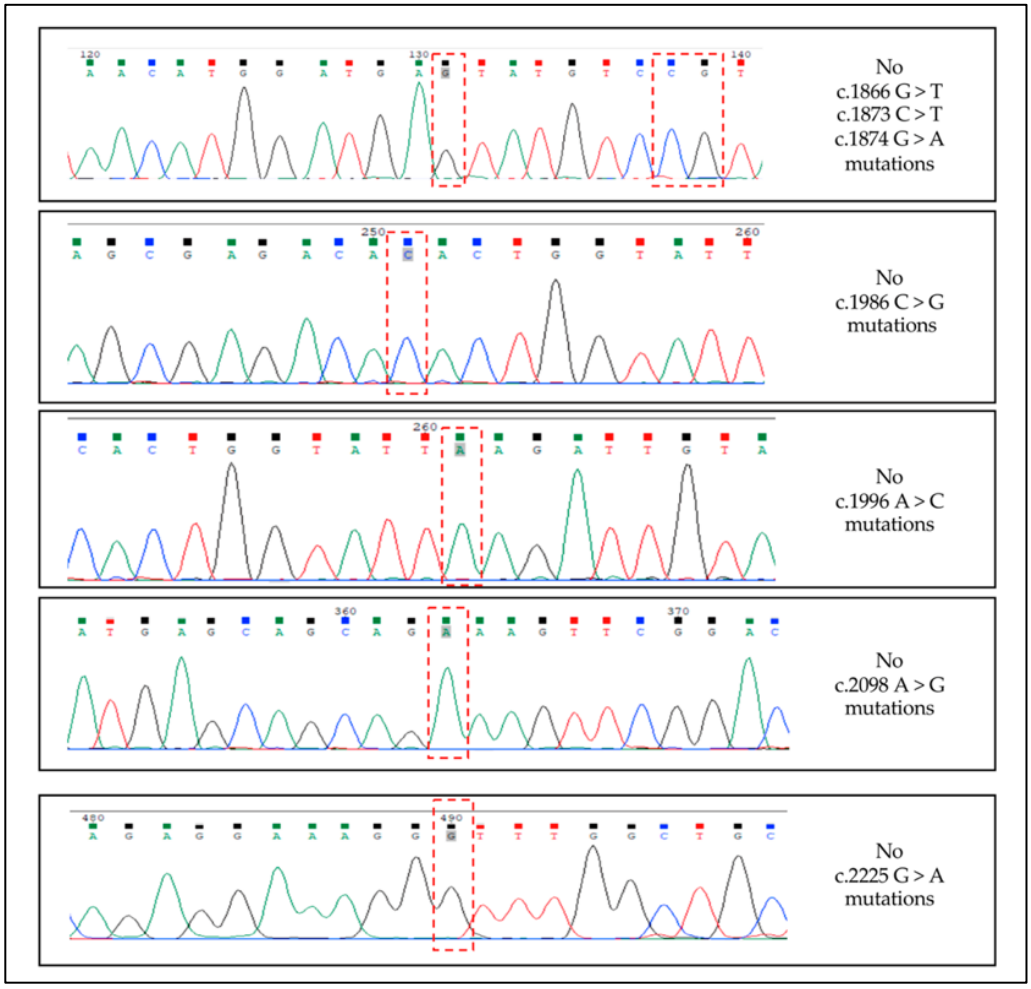


Figura 23. *Elettroferogrammi rappresentativi di SF3B1 che mostrano l'assenza di mutazioni di SF3B1 in c.1886, c.1873, c.1874, c.1986, c.1996, c.2098 e c.2225 associate ai PitNET.*

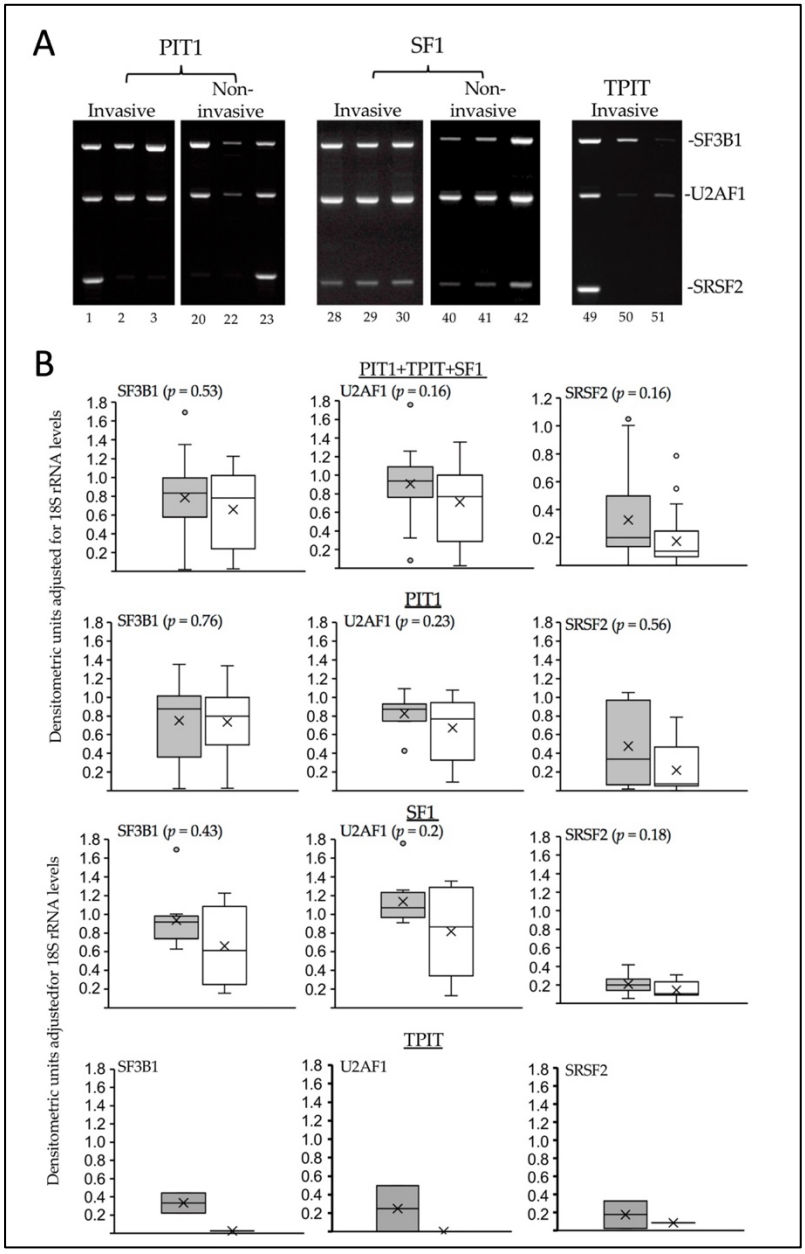


Figura 24. A) *RT-PCR che mostrano i prodotti SF3B1 (693 bp), U2AF1 (606 bp) e SRSF2 (408 bp) in PitNET PIT1, SF1 e TPIT invasivi e non invasivi rappresentativi.* ***B)*** *Box plot che mostrano confronti densitometrici dei livelli di SF3B1, U2AF1 e SRSF2 in tutti i PitNET invasivi (grigio) e in tutti i PitNET non invasivi (bianco) e nei PitNET raggruppati nei diversi sottotipi.*

1.1.1. Valutazione dell'espressione genica del Large T Antigen di JCPyV e dello splicing non convenzionale di Xbp-1

Mediante RT-PCR dello splicing non convenzionale di Xbp-1 è stato valutato un potenziale ruolo dell'attivazione dell'UPR nello splicing alternativo di TrkAIII dei PitNET. Lo splicing non convenzionale di Xbp-1 non è stato rilevato in nessuno dei 50 cDNA di PitNET analizzati (**Figura 25**). Inoltre, mediante RT-PCR è stata valutata l'espressione genica del large T antigen di JCPyV (come potenziale indicatore di infezione da JCPyV). L'espressione

genica del large T antigen di JCPyV non è stata rilevata nei PitNET che presentano splicing alternativo di TrkAIII (dati non mostrati).

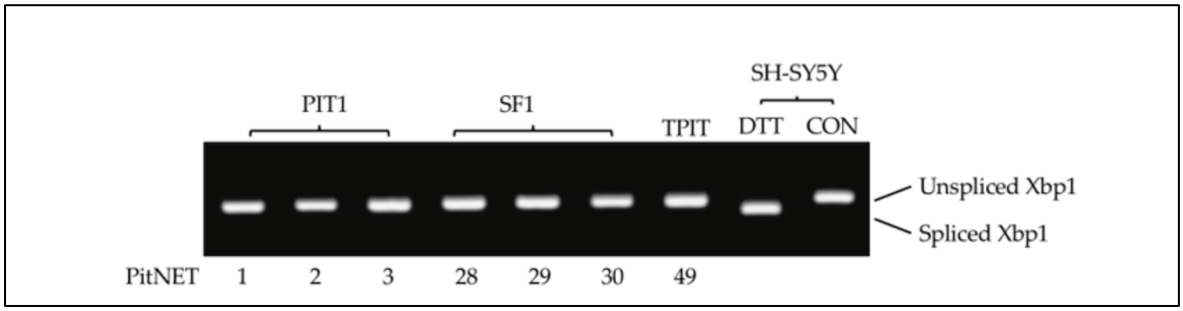


Figura 25. *RT-PCR per la rilevazione dello splicing non convenzionale di Xbp-1 in PitNET PIT1, SF1 e TPIT rappresentativi e nelle cellule di NB SH-SY5Y trattate con DTT e non trattate, utilizzate rispettivamente come controllo positivo e negativo dello splicing non convenzionale di Xbp-1.*

4.3. Valutazione del ruolo di TrkAIII nell'espressione di PD-L1 in linee cellulari di NB

4.3.1. Espressione genica di PD-L1 nei trasfettanti stabili SH-SY5Y

L'espressione genica di PD-L1 valutata mediante RT-PCR e qRT-PCR mostra un'elevata espressione di PD-L1 nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII e SH-SY5Y TrkA trattate con NGF (100 ng/mL per 6 ore) rispetto alle cellule SH-SY5Y pcDNA e alle cellule SH-SY5Y TrkA non trattate (**Figura 26**).

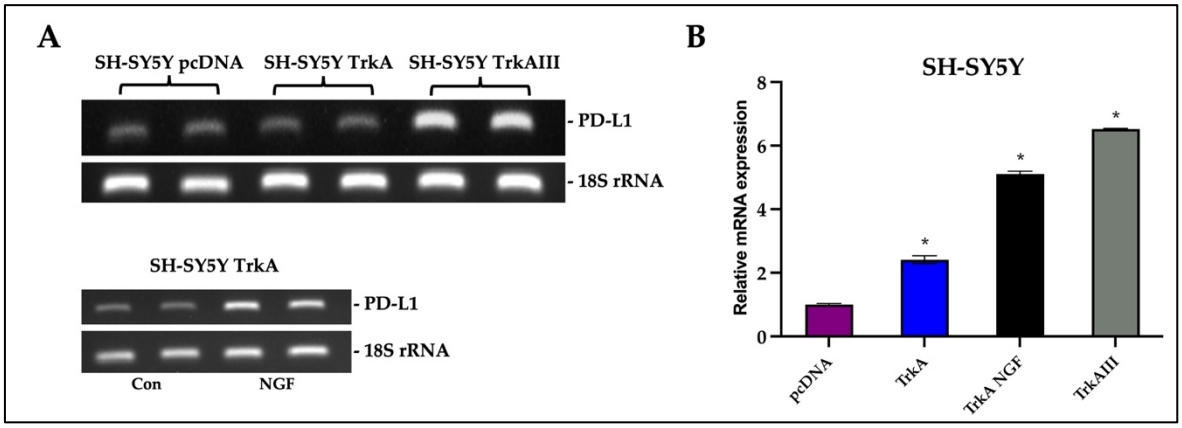


Figura 26*. (**A**) RT-PCR e (**B**) qRT-PCR per l'espressione genica di PD-L1 nei trasfettanti stabili pcDNA, TrkA, TrkA-NGF e TrkAIII della linea cellulare di NB SH-SY5Y. (I dati sono visualizzati come media ± SE di 3 esperimenti indipendenti e confrontati tramite One Way ANOVA. *p<0,05 rispetto SH-SY5Y pcDNA).*

Le cellule sono state successivamente trattate con inibitori di PI3K (LY-294002) (25 μM per 6 ore) e MEK (PD-98059) (10 μM per 6 ore). La qRT-PCR mostra una diminuzione nell'espressione di PD-L1 nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII e SH-SY5Y TrkA-NGF quando trattate con l'inibitore di PI3K, ma non dopo trattamento con l'inibitore di MEK (**Figura 27**).

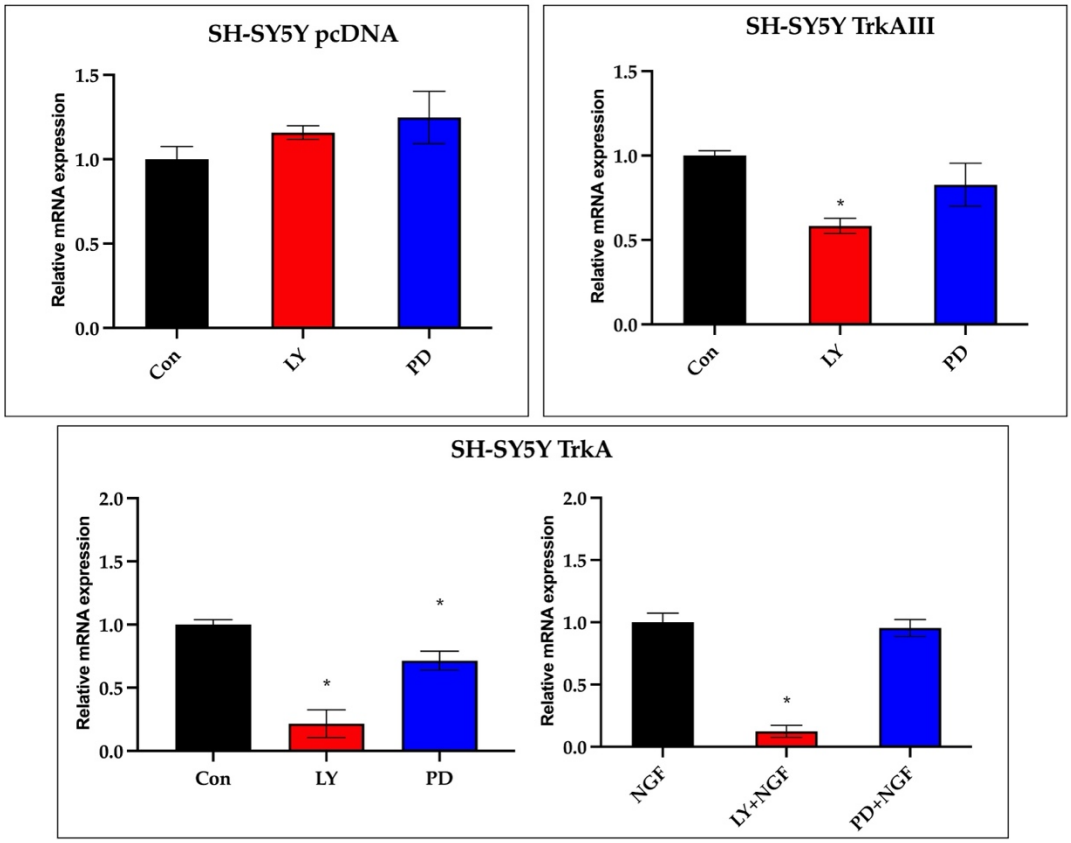


Figura 27. *qRT-PCR che confrontano l'espressione di PD-L1 nei trasfettanti stabili di NB trattati con inibitori di PI3K e MEK. (I dati sono visualizzati come media ± SE di 3 esperimenti indipendenti e confrontati tramite One Way ANOVA. *p<0,05 rispetto ai controlli).*

Inoltre, il trattamento delle cellule SH-SY5Y TrkA e TrkAIII con l'inibitore Trk Entrectinib (100 nM per 6 ore) mostra una significativa diminuzione dell'espressione genica di PD-L1 (**Figura 28**).

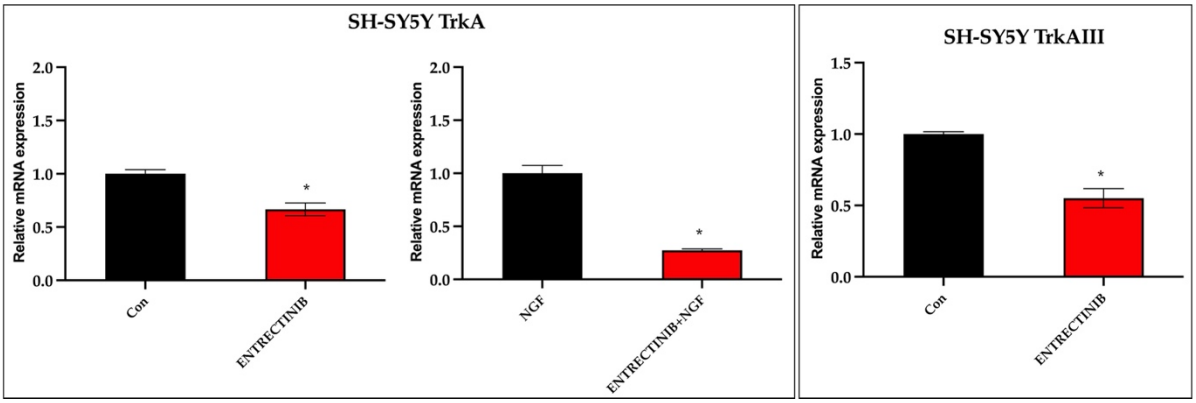


Figura 28. *qRT-PCR per l'espressione genica di PD-L1 nei trasfettanti stabili SH-SY5Y TrkA e TrkAIII trattati con Entrectinib. (I dati sono visualizzati come media ± SE di 3 esperimenti indipendenti e confrontati tramite One Way ANOVA. *p<0,05 rispetto ai controlli).*

4.3.2. Espressione proteica di PD-L1 nei trasfettanti stabili SH-SY5Y

L'espressione proteica tramite Western Blotting delle cellule di NB mostra un'espressione elevata di PD-L1 nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII non trattate rispetto alle SH-SY5Y pcDNA

e TrkA, che in queste ultime aumenta in seguito a trattamento con NGF (100 ng/ml per 6 ore). Inoltre, il trattamento con Entrectinib (100 nM per 72 ore) causa una riduzione dell'espressione proteica di PD-L1 nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII (**Figura 29A**).

L'IF indiretta nelle linee cellulari SH-SY5Y mostra l'inibizione da parte di Entrectinib (100 nM) dell'espressione proteica di PD-L1, che risultava elevata nelle cellule SH-SY5Y TrkAIII e nelle SH-SY5Y TrkA-NGF (**Figura 29B**).

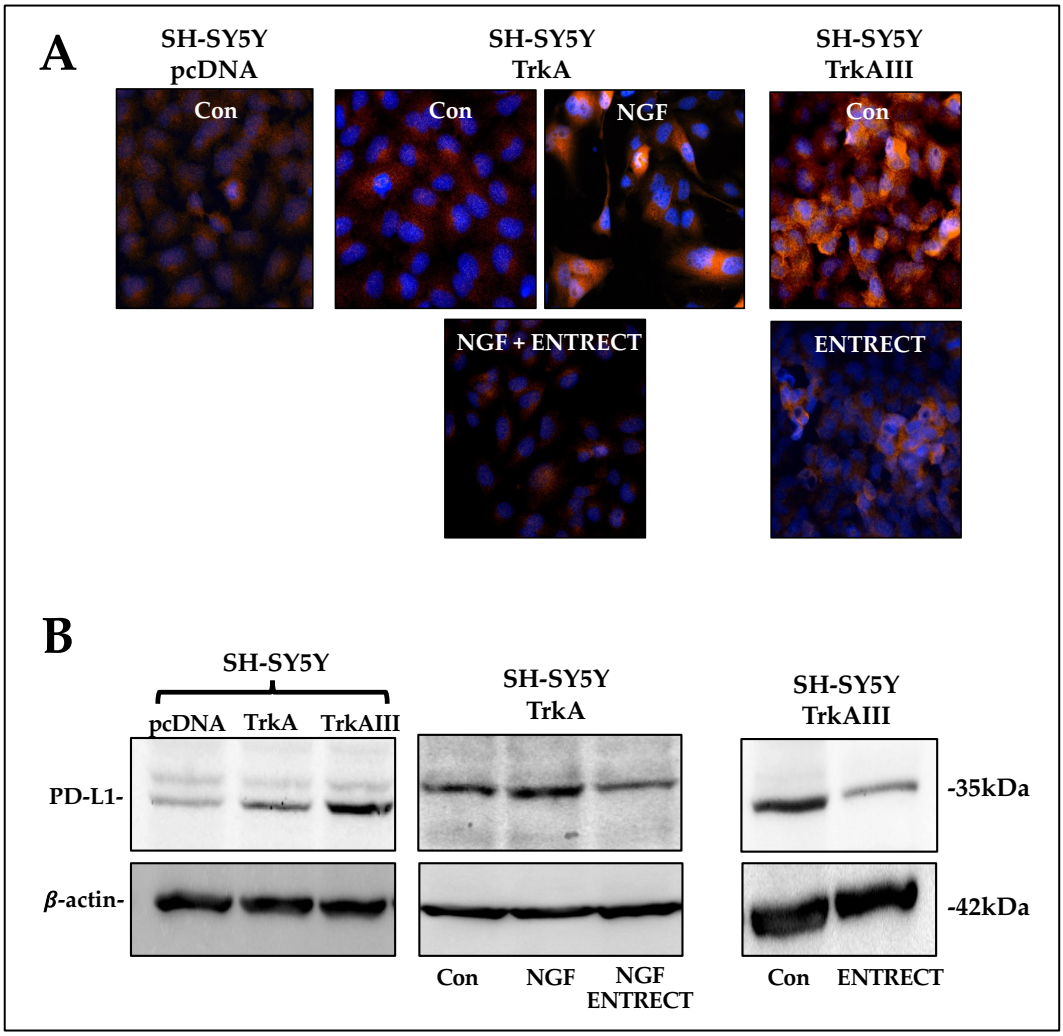


Figura 29. (A) *IF indiretta per l'espressione proteica di PD-L1 nelle cellule SH-SY5Y TrkA-NGF e SH-SY5Y TrkAIII trattate con Entrectinib.* ***(B)*** *Western Blotting per l'espressione proteica di PD-L1 nelle cellule SH-SY5Y TrkA-NGF e SH-SY5Y TrkAIII trattate con Entrectinib.*

4.3.3. Saggio ELISA per la rilevazione di IL-2

Le cellule T Jurkat sono state attivate con TPA (60 ng/mL) e PHA (1 µg/mL) ed è stata allestita una co-coltura con la linea cellulare di NB SH-SY5Y TrkAIII (in rapporto 1:8) per 48 ore in assenza e presenza di un anticorpo neutralizzante anti-PD-L1. Il saggio ELISA per la rilevazione dei livelli di IL-2 nei surnatanti mostra l'induzione da parte di TPA/PHA della produzione di IL-2 nelle cellule T Jurkat, l'abrogazione della produzione di IL-2 nella co-

coltura cellulare Jurkat/SH-SY5Y TrkAIII e il ripristino della produzione di IL-2 nella co-coltura cellulare Jurkat/SH-SY5Y TrkAIII in presenza dell'anticorpo neutralizzante anti-PD-L1 (**Figura 30**).

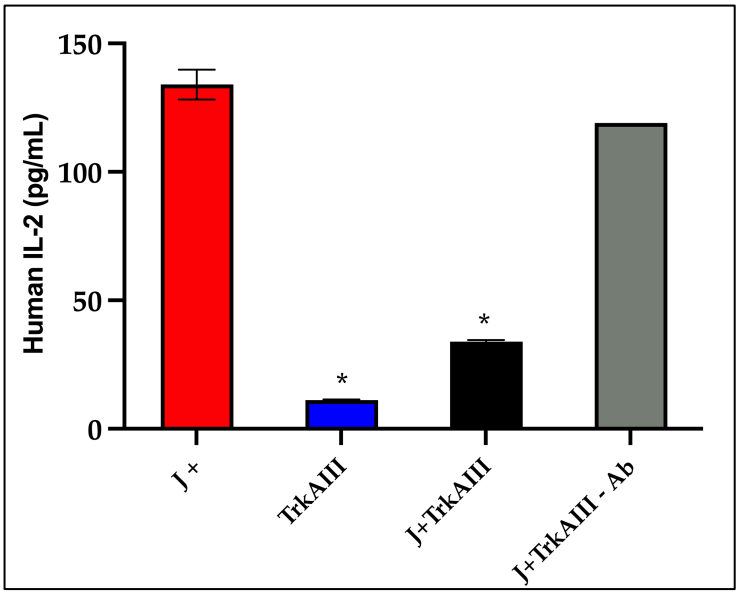


Figura 30. *Saggio ELISA per IL-2 nelle cellule T Jurkat non attive (J-), attivate da TPA/PHA (J+), in co-colture cellulari SH-SY5Y TrkAIII/Jurkat stimolate da TPA/PHA (J+TrkAIII) e dopo trattamento con l'anticorpo neutralizzante anti-PD-L1 (J+TrkAIII–Ab). (I dati sono visualizzati come media ± SE di 3 esperimenti indipendenti e confrontati tramite One Way Anova. *p<0,05 rispetto a J+).*

5. DISCUSSIONE

Il CMM, tumore estremamente aggressivo che deriva dalla trasformazione neoplastica dei melanociti, è frequentemente caratterizzato da amplificazione del gene *NTRK1* nei pazienti; tuttavia, la sovraespressione di TrkA in linee cellulari porta all'inibizione della proliferazione cellulare e a un fenotipo pro-differenziamento [43], [49]. Nel presente studio, è stato quindi valutato il possibile coinvolgimento dello splicing alternativo di TrkA in tessuti freschi e FFPE di diversi CMM e il possibile ruolo della variante di splicing TrkAIII nelle cellule di melanoma A375 con mutazione *BRAF* (V600E) [51]. L'espressione di TrkAIII è stata osservata più frequentemente nei CMM metastatici, predominava sull'espressione di TrkA full spliced in circa il 50% dei CMM metastatici e si associava a stress del RE e all'attivazione dell'UPR. Il coinvolgimento dello stress del RE nello splicing alternativo di TrkA nei CMM è stato infatti suggerito dall'associazione tra l'espressione delle varianti di TrkA e lo splicing non convenzionale di Xbp-1, indice di attivazione dell'UPR [79]. TrkAIII risulta inoltre essere l'unica variante di splicing espressa nei CMM, giustificando il paradosso per cui l'amplificazione genica nei pazienti affetti da CMM era associata a prognosi infausta, mentre in linee cellulari di melanoma la trasfezione con TrkA full spliced provocava un'inibizione della proliferazione e segnalava con stimoli pro-differenziamento [80]. Questi risultati suggeriscono una possibile relazione tra l'attivazione del sistema UPR, lo splicing alternativo di TrkA e l'espressione e attivazione della variante TrkAIII. Ciò è coerente con un ruolo oncogenico, orientato alla sopravvivenza, di TrkAIII nella progressione metastatica del CMM. Questo risultato è supportato dai dati su estratti proteici di tre CMM metastatici, che presentano immunoreattività dell'isoforma fosforilata intracellulare di TrkA e delle specie TrkA fosforilate, riconducibili a TrkAIII. Inoltre, lo stress riducente indotto da DTT attiva l'UPR nelle cellule di melanoma A375 con mutazione BRAF(V600E), promuove l'espressione genica e la fosforilazione di TrkAIII, la quale viene successivamente bloccata dall'inibitore Trk Lestaurtinib. In cellule A375 trasfettate con TrkAIII, lo stress riducente non solo promuove la fosforilazione di TrkAIII ma anche quella di Akt, con conseguente aumento della resistenza all'apoptosi, che è prevenuta dagli inibitori di Trk Lestaurtinib ed Entrectinib. Infine, nei test di citotossicità Lestaurtinib ha ri-sensibilizzato le cellule A375 trasfettate con TrkAIII alla morte indotta da DTT. Un effetto simile è stato osservato utilizzando l'inibitore di Trk Entrectinib [81]. I dati che collegano la fosforilazione di Akt alla fosforilazione di TrkAIII e all'aumentata resistenza allo stress nelle

cellule A375 estendono i precedenti rapporti secondo cui TrkAIII segnali attraverso PI3K/Akt, con conseguente maggiore resistenza alla morte indotta da DTT nelle cellule di NB SH-SY5Y [22], [23]. Nel complesso, questi dati suggeriscono che lo splicing alternativo di TrkA, responsabile dell'espressione e dell'attivazione di TrkAIII, contribuisca a un ulteriore meccanismo oncogenico pro-sopravvivenza nel CMM, mediato dall'attivazione del sistema UPR [82]. Questo meccanismo potrebbe essere efficacemente inibito da Lestaurtinib ed Entrectinib, noti inibitori di Trk.

I fenotipi aggressivi dei PitNET, sebbene poco frequenti, sono caratterizzati da fenomeni di alterazione dello splicing ed esibiscono spesso resistenza alle comuni terapie farmacologiche [55], [60]. In questo studio [62] è stato osservato che lo splicing alternativo dell'mRNA di TrkA è altamente presente nei PitNET, indipendentemente dal loro sottotipo di origine. I PitNET coinvolti in questo progetto esprimono tre varianti di splicing alternativo (TrkA full spliced, TrkAIII e TrkA Δ-esoni 2-7) e TrkAIII è l'unica variante di splicing in frame che codifica per il dominio tirosin-chinasico. Sebbene lo splicing alternativo di TrkAIII sia stato rilevato sia nei PitNET invasivi che in quelli non invasivi, è risultato significativamente più elevato nei tumori invasivi, in particolare nel gruppo PitNET invasivo PIT1. Inoltre, una caratteristica osservata unicamente nei PitNET è la frequente espressione genica predominante e occasionalmente esclusiva del trascritto di TrkAIII. Il rilevamento dell'espressione genica di TrkAIII in PitNET invasivi e non invasivi è coerente con l'attivazione intracellulare di TrkAIII nei PitNET che presentano un'espressione esclusiva o quasi esclusiva del trascritto di TrkAIII, suggerendo che TrkAIII partecipi a diverse fasi della patogenesi e della progressione dei PitNET. È interessante notare che l'espressione esclusiva e predominante del trascritto di TrkAIII era più comune nei PitNET invasivi, mentre l'espressione esclusiva di TrkA full spliced è stata osservata solo nei campioni non invasivi. Tuttavia, quando raggruppati in base al sottotipo, TrkAIII era significativamente più elevato solo nei PitNET PIT1 invasivi rispetto a quelli non invasivi; al contrario, i PitNET SF1 invasivi e non invasivi hanno mostrato livelli simili di TrkAIII. Per quanto riguarda i PitNET TPIT, sebbene questi fossero troppo esigui per confronti statistici, tutti e tre i casi invasivi hanno mostrato un'espressione esclusiva di TrkAIII. Nel complesso, questi risultati suggeriscono un potenziale coinvolgimento di TrkAIII nel comportamento invasivo dei PitNET PIT1 e nel comportamento invasivo e non invasivo dei PitNET SF1. Inoltre, l'immunoreattività delle isoforme di TrkA non fosforilate e fosforilate nei PitNET che mostrano un'espressione esclusiva o quasi esclusiva del trascritto di TrkAIII rafforza l'ipotesi di un coinvolgimento di TrkAIII nella patogenesi e nella progressione di PitNET. Sono stati

rilevati anche livelli inferiori di immunoreattività in tre PitNET SF1 invasivi che esibiscono livelli variabili di splicing alternativo di TrkAIII. Al contrario, l'immunoreattività era appena rilevabile in due PitNET SF1 e PIT1 non invasivi che in RT-PCR esibiscono un rapporto tra le due varianti con predominanza di TrkA full spliced. Nel complesso, questi risultati supportano una relazione funzionale tra l'espressione del trascritto di TrkAIII e l'attivazione di isoforme intracellulari di TrkA, inclusa l'oncoproteina TrkAIII. Ciò è coerente con gli studi secondo i quali i PitNET esibiscono un'espressione eterogenea di TrkA [83]. Poiché l'ipossia promuove lo splicing alternativo di TrkAIII nei progenitori della cresta neurale, nelle cellule staminali neurali e nelle cellule di NB [22], ne è stata valutata la possibile correlazione anche in questo tipo tumorale. A causa della indisponibilità degli estratti proteici, l'indagine sulla potenziale partecipazione dell'ipossia nello splicing alternativo di TrkAIII dei PitNET è stata limitata ai confronti, in RT-PCR, con l'espressione genica di HIF-1α e HIF-2α. L'elevato splicing alternativo di TrkAIII era correlato a livelli significativamente più elevati di espressione di HIF-2α ma non di HIF-1α nei PitNET PIT1 invasivi, suggerendo un potenziale ruolo dell'ipossia. Ciò identifica HIF-2α come potenziale marcatore del comportamento invasivo dei PitNET PIT1. In relazione ai potenziali meccanismi molecolari che potrebbero promuovere lo splicing di TrkAIII nei PitNET, sono state segnalate mutazioni hotspot nel fattore di splicing SF3B1 che inducono splicing abberrante nei PitNET lattotrofi [60]. Tuttavia, nei trascritti dei PitNET che esprimono TrkAIII non è stata riscontrata nessuna delle mutazioni in SF3B1 analizzate, escludendo un suo potenziale coinvolgimento. Anche la deregolazione dell'espressione dei fattori di splicing è stata correlata alla patogenesi e al comportamento aggressivo dei PitNET [78]. La scarsa disponibilità di RNA per questo studio ha limitato l'esame ai fattori SF3B1, SRSF2 e U2AF1, che sono stati selezionati sulla base di osservazioni secondo le quali SF3B1 regola lo splicing nei PitNET, e SRSF2 e U2AF1 sono espressi in modo differenziale in diversi sottotipi di PitNET [78]. Non sono state rilevate variazioni significative nell'espressione genica dei tre fattori di splicing nei campioni, sia nel loro insieme che raggruppati in base ai diversi sottotipi e all'invasività. Inoltre, l'espressione alterata di SF3B1, SRSF2 e U2AF1, laddove è stata rilevata, non era correlata con lo splicing alternativo di TrkAIII. Tuttavia, a causa della complessità del processo di splicing, non è possibile escludere il coinvolgimento di altri fattori. In questa indagine, è stato inoltre valutato lo splicing non convenzionale di Xbp-1, per valutare la relazione tra l'UPR e lo splicing alternativo di TrkAIII nei PitNET. Nessun campione che esprimeva il trascritto TrkAIII ha mostrato uno splicing non

convenzionale di Xbp-1, escludendo un potenziale un ruolo nell'attivazione del sistema UPR. Infine, a causa di precedenti studi su un possibile ruolo dell'infezione da JCPyV nella patogenesi dei PitNET [61], e considerando il ruolo del large T antigene di SV40 nel NB e di MCPyV nel MCC nell'induzione dello splicing di TrkAIII [24], [25] è stata valutata una possibile correlazione anche tra il virus JCPyV nei PitNET e lo splicing di TrkAIII. Tuttavia, l'espressione del large T antigen di JCPyV non è stata rilevata in nessuno dei PitNET esaminati, suggerendo che l'infezione di questo virus non è coinvolta nello splicing alternativo di TrkAIII nei PitNET.

Considerando che il checkpoint immunitario PD-L1/PD-1 è stato identificato come un potenziale bersaglio nel NB [39], è stato inoltre esaminato, in un modello di NB, un eventuale ruolo dello splicing alternativo di TrkA (con particolare attenzione alla variante oncogenica TrkAIII) nel contesto dell'evasione immunitaria. L'espressione genica di trasfettanti stabili della linea cellulare di NB SH-SY5Y mostra una maggiore espressione di PD-L1 nelle cellule che sovraesprimono la variante TrkAIII e TrkA, queste ultime precedentemente trattate con la neurotrofina NGF. Inoltre, le stesse cellule sono state trattate con inibitori della via PI3K (maggiormente attivata dall'oncogene TrkAIII) e di MEK (esclusivamente attivata dalla via di segnalazione che coinvolge TrkA full spliced). Se nelle SH-SY5Y pcDNA3.1 l'inibizione di queste vie non porta a nessuna variazione significativa dell'espressione genica di PD-L1, nelle cellule SH-SY5Y TrkA full spliced e TrkAIII si osserva una drastica diminuzione dei livelli di espressione di PD-L1 successivamente all'inibizione della via PI3K, suggerendo un ruolo regolatore da parte di questa pathway nei confronti dell'espressione di PD-L1 stesso. Inoltre, le cellule di NB sono state trattate con il pan-Trk inibitore Entrectinib, e sia l'espressione genica (valutata mediante qRT-PCR) che l'espressione proteica (valutata mediante Western blotting e IF indiretta) sottolineano come i livelli di PD-L1 subiscano una drastica riduzione (soprattutto SH-SY5Y TrkAIII) in seguito all'inibizione delle proteine Trk. Infine, è stato condotto un saggio ELISA per la rilevazione dei livelli di IL-2 in seguito all'allestimento di una co-coltura di SH-SY5Y TrkAIII e cellule T Jurkat attivate dagli agenti TPA e PHA [84]. La presenza delle cellule SH-SY5Y TrkAIII abbassa notevolmente i livelli di IL-2 prodotta dalle cellule T Jurkat, che vengono successivamente ripristinati con l'aggiunta di un anticorpo neutralizzante anti-PD-L1. Questi dati preliminari sono coerenti con un possibile ruolo di TrkAIII nella regolazione del checkpoint PD-L1/PD-1 messo in atto dalle cellule di NB nel contesto dell'evasione immunitaria.

6. CONCLUSIONI

La valutazione del possibile coinvolgimento dello splicing alternativo di TrkA nel CMM e nelle cellule di melanoma A375 con mutazione BRAF(V600E), suggerisce una correlazione tra stress riducente, attivazione del sistema UPR, espressione e attivazione intracellulare della variante di splicing alternativo di TrkAIII nel CMM metastatico, coerente con un ruolo pro-sopravvivenza di TrkAIII indotto dallo stress nella progressione del CMM. Le osservazioni effettuate in questo studio aiutano a spiegare il ruolo apparentemente contraddittorio del recettore TrkA nel CMM, a caratterizzare lo stress riducente come promotore dell'espressione di TrkAIII e dell'attività oncogenica e a identificare Lestaurtinib ed Entrectinib come inibitori terapeutici di questo nuovo potenziale meccanismo oncogenico nel CMM.

Inoltre, lo splicing alternativo del trascritto di TrkAIII è stato individuato come meccanismo comune a tutti i sottotipi di PitNET ed è significativamente più pronunciato nei PitNET invasivi, in particolare nel sottotipo invasivo PIT1. Gli aumenti significativi nello splicing alternativo di TrkAIII sono associati a un'espressione genica di HIF-2α significativamente elevata nei PitNET PIT1 invasivi, mettendo in relazione lo splicing alternativo di TrkAIII e la risposta all'ipossia. L'espressione genica esclusiva di TrkAIII risulta inoltre essere associata all'espressione proteica intracellulare e all'attivazione dell'oncoproteina TrkAIII. Sembra quindi che TrkAIII possa partecipare anche alla patogenesi e alla progressione dei PitNET, e che possa rappresentare in questo tumore un nuovo potenziale bersaglio terapeutico.

L'analisi di un possibile coinvolgimento di TrkAIII nel checkpoint immunitario PD-1/PD-L1, nonostante sia ancora in fase di studio, suggerisce che TrkAIII e TrkA attivato da NGF promuovano entrambi l'espressione genica e proteica di PD-L1 nelle cellule di NB SH-SY5Y tramite la via PI3K ma non MAPK e confermano la funzione di PD-L1 nell'inibizione della produzione di IL-2 da parte delle cellule T Jurkat attivate. Questi dati aggiungono la potenziale promozione dell'espressione di PD-L1 al repertorio oncogenico di TrkAIII e mostrano che gli inibitori di Trk abrogano l'espressione di PD-L1 incrementata da TrkAIII nelle cellule di NB, suggerendo un possibile utilizzo di inibitori Trk in combinazione con l'immunoterapia.

7. BIBLIOGRAFIA

[1] Y. B. Khotskaya, V. R. Holla, A. F. Farago, K. R. Mills Shaw, F. Meric-Bernstam, e D. S. Hong, «Targeting TRK family proteins in cancer», *Pharmacol Ther*, vol. 173, pp. 58–66, mag. 2017, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.006.

[2] A. Greco *et al.*, «The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain», *Mol Cell Biol*, vol. 15, fasc. 11, pp. 6118–6127, nov. 1995, doi: 10.1128/MCB.15.11.6118.

[3] H. U. Weier, A. P. Rhein, F. Shadravan, C. Collins, e D. Polikoff, «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*, vol. 26, fasc. 2, pp. 390–393, mar. 1995, doi: 10.1016/0888-7543(95)80226-c.

[4] K. Deinhardt e M. V. Chao, «Trk receptors», *Handb Exp Pharmacol*, vol. 220, pp. 103–119, 2014, doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_5.

[5] J. C. Arevalo, B. Conde, B. L. Hempstead, M. V. Chao, D. Martin-Zanca, e P. Perez, «TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor», *Mol Cell Biol*, vol. 20, fasc. 16, pp. 5908–5916, ago. 2000, doi: 10.1128/MCB.20.16.5908-5916.2000.

[6] M. Hirose, Y. Kuroda, e E. Murata, «NGF/TrkA Signaling as a Therapeutic Target for Pain», *Pain Pract*, vol. 16, fasc. 2, pp. 175–182, feb. 2016, doi: 10.1111/papr.12342.

[7] M. V. Sofroniew, C. L. Howe, e W. C. Mobley, «Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair», *Annu Rev Neurosci*, vol. 24, pp. 1217–1281, 2001, doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.1217.

[8] A. Tacconelli, A. R. Farina, L. Cappabianca, A. Gulino, e A. R. Mackay, «Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma», *Future Oncol*, vol. 1, fasc. 5, pp. 689–698, ott. 2005, doi: 10.2217/14796694.1.5.689.

[9] I. E. Demir, E. Tieftrunk, S. Schorn, H. Friess, e G. O. Ceyhan, «Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer», *Biochim Biophys Acta*, vol. 1866, fasc. 1, pp. 37–50, ago. 2016, doi: 10.1016/j.bbcan.2016.05.003.

[10] M. A. Pierotti e A. Greco, «Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor», *Cancer Lett*, vol. 232, fasc. 1, pp. 90–98, gen. 2006, doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.043.

[11] D. Martin-Zanca, R. Oskam, G. Mitra, T. Copeland, e M. Barbacid, «Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene», *Mol Cell Biol*, vol. 9, fasc. 1, pp. 24–33, gen. 1989, doi: 10.1128/mcb.9.1.24-33.1989.

[12] M. Sorokin *et al.*, «Clinically relevant fusion oncogenes: detection and practical implications», *Ther Adv Med Oncol*, vol. 14, p. 17588359221144108, 2022, doi: 10.1177/17588359221144108.

[13] A. Bounacer *et al.*, «Search for NTRK1 proto-oncogene rearrangements in human thyroid tumours originated after therapeutic radiation», *Br J Cancer*, vol. 82, fasc. 2, pp. 308–314, gen. 2000, doi: 10.1054/bjoc.1999.0920.

[14] E. Cocco, M. Scaltriti, e A. Drilon, «NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy», *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 15, fasc. 12, pp. 731–747, dic. 2018, doi: 10.1038/s41571-018-0113-0.

[15] A. Amatu, A. Sartore-Bianchi, K. Bencardino, E. G. Pizzutilo, F. Tosi, e S. Siena, «Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of NTRK gene fusions in cancer», *Ann Oncol*, vol. 30, fasc. Suppl_8, pp. viii5–viii15, nov. 2019, doi: 10.1093/annonc/mdz383.

[16] S.-Y. Han, «TRK Inhibitors: Tissue-Agnostic Anti-Cancer Drugs», *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 14, fasc. 7, p. 632, giu. 2021, doi: 10.3390/ph14070632.

[17] D. S. Shulman e S. G. DuBois, «The Evolving Diagnostic and Treatment Landscape of NTRK-Fusion-Driven Pediatric Cancers», *Paediatr Drugs*, vol. 22, fasc. 2, pp. 189–197, apr. 2020, doi: 10.1007/s40272-020-00380-9.

[18] G. Hagopian e M. Nagasaka, «Oncogenic fusions: Targeting NTRK», *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 194, p. 104234, feb. 2024, doi: 10.1016/j.critrevonc.2023.104234.

[19] D. S. Hong *et al.*, «Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials», *Lancet Oncol*, vol. 21, fasc. 4, pp. 531–540, apr. 2020, doi: 10.1016/S1470-2045(19)30856-3.

[20] P. Dubus, M. Parrens, Y. El-Mokhtari, J. Ferrer, A. Groppi, e J. P. Merlio, «Identification of novel trkA variants with deletions in leucine-rich motifs of the extracellular domain», *J Neuroimmunol*, vol. 107, fasc. 1, pp. 42–49, lug. 2000, doi: 10.1016/s0165-5728(00)00257-5.

[21] P. A. Barker, C. Lomen-Hoerth, E. M. Gensch, S. O. Meakin, D. J. Glass, e E. M. Shooter, «Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor», *J Biol Chem*, vol. 268, fasc. 20, pp. 15150–15157, lug. 1993.

[22] A. Tacconelli *et al.*, «TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma», *Cancer Cell*, vol. 6, fasc. 4, pp. 347–360, ott. 2004, doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.011.

[23] A. R. Farina *et al.*, «The oncogenic neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase variant, TrkAIII», *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 37, fasc. 1, p. 119, giu. 2018, doi: 10.1186/s13046-018-0786-3.

[24] S. Guadagni *et al.*, «Multidisciplinary Treatment, Including Locoregional Chemotherapy, for Merkel-Polyomavirus-Positive Merkel Cell Carcinomas: Perspectives for Patients Exhibiting Oncogenic Alternative Δ exon 6-7 TrkAIII Splicing of Neurotrophin Receptor Tropomyosin-Related Kinase A», *Int J Mol Sci*, vol. 21, fasc. 21, p. 8222, nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21218222.

[25] L. Cappabianca *et al.*, «A pilot study of alternative TrkAIII splicing in Merkel cell carcinoma: a potential oncogenic mechanism and novel therapeutic target», *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 38, fasc. 1, p. 424, ott. 2019, doi: 10.1186/s13046-019-1425-3.

[26] L. Cappabianca *et al.*, «Doxorubicin-Induced TrkAIII Activation: A Selection Mechanism for Resistant Dormant Neuroblastoma Cells», *Int J Mol Sci*, vol. 23, fasc. 18, p. 10895, set. 2022, doi: 10.3390/ijms231810895.

[27] D. Treis *et al.*, «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 Precis Oncol*, vol. 6, p. e2100271, gen. 2022, doi: 10.1200/PO.21.00271.

[28] R. Siddaway *et al.*, «Splicing is an alternate oncogenic pathway activation mechanism in glioma», *Nat Commun*, vol. 13, fasc. 1, p. 588, gen. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-28253-4.

[29] C. Chung *et al.*, «Neuroblastoma», *Pediatr Blood Cancer*, vol. 68 Suppl 2, fasc. Suppl 2, p. e28473, mag. 2021, doi: 10.1002/pbc.28473.

[30] J. I. Johnsen, C. Dyberg, e M. Wickström, «Neuroblastoma-A Neural Crest Derived Embryonal Malignancy», *Front Mol Neurosci*, vol. 12, p. 9, 2019, doi: 10.3389/fnmol.2019.00009.

[31] J. Z. Finklestein e G. S. Gilchrist, «Recent advances in neuroblastoma», *Calif Med*, vol. 116, fasc. 3, pp. 27–36, mar. 1972.

[32] Hallett Andrew e H. Traunecker, «A review and update on neuroblastoma», in *Symposium: oncology*, vol. 22.

[33] J. M. Maris, «Recent advances in neuroblastoma», *N Engl J Med*, vol. 362, fasc. 23, pp. 2202–2211, giu. 2010, doi: 10.1056/NEJMra0804577.

[34] M. Sbaffone *et al.*, «Nutraceutical Preventative and Therapeutic Potential in Neuroblastoma: From Pregnancy to Early Childhood», *Life (Basel)*, vol. 12, fasc. 11, p. 1762, nov. 2022, doi: 10.3390/life12111762.

[35] N. C. Colon e D. H. Chung, «Neuroblastoma», *Adv Pediatr*, vol. 58, fasc. 1, pp. 297–311, 2011, doi: 10.1016/j.yapd.2011.03.011.

[36] J. E. Heck, B. Ritz, R. J. Hung, M. Hashibe, e P. Boffetta, «The epidemiology of neuroblastoma: a review», *Paediatr Perinat Epidemiol*, vol. 23, fasc. 2, pp. 125–143, mar. 2009, doi: 10.1111/j.1365-3016.2008.00983.x.

[37] P. Yan *et al.*, «Comparison of Incidence and Outcomes of Neuroblastoma in Children, Adolescents, and Adults in the United States: A Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program Population Study», *Med Sci Monit*, vol. 26, p. e927218, nov. 2020, doi: 10.12659/MSM.927218.

[38] K. K. Matthay *et al.*, «Neuroblastoma», *Nat Rev Dis Primers*, vol. 2, p. 16078, nov. 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.78.

[39] P. Nallasamy *et al.*, «PD-L1, inflammation, non-coding RNAs, and neuroblastoma: Immuno-oncology perspective», *Semin Cancer Biol*, vol. 52, fasc. Pt 2, pp. 53–65, ott. 2018, doi: 10.1016/j.semcancer.2017.11.009.

[40] C. C. Swift, M. J. Eklund, J. M. Kraveka, e A. L. Alazraki, «Updates in Diagnosis, Management, and Treatment of Neuroblastoma», *Radiographics*, vol. 38, fasc. 2, pp. 566–580, 2018, doi: 10.1148/rg.2018170132.

[41] N. R. Pinto *et al.*, «Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma», *J Clin Oncol*, vol. 33, fasc. 27, pp. 3008–3017, set. 2015, doi: 10.1200/JCO.2014.59.4648.

[42] B. Qiu e K. K. Matthay, «Advancing therapy for neuroblastoma», *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 19, fasc. 8, pp. 515–533, ago. 2022, doi: 10.1038/s41571-022-00643-z.

[43] G. V. Long, S. M. Swetter, A. M. Menzies, J. E. Gershenwald, e R. A. Scolyer, «Cutaneous melanoma», *Lancet*, vol. 402, fasc. 10400, pp. 485–502, ago. 2023, doi: 10.1016/S0140-6736(23)00821-8.

[44] A. J. Miller e M. C. Mihm, «Melanoma», *N Engl J Med*, vol. 355, fasc. 1, pp. 51–65, lug. 2006, doi: 10.1056/NEJMra052166.

[45] L. Lugović-Mihić, D. Ćesić, P. Vuković, G. Novak Bilić, M. Šitum, e S. Špoljar, «Melanoma Development: Current Knowledge on Melanoma Pathogenesis», *Acta Dermatovenerol Croat*, vol. 27, fasc. 3, pp. 163–168, set. 2019.

[46] M. L. Chen, I. J. de Vere Hunt, E. M. John, M. A. Weinstock, S. M. Swetter, e E. Linos, «Differences in Thickness-Specific Incidence and Factors Associated With Cutaneous Melanoma in the US From 2010 to 2018», *JAMA Oncol*, vol. 8, fasc. 5, pp. 755–759, mag. 2022, doi: 10.1001/jamaoncol.2022.0134.

[47] D. Schadendorf *et al.*, «Melanoma», *Lancet*, vol. 392, fasc. 10151, pp. 971–984, set. 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)31559-9.

[48] W. W. Dzwierzynski, «Melanoma Risk Factors and Prevention», *Clin Plast Surg*, vol. 48, fasc. 4, pp. 543–550, ott. 2021, doi: 10.1016/j.cps.2021.05.001.

[49] L. Pasini *et al.*, «TrkA is amplified in malignant melanoma patients and induces an anti-proliferative response in cell lines», *BMC Cancer*, vol. 15, p. 777, ott. 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1791-y.

[50] L. C. M. Antunes, A. Cartell, C. B. de Farias, R. M. Bakos, R. Roesler, e G. Schwartsmann, «Tropomyosin-Related Kinase Receptor and Neurotrophin Expression in Cutaneous Melanoma Is Associated with a Poor Prognosis and Decreased Survival», *Oncology*, vol. 97, fasc. 1, pp. 26–37, 2019, doi: 10.1159/000499384.

[51] L. Cappabianca *et al.*, «The Alternative TrkAIII Splice Variant, a Targetable Oncogenic Participant in Human Cutaneous Malignant Melanoma», *Cells*, vol. 12, fasc. 2, p. 237, gen. 2023, doi: 10.3390/cells12020237.

[52] R. I. Hartman e J. Y. Lin, «Cutaneous Melanoma-A Review in Detection, Staging, and Management», *Hematol Oncol Clin North Am*, vol. 33, fasc. 1, pp. 25–38, feb. 2019, doi: 10.1016/j.hoc.2018.09.005.

[53] L. E. Davis, S. C. Shalin, e A. J. Tackett, «Current state of melanoma diagnosis and treatment», *Cancer Biol Ther*, vol. 20, fasc. 11, pp. 1366–1379, 2019, doi: 10.1080/15384047.2019.1640032.

[54] A. M. Menzies e G. V. Long, «Systemic treatment for BRAF-mutant melanoma: where do we go next?», *Lancet Oncol*, vol. 15, fasc. 9, pp. e371-381, ago. 2014, doi: 10.1016/S1470-2045(14)70072-5.

[55] S. Serioli *et al.*, «Aggressive PitNETs and Potential Target Therapies: A Systematic Review of Molecular and Genetic Pathways», *Int J Mol Sci*, vol. 24, fasc. 21, p. 15719, ott. 2023, doi: 10.3390/ijms242115719.

[56] W. Saeger, D. K. Lüdecke, M. Buchfelder, R. Fahlbusch, H.-J. Quabbe, e S. Petersenn, «Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry», *Eur J Endocrinol*, vol. 156, fasc. 2, pp. 203–216, feb. 2007, doi: 10.1530/eje.1.02326.

[57] S. Melmed *et al.*, «Clinical Biology of the Pituitary Adenoma», *Endocr Rev*, vol. 43, fasc. 6, pp. 1003–1037, nov. 2022, doi: 10.1210/endrev/bnac010.

[58] Y. Bao, D. Yoshida, D. Morimoto, e A. Teramoto, «Expression of laminin beta2: a novel marker of hypoxia in pituitary adenomas», *Endocr Pathol*, vol. 17, fasc. 3, pp. 251–261, 2006, doi: 10.1385/ep:17:3:251.

[59] Y. Zhou *et al.*, «Oxidative stress in pituitary neuroendocrine tumors: Affecting the tumor microenvironment and becoming a new target for pituitary neuroendocrine tumor therapy», *CNS Neurosci Ther*, vol. 29, fasc. 10, pp. 2744–2759, ott. 2023, doi: 10.1111/cns.14315.

[60] C. Li *et al.*, «Somatic SF3B1 hotspot mutation in prolactinomas», *Nat Commun*, vol. 11, fasc. 1, p. 2506, mag. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-16052-8.

[61] J. Gordon, L. Del Valle, J. Otte, e K. Khalili, «Pituitary neoplasia induced by expression of human neurotropic polyomavirus, JCV, early genome in transgenic mice», *Oncogene*, vol. 19, fasc. 42, pp. 4840–4846, ott. 2000, doi: 10.1038/sj.onc.1203849.

[62] M. Sbaffone *et al.*, «A Study of Alternative TrkA Splicing Identifies TrkAIII as a Novel Potentially Targetable Participant in PitNET Progression», *Biology (Basel)*, vol. 13, fasc. 3, p. 171, mar. 2024, doi: 10.3390/biology13030171.

[63] E. B. Gold, «Epidemiology of pituitary adenomas», *Epidemiol Rev*, vol. 3, pp. 163–183, 1981, doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036232.

[64] O. Mete, A. Cintosun, I. Pressman, e S. L. Asa, «Epidemiology and biomarker profile of pituitary adenohypophysial tumors», *Mod Pathol*, vol. 31, fasc. 6, pp. 900–909, giu. 2018, doi: 10.1038/s41379-018-0016-8.

[65] A. F. Daly e A. Beckers, «The Epidemiology of Pituitary Adenomas», *Endocrinol Metab Clin North Am*, vol. 49, fasc. 3, pp. 347–355, set. 2020, doi: 10.1016/j.ecl.2020.04.002.

[66] S. L. Asa, O. Mete, A. Perry, e R. Y. Osamura, «Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumors», *Endocr Pathol*, vol. 33, fasc. 1, pp. 6–26, mar. 2022, doi: 10.1007/s12022-022-09703-7.

[67] J. Trouillas, M.-L. Jaffrain-Rea, A. Vasiljevic, G. Raverot, F. Roncaroli, e C. Villa, «How to Classify the Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020», *Cancers (Basel)*, vol. 12, fasc. 2, p. 514, feb. 2020, doi: 10.3390/cancers12020514.

[68] N. A. Tritos e K. K. Miller, «Diagnosis and Management of Pituitary Adenomas: A Review», *JAMA*, vol. 329, fasc. 16, pp. 1386–1398, apr. 2023, doi: 10.1001/jama.2023.5444.

[69] S. Zuo *et al.*, «Potential role of the PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes on neuroblastoma», *Pediatr Surg Int*, vol. 36, fasc. 2, pp. 137–143, feb. 2020, doi: 10.1007/s00383-019-04616-9.

[70] Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara, e T. Honjo, «Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death», *EMBO J*, vol. 11, fasc. 11, pp. 3887–3895, nov. 1992, doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.

[71] Y. Jiang, M. Chen, H. Nie, e Y. Yuan, «PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations», *Hum Vaccin Immunother*, vol. 15, fasc. 5, pp. 1111–1122, 2019, doi: 10.1080/21645515.2019.1571892.

[72] Y. Han, D. Liu, e L. Li, «PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer», *Am J Cancer Res*, vol. 10, fasc. 3, pp. 727–742, 2020.

[73] K. M. Zak *et al.*, «Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1», *Structure*, vol. 23, fasc. 12, pp. 2341–2348, dic. 2015, doi: 10.1016/j.str.2015.09.010.

[74] L. Ai, A. Xu, e J. Xu, «Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond», *Adv Exp Med Biol*, vol. 1248, pp. 33–59, 2020, doi: 10.1007/978-981-15-3266-5_3.

[75] T. Yokosuka, M. Takamatsu, W. Kobayashi-Imanishi, A. Hashimoto-Tane, M. Azuma, e T. Saito, «Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2», *J Exp Med*, vol. 209, fasc. 6, pp. 1201–1217, giu. 2012, doi: 10.1084/jem.20112741.

[76] E. Hui *et al.*, «T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition», *Science*, vol. 355, fasc. 6332, pp. 1428–1433, mar. 2017, doi: 10.1126/science.aaf1292.

[77] R. G. Majzner *et al.*, «Assessment of programmed death-ligand 1 expression and tumor-associated immune cells in pediatric cancer tissues», *Cancer*, vol. 123, fasc. 19, pp. 3807–3815, ott. 2017, doi: 10.1002/cncr.30724.

[78] M. C. Vázquez-Borrego *et al.*, «Splicing Machinery is Dysregulated in Pituitary Neuroendocrine Tumors and is Associated with Aggressiveness Features», *Cancers (Basel)*, vol. 11, fasc. 10, p. 1439, set. 2019, doi: 10.3390/cancers11101439.

[79] H. Yoshida, «Unconventional splicing of XBP-1 mRNA in the unfolded protein response», *Antioxid Redox Signal*, vol. 9, fasc. 12, pp. 2323–2333, dic. 2007, doi: 10.1089/ars.2007.1800.

[80] J. B. DuRose, A. B. Tam, e M. Niwa, «Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress», *Mol Biol Cell*, vol. 17, fasc. 7, pp. 3095–3107, lug. 2006, doi: 10.1091/mbc.e06-01-0055.

[81] R. Iyer *et al.*, «Entrectinib is a potent inhibitor of Trk-driven neuroblastomas in a xenograft mouse model», *Cancer Lett*, vol. 372, fasc. 2, pp. 179–186, mar. 2016, doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.018.

[82] E. K. Sykes, S. Mactier, e R. I. Christopherson, «Melanoma and the Unfolded Protein Response», *Cancers (Basel)*, vol. 8, fasc. 3, p. 30, feb. 2016, doi: 10.3390/cancers8030030.

[83] M. Artico *et al.*, «Neurotrophins, their receptors and KI-67 in human GH-secreting pituitary adenomas: an immunohistochemical analysis», *Int J Immunopathol Pharmacol*, vol. 25, fasc. 1, pp. 117–125, 2012, doi: 10.1177/039463201202500114.

[84] W. Yang, P. W. Chen, H. Li, H. Alizadeh, e J. Y. Niederkorn, «PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro», *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 49, fasc. 6, pp. 2518–2525, giu. 2008, doi: 10.1167/iovs.07-1606.