



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

Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale
Curriculum Medicina Sperimentale, clinica e endocrinologia
XXXV ciclo

*Attivazione del TrkAIII indotta dalla Doxorubicina:
un meccanismo selettivo di resistenza delle cellule quiescenti
di Neuroblastoma*

MED-04

Dottoranda

Michela Sebastiano

Coordinatore del corso

Prof.ssa Mariagrazia Perilli

Tutor

Prof.ssa Lucia A.M. Cappabianca

Co-Tutor

Prof.ssa Antonietta R. Farina

a.a. 2021/2022

INDICE

INTRODUZIONE	1
NEUROBLASTOMA	1
<i>Patogenesi</i>	1
<i>Eziologia</i>	4
<i>Basi genetiche del Neuroblastoma</i>	4
<i>Diagnosi</i>	9
<i>Stadiazione e classificazione del rischio</i>	10
<i>Terapia</i>	12
<i>Trattamento per gruppo di rischio</i>	12
<i>Regression spontanea</i>	14
DOXORUBICINA	16
<i>Meccanismo d'azione</i>	17
<i>Tossicità e Farmaco resistenza</i>	18
TrkA	22
<i>Varianti di splicing del TrkA</i>	24
TrkA III	26
<i>Differenze tra le varianti di splicing TrkAI/II e TrkAIII</i>	27
<i>TrkAIII e terapia clinica</i>	28

SCOPO DEL LAVORO	29
MATERIALI E METODI	31
<i>Linee cellulari e condizioni di coltura</i>	31
<i>Reagenti per trattamenti cellulari</i>	31
<i>Anticorpi</i>	32
<i>Analisi cellulare</i>	32
<i>Estrazione proteica e Western Blot</i>	33
<i>Co-immunoprecipitazione calmodulina/TrkAIII</i>	34
<i>Immunofluorescenza indiretta (IF)</i>	34
<i>Purificazione dell'RNA e RT-PCR</i>	35
<i>Estrazione DNA genomico e sequenziamento</i>	36
<i>Analisi statistica</i>	36
RISULTATI	37
<i>La Doxorubicina induce l'attivazione del TrkAIII nelle SH-SY5Y/TrkAIII</i>	37
<i>La Doxorubicina induce lo splicing non convenzionale di Xbp1</i>	43
<i>L'attivazione del TrkAIII indotta dalla Doxorubicina coinvolge i recettori della rianodina (RyRs), la calmodulina (CaM), l'Hsp90 e l'assemblaggio dell'ERGIC ARF-1 dipendente</i>	44

<i>Complesso TrkAIII/CaM</i>	46
<i>L'attivazione del TrkAIII indotta dalla Doxorubicina aumenta la fosforilazione di Akt nelle SH-SY5Y/TrkAIII</i>	47
<i>La Doxorubicina non attiva il TrkA e non determina la fosforilazione di Akt nelle SH-SY5Y/TrkA</i>	49
<i>L'attivazione del TrkAIII indotta dalla Doxorubicina migliora la resistenza alla citotossicità da Dox ed è invertita dagli inibitori di Trk e IP3-K</i>	49
<i>Le SH-SY5Y, SH-SY5Y/TrkA e SH-SY5Y/TrkAIII non presentano la mutazione NM_004304.5 (ALK):c.3522C > A (p.Phe1174Leu)</i>	53
DISCUSSIONE	54
CONCLUSIONI	58
BIBLIOGRAFIA	59

ABSTRACT

Patients with advanced neuroblastoma (NB) receive multimodal clinical therapy, including the potent anthracycline chemotherapy drug doxorubicin (Dox). The acquisition of Dox resistance, however, is a major barrier to a sustained response and leads to a poor prognosis in advanced disease states, reinforcing the need to identify and inhibit Dox resistance mechanisms. In this context, we report on the identification and inhibition of a novel Dox resistance mechanism. This mechanism is characterized by the Dox-induced activation of the oncogenic TrkAIII alternative splice variant, resulting in increased Dox resistance, and is blocked by lestaurtinib, entrectinib, and crizotinib tyrosine kinase and LY294002 IP3-K inhibitors. Using time lapse live cell imaging, conventional and co-immunoprecipitation Western blots, RT-PCR, and inhibitor studies, we report that the Dox-induced TrkAIII activation correlates with proliferation inhibition and is CDK1- and Ca²⁺-uniporter-independent. It is mediated by ryanodine receptors; involves Ca²⁺-dependent interactions between TrkAIII, calmodulin and Hsp90; requires oxygen and oxidation; occurs within assembled ERGICs; and does not occur with fully spliced TrkA. The inhibitory effects of lestaurtinib, entrectinib, crizotinib, and LY294002 on the Dox-induced TrkAIII and Akt phosphorylation and resistance confirm roles for TrkAIII and IP3-K consistent with Dox-induced, TrkAIII-mediated pro-survival IP3K/Akt signaling. This mechanism has the potential to select resistant dormant TrkAIII-expressing NB cells, supporting the use of Trk inhibitors during Dox therapy in TrkAIII-expressing NBs.

INTRODUZIONE

NEUROBLASTOMA

Il Neuroblastoma (NB) è un tumore embrionale, descritto per la prima volta nel 1910 dal patologo James Homer Wright, il quale pubblicò una revisione su una serie di casi che avevano in comune la presenza di particolari tumori surrenalici caratterizzati da cellule che apparivano generalmente piccole, con nuclei rotondi ricchi di cromatina e con una quantità relativamente piccola di citoplasma associato a fibrille. Queste cellule presentavano caratteristiche morfologiche identiche ai neuroblasti di un tessuto surrenale fetale e pertanto suggerì di indicare questa neoplasia con il termine di “Neuroblastoma” (Wright, 1910).

Patogenesi

Ad oggi sappiamo che questo tumore pediatrico ha origine durante lo sviluppo del sistema nervoso simpatico (SNS) derivante dalle cellule della cresta neurale (Ponzoni *et al.*, 2022a), una popolazione cellulare embrionale che ha origine nell'ectoderma ai margini del tubo neurale, *Figura 1*, e che, dopo una fase di transizione epitelio-mesenchimale (EMT), inizia la sua migrazione per generare cellule di Schwann, neuroni e glia del sistema nervoso periferico, cellule cromaffini secretorie della midollare surrenale, cellule scheletriche cranio-facciali tra cui osteoblasti e condrociti, cellule mesenchimali, cellule muscolari lisce, adipociti, cellule cardiache ed inoltre forma una seconda fonte di progenitori multipotenti, che si associano e migrano lungo le fibre nervose per fornire cellule per l'omeostasi e la riparazione dei tessuti durante la tarda embriogenesi e nell'adulto (Farina *et al.*, 2021).

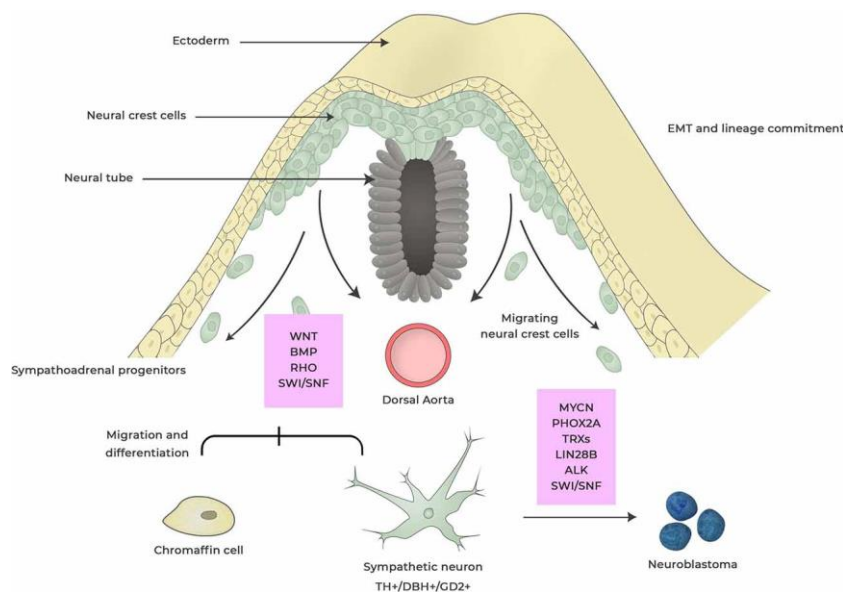


Figura 1. Sviluppo del Neuroblastoma delle cellule della cresta neurale
(fonte Johnsen, Dyberg, and Wickström 2019)

Il NB rappresenta l'8%-10% di tutti i tumori pediatrici e il 12%-15% dei decessi per cancro nei bambini. Nel 90% dei casi insorge nei bambini di età inferiore ai 10 anni (Tolbert and Matthay, 2018), si sviluppa raramente negli adolescenti e nei giovani adulti, i quali rappresentano meno del 5% dei casi (Matthay *et al.*, 2016).

Il fenotipo della malattia è spesso associato all'etnia e all'età: nei bambini di origine africana il tumore ha un'incidenza inferiore, ma si presenta con un fenotipo più aggressivo e tassi di sopravvivenza minori; mentre per quanto riguarda l'età, i bambini sotto i 12 mesi hanno più probabilità di andare incontro a regressione spontanea rispetto a bambini con età maggiore (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002).

Il sito primario più comune del tumore è l'addome, che nel 35% dei casi si presenta come una massa che ha origine dalle cellule che secernono gli ormoni adrenergici della midollare del surrene (Hallett and Traunecker, 2012). Frequenti anche i NB paraspinali, che possono espandersi attraverso gli spazi intraforaminali e causare paralisi per compressione del midollo spinale (Finklestein and Gilchrist, 2010). Un 20% di questo tumore si presenta nel mediastino posteriore ed un 5% nel collo e nelle pelvi (Hallett and Traunecker, 2012). In particolare, i NB primari nel collo e nel torace possono causare la sindrome di Horner o sindrome oculopupillare, caratterizzata da restringimenti delle palpebre e della pupilla (ptosi e miosi) e da assenza di sudorazione (anidrosi) sul volto (Finklestein and Gilchrist, 2010; Mullassery and Losty, 2016).

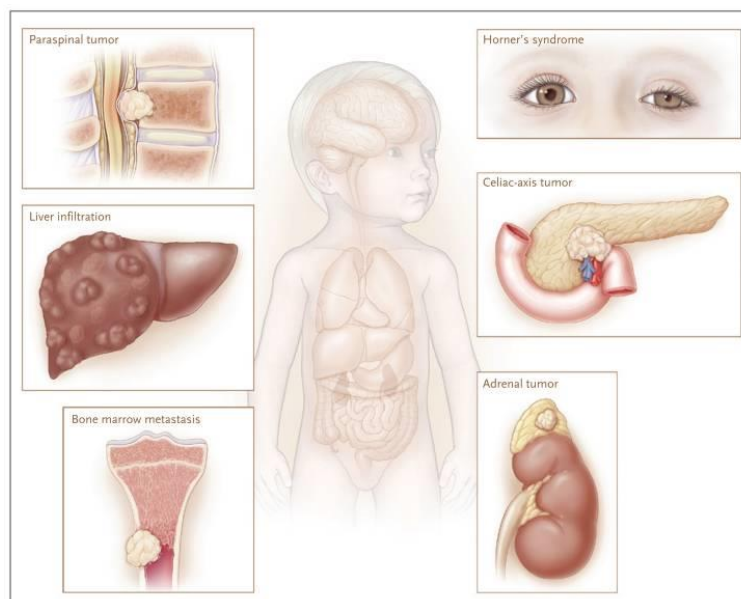


Figura 2. Quadro clinico Neuroblastoma (fonte Finklestein and Gilchrist 2010)

Il NB può rimanere incapsulato nel sito primario o invadere gli organi locali vicini e circondare nervi critici e vasi sanguigni vitali come il tronco celiaco (Finklestein and Gilchrist, 2010; Mullassery and Losty, 2016) o diffondersi nell'organismo generando metastasi, più frequentemente nei linfonodi, nel midollo osseo, da cui si infiltrano nella corteccia ossea, nel fegato e nella pelle (Schell M, 2003; Finklestein and Gilchrist, 2010). In alcuni rari casi si possono riscontrare metastasi nella cavità oculare, evidenziate da ecchimosi periorbitali e proptosi (Finklestein and Gilchrist, 2010; Mullassery and Losty, 2016), *Figura 2*.

A causa dell'eterogeneità del tumore e delle diverse sedi di localizzazione, i sintomi sono vaghi: dolore addominale, affaticamento, perdita di appetito, febbre e dolori articolari sono molto comuni ma variabili a seconda della sede del tumore primario e della presenza o assenza di metastasi, risultando difficile da diagnosticare in fase precoce (Jenney, 1994).

È noto che una sottopopolazione di cellule di NB sia costituita da cellule staminali tumorali (Cancer Stem Cells, CSC) ossia cellule indefinitamente proliferanti all'interno del tumore che esibiscono proprietà simili alle staminali incluso l'auto-rinnovamento, la multipotenza e/o il mantenimento della pluripotenza, il potenziale tumorigenico con capacità anti-apoptotica e metastatica. Le CSC svolgono un ruolo nella resistenza indotta dalla chemioterapia, con conseguente aumento del rischio di progressione e di recidiva del tumore. Questa funzione è attribuita al possesso di molteplici meccanismi, tra cui l'inibizione dell'apoptosi, l'aumento della riparazione del danno al DNA, la quiescenza (o

dormienza) e l'alterazione della risposta ai farmaci (Aravindan *et al.*, 2019; Johnsen, Dyberg and Wickström, 2019).

Eziologia

Nonostante gli ampi studi sperimentali, l'eziologia del NB non è ancora stata chiarita, tuttavia vi sono alcune sostanze chimiche che sono state indiziate come predisponenti alla loro insorgenza, ma senza alcuna conferma definitiva. La precoce età della diagnosi suggerisce infatti che l'esposizione materna a sostanze quali: droghe, fumo, alcool, pesticidi, idrocarburi e farmaci potrebbero avere un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione precoce della malattia. Viceversa, è stato associato un effetto protettivo all'assunzione in gravidanza di acido folico, per il suo ruolo nello sviluppo neuronale (Sbaffone *et al.*, 2022).

Basi genetiche del Neuroblastoma

Nonostante il NB sia un tumore principalmente sporadico, in una piccola percentuale di casi, circa l'1-2%, è ereditato come carattere autosomico dominante, rientrando in quello che viene definito neuroblastoma familiare (Knudson and Strong, 1972; Tolbert *et al.*, 2017). Le famiglie affette da NB ereditario, sebbene siano rare, mostrano spesso una significativa variabilità clinica nella gravità della malattia, presentando tumori ad *alto* e *basso rischio*. In questi casi la neoplasia si manifesta in giovane età, spesso sono presenti siti primari multipli come, ad esempio, il NB surrenale bilaterale e viene diagnosticato a più persone all'interno della stessa famiglia (Tolbert *et al.*, 2017).

Notevoli studi di associazione genomica "genome wide" (GWAS) e sequenziamento hanno permesso di iniziare a delineare il vastissimo panorama genetico del NB, identificando numerosi geni coinvolti nella tumorigenesi di questa neoplasia, come: CASC15, CHEK2, LMO1, LIN28B, BRCA1, TP53, SMARCA4, CDK1NB. I NB, come altri tumori pediatrici, presentano numerose variazioni del numero di copie (CNV) e poche mutazioni ricorrenti. Inoltre, è interessante evidenziare che l'instabilità cromosomica (CIN), identificata in questo tumore, potrebbe essere una delle principali protagoniste dell'oncogenesi nei NB (Tolbert *et al.*, 2017).

Le aberrazioni cromosomiche più frequenti associate a pazienti *ad alto rischio* e a prognosi sfavorevole nel NB sono il guadagno segmentale del cromosoma 17q, la perdita emizigote dei cromosomi 1p e 11q, l'amplificazione somatica acquisita del cromosoma 1p e 11q e l'amplificazione somatica dell'oncogene MYCN. D'altro canto, le aberrazioni cromosomiche possono indurre la formazione di numerosi geni di fusione (Yu *et al.*, 2019).

Inoltre, il NB *ad alto rischio* può anche presentarsi con riarrangiamenti nella regione cromosomica 5p15.33, che si trova vicino al gene della trascrittasi inversa della telomerasi (TERT), come per la maggior parte dei tumori infantili, i NB mostrano un basso numero di mutazioni somatiche e non esiste una singola mutazione in grado di svilupparli (Lundberg, Treis and Johnsen, 2022).

PHOX2B

Il primo gene scoperto essere implicato nella tumorigenesi del NB familiare è stato PHOX2B. Il gene, PHOX2B acronimo di paired-like homeobox 2B, localizzato sul cromosoma 4p12 codifica per un fattore di trascrizione espresso esclusivamente a livello del sistema nervoso, fondamentale nel differenziamento delle cellule della cresta neurale in neuroni noradrenergici (Raabe *et al.*, 2008; Stafman and Beierle, 2016). Nel 2004, è stata evidenziata l'associazione tra NB e altre malformazioni congenite derivate dalla cresta neurale, come la sindrome da ipoventilazione centrale congenita (CCHS) e la malattia di Hirschsprung (HSCR), determinate da mutazioni di PHOX2B che determinano la perdita della sua funzione. Le mutazioni del gene PHOX2B sono presenti in circa il 10% dei NB familiari e nel 2% dei casi di NB sporadici (Tolbert *et al.*, 2017).

ALK

Un altro gene ad essere stato identificato è ALK (Anaplastic lymphoma kinase), localizzato sul cromosoma 2p23, è espresso dalle cellule progenitrici simpaticoadrenali ed è il gene più frequentemente mutato nel NB anche nei tumori dell'adulto; codifica per un recettore tirosin-chinasico mutato nel dominio tirosin-chinasico che risulta costitutivamente fosforilato. Le mutazioni che attivano ALK si verificano all'incirca nel 50% dei casi di NB familiare e circa nel 7% dei casi di NB sporadico. Sono state identificate tre mutazioni missenso germinali a carico del dominio tirosin-chinasico presenti nella maggior parte dei casi familiari: R1192P, R1275Q e G1128A (Tonini and Capasso, 2020). Tali mutazioni hanno una penetranza fenotipica incompleta, ovvero la presenza della mutazione non

implica obbligatoriamente che gli individui affetti svilupperanno un NB. Fa eccezione la mutazione R1275Q che porta ad una penetranza quasi completa nelle famiglie affette, mentre G1128A è correlata ad una probabilità di circa il 25% di sviluppare un NB (Barr and Applebaum, 2018). Le mutazioni somatiche di ALK più comuni nei casi sporadici di NB si trovano nelle posizioni R1275 (la più frequente), F1174 e F1245 (Carpenter and Mossé, 2012).

Il ruolo oncogeno di ALK è stato ampiamente studiato, sappiamo che l'attivazione patologica di ALK nella cresta neurale, promuove la proliferazione e la migrazione cellulare, impedendo la differenziazione e inducendo l'insorgenza del NB (Wulf *et al.*, 2021). Questo fenomeno è esacerbato in combinazione con altre alterazioni geniche, come le amplificazioni del gene MYC, a causa della vicina localizzazione sul cromosoma 2p, i geni possono essere co-amplificati. Inoltre, l'amplificazione di ALK che porta a iper-espressione durante le fasi di sviluppo comporta una grave interruzione della differenziazione cellulare, la conseguente formazione di tumori o la morte fetale durante lo sviluppo (Wulf *et al.*, 2021).

MYCN

MYCN, localizzato sul cromosoma 2p24.3, appartiene a una piccola famiglia di geni, che oltre a MYCN (o N-Myc) comprende due geni strettamente correlati, C-Myc e L-Myc. Le proteine MYC si legano a promotori attivi alterando la trascrizione e influenzando l'espressione di oltre il 15% di tutti i geni presenti in una cellula. L'espressione deregolata dei geni MYC è frequentemente osservata in tumori di diversa origine, il che implica che le proteine MYC hanno funzioni centrali durante la carcinogenesi. A differenza di C-myc e L-myc, l'espressione di N-myc è limitata alle cellule staminali ematopoietiche e alle cellule all'interno del sistema nervoso in via di sviluppo (Otte *et al.*, 2021), nel corso del differenziamento dei neuroni simpatici, i livelli di MYCN nelle cellule diminuiscono gradualmente, suggerendo che la maturazione è indipendente dall'espressione di MYCN (Johnsen, Dyberg and Wickström, 2019). La sovr'espressione di N-myc è presente in diversi tumori umani derivati dalle cellule della cresta neurale come il NB, il retinoblastoma, il glioblastoma, l'astrocitoma così come le neoplasie ematologiche (Otte *et al.*, 2021). Per quanto riguarda il NB, l'amplificazione di MYCN, la quale è solitamente associata a perdita cromosomica segmentale del braccio corto distale del cromosoma 1 (1p) e viene usato come biomarcatore per la stratificazione del rischio, in quanto è stato dimostrato che i

pazienti che presentano l'amplificazione di MYCN hanno scarsa possibilità di sopravvivenza, rientrando automaticamente nella categoria *ad alto rischio*, ma il motivo per cui l'amplificazione di MYCN è associata a un fenotipo più aggressivo è ancora incerto. Sappiamo che MYCN svolge diversi ruoli nella malignità e nel mantenimento dello stato indifferenziato, può infatti attivare la trascrizione di geni coinvolti nel processo metastatico, nella sopravvivenza, nella proliferazione, nella pluripotenza e nell'angiogenesi, mentre può sopprimere l'espressione di geni che promuovono la differenziazione, l'arresto del ciclo cellulare e la sorveglianza immunitaria. È anche in grado di indurre apoptosi coinvolgendo p53, un fattore di trascrizione con funzione oncosoppressiva che regola il ciclo cellulare. Inoltre, ha un ruolo importante nella vascolarizzazione nel NB, in quanto facilita la produzione di fattori di crescita delle cellule endoteliali e previene il rilascio di inibitori dell'angiogenesi ed è probabilmente in grado di promuovere uno stato di tipo staminale, bloccando la differenziazione ed esprimendo fattori di pluripotenza (Huang and Weiss, 2013). La prevalenza dell'amplificazione di MYCN nei pazienti affetti da NB è del 20%-30% e la sopravvivenza complessiva per questi pazienti rimane inferiore al 50% (Otte *et al.*, 2021).

ATRX

ATRX (alfa talassemia/sindrome da ritardo mentale X-linked) fa parte di un complesso multiproteico e svolge un ruolo nella regolazione del rimodellamento della cromatina dipendente dall'adenosina trifosfato, nell'assemblaggio dei nucleosomi e nel mantenimento dei telomeri. Le mutazioni di ATRX identificate nei NB, sembrano essere mutazioni con perdita di funzione (Cheung *et al.*, 2012). Le mutazioni di ATRX sono piuttosto comuni nel NB sporadico e vi è una relazione statisticamente significativa tra le mutazioni e l'età del paziente alla diagnosi: si verificano nel 17% dei bambini di età compresa tra 18 mesi e 12 anni con malattia in stadio IV e nel 44% dei pazienti di età superiore ai 12 anni con una prognosi sfavorevole, mentre nei bambini di età inferiore ai 18 mesi in stadio IV non sono state identificate mutazioni ATRX con una prognosi migliore rispetto a quelli di età superiore (Cheung and Dyer, 2013).

NTRK

Ricopre un ruolo centrale nel normale sviluppo delle cellule neuronali la segnalazione delle neurotrofine. Sia NTRK1, 2, 3 che codificano per i recettori TrkA, B e C (recettori delle tropiomiosine chinasi A, B, C) che i loro ligandi NGF (Nerve Growth Factor), BDNF

(Brain-Derived Neurotrophic Factor) e NT-3 (Neurotrofina-3) rispettivamente sono stati ampiamente studiati nel NB. Il TrkA è maggiormente espresso in questi tumori con caratteristiche favorevoli, la segnalazione del TrkA media la regressione spontanea che spesso si osserva nei neonati con NB localizzato o allo stadio 4S (Irwin and Park, 2015). Al contrario, della variante oncogenica di splicing del TrkA, il TrkAIII, che è espressa negli stadi avanzati, metastatici e recidivanti del NB (Farina *et al.*, 2021) e il TrkB che ha proprietà proliferative e migratorie, aumenta la chemioresistenza ed è altamente espresso nei NB sfavorevoli che presentano N-MYC amplificato (Irwin and Park, 2015).

Inoltre, il gene NTRK è anche coinvolto in alterazioni genomiche che portano alla formazione di proteine di fusione. La struttura di base di questi trascritti chimerici è fortemente mantenuta: la parte al 5' della fusione contiene una regione regolatoria di un gene trascrizionale che modula l'espressione di tutto il costrutto che al 3' presenta la sequenza codificante il dominio tirosin-chinasico delle proteine Trk, *Figura 3*. Questa struttura chimerica provoca sovrespressione del dominio chinasi del Trk che risulta costitutivamente attivo (Vaishnavi, Le and Doebele, 2015) ed inoltre queste proteine svolgono funzione oncogenica, tramite l'attivazione di alcune vie di segnalazione come la via IP3K/Akt e la via MAPK (Tognon *et al.*, 2001; Drilon *et al.*, 2017).

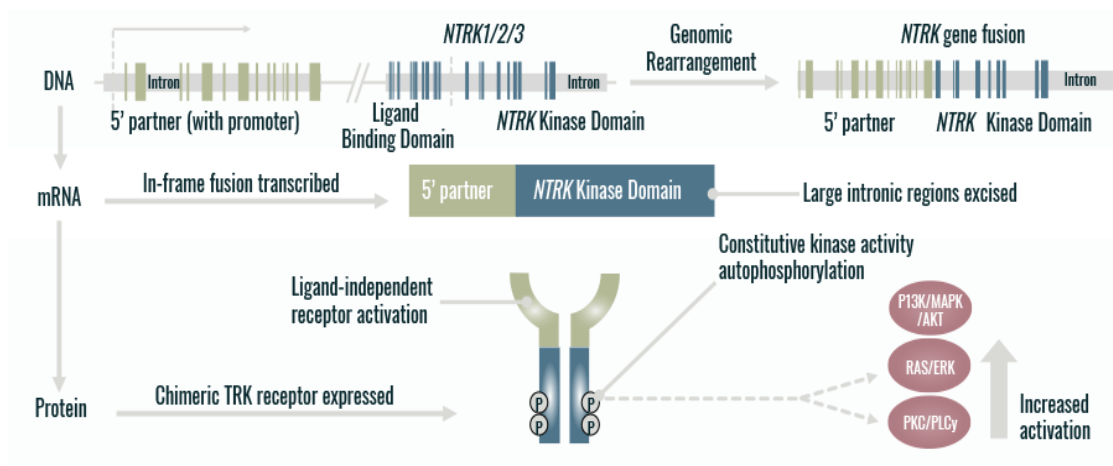


Figura 3. Meccanismo di attivazione delle fusioni del gene NTRK (fonte Bayer: <https://global.ntkrtesting.com/ntkr-gene-fusions-in-oncology/ntkr-gene-fusions-in-oncogenesis>)

Diagnosi

Il NB è il tumore più comunemente diagnosticato in età pediatrica, rappresenta la terza neoplasia, per frequenza di diagnosi, dopo le leucemie e i tumori cerebrali; si manifesta il più delle volte, nel primo mese di vita del bambino quando il tumore inizia a crescere e a causare sintomi (Matthay *et al.*, 2016); l'età media della diagnosi è di 17 mesi, ed ha un'incidenza di 9-12 casi su un milione di individui sotto i 15 anni di età (Mullassery and Losty, 2016).

La diagnosi di NB richiede, oltre ad un accurato esame clinico, la valutazione dell'**imaging radiografico**, degli **esami di laboratorio** e dell'**istologica del tumore**.

- **Imaging radiografico:** per determinare le dimensioni, l'estensione regionale e la presenza di diffusione metastatica al collo, al torace, all'addome o alla pelvi viene eseguita, come primo approccio, un'ecografia addominale e una RX del torace, e successivamente si prosegue con una Risonanza Magnetica (RM) o una Tomografia Computerizzata (TC) con mezzo di contrasto per precisare l'estensione della malattia.

- **Esami di laboratorio:** a livello ematochimico, oltre agli esami di routine (emocromo, funzionalità epatica e renale, profilo coagulativo, LDH e ferritina) è fondamentale il dosaggio dei metaboliti urinari delle catecolamine (acido omovanillico, HVA e vanilmandelico, VMA). Questo test è altamente sensibile e specifico per il NB; infatti, i metaboliti urinari risultano notevolmente aumentati in circa il 90% di tutti i pazienti con questa neoplasia e le loro quantità relative sono correlate al grado di differenziazione delle cellule derivate dalla cresta neurale tumorale, con livelli aumentati associati a un decorso sfavorevole della malattia. Nel caso in cui dovesse essere difficile ottenere campioni di urina adeguati, come nel caso dei neonati, il dosaggio dei metaboliti a livello ematico rappresenta un'alternativa valida. Livelli aumentati di marcatori sierici invece, come lattato deidrogenasi o enolasi neurone-specifica, sono stati descritti come marcatori prognostici sfavorevoli ma con bassa specificità (Matthay *et al.*, 2016).

- **Istologica del tumore:** l'istologia del tumore è essenziale, in aggiunta alle caratteristiche genetico-molecolari, per la stratificazione del rischio prognostico.

Nel 1999 è stata istituita la classificazione istologica internazionale della patologia del Neuroblastoma (International NB Pathology Classification, INPC), revisionata nel 2003

(Peuchmaur *et al.*, 2003), che descrive quattro categorie di tumori neuroblastici periferici (pNT) (Nakazawa, 2021):

- Ganglioneuroma (GN, istologia favorevole),
- Ganglioneuroblastoma intermixed (GNBi, istologia favorevole)
- Ganglioneuroblastoma nodulare (GNBn, istologia non favorevole)
- Neuroblastoma (NB) distinto a sua volta in tre sottotipi: indifferenziato, scarsamente differenziato e differenziato con istologia favorevole e non favorevole basata sull'età, grado di differenziazione neuroblastica e classe di indice mitotico.

Per individuare le sedi metastatiche sono necessari aspirati bilaterali e biopsie del midollo osseo, esame istologico e immunoistochimica, può essere utilizzata la scintigrafia metaiodobenzilguanidina radiomarcata con iodio-123 (123I-MIBG), un analogo della noradrenalina, che si concentra selettivamente nel tessuto nervoso simpatico; l'esame ha una sensibilità stimata del 90% e una specificità del 99% (Irwin and Park, 2015). L'entità della malattia metastatica nei pazienti con NB non avido di mIBG, circa il 15% dei casi di NB, può essere valutata utilizzando altre tecniche come la scintigrafia ossea con Tecnezio-99, la Tomografia a Emissione di Positroni con 18f-dopa (DOPA-PET) o la PET con fluoro-desossiglucosio (FBG-PET).

Inoltre, per l'analisi delle mutazioni e delle alterazioni a livello del genoma a carico dell'oncogene MYCN e del gene ALK, poliploidie ed eventuali alterazioni cromosomiche numeriche o strutturali presenti nel tumore alla diagnosi si utilizzano la tecnica array-based Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) e la tecnica Fluorescence In Situ Hybridation (FISH).

Al momento non esistono programmi di screening standard o di routine specifici per il NB, se non per soggetti con una particolare predisposizione familiare o portatori di sindromi associate ad un aumentato rischio di sviluppo di neoplasie (National Cancer Institute, 2023).

Stadiazione e classificazione del rischio

Dal 1988 i criteri per la diagnosi e la stadiazione sono stati basati sul Sistema Internazionale di stadiazione del neuroblastoma (INSS o International Neuroblastoma Staging System)

che classifica questa neoplasia in stadi: 1, 2A, 2B, 3, 4 e 4S. Gli stadi da 1 a 3 rappresentano tumori localizzati, classificati in base all'entità della resezione, all'invasione locale e al coinvolgimento dei linfonodi. Lo stadio 4 indica la presenza di metastasi a distanza e lo stadio 4S (4Speciale) caratterizzato da metastasi al fegato, alla cute e/o al midollo nei neonati, di solito è associato a caratteristiche biologiche favorevoli e può andare incontro a regressione spontanea del tumore senza trattamento (Brodeur *et al.*, 1988, 1993).

Nel 2009 un gruppo di ricercatori esperti in NB ha sviluppato un nuovo sistema di stadiazione clinica pretrattamento, l'International Neuroblastoma Risk Group Staging System, INRGSS, che non si basa sull'estensione della resezione chirurgica come l'INSS, ma sui risultati dell'imaging del tumore (di solito TC o RM, e scansione MIBG); prevede lo stadio: L1 per le forme localizzate e operabili, lo stadio L2 per quelle localizzate ma inoperabili all'esordio, lo stadio M per la malattia metastatica e lo stadio MS per la malattia metastatica nei bambini di età inferiore ai 18 mesi con localizzazioni epatiche e/o midollari e/o cutanee (Monclair *et al.*, 2009). Inoltre, gli stessi ricercatori hanno anche ideato delle categorie di rischio basate sullo stadio INRG, età, categoria istologica, grado di differenziazione del tumore, amplificazione di MYCN, presenza o assenza di aberrazioni del cromosoma 11q e ploidia delle cellule tumorali. Questo sistema INRG garantisce, ai bambini con diagnosi di NB, una stratificazione in un determinato gruppo valido in tutti i paesi del mondo. Le categorie si dividono in: *basso, intermedio e alto rischio* (Cohn *et al.*, 2009; Monclair *et al.*, 2009) vedi *Figura 4*.

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

Figura 4. International Neuroblastoma Risk Group System, INRG (fonte: E. Sokol and A. V. Desai, "The evolution of risk classification for neuroblastoma," *Children*, vol. 6, no. 2. *Children* (Basel), 01-Feb-2019)

Terapia

Diverse modalità terapeutiche vengono combinate in base al gruppo di rischio. La chirurgia viene utilizzata in fase di esordio della malattia per eseguire una biopsia, quando le caratteristiche della massa consentano l'asportazione radicale, per rimuovere metastasi o in caso di recidiva. La radioterapia è una tecnica che viene utilizzata sia con scopo adiuvante negli alti rischi, sia come terapia palliativa in caso di disseminazione metastatica, compressione midollare o in corso di recidiva; viene invece evitata nei pazienti a *basso rischio* a causa dei potenziali effetti tardivi nonostante le nuove tecnologie che offrono la possibilità di minimizzare la dose in un campo da irradiare sempre più specifico e ristretto. La chemioterapia di induzione comprende vari chemioterapici: **doxorubicina**, cisplatino, carboplatino, etoposide, ciclofosfamida che vengono somministrati ogni 10 giorni con diverse associazioni e con dosi elevate per interferire con il recupero delle cellule tumorali. La Terapia mieloablativa con trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche (TCSEa), viene utilizzata in pazienti *ad alto rischio* con regimi di condizionamento contenenti Melfalan o Terapia di differenziazione con acido *cis*-retinoico ma nei NB *ad alto rischio* in quanto il 50% dei pazienti recidiva mesi o anni dopo il trapianto e l'aggiunta di acido *cis*-retinoico ha mostrato un miglioramento (Matthay *et al.*, 2016). L'immunoterapia con disialoganglioside GD2, un glicosfingolipide altamente espresso in tumori di origine ectodermica quali NB e melanoma, motivo per cui vengono applicati anticorpi monoclonali anti GD2 (Dinutuximab) che mediano la lisi cellulare, associati o meno a somministrazione di citochine quali IL-2 e/o GM-CSF (Vantaku *et al.*, 2019).

Trattamento per gruppo di rischio

Il trattamento iniziale di pazienti affetti da NB viene stabilito principalmente dal gruppo di rischio. Si va dalla semplice osservazione di alcuni pazienti a "*rischio molto basso*" fino a terapie multimodali per quelli con malattia ad "*alto rischio*".

- *Rischio molto basso*: per i pazienti con età inferiore a 18 mesi con stadi L1, L2 o MS, senza amplificazione di MYCN, con caratteristiche genomiche favorevoli, in assenza di sintomi clinici o progressione del tumore, può essere sufficiente il follow up senza una chirurgia citoriduttiva. L'osservazione include il monitoraggio mediante esame obiettivo, valutazione dei livelli di catecolamine urinarie e imaging con ecografia o RM inizialmente a 6 e 12 settimane, poi ogni 3 mesi per il primo anno e ogni 6 mesi dal secondo anno. In

alcuni casi è richiesta invece la resezione chirurgica, non necessariamente completa, dal momento che la progressione del residuo del tumore è solitamente autolimitante (Tolbert and Matthay, 2018)

- *Basso rischio*: la strategia di trattamento dipende dalle manifestazioni cliniche. Nei pazienti con NB allo stadio L1, MYCN non amplificato viene effettuata la resezione chirurgica del tumore primitivo mentre per i pazienti con NB stadio L2 o MS, MYCN non amplificato, età < di 18 mesi sono trattati con alcuni cicli di chemioterapia adiuvante; in caso di pazienti asintomatici si può attuare la sola osservazione clinica
- *Rischio Intermedio*: per pazienti affetti da NB inoperabile, età superiore ai 18 mesi, con MYCN non amplificato, si identificano due strategie in base alla presenza o meno di metastasi. I pazienti L2, MYCN non amplificato, ma con presenza di aberrazioni cromosomiche come 11q: viene eseguita la chemioterapia per permettere la resezione completa, o quasi, del tumore considerato inoperabile alla diagnosi. I pazienti con stadio M età < 18 mesi, MYCN non amplificato, la terapia consiste in 4-8 cicli di chemioterapia e resezione del tumore primitivo (Whittle *et al.*, 2017)
- *Alto Rischio*: nei pazienti con stadio L1, L2, M e MS di qualsiasi età con MYCN amplificato e pazienti di stadio M con età > 18 mesi, l'approccio terapeutico consta delle seguenti fasi:
 - chemioterapia di induzione e di combinazione per ridurre la massa tumorale primitiva e le metastasi
 - intervento chirurgico
 - chemioterapia mieloablativa ad alte dosi e trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche per eliminare le cellule tumorali residue
 - terapia di mantenimento con anticorpo monoclonale anti-GD2 e immunoterapia con citochine come IL2
 - terapia differenziante con acido *cis*-retinoico

Questa strategia terapeutica multimodale, fortemente aggressiva, ha portato a frequenti ricadute e decessi nei pazienti *ad alto rischio*, motivo per cui la ricerca si sta concentrando sullo studio delle origini della malattia al fine di trovare nuovi approcci terapeutici.

A seguito della scoperta e dell'importanza delle fusioni che coinvolgono i geni NTRK1, NTRK2 e NTRK3 in diverse neoplasie sono stati approvati dei nuovi farmaci specifici per il TRK, ed altri sono in fase di sperimentazione clinica; questi farmaci sono indipendenti dal tipo di lesione e dalla sede del tumore mirati proprio contro le proteine chimeriche prodotte dai geni di fusione (Drilon *et al.*, 2017). (argomento approfondito al paragrafo "*TrkAIII e terapia clinica*")

Le fusioni geniche possono essere identificate utilizzando differenti molecole, a partire dal DNA tramite analisi di sequenza o ibridazione fluorescente *in situ* (FISH), passando per l'RNA analizzabile tramite PCR quantitativa associata a retrotrascrizione (qRT-PCR), sequenziamento impiegando pannelli NGS (next generation sequencing) multigenici, per arrivare alla valutazione del prodotto peptidico attraverso l'immunoistochimica.

Regressione spontanea

Nei bambini affetti da NB, al di sotto di un anno di età, la neoplasia può regredire spontaneamente ma allo stesso tempo disseminarsi nel fegato, midollo osseo o cute. Il fenomeno della regressione spontanea è stato ben descritto nei neonati affetti da NB, soprattutto in quelli con stadio 4S di diffusione metastatica. La regressione spontanea sembra verificarsi solo nei tumori con guadagni di cromosomi interi, MYCN non amplificato e maggiore espressione di geni presenti sul braccio corto del cromosoma 1(1p) (Brodeur, 2018).

Ulteriori caratteristiche associate alla regressione spontanea includono la mancanza di espressione della telomerasi (Hiyama *et al.*, 1995) e l'espressione del recettore neurotrofico TrkA. È stato dimostrato che cellule di NB che esprimono il TrkA in coltura sopravvivono e si differenziano in presenza di NGF ma vanno incontro ad apoptosi in sua assenza. Pertanto, privare le cellule di NGF o inibire la segnalazione del TrkA, utilizzando farmaci inibitori del Trk, può essere un approccio efficace per indurre la regressione. Tuttavia, la maggior parte degli inibitori del Trk sono potenti inibitori di TrkA ma anche di TrkB e TrkC. Prima che questi agenti vengano utilizzati per trattare i neonati con malattia in stadio

4S, gli studi clinici sugli inibitori di Trk di *seconda generazione* dovrebbero dimostrare la sicurezza e l'efficacia contro i NB ricorrenti e/o refrattari che esprimono TrkB, specialmente nei bambini piccoli (Brodeur, 2018).

Contrariamente alcuni studi hanno suggerito che i neonati con NB surrenalico asintomatico, di piccole dimensioni e a *basso rischio*, rilevato dallo screening o durante un esame ecografico prenatale o incidentale, spesso hanno tumori che regrediscono spontaneamente senza il bisogno di alcun intervento chirurgico o diagnosi tissutale (Yamamoto *et al.*, 2002).

DOXORUBICINA

La Doxorubicina (Dox), chiamata anche Adriamicina, è un antibiotico ad azione chemioterapica appartenente alla famiglia delle antracicline; isolato dal batterio *Streptomyces peucetius* sottospecie *caesius* (Johnson-Arbor and Dubey, 2022). Usata come agente chemioterapico dagli anni '60, nel 1974 è stato il primo farmaco antitumorale, incapsulato nei liposomi ad ottenere l'approvazione clinica da parte della *Food and Drug Administration* (FDA) (Rivankar, 2014). La Dox, da sola o in combinazione con altri farmaci chemioterapici, è ampiamente utilizzata come terapia di prima linea per una miriade di tumori solidi e metastatici: il neuroblastoma, la leucemia linfoblastica o mieloblastica acuta, il carcinoma polmonare a piccole cellule, il tumore alla mammella, il tumore ovarico, il tumore della vescica, il tumore gastrico, il tumore della tiroide, i tumori ossei osteogenici, il tumore di Wilms, il linfoma di Hodgkins ed il linfoma cutaneo a cellule T (Sritharan and Sivalingam, 2021).

Il farmaco si presenta di colore rosso a pH neutro, è idrosolubile e fotosensibile (Rivankar, 2014). Viene somministrato per via endovenosa, ha un'emivita totale di 30 ore e la clearance plasmatica è di 324-809 ml/min/metro². Circa il 40% della dose somministrata viene metabolizzata nella bile ed eliminata in 5 giorni. Anche se la Dox viene escreta principalmente per via biliare, il 5-12% viene eliminata con le urine e meno del 3% viene metabolizzata in doxorubicinolo dal fegato e dal rene (Johnson-Arbor and Dubey, 2022). I sintomi associati al farmaco sono: vomito, formazione di ulcere orali, alopecia, pigmentazione cutanea e si manifestano dopo 24 ore dall'infusione endovenosa (Rivankar, 2014).

Meccanismo d'azione

La Dox si lega a molteplici bersagli intracellulari (Sritharan and Sivalingam, 2021), *Figura 5*. Innanzitutto, entra nella cellula per semplice diffusione e nel citoplasma forma un complesso con il proteasoma 26S che gli permette di traslocare nel nucleo passando attraverso i pori nucleari (Carvalho *et al.*, 2009). La Dox presenta una maggiore affinità di legame con il DNA rispetto al proteasoma 26S pertanto, nel nucleo, si dissocia dal proteasoma e si intercala nel DNA dove inibisce l'attività dell'enzima Topoisomerasi II. L'inibizione provoca un rilassamento della doppia elica del DNA e cambiamenti nella struttura del nucleosoma dovuti alla dissociazione del dimero istonico H2A/H2B, ciò determina la rottura del doppio filamento del DNA che non essendo più riparabile si conclude con l'apoptosi della cellula (Sritharan and Sivalingam, 2021).

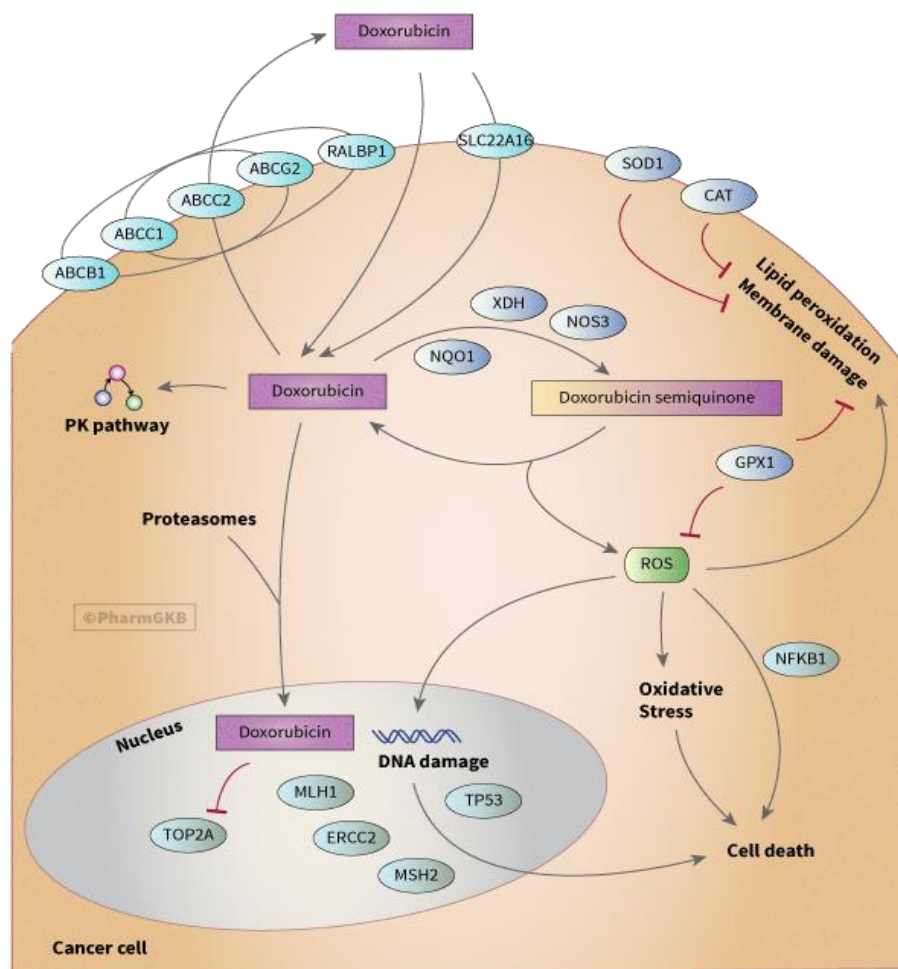


Figura 5. Bersagli intracellulari Doxorubicina (fonte: C. F. Thorn et al., "Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects," *Pharmacogenet. Genomics*, vol. 21, no. 7, pp. 440–446, 201).

Il farmaco, oltre all'attività nucleare, nel citoplasma agisce come accettore di elettroni e viene convertita dagli enzimi ossidoreduttasi, come l'NADH deidrogenasi, l'ossido nitrico sintasi e la xantina ossidasi nella forma Dox semichinone, una forma instabile e quando viene riconvertita in Dox determina il rilascio dei ROS. Questo ulteriore aumento di specie reattive dell'ossigeno provoca: stress ossidativo, perossidazione lipidica, danno alla membrana, danno al DNA e infine apoptosi (Sritharan and Sivalingam, 2021). Inoltre, la Dox attiva componenti della risposta al danno al DNA come: Chk1, Chk2, ATR e p53 determinando la defosforilazione di Src e l'attivazione di p21 che provocano l'arresto della proliferazione in fase G1/S del ciclo cellulare favorendo l'ingresso, delle cellule tumorali, in uno stato di senescenza (Cappabianca *et al.*, 2022), *Figura 6*.

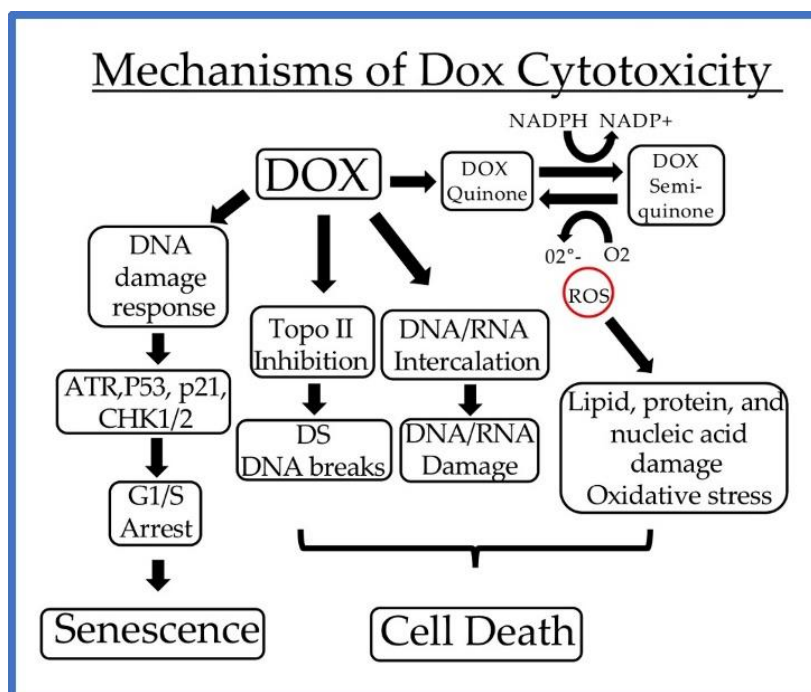


Figura 6. Meccanismi di citotossicità indotti dalla Doxorubicina

Tossicità e Farmaco resistenza

Questo farmaco utilizzato come trattamento chemioterapico multimodale nei pazienti affetti da NB *ad alto rischio*, presenta un limite nella risposta clinica dovuto dallo sviluppo della cardiotoxicità e dalla chemioresistenza (Cappabianca *et al.*, 2022).

La cardiotoxicità viene classificata in acuta e cronica, tra gli effetti acuti abbiamo l'ipotensione e la tachicardia che solitamente sono reversibili mentre la cardiomiopatia con

conseguente insufficienza cardiaca congestizia è un indice di tossicità cardiaca cronica, si manifesta anche a distanza di anni dal trattamento e può essere fatale per il paziente (Rivankar, 2014).

La tossicità cardiaca può essere causata da una down-regolazione di geni specifici per il cuore, da un aumento dello stress ossidativo dei cardiomiociti e dall'induzione dell'apoptosi (Johnson-Arbor and Dubey, 2022).

Una delle principali aree di ricerca nel campo delle antracicline è incentrata sul cercare di ridurre la cardiotossicità del farmaco preservando l'efficacia terapeutica. Proprio per questa ragione, ad oggi la Dox viene utilizzata in combinazione con altri farmaci antitumorali o cardioprotettori come i β -bloccanti, gli ACE inibitori (Hahn, Lenihan and Ky, 2014), solo in rare occasioni viene somministrata da sola; si utilizza il farmaco con una formulazione liposomiale in quanto i liposomi, data la loro struttura, non possono uscire dallo spazio vascolare e riversarsi in aree con giunzioni capillari strette come nel miocardio ma possono lasciare la circolazione per spostarsi in tessuti e organi rivestiti da cellule non strettamente unite come le cellule tumorali. Un altro vantaggio associato all'uso dei liposomi è che vengono utilizzati fosfolipidi di origine naturale, tuorlo d'uovo o soia, per la formazione di queste vescicole e quindi sono particolarmente sicuri per la salute umana (Rivankar, 2014). Inoltre, per quanto riguarda la tossicità cardiaca, sono in fase di sperimentazione nuovi derivati delle antracicline (Thorn *et al.*, 2011).

Nelle cellule di NB, la resistenza alla Dox è associata ad un fenotipo simile a quello di una cellula staminale tumorale (CSC) dovuta:

- da una maggiore espressione delle pompe di efflusso di farmaci ABCG2 e ABCG3. I trasportatori ABC (ATP-binding cassette) sono proteine transmembrana che guidano l'efflusso di molti farmaci chemioterapici, è stato dimostrato che diversi tumori come il NB presentano un'elevata espressione di ABCG2 (ABC sottofamiglia G membro 2) e ABCG3 (ABC sottofamiglia G membro 3), tanto da essere considerati veri e propri marcatori tumorali. Queste proteine sono associate alle cellule progenitrici neurali, influenzando il mantenimento della staminalità (Aravindan *et al.*, 2019).
- dall'attivazione di segnali pro-sopravvivenza da parte di Akt e JARID1B (istone H3 lisina 4 demetilasi). Akt esercita i suoi effetti pro-sopravvivenza attraverso l'induzione

della fosforilazione di diverse molecole ad attività pro-apoptotica: il fattore di trascrizione FKHR che inibisce l'espressione del ligando Fas (FasL), BAD che porta al rilascio della proteina anti-apoptotica Bcl-xL, la caspasi-9, la glicogenosintasi chinasi 3- β (GSK3- β) (Emran, Rebbaa and Mirkin, 2002) e la cascata di segnalazione ZAK/MKK4/MKK7/JNK (Cappabianca *et al.*, 2022). JARID1B (noto anche come KDM5B o PLU1) fa parte della famiglia dei geni JHDM. Questi sono responsabili della demetilazione delle lisine tri- e di-metilate in posizione 4 dell'istone 3 e insieme a Nestin risultano ampiamente espresse in cellule CSC di NB, determinando una ridotta risposta alla Dox. Difatti, silenziando JARID1B si ha una riduzione del fenotipo CSC, del processo di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e alla compromissione della via di segnalazione di NOTCH (Aravindan *et al.*, 2019), *Figura 7*.

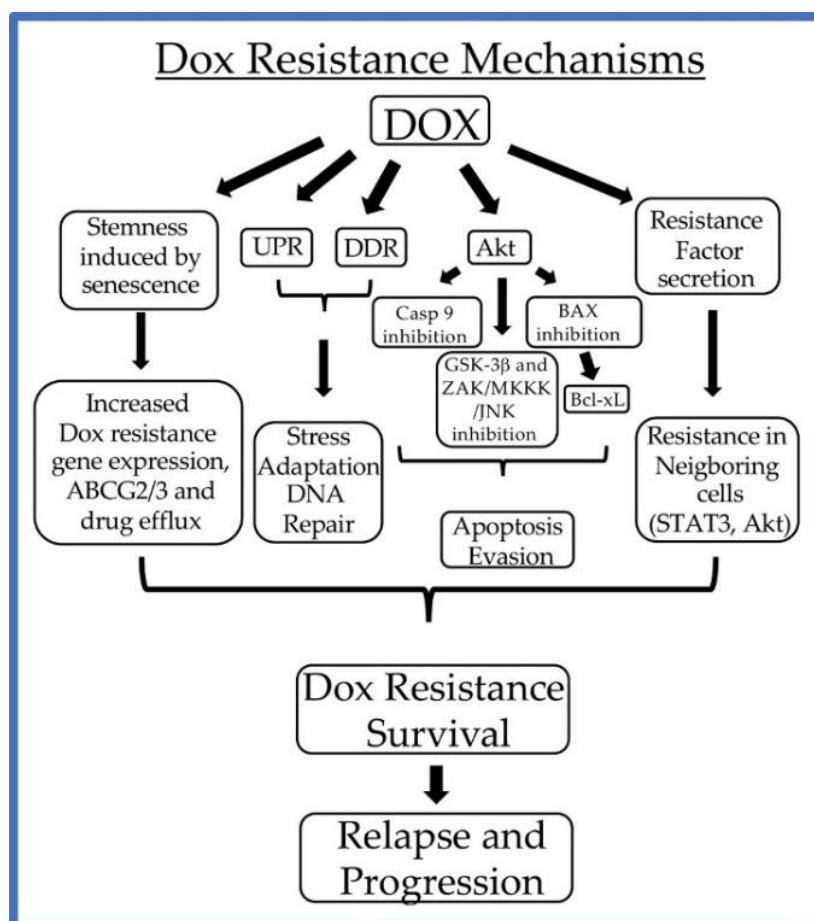


Figura 7. Meccanismi di resistenza indotti dalla Doxorubicina

Una delle cause principali cause del fallimento di questo trattamento antitumorale è proprio lo sviluppo della resistenza che promuove la quiescenza e la staminalità delle cellule tumorali con una potenziale recidiva post-terapeutica maggiormente aggressiva. Infatti, la

ricerca scientifica cerca di approfondire continuamente i processi alla base del fenomeno per rendere la cura, per i pazienti affetti da NB, sempre più efficace. Ad esempio, è noto che gli inibitori di JAK2 e dell'istone deacetilasi (HDAC) riducano la resistenza alla Dox nelle cellule di NB (Cappabianca *et al.*, 2022) e potrebbero essere utilizzati in terapia come adiuvati in combinazione con Dox proprio per cercare di inibirne la resistenza.

TrkA

Il recettore della tropomiosina chinasi A, TrkA è un membro della famiglia dei recettori neurotrofici tirosin-chinasici che comprende, oltre al TrkA, il TrkB e il TrkC; ed è il recettore preferenziale per l'NGF (Nerve Growth Factor) (Klein *et al.*, 1991; Patapoutian and Reichardt, 2001).

Il gene umano NTRK1, che codifica per il TrkA è costituito da 25 kb, è organizzato in 17 esoni localizzati sul cromosoma 1q21-q22 (Weier *et al.*, 1995; Greco, Villa and Pierotti, 1996). L'espressione del TrkA è assolutamente necessaria nello sviluppo del sistema nervoso periferico in quanto regola la formazione, la differenziazione e la sopravvivenza dei neuroni simpatici derivanti dalle cellule della cresta neurale (Bibel and Barde, 2000). Il TrkA è anche fondamentale per lo sviluppo e la funzione del sistema immunitario (Vega *et al.*, 2003; Fiore, Chaldakov and Aloe, 2009).

Il recettore transmembrana, TrkA, di 140 kDa è costituito da un dominio: **extracellulare, transmembrana, juxtamembrana e intracellulare**, *Figura 8*.

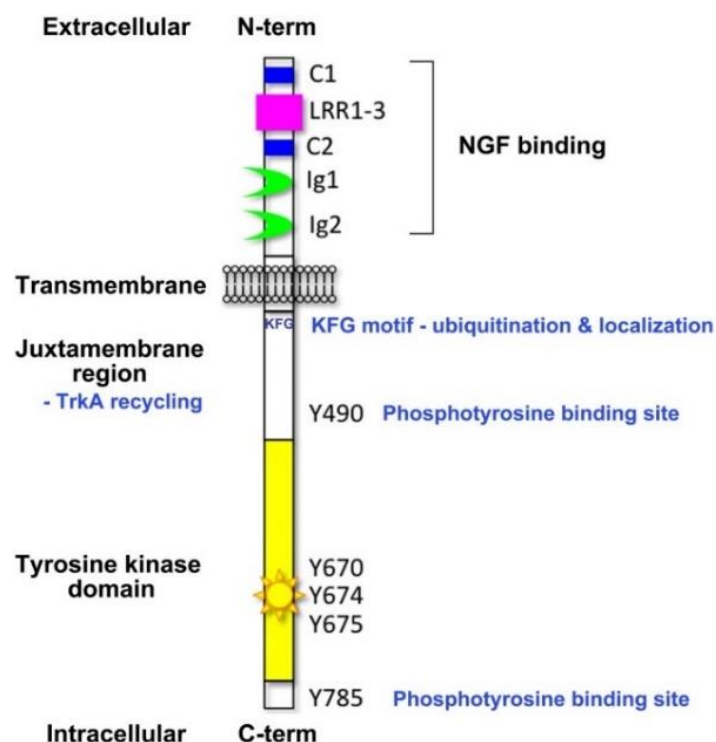


Figura 8. Organizzazione dei domini del recettore Trk (fonte Uren and Turnley 2014)

Il **dominio extracellulare** contiene due regioni ricche di cisteine, C1 e C2 interrotte da una regione ricca di leucine, LRR1-3 e due domini Immunoglobulin-like (IgG-like), Ig1 e Ig2 (Windisch, Marksteiner and Schneider, 1995; Holden *et al.*, 1997; Arevalo *et al.*, 2000). Quando il ligando non è presente, il TrkA è mantenuto in forma inattiva (monomeric) all'interno di caveole; l'N-glicosilazione del dominio extracellulare e la presenza dei domini IgG-like prevengono la dimerizzazione ligando-indipendente (Arevalo *et al.*, 2000).

I **domini transmembrana e juxtamembrana** sono di fondamentale importanza affinché si verifichi la trasduzione del segnale all'interno della cellula (Peng *et al.*, 1995; Monshipouri, Jiang and Lazarovici, 2000). Nella juxtamembrana troviamo il motivo KFG che è un sito di ubiquitinazione coinvolto nella localizzazione del recettore (Uren and Turnley, 2014).

E proprio nel **dominio intracellulare**, al momento della dimerizzazione recettoriale, ha inizio la trasduzione del segnale mediante autofosforilazione dei residui di tirosina:

- Y490 che interagisce con FRS2 e Shc
- Y674/675 che interagisce con Grb-2/SOS
- Y751 che lega la subunità p85 α di PI3K
- Y785 che interagisce con PLC- γ

La trasduzione del segnale intracellulare prosegue mediante le vie Ras/MAPK, PI3K/Akt/NF- κ B e PKC con conseguenti effetti sulla proliferazione, differenziamento, sopravvivenza e apoptosi cellulare, *Figura 9*, (Tacconelli *et al.*, 2004).

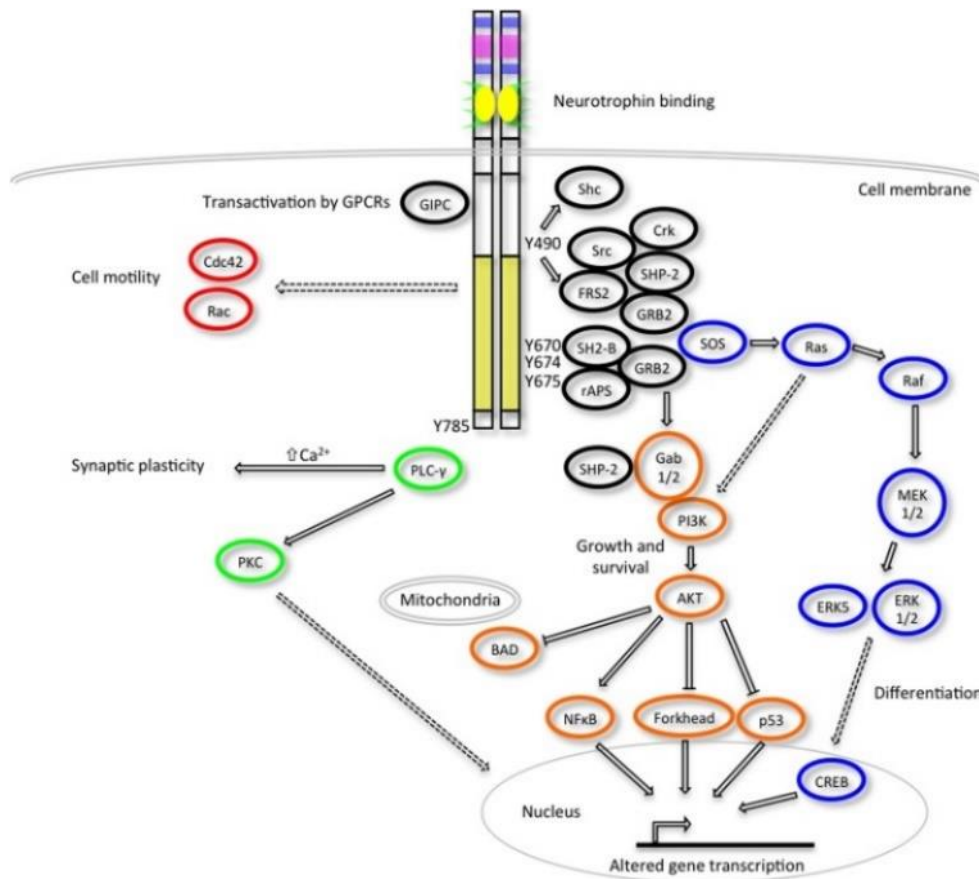


Figura 9. Via di segnalazione del recettore Trk (fonte Urean and Turnley 2014)

Nonostante l'espressione variabile del TrkA e la presenza di polimorfismi e mutazioni non codificanti del gene NTRK1 nei NB (Scaruffi *et al.*, 1999), non ci sono evidenze che associno mutazioni del TrkA all'attività oncogena in questo tumore. Al contrario, il TrkA è considerato un potenziale soppressore del NB, questo concetto deriva dall'identificazione dell'associazione tra alti livelli di espressione del Trk e NB a *basso rischio* e ha portato a considerare l'espressione del TrkA come un marcatore prognostico favorevole sia nella regressione spontanea che indotta dalla terapia (Brodeur *et al.*, 1997).

Varianti di splicing del TrkA

Lo splicing alternativo è un meccanismo cellulare fondamentale che consente a un singolo gene di codificare per più proteine attraverso l'utilizzo di esoni alternativi, è in gran parte responsabile della complessità proteomica degli organismi superiori (Modrek and Lee, 2002) ed è anche coinvolto nella patogenesi tumorale sia a per l'attivazione di oncogeni

che per l'inattivazione di oncosoppressori. I recettori tirosin-chinasici coinvolti nello splicing alternativo includono il recettore dell'EGF (Epidermal Growth Factor), il recettore-1 dell'FGF (Fibroblast Growth Factor), il recettore dell'insulina e il TrkA (Tacconelli *et al.*, 2004; Kalniņa *et al.*, 2005).

Le varianti di splicing relative al TrkA includono:

- TrkA L0 e L1: L0 manca degli esoni 2,3 e 4, L1 manca degli esoni 2 e 3; in entrambe le varianti l'assenza degli esoni si traduce in un recettore privo del dominio ricco di leucine che determina un'alterazione del legame ligando-recettore. Non esistono rapporti che colleghino direttamente le due varianti di splicing ai tumori (Dubus *et al.*, 2000)

- TrkAI e TrkAII: assenza dell'esone 9 nella variante TrkAI che non altera la normale via di segnalazione del recettore. Presenza dell'esone 9 nel TrkAII è espresso prevalentemente all'interno del sistema nervoso, mentre l'espressione di TrkAI predomina nei tessuti timici (Barker *et al.*, 1993)

- TrkAIII: privo degli esoni 6 e 7 e dell'esone 9 (Tacconelli *et al.*, 2004).

TrkA III

Il TrkAIII è stato originariamente identificato nel nostro laboratorio, in un risultato di RT-PCR proveniente da mRNA purificati di NB primari umani allo stadio 4 e successivamente è stato clonato nella linea cellulare di NB umano, SH-SY5Y.

Il TrkAIII è stato caratterizzato come una nuova variante alternativa di splicing, mancante degli esoni 6,7 e dell'esone 9, *Figura 10* (Tacconelli *et al.*, 2004). Il salto degli esoni 6 e 7 determina una delezione senza cambiamento del modulo di lettura (in frame) degli aminoacidi 192-284, che codificano per l'intero dominio extracellulare D4 Ig e presenta una valina in corrispondenza della giunzione dell'esone 5/8 che causa la perdita di diversi siti funzionali di N-glicosilazione (Tacconelli *et al.*, 2004).

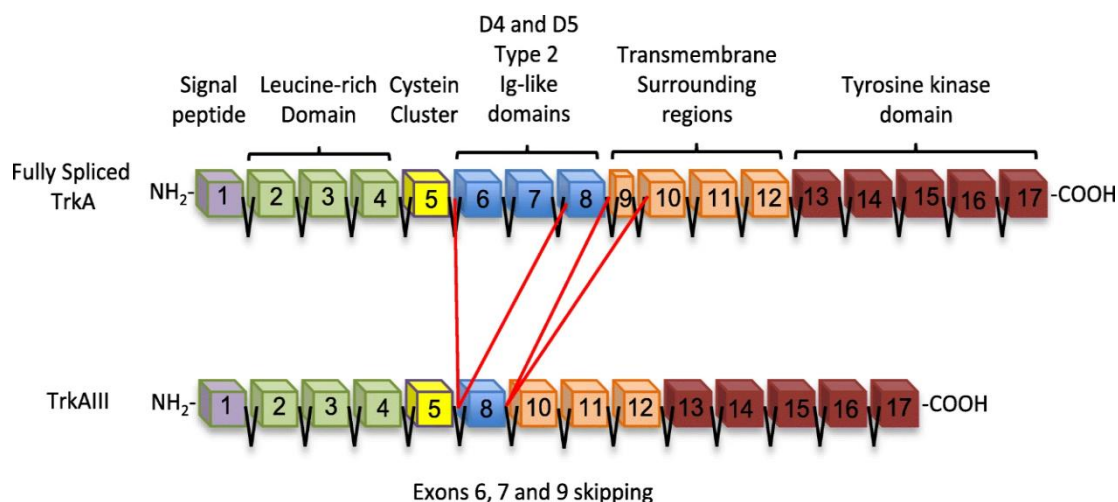


Figura 10. Struttura del TrkA e della variante di splicing TrkAIII (fonte Antonietta Rosella Farina *et al.* 2018)

Il TrkAIII risulta espresso in cellule staminali neurali umane, nelle linee cellulari di NB umano: SK-N-SH, SH-SY5Y, IMR32, SK-N-AS, KCNR, LAN5 e SKN-BE ma non in cellule differenziate come ad esempio le cellule dei granuli cerebellari (Tacconelli *et al.*, 2004); inoltre, l'espressione del TrkAIII da parte delle cellule di NB non si associa a mutazioni o delezioni nel gene del TrkA (Tacconelli *et al.*, 2004).

La presenza di un alto livello di espressione del TrkAI/II ma non del TrkAIII in un NB a *basso rischio* e un basso livello di espressione del TrkAI/II ma non del TrkAIII in un NB ad *alto rischio* (Tacconelli *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2010), supporta l'ipotesi che i NB passino dall'espressione del TrkAI a quella del TrkAIII durante la progressione tumorale e che

l'espressione del TrkAIII possa essere collegata a un comportamento più aggressivo del NB.

Differenze tra le varianti di splicing TrkAI/II e TrkAIII

L'analisi comparativa tra i recettori TrkAI/II e TrkAIII, espressi in cellule di NB umano SH-SY5Y, ha messo in evidenza differenze significative, *Tabella 1*.

Il TrkAI/II è espresso come proteina immatura a 110kDa e matura, N-glicosilata, a 140kDa mentre il TrkAIII è espressa come proteina N-glicosilata a 100kDa. Il recettore TrkAI/II maturo è espresso prevalentemente sulla superficie cellulare a differenza della forma immatura che si accumula nell'apparto del Golgi. Il TrkAIII non è espresso sulla superficie cellulare ma rimane internalizzato nelle membrane intracellulari: del Reticolo Endoplasmatico (ER), del compartimento intermedio tra Reticolo Endoplasmatico e Golgi (ERGIC), dell'apparato del Golgi e dei compartimenti vescicolari associati, all'interno dei quali risulta distribuito in quantità relativamente uguali (Tacconelli *et al.*, 2004; A. R. Farina *et al.*, 2009; Antonietta Rosella Farina *et al.*, 2009). Il TrkAI/II mostra un'attività ligando-dipendente diversamente dal TrkAIII che mostra un'attivazione spontanea e non ligando-dipendente probabilmente dovuta dalla mancanza del dominio extracellulare D4 Ig. Per quanto riguarda le differenze nella trasduzione del segnale post-recettoriale, il TrkAI/II, legato al ligando, presenta attività tirosin-chinasica, vengono fosforilati i residui Y490, Y674/675 e Y758 e lega Shc, Grb-2 e FRS2 che segnalano la trasduzione del segnale attraverso le vie PI3K/Akt e Ras/MAPK; mentre TrkAIII attivato spontaneamente, presenta attività tirosin-chinasica ma risulta costitutivamente fosforilato su Y490, Y674/675 e Y758, lega solo Shc ma non Grb-2 né FRS2 e in aggiunta induce la trasduzione solo attraverso la via IP3K/Akt ma non Ras/MAPK (Tacconelli *et al.*, 2004). Infine, presentano un'importante differenza relativa all'attività biologica, il TrkAI/II mostra un'attività soppressiva del tumore mentre il TrkAIII rivela un'attività oncogena osservata in modelli di NB (Tacconelli *et al.*, 2004).

Quest'attività oncogena del TrkAIII è emersa *in vitro* in quanto il TrkAIII promuove la crescita di sferoidi in cellule di NB (Tacconelli *et al.*, 2004), *in vivo* nei topi nudi poiché è in grado sia di "trasformare" i fibroblasti NIH3T3 rendendoli tumorigenici e sia di promuovere la crescita di NB primari e metastatici xenotrapiantati (Tacconelli *et al.*, 2004). Tuttavia il TrkAIII, in condizioni di stress, risulta espresso anche in cellule staminali neurali non tumorali, nei progenitori della cresta neurale e nei timociti non tumorali

(Tacconelli *et al.*, 2004), ciò suggerisce che il “potere trasformante” del TrkAIII, come quello di molti oncogeni, dipende da altri fattori.

Lo splicing alternativo del TrkAIII può essere rappresentato come un “interruttore” che regola il NB con il quale i segnali di soppressione del tumore da parte del TrkA I/II possono essere convertiti in segnali oncogeni dal TrkAIII.

	TrkAI/II	TrkAIII
Espressione sulla superficie cellulare	SI	NO
Legame con il ligando (NGF)	SI	NO
Fosforilazione tirosin-chinasica costitutiva	NO	SI
Trasduzione del segnale Ras/MAPK	SI	NO
Soppressione del Neuroblastoma	SI	NO
Attività oncogenica	NO	SI

Tabella 1. Differenze tra le varianti di splicing TrkAI/II e TrkAIII

TrkAIII e terapia clinica

Considerando che il TrkAIII mostra un'espressione predominante nel NB in fase avanzata e promuove l'oncogenesi in modelli di NB con l'attivazione spontanea e la segnalazione post-recettoriale costitutivamente attiva, attraverso la via PI3K/Akt/NF- κ B ma non Ras/MAPK, tutte queste caratteristiche provocano nelle cellule di NB l'impedimento del differenziamento e l'inibizione della crescita, aumento della resistenza allo stress, maggiore instabilità genetica, un fenotipo più angiogenico e tumorigenico (Tacconelli *et al.*, 2004; A. R. Farina *et al.*, 2009; Antonietta Rosella Farina *et al.*, 2009).

In questo contesto, gli inibitori del Trk:

- K252 α e il suo analogo **CEP-701** (Lestaurtinib)
- Brefeldina A (**BFA**) inibitore di Arf (fattore di ADP-ribosilazione)
- Geldanamicina (**GA**) inibitore di Hsp90 (Heat Shock Protein 90)

hanno tutti dimostrato di inibire l'attività della tirosin-chinasi TrkAIII (A. R. Farina *et al.*, 2009; Antonietta Rosella Farina *et al.*, 2009). **CEP-701** inibisce reversibilmente l'attività del TrkAIII come l'amplificazione dei centrosomi indotta dal TrkAIII stesso (A. R. Farina *et al.*, 2009) e mostra attività antitumorale in modelli di NB xenotrapiantati (Evans *et al.*, 1999).

La tossina fungina **BFA**, prodotta dal fungo *Eupenicillium brefeldianum*, è un inibitore non competitivo dell'interazione tra Arf-GEF, che contiene il dominio sec7, Arf1 e Arf5; l'inibizione interrompe il ciclo GDP-GTP necessario ad Arf per l'assemblaggio delle vescicole nel compartimento ERGIC/apparato del Golgi (Pommier and Cherfils, 2005; Vigil *et al.*, 2010), allo stesso tempo la BFA, inibisce anche l'attività del TrkAIII in modo reversibile (A. R. Farina *et al.*, 2009; Antonietta Rosella Farina *et al.*, 2009). La tossina fungina mostra un'attività antitumorale infatti viene principalmente utilizzata come adiuvante agli agenti chemioterapici standard per le cellule tumorali neuroendocrine (Larsson *et al.*, 2009), suggerendo il suo potenziale terapeutico nel ridurre il TrkAIII nel NB.

La **GA** è un antibiotico, inibitore di Hsp90, ed i suoi analoghi clinicamente rilevanti, il 17-AAG e il 17-DMAG, inibiscono l'attività oncogenica del recettore tirosin-chinasico e la crescita di cellule di NB xenotrapiantate, infatti, attualmente sono in fase di sperimentazione clinica per poterle eventualmente utilizzare nei pazienti affetti da NB (Kang *et al.*, 2006; Szul *et al.*, 2007). Inoltre, GA e gli analoghi della GA inibiscono reversibilmente anche l'attività del TrkAIII e inibiscono la proliferazione delle cellule di NB che lo esprimono (A. R. Farina *et al.*, 2009; Antonietta Rosella Farina *et al.*, 2009).

Negli ultimi anni, grazie ai progressi della biologia molecolare e della genetica si è giunti alla scoperta delle fusioni geniche per il gene NTRK, che si traducono in proteine chimeriche oncogeniche pertanto sono stati approvati nuovi farmaci e altri sono in fase di sperimentazione clinica diretti proprio contro le proteine di fusione oncogeniche del Trk, passando così ad un nuovo approccio diagnostico-terapeutico che prevede l'utilizzo di farmaci agnostici ossia farmaci mirati al tipo di "mutazione driver" che caratterizza la neoplasia. L'indicazione terapeutica diviene, quindi, indipendente dalla sede e dal tipo di tumore e strettamente guidata dal profilo mutazionale (Russo *et al.*, 2021).

Tra i farmaci approvati e presenti in commercio abbiamo farmaci definiti di *prima generazione*:

- Larotrectinib (LOXO-101; ARRY-470), approvato dalla FDA nel 2018, è un pan-Trk inibitore che compete con l'ATP (adenosina trifosfato) per il sito catalitico della chinasi. L'inibizione dei recettori Trk da parte del farmaco ne impedisce l'attivazione determinando l'inibizione della proliferazione cellulare e l'induzione dell'apoptosi (Vaishnavi *et al.*, 2013; Scott, 2019; Liu *et al.*, 2021). Sia *in vitro* che *in vivo*, Larotrectinib ha mostrato una notevole attività antitumorale in cellule con attivazione costitutiva delle proteine Trk risultante da fusioni geniche o delezioni dei domini di regolazione del Trk e in cellule con elevati livelli di espressione del recettore (Scott, 2019).
- Entrectinib (RXDX-101; NMS-E628) è un inibitore del Trk, agisce anche su Alk e ROS1 (protooncogene tirosin-chinasi ROS). Il farmaco agisce andando a bloccare selettivamente la proliferazione delle linee cellulari Alk-dipendenti e induce autofagia nelle cellule di NB (Rolfo *et al.*, 2015).

Con lo scopo di essere efficaci nei confronti delle mutazioni secondarie di NTRK sono già stati sintetizzati inibitori di *seconda generazione*:

- Selitrectinib (LOXO-195) inibitore selettivo per i recettori Trk sviluppato per creare una molecola in grado di agire sui tumori resistenti a Larotrectinib. La molecola è stata progettata basandosi su esperimenti di mutagenesi diretta per mutazioni del dominio chinasi dei geni NTRK potenzialmente associate a farmaco-resistenza (Liu *et al.*, 2021).
- Crizotinib inibisce selettivamente il recettore tirosin-chinasi di ALK e delle sue varianti oncogeniche (per esempio prodotti di fusione di ALK). Il farmaco è anche un inibitore del recettore tirosin-chinasi di Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR, c-Met), del ROS1 e di RON (Recepteur d'Origine Nantais). Crizotinib ha dimostrato un'attività inibitoria efficace e selettiva sulla crescita cellulare e ha indotto apoptosi nelle linee cellulari tumorali che mostravano prodotti di fusione di ALK, varianti di fusione ROS1 o che mostravano amplificazione dei geni ALK e MET (Heigener and Reck, 2018).
- Taletrectinib (DS-6051b/AB-106) è un inibitore di ROS1/TRK che ha mostrato una certa efficacia nei pazienti non responsivi al Crizotinib (Liu *et al.*, 2021; Harada and Drilon, 2022).
- Repotrectinib (TPX-0005) è un inibitore dell'attività enzimatica delle chinasi con mutazioni puntiformi nei geni ROS1, TRKA, TRKB, TRKC e ALK che comportano delle

sostituzioni amminoacidiche nella proteina mutata, conferendo resistenza ai farmaci di *prima generazione* (Liu *et al.*, 2021).

L'azione mirata di questi farmaci, di *prima e seconda generazione*, suggerisce che anche i NB caratterizzati dall'espressione del TrkAIII potrebbero essere dei validi target terapeutici per gli inibitori del Trk (Farina *et al.*, 2018).

SCOPO DEL LAVORO

I Neuroblastomi (NB) sono tumori pediatrici altamente eterogenei ed aggressivi che derivano dalle cellule progenitrici della cresta neurale e di solito vengono diagnosticati in una fase già troppo avanzata dello sviluppo. Nonostante l'uso clinico di strategie di trattamento multimodale intensivo, la prognosi del NB ad *alto rischio* rimane infausta. Infatti, un tasso di recidiva del 50% riduce significativamente la sopravvivenza del paziente (Cappabianca *et al.*, 2022; Lundberg, Treis and Johnsen, 2022; Ponzoni *et al.*, 2022b).

Le strategie per il trattamento clinico multimodale intensivo, in pazienti affetti da NB in stadio avanzato con prognosi sfavorevole, includono la chemioterapia di induzione che prevede l'utilizzo di diversi agenti chemioterapici alternati ad alte dosi, incluso il potente antibiotico Doxorubicina (Dox) (Sritharan and Sivalingam, 2021). Tuttavia, la risposta clinica alla Dox è limitata dalla resistenza al farmaco e dalla cardiotoxicità, che sono alla base del frequente fallimento del trattamento, della ricaduta post-terapeutica e della progressione della malattia (Rivankar, 2014; Sritharan and Sivalingam, 2021; Cappabianca *et al.*, 2022). Pertanto, l'identificazione e l'inibizione dei meccanismi responsabili della resistenza alla Dox e della cardiotoxicità sono di fondamentale importanza per una migliore efficacia farmacologica.

Inoltre, la Dox inibisce la proliferazione delle cellule tumorali attivando i componenti della risposta al danno del DNA: ATR, p53, Chk1 e Chk2, con conseguente espressione di p21/WAF1 dipendente da p53 e CREB3L1 e fosforilazione inibitoria di Src, che promuovono l'arresto in G1/S e la senescenza cellulare (Karabicici *et al.*, 2021; Cappabianca *et al.*, 2022).

I NB in stadio avanzato mostrano una maggiore espressione del TrkAIII, variante di splicing oncogenica del recettore della tropomiosina chinasi A (TrkA). Contrariamente al TrkA, la sua variante TrkAIII non è espressa sulla superficie cellulare ma si accumula nelle membrane intracellulari del reticolo endoplasmatico, dell'ERGIC e dell'apparato del Golgi. All'interno della cellula il TrkAIII mostra un'attivazione spontanea, regolata dal ciclo cellulare, indipendente dal ligando, pro-sopravvivenza (IP3-K/Akt, Bcl-xL e Mcl-1), pro-angiogenica (MMP-9 e VEGF) ed è associata a un fenotipo simile a quello delle cellule staminali tumorali (CSC) (Tacconelli *et al.*, 2004; Farina *et al.*, 2018).

È stata recentemente dimostrata la capacità terapeutica del Trk, utilizzato come target nel NB ad *alto rischio* in un contesto in cui le diverse opzioni terapeutiche erano ormai esaurite. Un bambino affetto da NB metastatico, recidivante, persistente (> 5 anni) e refrattario che esprimeva TrkAIII è stato sottoposto a terapia compassionevole con la somministrazione del farmaco, di *seconda generazione*, Entrectinib ad attività Alk/Trk inibitoria (Treis *et al.*, 2022) permettendo un'ottima tollerabilità e riuscita del trattamento. Questo, ed altri studi, hanno permesso di migliorare le prospettive future sull'espansione della terapia con gli inibitori Trk, che è stata approvata per i tumori guidati da oncogeni di fusione del Trk, come nel caso dei NB metastatici e refrattari che esprimono TrkA.

Nel presente studio, abbiamo cercato di identificare una possibile relazione esistente tra il meccanismo di resistenza al chemioterapico Dox e la variante oncogenica TrkAIII al fine di poter ottimizzare il percorso terapeutico dei pazienti affetti da NB ad *alto rischio* che esprimono TrkAIII, offrendo al clinico la possibilità di strutturare una terapia più personalizzata e mirata ad un determinato target specifico.

MATERIALI E METODI

Linee cellulari e condizioni di coltura

Le linee cellulari di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state fornite da DR. U.P. Thorgeirsson (NCI, NIH Bethesda, MD, USA) e le IMR32 (ATCC CCL-127) fornite da ATCC (Manassas, VI, USA).

Cellule SH-SY5Y trasfettate stabilmente con i vettori ad espressione eucariotica pcDNA™ 3.1/Zeo (+), contenenti i cDNA per TrkAI e TrkAIII, erano disponibili nel nostro laboratorio.

Entrambe le linee cellulari sono state coltivate con terreno di crescita raccomandato, RPMI-1640, arricchito con il 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% (2 mM) di L-glutammina e 1% degli antibiotici come penicillina (50 IU) /streptomicina (50 µg/mL) e Zeocina per i trasfettanti stabili; mantenute in un incubatore a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ e 95% di O₂. Il terreno, la L-glutammina e gli antibiotici sono stati forniti da Euroclone, MI, Italia; la Zeocina da ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA.

Per le condizioni di ipossia le cellule sono state coltivate con mezzo di coltura RPMI-1640 privo di glucosio fornito da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) e mantenute in un incubatore ipossico (New Brunswick Galaxy 48R) con O₂ < 0,1% e CO₂ al 5%; il terreno è stato precedentemente degassato per 24 ore nell'incubatore ad ipossia.

Reagenti per trattamenti cellulari

Per i trattamenti sono stati utilizzati: Doxorubicina cloridrato, Ditiotreitolo (DTT), Geldanaicina (GA), Brefeldina A (BFA), Dantrolene, borato 2-amminoetossidifenile (2-APB), PP1, PD98059, LY294002, Lestaurtinib (CEP-701), NGF (Nerve Growth Factor) tutti forniti da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Crizotinib e RO-3306 forniti da Med Chem Express (Monmouth Junction, NJ, USA). Entrectinib ottenuto da Selleck Chemicals (Houston, TX, USA), DS16570511 da Cayman Chemical (Ann Arbor MI, USA), Resveratrolo da ENZO Life Sciences Inc (Farmingdale, NY, USA) ed infine, W-7 da Millipore Sigma (Burlington, MA, USA).

Anticorpi

Gli anticorpi monoclonali di topo anti-TrkA (B3, sc-7268, 200 µg/mL) e anti-calmodulina (sc-137079, 200 µg/mL) sono stati forniti da SantaCruz (Santa Cruz, CA, USA). Gli anticorpi policlonali di coniglio anti-pTrkA Y490 (9141, 36 µg/mL), anti-Akt (9272, 31 µg/mL) e anti-pAkt Ser473 (4060, 91 µg/mL) sono stati ottenuti da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Gli anticorpi secondari (1 mg/mL) coniugati con la perossidasi di rafano (HRP, horseradish peroxidase) sono stati ottenuti da Bethyl Laboratories Inc. (Fortis, Waltham, MA, USA) mentre gli anticorpi secondari coniugati ad un fluorocromo, Alexa Fluor® 488 (verde)-anti-coniglio (1 mg/mL) e Alexa Fluor® 594 (rosso)-anti-topo (1 mg/mL) sono stati forniti da Life Technologies (Waltham, MA, USA).

Analisi cellulare

Sia la crescita cellulare che la tossicità a vari trattamenti sono state osservate in tempo reale, in presenza o in assenza di inibitori mediante l'utilizzo dell'incubatore *IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System*, sviluppato dal gruppo Sartorius (Goettingen, Germany).

Le cellule sono state piastrate in una piastra a 96-pozzetti (353072, Corning Inc, NY, USA) ad una densità di 1×10^3 cellule per pozzetto e successivamente sono state trattate con diverse molecole a tempi e concentrazioni diverse. Il software di analisi IncuCyte è stato programmato per acquisire immagini ad intervalli di tempo (in time-lapse) di 2 ore e catturarle in due aree differenti per ogni pozzetto della piastra utilizzando un ingrandimento 10X. Terminata l'acquisizione, le cellule sono state analizzate per mezzo dei video in time-lapse ottenuti, è stata effettuata una conta diretta in contrasto di fase con la quale è stata poi creata una cura di crescita e sopravvivenza cellulare. Le cellule che presentavano formazione di vescicole (blebbing) citoplasmatiche e nucleari o un rigonfiamento citoplasmatico e lisi necroptotica sono state considerate morte o morenti, mentre le cellule che presentavano una morfologia nucleare e citoplasmatica relativamente normale sono state considerate vive. Le cellule vive e quelle morte o morenti sono state contate dividendo ogni immagine acquisita in 4 campi indipendenti e per ognuna di esse è stato calcolato il rapporto tra cellule vive e morte o morenti.

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

Estrazione proteica e Western Blot

Estratti proteici totali sono stati ottenuti, utilizzando il tampone di lisi (tampone fosfato salino 1X (PBS) contenente 0.5% di deossicolato di sodio, 1% di NP40, 0.1% di SDS, 1 mM di ortovanadato di sodio, 1 mM di PMSF, 1 µg/mL di pepstatina A e Aprotinina). Le cellule sono state lavate con PBS 1X e screpate in ghiaccio con 2–3 ml di tampone di lisi; il lisato ottenuto è stato centrifugato a 15000×g a 4°C per 30 minuti. Gli estratti proteici ottenuti sono stati dosati con il metodo Bradford e risospesi in un tampone riducente per SDS-PAGE (62.5mM di TrisHCl pH6.8, 2.5% di SDS, 0.002% di blu di bromofenolo, 5% di β-mercaptoetanolo e 10% di glicerolo), riscaldati a 95°C per 5 minuti e sottoposti a SDS-PAGE /Western blotting. Le proteine, dopo la corsa elettroforetica, sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa Hybond-C Extra fornita da GE Healthcare Life Science, Amersham, (UK). I siti di legame proteici non specifici sono stati bloccati incubando la membrana per 1 ora a 4 °C in una soluzione di bloccaggio costituita da TBS-T (Tris Buffer Saline: 15mM di NaCl, 10 mM di Tris-HCl - 10% di Tween 20, pH 8.0) e latte magro in polvere al 5% fornito da Euroclone, MI, Italia, poi è stato incubato l'anticorpo primario specifico, diluito nella stessa soluzione di bloccaggio, a 4°C in oscillazione per tutta la notte. Le diluizioni usate per gli anticorpi primari sono: 1:500 per l'anti-TrkA (B3), 1:1000 per l'anti-pTrkA Y490 (9141), 1:1000 per anti-pAkt Ser473 Akt (4060) e anti-calmodulina (sc-137079), 1:3000 per anti-Akt (9272). Gli anticorpi secondari anti-topo e anti-coniglio HRP-coniugati sono stati diluiti 1:2000.

Terminata l'incubazione la membrana è stata sottoposta a tre lavaggi in TBS-T di 10 minuti ognuno e incubata con l'anticorpo secondario opportuno diluito 1:2000 anch'esso nella soluzione di bloccaggio per 1 ora a 4°C in oscillazione. In seguito, sono state lavate in TBS-T 3 volte per 10 minuti e le specie immunoreattive sono state rivelate tramite una reazione di chemiluminescenza utilizzando il kit *ECL Western blotting detection* fornito da GE Healthcare Life Science, Amersham, (UK), per mezzo dello strumento d'analisi ImageQuant™ LAS 4000 fornito da GE Healthcare Life Science, Amersham, (UK).

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

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

Co-immunoprecipitazione calmodulina/TrkAIII

Gli estratti cellulari totali e risospesi in tampone di lisi (tampone fosfato salino 1X (PBS) contenente 0.5% di deossicolato di sodio, 1% di NP40, 0.1% di SDS, 1 mM di ortovanadato di sodio, 1 mM di PMSF, 1 µg/mL di pepstatina A e Aprotinina) sono stati sottoposti ad un pre-clearing di 2 ore incubando 1mg di estratto cellulare con pre-immune IgG (1µg/mL) e Proteina A-sefariosio Fast Flow (20µL/mL) a 4°C in rotazione. I coniugati proteina A-sefariosio/IgG sono stati precipitati tramite centrifugazione a 10.000×g per 5 minuti, a 4°C. Il surnatante è stato poi incubato durante tutta notte con anticorpo anti-CaM (calmodulina) diluito 1:200 in tampone di lisi a 4°C in rotazione. In seguito, 20µL di Proteina A-sefariosio sono stati aggiunti al tampone di lisi cellulare e reincubato per 60 minuti a 4°C in rotazione. I coniugati proteina A-sefariosio/IgG sono stati poi raccolti mediante centrifugazione (15.000 rpm per 5 min), lavati 3 volte in 1 ml di tampone di lisi, ricentrifugati, risospesi nel tampone riducente SDS-PAGE (62.5mM di TrisHCl pH6.8, 2.5% di SDS, 0.002% di blu di bromofenolo, 5% di β-mercaptoetanolo e 10% di glicerolo) e sottoposti a riduzione SDS-PAGE/Western blotting. L'immunoreattività della CaM e del TrkA è stata rilevata utilizzando anticorpi anti-CaM (diluizione 1:1000) e anti-TrkA (diluizione 1:500) ed è stata confrontata con appropriati controlli relativi alle pre-immuni IgG. Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione sono stati eseguiti in duplicato e ripetuti due volte.

Immunofluorescenza indiretta (IF)

Le cellule sono state piastrate su vetrini con sistema Chamber Slide™ Lab-Tek® Nunc® forniti da Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA sono state lavate con PBS 1X, fissate in formalina al 10% v/v per 15 minuti e permeabilizzate con metanolo ghiacciato al 100% (-20°C). Le cellule fissate e permeabilizzate sono state incubate per 1 ora con una soluzione bloccante composta da PBS-T (PBS + TritonX100 0,03%) e BSA (albumina di siero bovino all'1%), successivamente incubate per 2 ore con anticorpi primari anti-TrkA e anti-p TrkA Y490 diluiti 1:100 in soluzione bloccante a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, i vetrini sono stati lavati in PBS-T e incubati per 1 ora con i relativi anticorpi Alexa Fluor® 488 (verde)-anti-coniglio e Alexa Fluor® 594 (rosso)-anti-topo diluiti 1: 500 in soluzione bloccante a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, i vetrini sono stati lavati tre volte con PBS-T, ed un'ultima volta con PBS. Infine, è stato aggiunto sui vetrini il montante contenente DAPI, ProLong™ fornito da Invitrogen (Thermo-Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA) e osservati con l'utilizzo del microscopio a fluorescenza Zeiss Axioplan 2 con una fotocamera digitale ed il software Leica M500 Image Manager, sono stati fotografati digitalmente. Gli esperimenti di IF sono stati ripetuti almeno due volte.

Purificazione dell'RNA e RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto con il kit Miniprep Quick-RNA™ come descritto dal produttore Zymo Research, Freiburg im Breisgau, GE. Dopo l'estrazione, la concentrazione di mRNA è stata determinata attraverso l'uso dello spettrofotometro NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Le reazioni di trascrizione inversa (RT) sono state eseguite revertando 1µg di mRNA utilizzando il kit SuperScript IV VILO Master Mix come indicato dal produttore Invitrogen (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le RT-PCR sono state eseguite utilizzando set di primer specifici:

- rRNA 18s, (amplicone 100bp):

F 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG -3'

R 5'-CCTCGAAAGAGTCCTGTATTG-3'

- TrkA esoni 1-8, (amplicone 1114bp):

F 5'-ATGCCTGCGAGGCGGACGGCGC-3'

R 5'-GGAGGCCTGGCCGAAGGGGTT-3'

- Xbp-1, (amplicone 282bp):

F 5'-TTACGAGAGAAAACATGGC-3'

R 5'-CGGTCCAAGTTGTCCCAGAATGC-3'

Tutte le RT-PCR sono state eseguite in duplicato e ripetute almeno due volte. 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.

Estrazione DNA genomico e sequenziamento

I campioni di DNA genomico sono stati ottenuti dalle cellule parentali SH-SY5Y e dai transfettati stabili TrkA e TrkAIII SH-SY5Y. L'estrazione è stata realizzata mediante l'uso del kit di purificazione del DNA genomico Promega Wizard, come indicato dal produttore Promega, Madison, WI, USA. La mutazione NM_004304.5 (ALK):c.3522C > A (p.Phe1174Leu) è stata valutata per mezzo del sequenziatore ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) tramite metodologia Sanger a doppio filamento, impiegando i prodotti di PCR, che sono stati ottenuti utilizzando primers specifici:

- Alk:

F 5'-TCCTGTTCCCTCCCAGTTTAAGA-3'

R 5'-CACTCTTGCTCCTTCCATCC-3'

I prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit EuroSAP PCR Enzymatic Clean-up come indicato dal produttore Euroclone, Milano, Italia e sono stati sequenziati utilizzando il kit di sequenziamento BigDye Terminator V.2.1. come indicato dal fornitore Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA.

Analisi statistica

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

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

RISULTATI

La Doxorubicina induce l'attivazione del TrkAIII nelle SH-SY5Y/TrkAIII

Le cellule SHSY5Y/TrkAIII trattate con la Dox per 3 e 6 ore ad una concentrazione di 0,5 µg/mL e 1 µg/mL, in Western blot hanno rilevato un aumento significativo dei livelli del TrkAIII fosforilato rispetto ai livelli totali (p -value =0,039 e 0,0105 per 0,5 µg/mL di Dox e p -value =0,0089 e 0,0139 per 1 µg/mL di Dox rispettivamente, $df = 2$), *Figura 11 a*; anche dall'IF indiretta è stata rilevata una maggiore fosforilazione del TrkAIII rispetto alla sua espressione dopo il trattamento delle stesse cellule con la Dox ad 1 µg/mL per 6 ore, *Figura 11 b*.

I saggi di proliferazione effettuati mediante *IncuCyte® S3*, ha evidenziato che le cellule SH-SY5Y/TrkAIII non trattate hanno un tempo di duplicazione di circa 12 ore, con una crescita cellulare che aumenta di circa quattro volte dopo 24 ore, *Figura 12 a-b*, diversamente dal risultato ottenuto trattando le stesse cellule con la Dox (1 µg/mL). Il farmaco ha completamente inibito la proliferazione delle SH-SY5Y/TrkAIII e ha ridotto il numero delle cellule vive dall'84% circa al 24%, *Figura 12 b*.

La proliferazione delle SH-SY5Y/TrkAIII è stata completamente bloccata anche da RO-3306 (10µM) inibitore della CDK1 (Vassilev *et al.*, 2006), dal DS16570511 (40µM) inibitore dell'uniporter del Ca^{2+} (Kon *et al.*, 2017), dall'antiossidante Resveratrolo (100µM) (Wang, Lin and Liu, 2001), e in condizioni di ipossia ($O_2 < 0,1\%$), che hanno impedito un aumento significativo del numero di cellule nel corso delle 24 ore, *Figura 12 a-b*.

La valutazione del numero di cellule in mitosi ha evidenziato che rispetto ai controlli non trattati le cellule trattate per 6 ore con Dox (1µg/mL), con RO-3304 (10µM), con Resveratrolo (100µM) e sottoposte a condizioni di ipossia ($O_2 < 0,1\%$) mostrano una completa assenza dei corpi mitotici. Al contrario, le cellule trattate con DS16570511 (40µM) hanno mostrato un aumento, di circa sette volte, della formazione dei corpi mitotici, coerente con l'arresto in fase M del ciclo cellulare indotto dal DS16570511 (Zhao *et al.*, 2019), *Figura 12 b*.

Ulteriori indagini sull'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox in cellule non proliferanti arrestate da CDK1 sono state effettuate in Western blot. Le cellule SH-SY5Y/TrkAIII non

proliferanti arrestate in fase G2/M dall'inibitore CDK1 (10 μ M, 6 ore) (Sunada *et al.*, 2021), hanno rilevato una significativa riduzione dei livelli del TrkAIII fosforilato (p -value =0,0032, df = 2), *Figura 13 a*, mentre in presenza della Dox (1 μ g/mL), RO-3306 non ha inibito ma ha aumentato la fosforilazione del TrkAIII che risultava già significativamente aumentata con solo il trattamento con la Dox (p -value =0,006, df = 2), *Figura 13 a*.

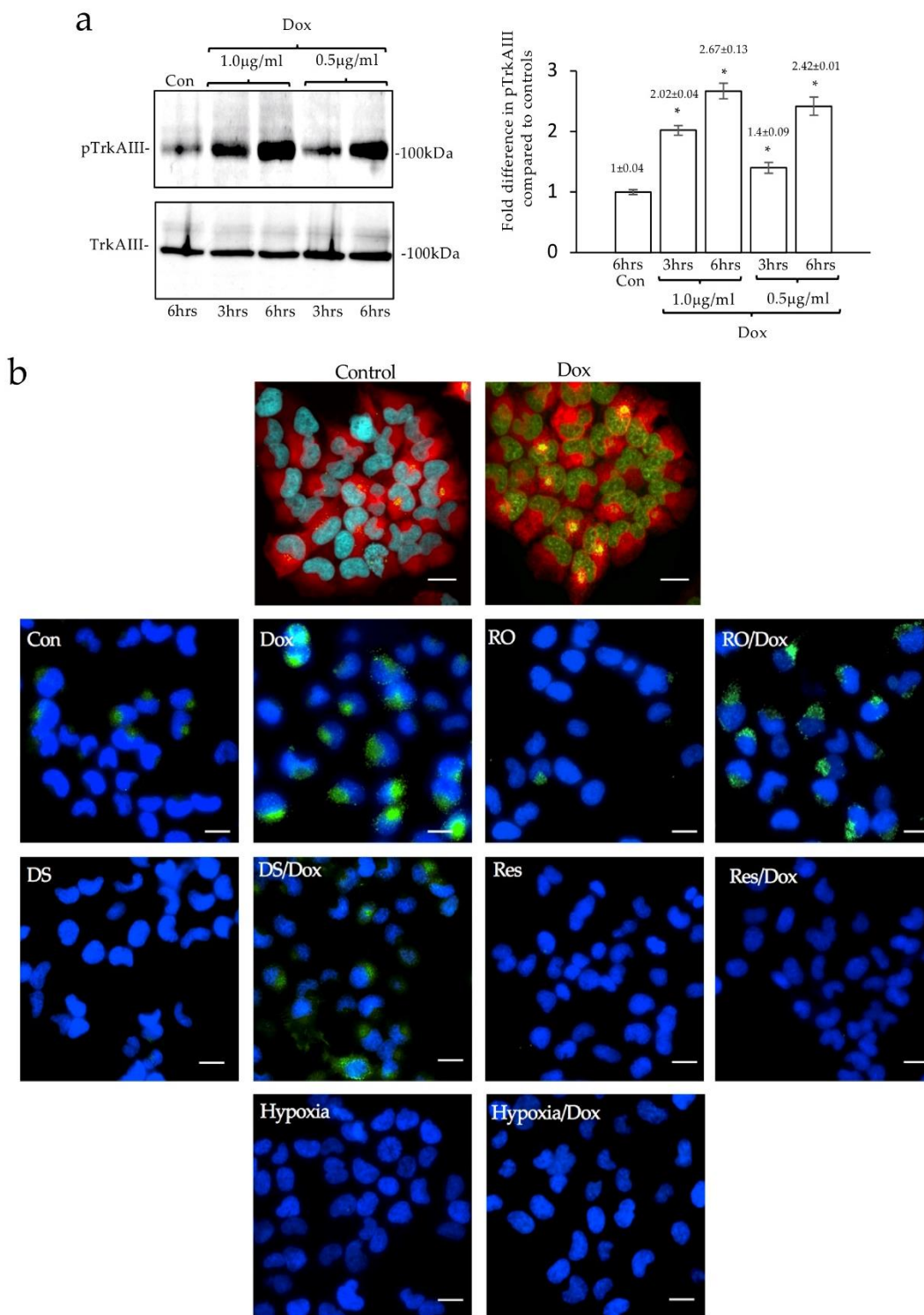


Figura 11. La Dox induce l'attivazione del TrkAIII. (a) Il Western blot ed il relativo istogramma dimostrano un aumento dei livelli di fosforilazione costitutiva del TrkAIII nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII (Con), in seguito al trattamento con la Dox, alle concentrazioni e ai tempi indicati (* = significatività statistica). (b) immagini relative all'IF indiretta, dimostrano che un aumento della fosforilazione del TrkAIII (giallo) si sovrappone al TrkAIII (rosso) in cellule trattate con Dox (1µg/mL per 6 ore) (a destra) rispetto a cellule SH-SY5Y/TrkAIII non trattate (a sinistra), inoltre mostrano il paragone della fosforilazione del TrkAIII (verde) in cellule SH-SY5Y/TrkAIII non trattate (Con) o trattate per 6 ore con Dox (1µg/mL) (Dox); RO-3306 (10µM) (RO); RO-3306 (10µM) più Dox (1µg/mL) (RO/Dox); DS16570511 (40µM) (DS); DS16570511 (40µM) più Dox (1µg/mL) (DS/Dox); Resveratrolo (100µM) (Res); Resveratrolo (100µM) più Dox (1µg/mL) (Res/Dox); ipossia (<0,1% O₂); ipossia (<0,1% O₂) più Dox (1µg/mL) (Ipossia/Dox) (bar = 10µM)

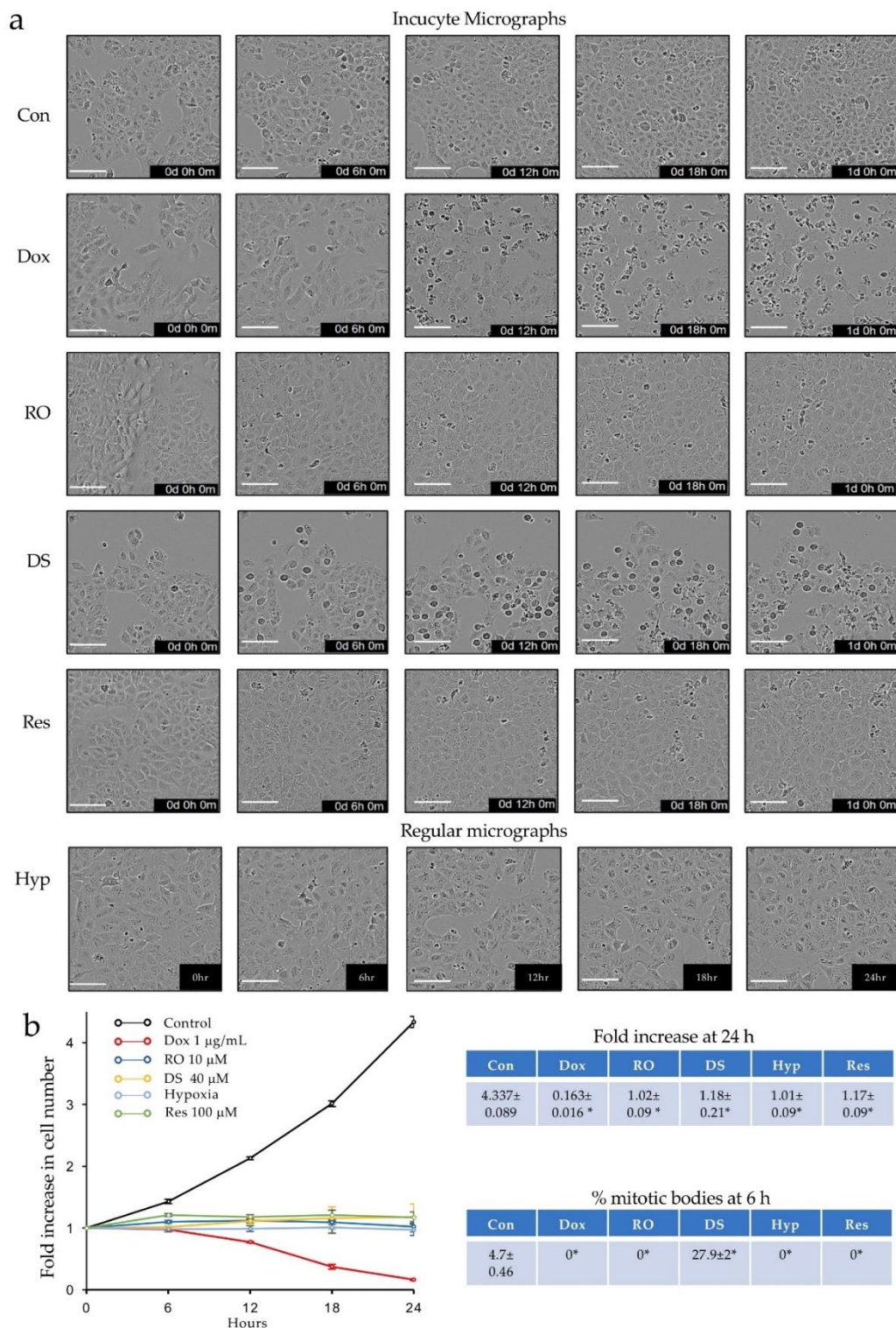


Figura 12. Effetti Dox, RO-3306, DS16570511, Resveratrolo e ipossia sulla proliferazione delle SHSY5Y/TrkAIII. (a) Immagini rappresentative IncuCyte® S3 delle cellule SH-SY5Y/TrkAIII, non trattate (Con) o trattate con Dox (1µg/mL) (Dox), RO-3306 (10µM) (RO), DS16570511 (40µM) (DS), Resveratrolo (100µM) (Res) e ipossia (<0,1% O₂) (Hyp) ai tempi indicati. (b) Grafico a linee che mostra le differenze negli incrementi del numero di cellule SH-SY5Y/TrkAIII vive, non trattate (Con) e trattate con Dox (Dox), RO-3306 (RO), DS16570511 (DS), ipossia (Hyp) e Resveratrolo (Res), alle concentrazioni e tempi indicati, con relative tabelle che riportano la media (±) dell'aumento del numero di cellule vive a 24 ore e della percentuale di corpi mitotici a 6 ore di cellule non trattate (Con) e trattate con Dox, RO, DS, Hyp e Res alle concentrazioni di cui sopra (* = significativamente diverso dai controlli) (bar = 100µM)

I Western blot hanno anche rilevato una significativa riduzione dei livelli del TrkAIII fosforilato a 6 ore ($p\text{-value} = 0,0341$, $df = 2$) e a 24 ore ($p\text{-value} = 0,045$, $df = 2$) nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII trattate con DS16570511 (40 μ M), *Figura 13 a*, al contrario, nelle stesse cellule trattate per 6 ore con DS16570511 in combinazione con la Dox i livelli del TrkAIII fosforilato sono significativamente aumentati ($p\text{-value} = 0,044$, $df = 2$), *Figura 13 c*.

Inoltre, la Dox non ha incrementato significativamente la fosforilazione del TrkAIII nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII selezionate in fase M e pretrattate per 24 ore con DS16570511 ma ne ha indotto l'aumento nelle cellule trattate con DS16570511 che non sono state selezionate in una fase specifica del ciclo cellulare ($p\text{-value} = 0,044$, $df = 2$).

Ciò conferma che l'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox è indipendente dall'uniporter del Ca^{2+} e si verifica nelle cellule senescenti, che sono presumibilmente arrestate in fase G1/S ma non sono entrate in mitosi (Forrest *et al.*, 2012; Karabicici *et al.*, 2021).

Un'ulteriore analisi in IF indiretta ha mostrato una ridotta fosforilazione del TrkAIII nelle cellule SHSY5Y/TrkAIII trattate solo con DS16570511 per 6 ore ma non nelle cellule trattate con DS16570511 in combinazione con la Dox, *Figura 11 b*.

Il potenziale coinvolgimento di c-Src nell'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox è stato valutato utilizzando PP1, inibitore di Src (1 μ M, 6 ore) (Hanke *et al.*, 1996); PP1 non ha impedito la fosforilazione del TrkAIII indotta dalla Dox, *Figura 13 c*, ma valutando l'ossidazione utilizzando l'antiossidante Resveratrolo (100 μ M, 6 ore) si osserva l'inibizione della fosforilazione del TrkAIII indotta dalla Dox ($p\text{-value} = 0,021$, $df = 2$) che costitutiva rilevata in Western blot, *Figura 13 c*, in IF indiretta, *Figura 11 b*.

Il fabbisogno di ossigeno per la fosforilazione del TrkAIII è stato confermato in condizioni di ipossia ($O_2 < 0,1\%$), che ha inibito completamente la fosforilazione del TrkAIII indotta dalla Dox nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII, come rilevato attraverso Western blot e IF indiretta, *Figura 11 b - Figura 13 c*. Queste osservazioni confermano che l'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox è dipendente dalla presenza di ossigeno e dall'ossidazione ma non da c-Src.

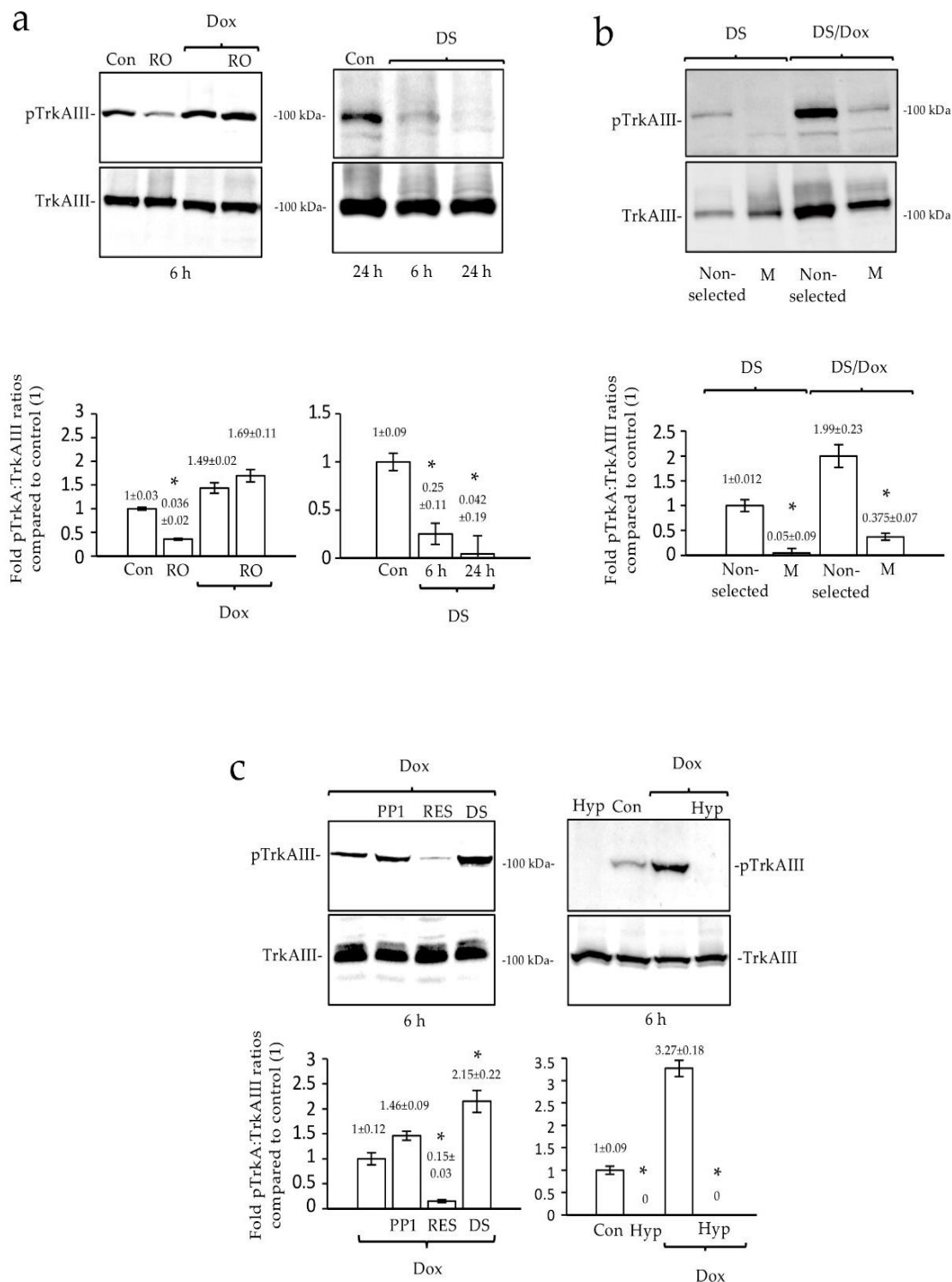


Figura 13. L'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox si verifica nelle cellule arrestate nella proliferazione ma non in fase M ed è dipendente dall'ossigeno e dall'ossidazione. Western blot e relativi istogrammi dimostrano quanto segue: **(a)** una riduzione della fosforilazione del TrkA relativa al TrkAIII totale nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII trattate con RO-3306 (10 μM) (RO) solo ma non RO-3306 (10 μM) più Dox (1 μg/mL) (RO/Dox) e seguenti trattamenti con DS16570511 (40 μM) per gli tempi indicati; **(b)** differenze nella fosforilazione di TrkAIII nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII in fase M arricchite dal distacco indotte da DS16570511 (40 μM per 24 ore) rispetto alle controparti non selezionate trattate con DS16570511, e in Dox (1 μg/mL) cellule SH-SY5Y/TrkAIII arricchite in fase M trattate in g/mL, 6 ore) rispetto alle controparti non selezionate trattate con Dox; **(c)** riduzione di Dox (1 μg/mL) fosforilazione di TrkAIII indotta da resveratrolo (100 μM) ma non da PP1 (1 μM) o DS16570511 (40 μM) e inibizione di costitutiva (Con) e Dox (1 μg/mL)-fosforilazione di TrkAIII indotta da ipossia (<0,1% O₂) (Hyp) agli orari indicati nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII (* = significatività statistica)

La Doxorubicina induce lo splicing non convenzionale di Xbp1

L'analisi RT-PCR eseguita con i primers specifici per Xbp-1 come indice di stress del reticolo endoplasmatico è stata eseguita utilizzando le cellule SH-SY5Y (N-Myc non amplificato) e le cellule IMR32 (N-Myc amplificato) trattate con la Dox (1 µg/mL) per 6 e 24 ore. In entrambe le linee cellulari la Dox ha indotto lo splicing non convenzionale di Xbp-1 rispetto ai controlli non trattati; come controllo positivo per lo splicing non convenzionale di Xbp-1 sono state trattate le cellule SH-SY5Y con DTT (10mM per 6 ore), *Figura 14 a*.

L'analisi RT-PCR eseguita con primers specifici per il TrkAIII ha evidenziato che la Dox non promuove lo splicing alternativo del TrkAIII né nelle cellule SH-SY5Y né nelle IMR32, *Figura 14 b* a differenza dell'ipossia che, invece, promuove lo splicing alternativo del TrkAIII sia nelle SH-SY5Y ($p\text{-value} = 0,0173$ a 6 ore e $p\text{-value} = 0,002$ a 12 ore, $df = 2$) che nelle cellule IMR32 ($p\text{-value} = 0,038$ a 6 ore e $p\text{-value} = 0,016$ a 24 ore, $df = 2$), *Figura 14 c*.

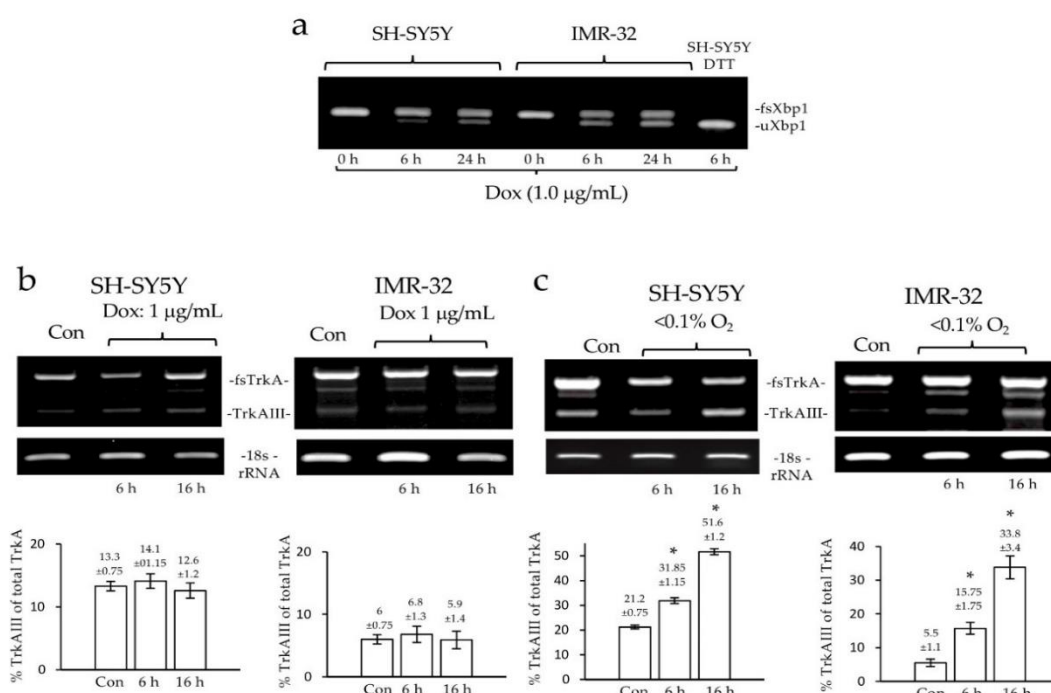


Figura 14. La Dox induce lo splicing non convenzionale di Xbp-1 nelle cellule NB. (a) Gel d'agarosio, che dimostra l'induzione, dipendente dal tempo, dello splicing non convenzionale di Xbp-1 (uXbp1) in RT-PCR su campioni di RNA estratti da cellule SH-SY5Y e IMR-32 NB, trattate con Dox (1 µg/mL) rispetto a controlli negativi SH-SY5Y e IMR32 non trattati e SH-SY5Y trattate con DTT 10 mM (controllo positivo), alle concentrazioni e nei tempi indicati. (b) Gel d'agarosio ed istogrammi, che non mostrano cambiamenti significativi nei livelli di espressione del TrkA (fsTrkA) e del TrkAIII in campioni di RNA ottenuti da cellule SH-SY5Y e IMR32 trattate con Dox alle concentrazioni e ai tempi indicati. (c) Gel d'agarosio ed istogrammi, che dimostrano un aumento significativo (*) dei valori medi (±) relativi ai livelli di prodotto RT-PCR del TrkAIII e TrkA (fsTrkA) nelle cellule SH-SY5Y e IMR32 in condizioni di ipossia, ai tempi indicati, rispetto ai controlli in normossia (Con)

L'attivazione del TrkAIII indotta dalla Doxorubicina coinvolge i recettori della rianodina (RyRs), la calmodulina (CaM), l'Hsp90 e l'assemblaggio dell'ERGIC ARF-1 dipendente

Per studiare il potenziale coinvolgimento dei canali del calcio regolati dallo stress del reticolo endoplasmatico nell'attivazione del TrkAIII, le cellule SH-SY5Y/TrkAIII sono state trattate con il Dantrolene inibitore della RyR (10 μ M, 6 ore) (Zhao *et al.*, 2001) e 2-APB inibitore di IP3R (100 μ M, 6 ore) (Spletstoeser, Florea and Büsselberg, 2007). Il Dantrolene ma non il 2-APB, ha ridotto significativamente il livello di fosforilazione del TrkAIII sia in presenza che in assenza della Dox (1 μ g/mL, 6 ore) (p -value = 0,0037 e p -value = 0,0229, rispettivamente, $df = 2$), *Figura 15 a-b*.

Per valutare il coinvolgimento della CaM Ca^{2+} -dipendente nella fosforilazione del TrkAIII, le cellule SH-SY5Y/TrkAIII sono state trattate con W-7 inibitore della CaM Ca^{2+} -dipendente (60 μ M, 6 ore) (Hidaka *et al.*, 1981). W-7 ha inibito la fosforilazione del TrkAIII indotta e non indotta dalla Dox (p -value = 0,0012 e p -value = 0,0092, rispettivamente $df = 2$), *Figura 15 c*.

Per determinare se l'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox ha un impatto sull'assemblaggio dell'ERGIC dipendente da ARF-1, le cellule SH-SY5Y/TrkAIII sono state trattate con la Brefeldina A (Bfa) inibitore di ARF-1 che provoca la dissociazione dell'ERGIC, (5 μ g/mL, 6 ore) (Chun *et al.*, 2008). La Bfa ha ridotto significativamente la fosforilazione del TrkAIII indotta dalla Dox e quella costitutivamente regolata dal ciclo cellulare (p -value = 0,0143 e p -value = 0,02, rispettivamente $df = 2$), *Figura 15 d*.

Inoltre, per valutare il coinvolgimento di Hsp90 nella fosforilazione del TrkAIII indotta dalla Dox, le cellule SH-SY5Y/TrkAIII sono state trattate con la Geldanamicina (GA), inibitore di HSP90 (1 μ M, 6 ore) (A. R. Farina *et al.*, 2009). La GA ha ridotto significativamente la fosforilazione del TrkAIII indotta dalla Dox, indotta dal DTT (10mM, 6 ore) e regolata dal ciclo cellulare (p -value = 0,0027, p -value = 0,0024 e p -value = 0,0007, rispettivamente, $df = 2$), *Figura 15 e*.

Queste osservazioni indicano che l'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox e costitutiva del ciclo cellulare dipendono dall'assemblaggio dell'ERGIC, da RyRs, dalla CaM, da Hsp90 e ARF.

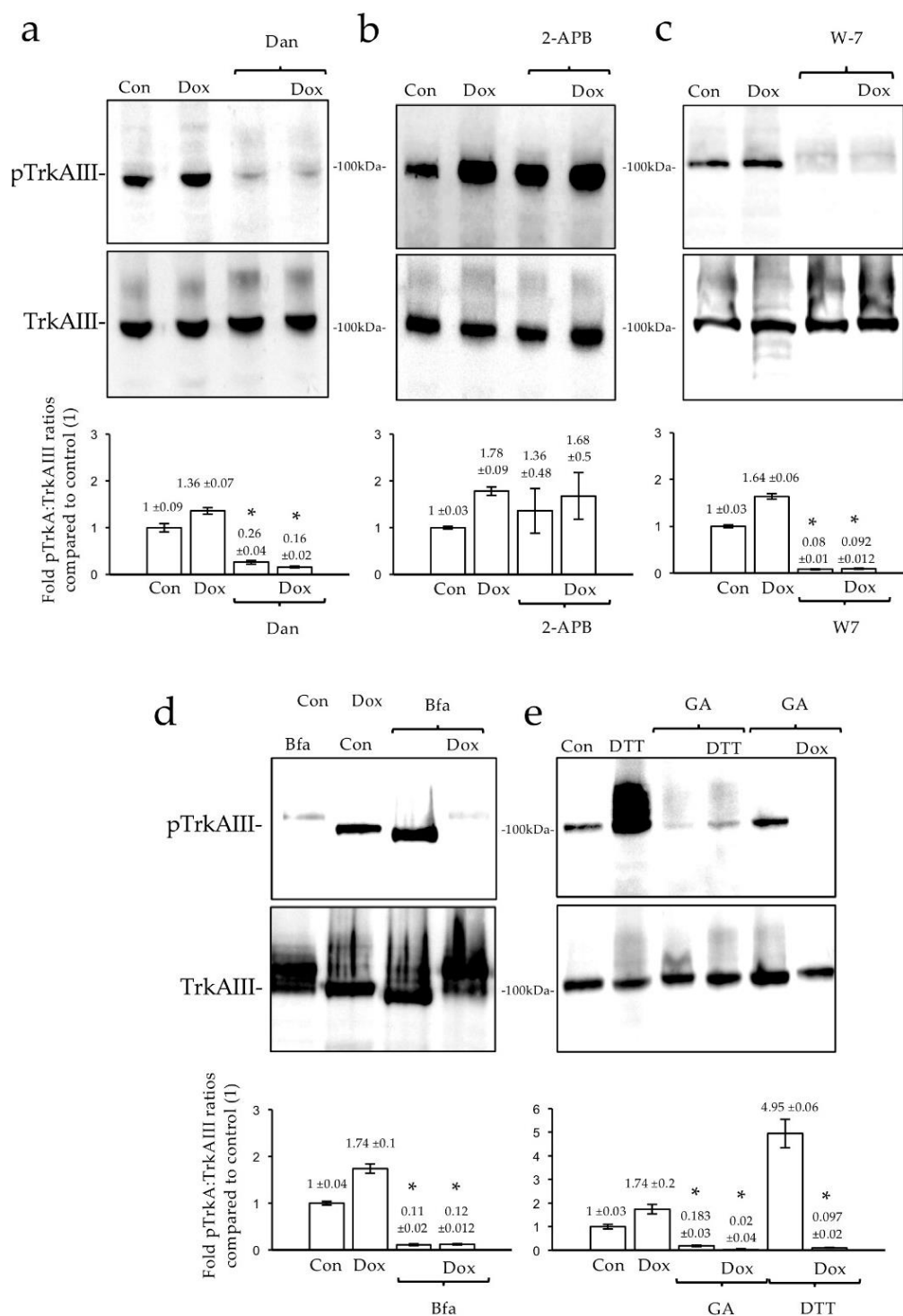


Figura 15. L'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox dipende da RyR, CaM e ARF-1. I Western blot e gli istogrammi, dimostrano quanto segue: (a) riduzioni significative (*) dei valori medi (±) della fosforilazione del TrkAIII regolata dal ciclo cellulare (Con) e indotta da Dox (Dox), relativa ai livelli totali di TrkAIII nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII trattate per 6 ore con Dantrolene (10µM) (Dan) e Dantrolene (10µM) più Dox (1µg/mL) (Dan/Dox); (b) nessuna riduzione della fosforilazione del TrkAIII né costitutiva né Dox-dipendente (1µg/mL) si evidenzia nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII trattate con l'inibitore 2-APB (100µM); (c) l'inibizione sia della fosforilazione del TrkAIII costitutiva (Con) che della forma indotta dalla Dox (1µg/mL per 6 ore) nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII trattate con W-7 (60µM); (d) l'inibizione della fosforilazione del TrkAIII costitutiva (Con) e indotta dalla Dox (1µg/mL per 6 ore) nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII trattate con Brefeldina A (5µg/mL) (Bfa), (e) inibizione della fosforilazione costitutiva del TrkAIII, con DTT (10 mM per 6 ore) e indotta dalla Dox (1µg/mL per 6 ore) nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII trattate con Geldanamicina (1µM) (AG)

Complesso TrkAIII/CaM

Per indagare ulteriormente sul coinvolgimento della CaM nell'attivazione del TrkAIII, sono stati eseguiti esperimenti di co-immunoprecipitazione. Il Western blotting dalla co-immunoprecipitazione ha messo in evidenza che il pull-down CaM/TrkAIII degli estratti delle SH-SY5Y/TrkAIII non trattate è aumentato significativamente dopo trattamento con la Dox (1µg/mL, 6 ore) (p -value =0,0158, $df = 2$). Il trattamento con W-7 (60 µM, 6 ore) ha ridotto sia la forma costitutivamente espressa del complesso che quella correlata all'attività della Dox (p -value =0,0097 e p -value =0,0182, rispettivamente $df = 2$), *Figura 16*. Ciò implica che il complesso TrkAIII/CaM Ca^{2+} -dipendente è implicato nella fosforilazione del TrkAIII indotta da Dox.

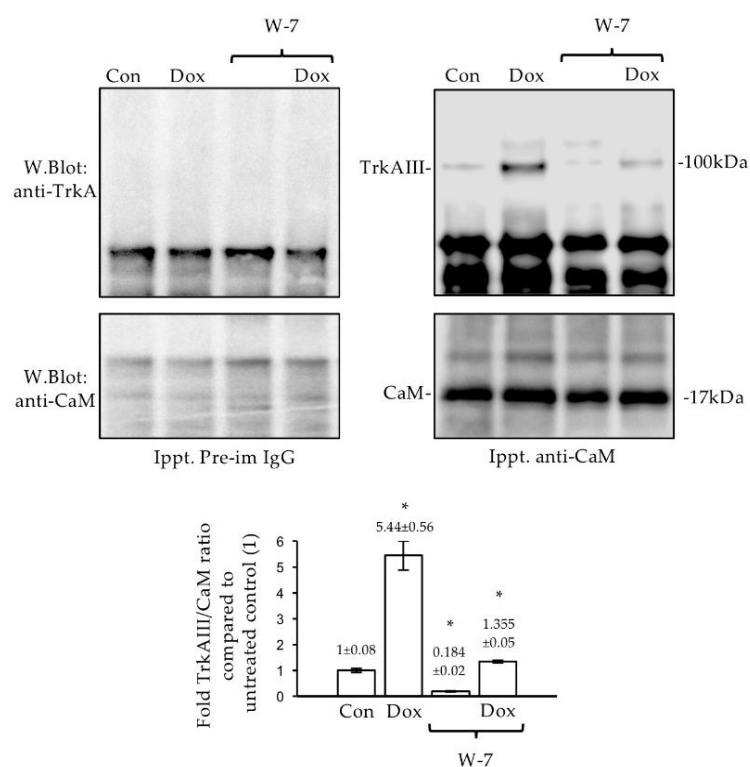


Figura 16. La Dox aumenta il CaM/TrkAIII. IgG pre-immuni e anti-CaM immunoprecipitazione, Western blot ed istogramma, dimostrano un aumento significativo (*) del pull-down CaM/TrkAIII costitutivo nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII non trattate (Con), in seguito al trattamento con la Dox (1µg/mL per 6 ore) e riduzioni significative (*) sia nel pull-down CaM/TrkAIII costitutivo che in presenza della Dox nelle cellule trattate con W-7 (60µM) (Dox/W-7)

L'attivazione del TrkAIII indotta dalla Doxorubicina aumenta la fosforilazione di Akt nelle SH-SY5Y/TrkAIII

Per determinare la possibile relazione tra l'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox e la fosforilazione di Akt, le cellule SHSY5Y/TrkAIII non trattate e trattate in combinazione con Dox (1 µg/mL, 6 ore), in presenza e in assenza di Lestaurtinib (1µM, 6 ore) (Shabbir and Stuart, 2010), Entrectinib (1µM, 6 ore) (Pacenta and Macy, 2018), e Crizotinib (100nM, 6 ore) (Heigener and Reck, 2018) sono state analizzate tramite Western blot. Lestaurtinib, Entrectinib e Crizotinib, alle concentrazioni e ai tempi indicati, hanno inibito la fosforilazione del TrkAIII indotta dalla Dox, *Figura 17 a*. La Dox ha aumentato significativamente l'Akt fosforilato nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII ($p\text{-value} = 0,0288$, $df = 2$), che è stato significativamente ridotto da Lestaurtinib, Entrectinib e Crizotinib ($p\text{-value} = 0,0229$, $p\text{-value} = 0,562$ e $p\text{-value} = 0,0183$, rispettivamente, $df = 2$), *Figura 17 b*. Ciò implica che TrkAIII è indotto dalla Dox è coinvolto nella fosforilazione di Akt.

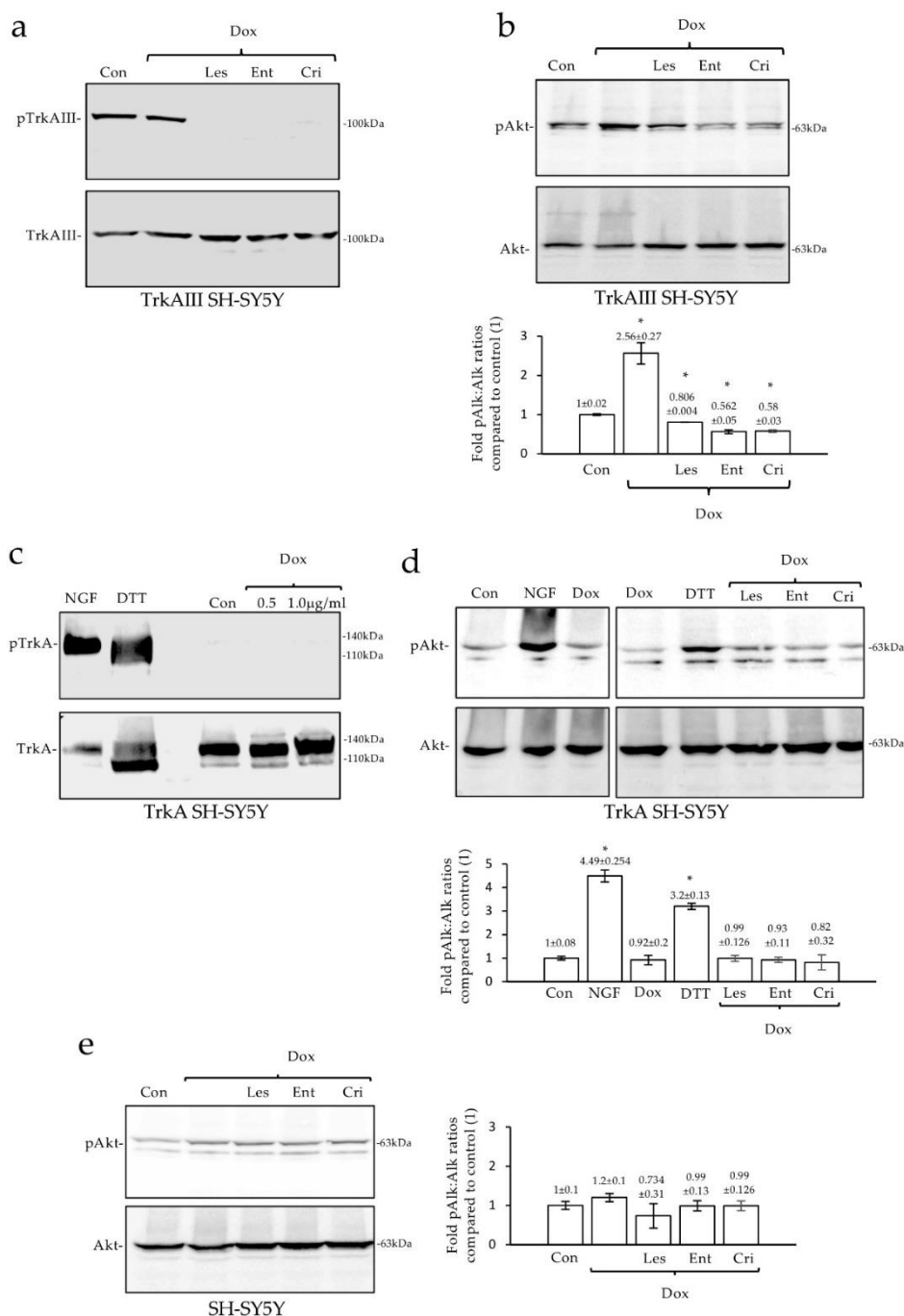


Figura 17. Dox induce la fosforilazione di TrkAIII e Akt ma non la fosforilazione di TrkA. (a) Western blot che dimostrano la completa inibizione della fosforilazione del TrkAIII indotta da 6 ore di trattamento con Dox (1µg/mL) da sola e in combinazione con Lestaurtinib (1µM) (Les/Dox), Entrectinib (1µM) (Ent/Dox) e Crizotinib (100 nM) (Cri/Dox). (b) Western blot e relativo istogramma, che dimostrano cambiamenti significativi (*) nella fosforilazione di Akt nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII non trattate (Con), dopo trattamento di 6 ore con Dox (1µg/mL) da sola e in combinazione con Lestaurtinib (1µM) (Les/Dox), Entrectinib (1µM) (Ent/Dox) e Crizotinib (100nM) (Cri/Dox). (c) Western blot che dimostrano l'induzione della fosforilazione del TrkA nelle cellule SH-SY5Y/TrkA mediante NGF (100 ng/mL per 15 min) e DTT (10 mM per 6 ore) ma non in presenza della Dox alle concentrazioni indicate per 6 ore. (d) Western blot ed istogramma, che dimostrano aumenti significativi (*) nella fosforilazione di Akt nelle cellule SH-SY5Y/TrkA non trattate, con NGF e DTT ma non con Dox, alle concentrazioni e nei tempi di cui sopra, e nessun cambiamento nella fosforilazione di Akt nelle cellule SH-SY5Y/TrkA trattate per 6 ore con Dox (1µg/mL) più Lestaurtinib (1µM) (Les/Dox), Entrectinib (1µM) (Ent/Dox) e Crizotinib (100 nM) (Cri/Dox). (e) Western blot e istogramma, che non dimostrano differenze nella fosforilazione di Akt nelle cellule parentali SH-SY5Y non trattate (Con) e nelle stesse cellule trattate per 6 ore con Dox (1µg/mL) da sola e in combinazione con Lestaurtinib (1µM) (Les/Dox), Entrectinib (1µM) (Ent/Dox) e Crizotinib (100 nM) (Cri/Dox)

La Doxorubicina non attiva il TrkA e non determina la fosforilazione di Akt nelle SH-SY5Y/TrkA

Per determinare se l'attivazione indotta dalla Dox è specifica per il TrkAIII, l'effetto della Dox (1µg/ml, 6 ore) è stato valutato anche sulle cellule SH-SY5Y/TrkA, che esprimono la forma *fully spliced* del TrkA (Pacenta and Macy, 2018; Lebedev *et al.*, 2020). I Western blot hanno rivelato che NGF (100ng/mL, 15 minuti) e DTT (10mM, 6 ore) ma non la Dox inducono la fosforilazione del TrkA nelle cellule SH-SY5Y/TrkA, *Figura 17 c*. La fosforilazione costitutiva di Akt nelle cellule SH-SY5Y/TrkA risulta aumentata significativamente da NGF e DTT (p -value =0,0058 e p -value = 0,0095, rispettivamente, $df = 2$) ma non dalla Dox, e non è stata alterata da Lestaurtinib (1µM, 6 ore), Entrectinib (1µM, 6 ore) e Crizotinib (100nM, 6 ore), *Figura 17 d*. Anche la fosforilazione costitutiva di Akt nelle cellule parentali SH-SY5Y non è stata alterata dalla Dox né tanto meno dagli inibitori Lestaurtinib (1µM, 6 ore), Entrectinib (1µM, 6 ore) e Crizotinib (100nM, 6 ore), *Figura 17 e*. Queste osservazioni confermano ulteriormente il coinvolgimento specifico del TrkAIII nella fosforilazione di Akt incrementata dalla Dox.

L'attivazione del TrkAIII indotta dalla Doxorubicina migliora la resistenza alla citotossicità da Dox ed è invertita dagli inibitori di Trk e IP3-K

Per studiare gli effetti biologici dell'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox, sono state confrontate la crescita e la sopravvivenza delle cellule SH-SY5Y, SH-SY5Y/TrkA e SH-SY5Y/TrkAIII con diverse condizioni di trattamento mediante *IncuCyte® S3 analysis system*. Le cellule SH-SY5Y, SH-SY5Y/TrkA e SH-SY5Y/TrkAIII senza alcun trattamento non hanno mostrato differenze nei tassi di proliferazione e hanno mostrato un raddoppiamento del numero di cellule dopo circa 12 ore, *Figura 18 a*. Ciò conferma che il TrkA inattivo e il TrkAIII costitutivamente espresso non influenzano la proliferazione delle SH-SY5Y. Negli studi sugli inibitori, Entrectinib (100nM - 1µM, 6 ore) e Crizotinib (100nM, 6 ore), alle concentrazioni e al tempo indicati, non hanno inibito in modo significativo la proliferazione di SH-SY5Y, SH-SY5Y/TrkA e SH-SY5Y/TrkAIII nelle 24 ore, *Figura 18 a*, mentre Lestaurtinib ad 1µM (6 ore) ma non a 100nM (6 ore) ha inibito quasi completamente la proliferazione di tutte e 3 le linee cellulari (p -value <0,0001, per

tutte e 3 le linee cellulari in tutti i punti temporali). Ciò conferma che il TrkAIII non regola la proliferazione delle SH-SY5Y.

Per determinare i ruoli del TrkAIII, IP3-K e MEK/MAPK nella resistenza alla Dox, è stata valutata la sopravvivenza delle SH-SY5Y, SH-SY5Y/TrkA e SH-SY5Y/TrkAIII dopo il trattamento con la Dox (1 µg/mL, 6 ore) da sola e in combinazione con Lestaurtinib (100nM e 1µM, 6 ore), Entrectinib (100nM - 1µM, 6 ore), Crizotinib (100nM, 6 ore), LY294002 inibitore di IP3-K (25µM, 6 ore) (Gharbi *et al.*, 2007) e PD098059 inibitore di MEK/MAPK (10µM, 6 ore) (Alessi *et al.*, 1995), alle concentrazioni e al tempo indicati. La sopravvivenza delle cellule SH-SY5Y e SH-SY5Y/TrkA trattate con la Dox non è stata significativamente alterata da nessuno degli inibitori utilizzati, *Figura 18 c*. Al contrario, la sopravvivenza delle cellule SH-SY5Y/TrkAIII trattate con la Dox è stata significativamente ridotta da Lestaurtinib, Entrectinib, Crizotinib e LY294002 ma non da PD98059; infatti come mostrato in *Figura 18 c* la sopravvivenza delle SH-SY5Y/TrkAIII dopo il trattamento, per 12 ore, con la Dox è stata significativamente ridotta da Lestaurtinib del 13% circa con entrambe le concentrazioni utilizzate per questo inibitore (*p-value* <0.0001, *df* = 8), per Entrectinib a 100 nM del 18% circa e ad 1µM del 45% circa (*p-value* <0.0001, *df* = 8), per Crizotinib del 34% circa (*p-value* <0.0001, *df* = 8) e per LY294002 18% circa, ma non è stata significativamente ridotta da PD98059, *Figura 18 c*. Gli effetti degli inibitori tirosin-chinasici e LY294002 sulla sopravvivenza delle cellule SH-SY5Y/TrkAIII in assenza e in presenza della Dox sono osservabili anche attraverso le immagini ottenute dal software di analisi *IncuCyte® S3* in *Figura 19*.

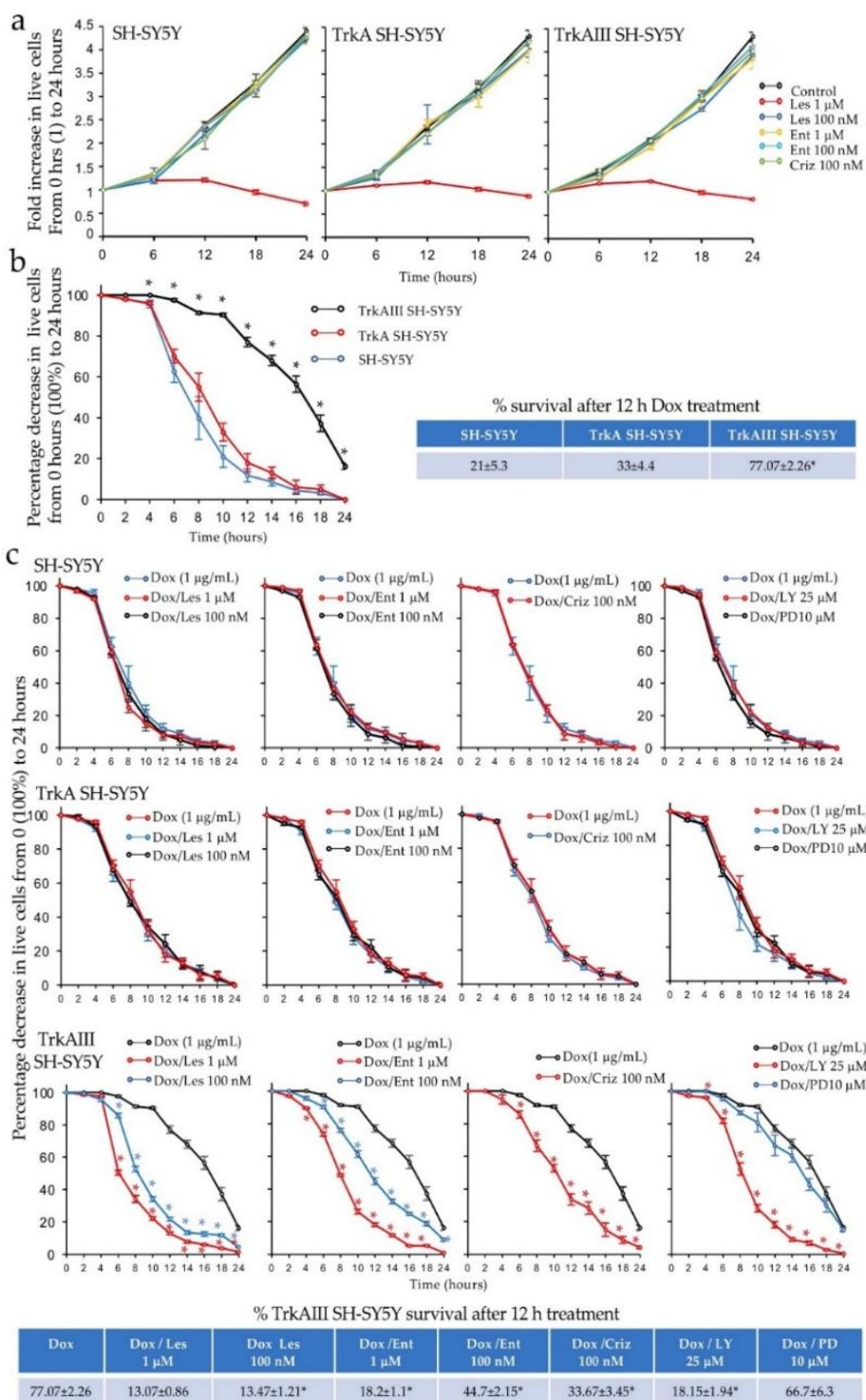
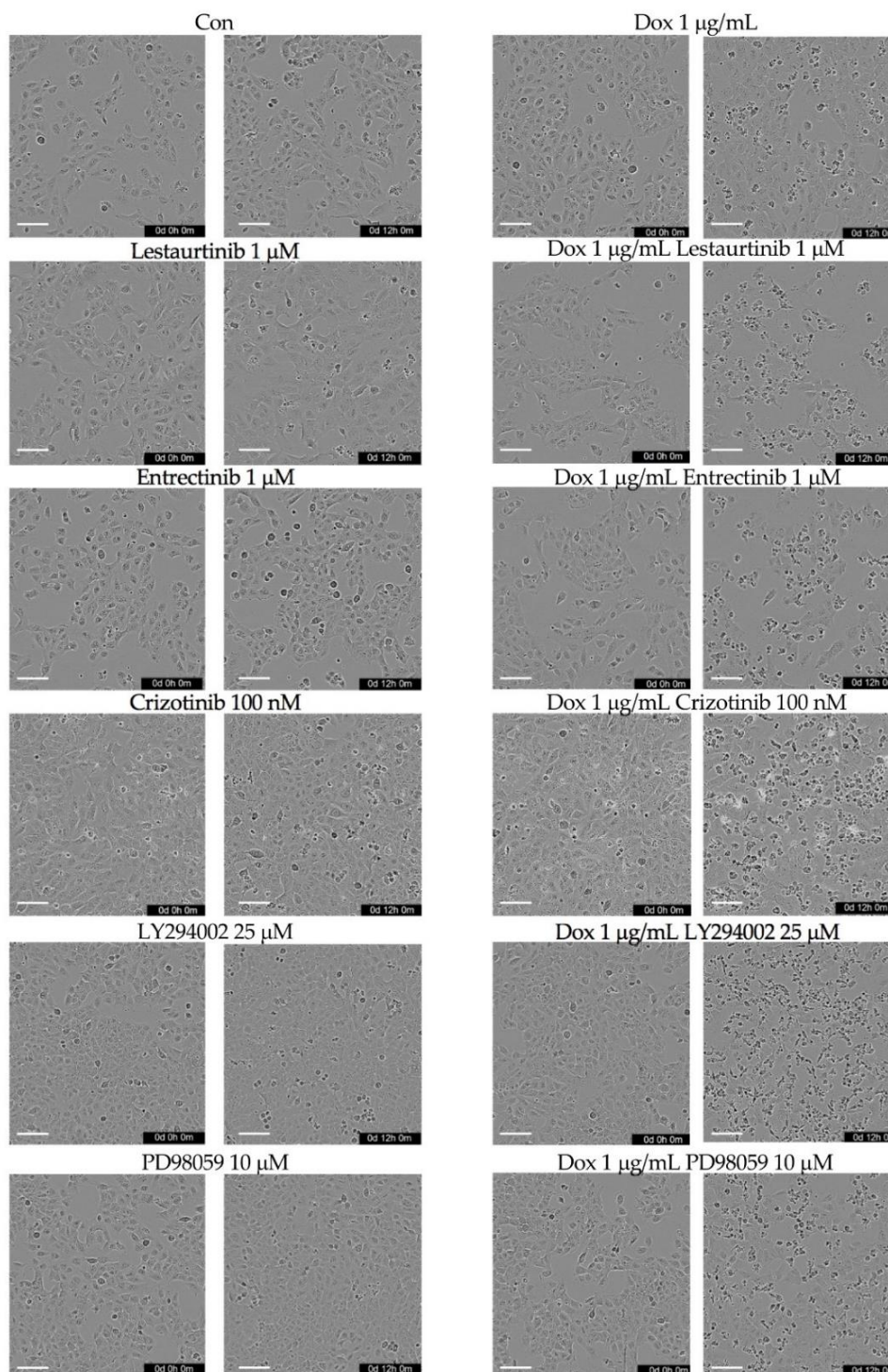


Figura 18. L'attivazione di TrkAIII indotta da Dox conferisce resistenza dipendente dalla Dox alle cellule SH-SY5Y. (a) Grafici a linee che dimostrano i tassi di proliferazione di SH-SY5Y, SH-SY5Y/TrkA e SH-SY5Y/TrkAIII senza trattamento ed in presenza di Lestaurtinib (Les), Entrectinib (Ent) e Crizotinib (Criz), alle concentrazioni indicate, nell'arco di 24 ore. (b) Grafici a linee che dimostrano una sopravvivenza significativamente migliorata (*) delle SH-SY5Y/TrkAIII rispetto alle parentali SH-SY5Y e alle SH-SY5Y/TrkA in presenza di Dox ad 1μg/mL, in 24 ore (* = significatività statistica); la tabella mostra la media (±) delle percentuali di sopravvivenza delle cellule SH-SY5Y, SH-SY5Y/TrkA e SH-SY5Y/TrkAIII dopo il trattamento con la Dox a 12 ore. (c) Grafici a linee dimostrano riduzioni significative (*) della sopravvivenza delle SH-SY5Y/TrkAIII in presenza della Dox (1μg/mL) in combinazione con Lestaurtinib (Les), Entrectinib (Ent), Crizotinib, (Criz) e LY294002 (LY) ma non con PD08059 (PD) alle concentrazioni indicate, rispetto alle SH-SY5Y e alle SH-SY5Y/TrkA sotto le stesse condizioni nell'arco di 24 ore (* = significatività statistica), la tabella riporta la media (±) in percentuale di sopravvivenza delle cellule SH-SY5Y/TrkAIII dopo 12 ore di trattamento con la Dox da sola e in combinazione con Lestaurtinib (Les), Entrectinib (Ent), Crizotinib, (Criz), LY294002 (LY) e PD08059 (PD) alle concentrazioni indicate



% TrkAIII SH-SY5Y survival after 12 h treatment

Dox 1 µg/mL	Dox / Lest 1 µM	Dox / Lest 100 nM	Dox / Ent 1 µM	Dox / Ent 100 nM	Dox / Criz 100 nM	Dox / LY 25 µM	Dox / PD 10 µM
77.07±2.26	13.07±0.86	13.47±1.21*	18.2±1.1*	44.7±2.15*	33.67±3.45*	18.15±1.94*	66.7±6.3

Figura 19. Gli inibitori del Trk aumentano la citotossicità delle SH-SY5Y/TrkAIII indotta dalla Dox. Immagini rappresentative IncuCyte® S3, dimostrano i cambiamenti nei livelli di cellule vive e morte o morenti in cellule SH-SY5Y/TrkAIII non trattate e nelle stesse cellule trattate per 12 ore con Lestaurtinib, Entrectinib, Crizotinib, LY294002 e PD98059 da soli e in combinazione con la Dox alle concentrazioni elencate (bar = 100µm, * = significatività statistica)

Le SH-SY5Y, SH-SY5Y/TrkA e SH-SY5Y/TrkAIII non presentano la mutazione NM_004304.5 (ALK):c.3522C > A (p.Phe1174Leu)

Il sequenziamento effettuato utilizzando l'amplificato del DNA genomico con primers che coprono la mutazione NM_004304.5 (ALK): c.3522C > A (p.Phe1174Leu) non ha rilevato questa mutazione nelle linee cellulari parentali SH-SY5Y, *Figura 20*, né nei trasfettanti stabili SH-SY5Y/TrkA e SH-SY5Y/TrkAIII. Questo spiega perché gli inibitori di ALK: Entrectinib e Crizotinib non hanno inibito la proliferazione nelle nostre cellule SH-SY5Y. Questa linea cellulare è stata originariamente ottenuta da NIH (Bethesda MD, USA) nel 1986, 3 anni dopo la pubblicazione (Ross, Spengler and Biedler, 1983), suggerendo che la mutazione di ALK recentemente descritta nelle cellule SH-SY5Y (George *et al.*, 2008; Mazot *et al.*, 2012) potrebbe essere stata acquisita in coltura (Petljak *et al.*, 2022).

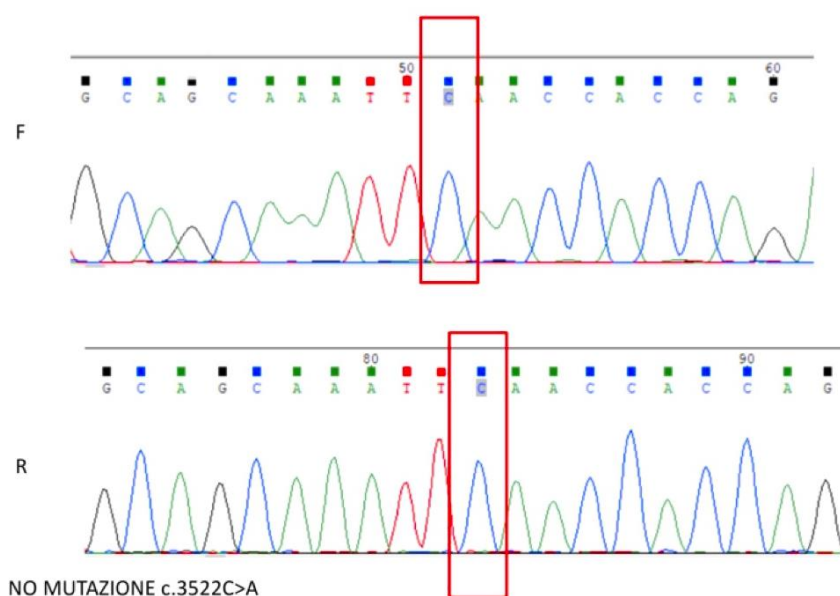


Figura 20. Le cellule SH-SY5Y non portano la mutazione NM_004304.5 (ALK):c.3522C > A (p. Phe1174Leu). Sequenza del sito di mutazione genomica c.3522C > A Alk, che dimostra l'assenza della mutazione NM_004304.5(ALK):c.3522C > A (p. Phe1174Leu) nelle cellule parentali SH-SY5Y

DISCUSSIONE

Nell'insieme i risultati mostrano un nuovo meccanismo di resistenza alla Dox nelle cellule di NB umano, caratterizzato dall'attivazione della variante oncogenica di splicing TrkAIII, indotta dalla Dox stessa. Questo meccanismo è specifico per il TrkAIII, non influenza la forma del TrkA *full spliced*, si verifica nelle cellule non proliferanti, all'interno del compartimento intermedio tra Reticolo Endoplasmatico e Golgi assemblati (ERGIC) e coinvolge la via di segnalazione IP3-K/Akt.

Differisce dalla regolazione del ciclo cellulare in quanto è indipendente da CDK1 ma anche dall'uniporter del Ca^{2+} .

L'attivazione del TrkAIII, indotta dalla Dox, dipende dai recettori RyRs, dalla calmodulina Ca^{2+} -dipendente e da HSP90, richiede la presenza di ossigeno e ossidazione ed è associata all'attivazione dell'UPR (Unfolded Protein Response). Tuttavia, viene inibita dai farmaci Lestaurinib, Entrectinib e Crizotin inibitori tirosin-chiansici e dall'inibitore del IP3-K, LY294002.

La specificità di questo nuovo meccanismo di resistenza per il TrkAIII riflette principalmente la mancanza del dominio extracellulare D4 codificato dagli esoni 6 e 7 non presenti in questa variante di splicing della tropomiosina chinasi A. Il dominio D4 è necessario per la traslocazione sulla superficie cellulare del TrkA, limita il suo confinamento intracellulare nell'apparato del Golgi e ne previene l'attivazione spontanea (Arevalo *et al.*, 2000; Tacconelli *et al.*, 2004; A. R. Farina *et al.*, 2009; Farina *et al.*, 2018; Treis *et al.*, 2022). La delezione del dominio D4 nel TrkAIII compromette l'espressione sulla superficie cellulare, promuove l'accumulo intracellulare nell'ERGIC e facilita l'attivazione spontanea (Tacconelli *et al.*, 2004; Farina *et al.*, 2018).

Sebbene un grave stress del Reticolo Endoplasmatico prevenga la maturazione del TrkA e promuova l'accumulo intracellulare del TrkA immaturo e la sua attivazione spontanea, come mostrato in questo studio (Schecterson *et al.*, 2010), il livello di stress del RE indotto dalla Dox, come confermato dallo splicing non convenzionale di Xbp-1, non ha impedito la maturazione del TrkA, non ha promosso l'accumulo e non ha indotto l'attivazione intracellulare, avvalorando la specificità di questo meccanismo per il TrkAIII.

L'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox in cellule senescenti SH-SY5Y/TrkAIII bloccate nella proliferazione, dal danno al DNA Dox indotto, dalla risposta al danno del DNA e da RO-3306 inibitore di CDK1 (Sunada *et al.*, 2021) conferma un meccanismo di attivazione CDK1 e ciclo cellulare indipendente (Forrest *et al.*, 2012; Karabicici *et al.*, 2021).

Tuttavia, l'inibizione da parte di RO-3306 della fosforilazione costitutiva del TrkAIII in assenza del trattamento con la Dox conferma che l'attivazione del TrkAIII nelle cellule in attiva proliferazione è CDK1-dipendente e regolata dal ciclo cellulare. La fosforilazione costitutiva del TrkAIII regolata dal ciclo cellulare nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII inizia dopo la citocinesi, diminuisce con il progredire del ciclo cellulare e viene inibita durante la mitosi, come dimostrato in questo studio (Antonietta Rosella Farina *et al.*, 2009). Pertanto, la fosforilazione del TrkAIII Dox-indotta, nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII senescenti, deriva probabilmente dall'arresto in uno stato di post-divisione che ne favorisce l'attivazione o potrebbe essere causata da modifiche delle condizioni inibitorie, durante le quali il TrkAIII fosforilato si trova in uno stato del ciclo cellulare, non mitotico, caratterizzato dall'assemblaggio dell'ERGIC.

L'inibizione da parte del DS16570511 dell'attivazione del TrkAIII regolata dal ciclo cellulare ma non indotta dalla Dox conferma che il meccanismo d'attivazione regolato dal ciclo cellulare è dipendente dall'uniporter del Ca^{2+} mitocondriale, infatti, in questo caso è possibile notare l'arresto in fase M indotto da DS16570511 (Zhao *et al.*, 2019), caratterizzato dalla dissociazione dell'ERGIC e dall'inibizione della fosforilazione del TrkAIII.

Inoltre, il DS16570511 inibisce il Ca^{2+} mitocondriale implicato nel "burst metabolico" necessario per il completamento della fase M e della citocinesi (Zhao *et al.*, 2019). Ciò suggerisce che questo "burst metabolico" fornisca anche le condizioni ossidative utili affinché si verifichi l'attivazione del TrkAIII dopo la citocinesi, come supportato dall'ipossia e dalla prevenzione dell'attivazione di TrkAIII regolata dal ciclo cellulare da parte del Resveratrolo. L'incapacità del DS16570511 di prevenire l'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox può essere spiegata dalla generazione dei ROS da parte della Dox in molteplici siti intracellulari attraverso interazioni con NADPH/NADP e ossigeno (Yu and Zhang, 2018). Questo fornirebbe le condizioni ossidative necessarie per l'attivazione intracellulare del TrkAIII attraverso l'inibizione della PTPasi (Doroshov, 2019), sostenuta

anche dall'ipossia e dalla capacità di prevenire l'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox da parte del Resveratrolo, confermando la dipendenza dall'ossigeno e dall'ossidazione.

La riduzione dell'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox da parte del Dantrolene (Zhao *et al.*, 2001) ma non di 2-APB (Spletstoeser, Florea and Büsselberg, 2007) implica il coinvolgimento dei recettori RyR ma non del IP3R nel meccanismo d'attivazione. Ciò è supportato da dati presenti in letteratura secondo i quali la Dox lega e attiva i recettori RyR, compreso RyR2 che è espresso nelle cellule SH-SY5Y (Saeki *et al.*, 2002; Oulès *et al.*, 2012; Del Prete, Checler and Chami, 2014; Stolarz *et al.*, 2019). Inoltre, il Dantrolene blocca l'attivazione del TrkAIII regolata dal ciclo cellulare, in quanto probabilmente è coinvolto l'UPR nell'adattamento del TrkAIII nelle cellule SH-SY5Y (A. R. Farina *et al.*, 2009) che sappiamo essere attivato dal Ca^{2+} mediato a sua volta dai RyR2 nel RE (Yamamoto *et al.*, 2019).

Il coinvolgimento del Ca^{2+} e della CaM nell'attivazione del TrkAIII, indotta dalla Dox, è stato confermato dall'analisi in combinazione in presenza dell'inibitore W-7 e dalla formazione del complesso TrkAIII/CaM rafforzato dalla Dox nel trattamento con W-7 (Hidaka *et al.*, 1981). Confermando e rafforzando l'ipotesi secondo cui la CaM lega il TrkA (Llovera *et al.*, 2004) ed ampliandola anche per la variante di splicing TrkAIII, suggeriamo infatti che l'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox dipenda dal rilascio del Ca^{2+} presente nel Reticolo Endoplasmatico mediato da RyR e dalla formazione del complesso CaM Ca^{2+} -dipendente /TrkAIII. La CaM regola anche l'attività di Hsp90 (Minami *et al.*, 1993) e la GA, inibitore di Hsp90, ha bloccato l'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox, comprovando un precedente risultato ottenuto nel nostro laboratorio secondo il quale l'attivazione del TrkAIII è Hsp90-dipendente (A. R. Farina *et al.*, 2009) ed inoltre, suggerisce che l'attivazione del TrkAIII Dox-indotta coinvolge complessi regolati dal Ca^{2+} attraverso interazioni tra TrkAIII, CaM e Hsp90, che possono essere implicati anche nell'attivazione del TrkAIII regolata dal ciclo cellulare.

La resistenza, significativamente aumentata, alla citotossicità della Dox mostrata nelle cellule di NB SH-SY5Y/TrkAIII è stata abrogata da Lestaurtinib, Entrectinib, Crizotinib e da LY294002 ma non da PD98059 a concentrazioni inibitorie per il TrkAIII considerando che il TrkAIII e IP3-K sono coinvolti in questo meccanismo di resistenza ma non MEK/MAPK. Gli stessi inibitori, ma non quello delle MEK/MAPK, hanno anche impedito l'aumento della fosforilazione di Akt indotto dalla Dox nelle cellule SH-SY5Y/TrkAIII.

Ciò evidenzia che questo meccanismo deriva dalla segnalazione pro-sopravvivenza indotta dalla Dox, mediata dal TrkAIII e dipendente da IP3-K/Akt, coerente con risultati pubblicati in precedenza che suggerivano che il TrkAIII induce una segnalazione IP3-K/Akt pro-sopravvivenza (Tacconelli *et al.*, 2004; Farina *et al.*, 2018) e che Akt media la resistenza alla Dox nelle cellule di NB (Rebbaa, Chou and Mirkin, 2001; Emran, Rebbaa and Mirkin, 2002; Peirce *et al.*, 2011; Fey *et al.*, 2015; Tuffery, Halasz and Fey, 2020; Chilamakuri *et al.*, 2022).

L'induzione dello splicing non convenzionale di Xbp-1 da parte della Dox sopprime l'inibizione della via IRE1 α /XBP1 dell'UPR in questo meccanismo di resistenza (Jiang *et al.*, 2016), mentre PP1 non ha impedito l'attivazione del TrkAIII, indotta dalla Dox, indicando che qualsiasi potenziale coinvolgimento di Src avverrebbe a valle della cascata di segnalazione (Lee *et al.*, 2018). Poiché il TrkAIII promuove un fenotipo di NB simile a quello delle cellule staminali (Ruggeri *et al.*, 2014), non escludiamo che l'espressione di geni di resistenza alla Dox associati alle cellule staminali o EMT (Aravindan *et al.*, 2019; Mirzaei *et al.*, 2021) possano avere un potenziale ruolo in questo meccanismo.

La dipendenza, di questo nuovo meccanismo, dall'ossigeno combinata con l'osservazione che la Dox non promuove lo splicing alternativo dell'mRNA del TrkAIII nonostante l'attivazione dell'UPR, indica che la resistenza alla Dox sarebbe limitata ai microambienti tumorali ossigenati "popolati" da cellule tumorali che già esprimono il TrkAIII.

Lo splicing alternativo del TrkAIII nelle cellule di NB è supportata da agenti che inducono un grave stress del RE, dall'antigene T grande del polyomavirus SV40 e da CoCl₂ che mima uno stato di ipossia (Tacconelli *et al.*, 2004; Farina *et al.*, 2018), fornendo per l'appunto tre condizioni per le quali l'espressione del TrkAIII può essere promossa nei NB.

Con questo studio, confermiamo ulteriormente l'ipotesi secondo cui le condizioni di ipossia, nelle cellule di NB, promuovono lo splicing alternativo del TrkAIII ma ne impediscono l'attivazione indotta dalla Dox, pertanto l'ipossia e la riossigenazione, che caratterizzano il 20-30% dei microambienti tumorali in qualsiasi momento (Michiels, Tellier and Feron, 2016), possono fornire le condizioni ideali per attivare questo meccanismo di resistenza alla Dox.

Infine, l'ipossia promuove l'espressione del TrkAIII che potrebbe essere attivato dalla riossigenazione al momento del ripristino del flusso sanguigno e dell'arrivo della Dox. Questo, in associazione con l'arresto della proliferazione e la senescenza indotta dalla Dox

(Karabicici *et al.*, 2021), potrebbe fornire un nuovo meccanismo di selezione delle cellule di NB resistenti e quiescenti che esprimono la variante oncogenica TrkAIII, aumentando la possibilità di una ricaduta post-terapeutica e della progressione metastatica del tumore (Tacconelli *et al.*, 2004; Farina *et al.*, 2018; Karabicici *et al.*, 2021).

CONCLUSIONI

I pazienti affetti da Neuroblastoma in stadio avanzato ricevono una terapia clinica multimodale, che include il potente farmaco chemioterapico, Doxorubicina (Cappabianca *et al.*, 2022; Johnson-Arbor and Dubey, 2022). L'acquisizione della resistenza alla Dox, tuttavia, è un ostacolo all'efficacia clinica della chemioterapia e porta ad una prognosi sfavorevole negli stati avanzati della malattia, rendendo necessaria l'identificazione e l'inibizione dei meccanismi di resistenza alla Dox (Cappabianca *et al.*, 2022).

In questo studio, abbiamo individuato un nuovo meccanismo di resistenza alla Dox caratterizzato dall'attivazione della variante alternativa di splicing del recettore della tropomiosina chinasi A, il TrkAIII, variante oncogena, indotta dal chemioterapico stesso, che determina un aumento della resistenza alla Dox, ed è bloccato dagli inibitori tirosin-chinasici Lestaurtinib, Entrectinib e Crizotinib e dall'inibitore di IP3-K, LY294002. Inoltre, riportiamo che l'attivazione del TrkAIII indotta dalla Dox è correlata all'inibizione della proliferazione ed è CDK1- e uniporter del Ca^{2+} -indipendente. È mediata dai recettori rianodinici e da interazioni Ca^{2+} -dipendenti tra TrkAIII, calmodulina e Hsp90; richiede la presenza di ossigeno e ossidazione; si verifica all'interno dell'ERGIC assemblato ed è un meccanismo esclusivo per il TrkAIII, infatti, non si verifica per il TrkA *full spliced*. Gli effetti inibitori di Lestaurtinib, Entrectinib, Crizotinib e LY294002 sulla fosforilazione del TrkAIII e Akt indotta dalla Dox, confermano un ruolo del TrkAIII e di IP3-K coerente con la segnalazione IP3K/Akt pro-sopravvivenza indotta dalla Dox e mediata dal TrkAIII.

In conclusione, questo nuovo meccanismo di resistenza alla Dox ha la capacità di selezionare cellule di NB resistenti, quiescenti, che esprimono la variante oncogena TrkAIII e che potrebbero rientrare nel ciclo cellulare con un fenotipo più aggressivo e metastatico, promuovendo la ricaduta post-terapeutica. Ciò nonostante, l'uso di inibitori Trk clinicamente approvati, come Lestaurtinib, Entrectinib e Crizotinib, nei NB che esprimono il TrkAIII, in combinazione con il chemioterapico Doxorubicina potrebbero essere d'aiuto nel ridurre la farmaco resistenza, al fine di rendere le cellule più sensibili al chemioterapico con una vantaggiosa ed efficace riuscita del trattamento.

BIBLIOGRAFIA

- Alessi, D. R. *et al.* (1995) 'PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo', *The Journal of biological chemistry*. *J Biol Chem*, 270(46), pp. 27489–27494. doi: 10.1074/JBC.270.46.27489.
- Aravindan, N. *et al.* (2019) 'Cancer stem cells in neuroblastoma therapy resistance', *Cancer Drug Resistance*. OAE Publishing Inc, pp. 948–967. doi: 10.20517/cdr.2019.72.
- Arevalo, J. C. *et al.* (2000) 'TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor', *Molecular and cellular biology*. *Mol Cell Biol*, 20(16), pp. 5908–5916. doi: 10.1128/MCB.20.16.5908-5916.2000.
- Barker, P. A. *et al.* (1993) 'Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 268(20), pp. 15150–15157. doi: 10.1016/S0021-9258(18)82449-8.
- Barr, E. K. and Applebaum, M. A. (2018) 'Genetic predisposition to neuroblastoma', *Children*. Children (Basel). doi: 10.3390/children5090119.
- Bibel, M. and Barde, Y. A. (2000) 'Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system', *Genes & development*. *Genes Dev*, 14(23), pp. 2919–2937. doi: 10.1101/GAD.841400.
- Brodeur, G. M. *et al.* (1988) 'International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma', *Journal of Clinical Oncology*. *J Clin Oncol*, 6(12), pp. 1874–1881. doi: 10.1200/JCO.1988.6.12.1874.
- Brodeur, G. M. *et al.* (1993) 'Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. *J Clin Oncol*, 11(8), pp. 1466–1477. doi: 10.1200/JCO.1993.11.8.1466.
- Brodeur, G. M. *et al.* (1997) 'Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas', *Journal of Neuro-Oncology*. Springer New York LLC, 31(1–2), pp. 49–56. doi: 10.1023/A:1005729329526/METRICS.
- Brodeur, G. M. (2018) 'Spontaneous regression of neuroblastoma', *Cell and tissue research*. NIH Public Access, 372(2), p. 277. doi: 10.1007/S00441-017-2761-2.

- Cao, F. *et al.* (2010) 'Expression of TrkA splicing isoforms in neuroblastoma and its clinical significance', *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 37(22), pp. 1282–1285. doi: 10.3969/J.ISSN.1000-8179.2010.22.006.
- Cappabianca, L. *et al.* (2022) 'Doxorubicin-Induced TrkAIII Activation: A Selection Mechanism for Resistant Dormant Neuroblastoma Cells', *International journal of molecular sciences*. Int J Mol Sci, 23(18). doi: 10.3390/IJMS231810895.
- Carpenter, E. L. and Mossé, Y. P. (2012) 'Targeting ALK in neuroblastoma--preclinical and clinical advancements', *Nature reviews. Clinical oncology*. Nat Rev Clin Oncol, 9(7), pp. 391–399. doi: 10.1038/NRCLINONC.2012.72.
- Carvalho, C. *et al.* (2009) 'Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect', *Current medicinal chemistry*. Curr Med Chem, 16(25), pp. 3267–3285. doi: 10.2174/092986709788803312.
- Cheung, N. K. V. *et al.* (2012) 'Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma', *JAMA*. JAMA, 307(10), pp. 1062–1071. doi: 10.1001/JAMA.2012.228.
- Cheung, N. K. V. and Dyer, M. A. (2013) 'Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy', *Nature reviews. Cancer*. Nat Rev Cancer, 13(6), pp. 397–411. doi: 10.1038/NRC3526.
- Chilamakuri, R. *et al.* (2022) 'BX-795 inhibits neuroblastoma growth and enhances sensitivity towards chemotherapy', *Translational Oncology*. Elsevier, 15(1), p. 101272. doi: 10.1016/J.TRANON.2021.101272.
- Chun, J. *et al.* (2008) 'Characterization of Class I and II ADP-Ribosylation Factors (Arfs) in Live Cells: GDP-bound Class II Arfs Associate with the ER-Golgi Intermediate Compartment Independently of GBF1', *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology, 19(8), p. 3488. doi: 10.1091/MBC.E08-04-0373.
- Cohn, S. L. *et al.* (2009) 'The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: An INRG task force report', *Journal of Clinical Oncology*. J Clin Oncol, 27(2), pp. 289–297. doi: 10.1200/JCO.2008.16.6785.
- Doroshov, J. H. (2019) 'Mechanisms of Anthracycline-Enhanced Reactive Oxygen Metabolism in Tumor Cells', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi

Limited, 2019. doi: 10.1155/2019/9474823.

Drilon, A. *et al.* (2017) ‘Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1)’, *Cancer discovery*. *Cancer Discov*, 7(4), pp. 400–409. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1237.

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

Emran, M. A., Rebbaa, A. and Mirkin, B. L. (2002) ‘Doxorubicin resistant neuroblastoma cells secrete factors that activate AKT and attenuate cytotoxicity in drug-sensitive cells’, *Cancer Letters*. *Cancer Lett*, 182(1), pp. 53–59. doi: 10.1016/S0304-3835(02)00062-9.

Evans, A. E. *et al.* (1999) ‘Antitumor activity of CEP-751 (KT-6587) on human neuroblastoma and medulloblastoma xenografts.’, *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 5(11), pp. 3594–3602. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/5/11/3594> (Accessed: 24 March 2023).

Farina, Antonietta Rosella *et al.* (2009) ‘The alternative TrkAIII splice variant targets the centrosome and promotes genetic instability’, *Molecular and cellular biology*. *Mol Cell Biol*, 29(17), pp. 4812–4830. doi: 10.1128/MCB.00352-09.

Farina, A. R. *et al.* (2009) ‘The neuroblastoma tumour-suppressor TrkAI and its oncogenic alternative TrkAIII splice variant exhibit geldanamycin-sensitive interactions with Hsp90 in human neuroblastoma cells’, *Oncogene*. *Oncogene*, 28(46), pp. 4075–4094. doi: 10.1038/ONC.2009.256.

Farina, A. R. *et al.* (2018) ‘The oncogenic neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase variant, TrkAIII’, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. BioMed Central Ltd., 37(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/S13046-018-0786-3/FIGURES/10.

Farina, A. R. *et al.* (2021) ‘Mechanisms involved in selecting and maintaining neuroblastoma cancer stem cell populations, and perspectives for therapeutic targeting’, *World Journal of Stem Cells*. *World J Stem Cells*, 13(7), pp. 685–736. doi: 10.4252/wjsc.v13.i7.685.

- Fey, D. *et al.* (2015) 'Signaling pathway models as biomarkers: Patient-specific simulations of JNK activity predict the survival of neuroblastoma patients', *Science signaling*. *Sci Signal*, 8(408). doi: 10.1126/SCISIGNAL.AAB0990.
- Finklestein, J. Z. and Gilchrist, G. S. (2010) 'Recent advances in neuroblastoma', *The New England journal of medicine*. *N Engl J Med*, 362(23), pp. 116–127. doi: 10.1056/NEJMRA0804577.
- Fiore, M., Chalidakov, G. N. and Aloe, L. (2009) 'Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems', *Reviews in the neurosciences*. *Rev Neurosci*, 20(2), pp. 133–145. doi: 10.1515/REVNEURO.2009.20.2.133.
- Forrest, R. A. *et al.* (2012) 'Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier, 83(12), pp. 1602–1612. doi: 10.1016/J.BCP.2012.02.026.
- George, R. E. *et al.* (2008) 'Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma', *Nature*. *Nature*, 455(7215), pp. 975–978. doi: 10.1038/NATURE07397.
- Gharbi, S. I. *et al.* (2007) 'Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002.', *The Biochemical Journal*, 404(1), pp. 15–21. doi: 10.1042/BJ20061489.
- Greco, A., Villa, R. and Pierotti, M. (1996) 'Genomic organization of the human NTRK1 gene.', *Oncogene*.
- Hahn, V. S., Lenihan, D. J. and Ky, B. (2014) 'Cancer therapy-induced cardiotoxicity: basic mechanisms and potential cardioprotective therapies', *Journal of the American Heart Association*. *J Am Heart Assoc*, 3(2). doi: 10.1161/JAHA.113.000665.
- Hallett, A. and Traunecker, H. (2012) 'A review and update on neuroblastoma', *Paediatrics and Child Health*, 22(3), pp. 103–107. doi: 10.1016/j.paed.2011.08.005.
- Hanke, J. H. *et al.* (1996) 'Discovery of a Novel, Potent, and Src Family-selective Tyrosine Kinase Inhibitor', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier BV, 271(2), pp. 695–701. doi: 10.1074/jbc.271.2.695.
- Harada, G. and Drilon, A. (2022) 'TRK inhibitor activity and resistance in TRK fusion-positive cancers in adults', *Cancer Genetics*. Elsevier Inc., 264–265, pp. 33–39. doi: 10.1016/j.cancergen.2022.03.002.

- Heigener, D. F. and Reck, M. (2018) 'Crizotinib', *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer. Recent Results Cancer Res*, 211, pp. 57–65. doi: 10.1007/978-3-319-91442-8_4.
- Hidaka, H. *et al.* (1981) 'N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(7 I), pp. 4354–4357. doi: 10.1073/PNAS.78.7.4354.
- Hiyama, E. *et al.* (1995) 'Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes', *Nature medicine. Nat Med*, 1(3), pp. 249–255. doi: 10.1038/NM0395-249.
- Holden, P. H. *et al.* (1997) 'Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor', *Nature Biotechnology 1997 15:7*. Nature Publishing Group, 15(7), pp. 668–672. doi: 10.1038/nbt0797-668.
- Huang, M. and Weiss, W. A. (2013) 'Neuroblastoma and MYCN', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine. Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(10). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A014415.
- Irwin, M. S. and Park, J. R. (2015) 'Neuroblastoma: Paradigm for precision medicine', *Pediatric Clinics of North America*, 62(1), pp. 225–256. doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.015.
- Jenney, M. E. M. (1994) 'Principles and Practice of Pediatric Oncology', *Archives of Disease in Childhood. Lippincott Williams & Wilkins*, 70(1), pp. 73–73. doi: 10.1136/adc.70.1.73-a.
- Jiang, D. *et al.* (2016) 'Identification of Doxorubicin as an Inhibitor of the IRE1 α -XBP1 Axis of the Unfolded Protein Response', *Scientific reports. Sci Rep*, 6. doi: 10.1038/SREP33353.
- Johnsen, J. I., Dyberg, C. and Wickström, M. (2019) 'Neuroblastoma—A neural crest derived embryonal malignancy', *Frontiers in Molecular Neuroscience. Front Mol Neurosci*. doi: 10.3389/fnmol.2019.00009.
- Johnson-Arbor, K. and Dubey, R. (2022) 'Doxorubicin', *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. StatPearls Publishing*, pp. 1–5. doi: 10.1016/B978-008055232-3.61650-2.
- Kalniņa, Z. *et al.* (2005) 'Alterations of pre-mRNA splicing in cancer', *Genes*,

chromosomes & cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 42(4), pp. 342–357. doi: 10.1002/GCC.20156.

Kang, J. *et al.* (2006) ‘Inhibition of neuroblastoma xenograft growth by Hsp90 inhibitors.’, *Anticancer Research*, 26(3A), pp. 1903–1908. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16827123/?tool=EBI> (Accessed: 24 March 2023).

Karabicici, M. *et al.* (2021) ‘Doxorubicin-induced senescence promotes stemness and tumorigenicity in EpCAM-/CD133- nonstem cell population in hepatocellular carcinoma cell line, HuH-7’, *Molecular oncology*. *Mol Oncol*, 15(8), pp. 2185–2202. doi: 10.1002/1878-0261.12916.

Klein, R. *et al.* (1991) ‘The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor’, *Cell*. *Cell*, 65(1), pp. 189–197. doi: 10.1016/0092-8674(91)90419-Y.

Knudson, A. G. and Strong, L. C. (1972) ‘Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma.’, *American Journal of Human Genetics*. Elsevier, 24(5), p. 514. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1762170/> (Accessed: 23 March 2023).

Kon, N. *et al.* (2017) ‘DS16570511 is a small-molecule inhibitor of the mitochondrial calcium uniporter’, *Cell death discovery*. *Cell Death Discov*, 3(1). doi: 10.1038/CDDISCOVERY.2017.45.

Larsson, D. E. *et al.* (2009) ‘Combination analyses of anti-cancer drugs on human neuroendocrine tumor cell lines’, *Cancer chemotherapy and pharmacology*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 65(1), pp. 5–12. doi: 10.1007/S00280-009-0997-6.

Lebedev, T. D. *et al.* (2020) ‘[Inhibition of Non-Receptor Tyrosine Kinase JAK2 Reduces Neuroblastoma Cell Growth and Enhances the Action of Doxorubicin]’, *Molekuliarnaia biologiiia*. *Mol Biol (Mosk)*, 54(2), pp. 293–299. doi: 10.31857/S0026898420020111.

Lee, Y. S. *et al.* (2018) ‘TP53-dependence on the effect of doxorubicin and Src inhibitor combination therapy’, *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. *Tumour Biol*, 40(8). doi: 10.1177/1010428318794217.

Liu, Z. *et al.* (2021) ‘Discovery of the Next-Generation Pan-TRK Kinase Inhibitors for the

- Treatment of Cancer', *Journal of medicinal chemistry*. J Med Chem, 64(14), pp. 10286–10296. doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.1C00712.
- Llovera, M. *et al.* (2004) 'Trk is a calmodulin-binding protein: implications for receptor processing', *Journal of neurochemistry*. J Neurochem, 88(2), pp. 422–433. doi: 10.1046/J.1471-4159.2003.02178.X.
- Lundberg, K. I., Treis, D. and Johnsen, J. I. (2022) 'Neuroblastoma Heterogeneity, Plasticity, and Emerging Therapies', *Current oncology reports*. Curr Oncol Rep, 24(8), pp. 1053–1062. doi: 10.1007/S11912-022-01270-8.
- Matthay, K. K. *et al.* (2016) 'Neuroblastoma', *Nature Reviews Disease Primers*. Nat Rev Dis Primers, 2. doi: 10.1038/nrdp.2016.78.
- Mazot, P. *et al.* (2012) 'Internalization and down-regulation of the ALK receptor in neuroblastoma cell lines upon monoclonal antibodies treatment', *PloS one*. PLoS One, 7(3). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0033581.
- Michiels, C., Tellier, C. and Feron, O. (2016) 'Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment', *Biochimica et biophysica acta*. Biochim Biophys Acta, 1866(1), pp. 76–86. doi: 10.1016/J.BBCAN.2016.06.004.
- Minami, Y. *et al.* (1993) 'The calmodulin-binding domain of the mouse 90-kDa heat shock protein', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 268(13), pp. 9604–9610. doi: 10.1016/s0021-9258(18)98393-6.
- Mirzaei, S. *et al.* (2021) 'The involvement of epithelial-to-mesenchymal transition in doxorubicin resistance: Possible molecular targets', *European journal of pharmacology*. Eur J Pharmacol, 908. doi: 10.1016/J.EJPHAR.2021.174344.
- Modrek, B. and Lee, C. (2002) 'A genomic view of alternative splicing', *Nature Genetics* 2002 30:1. Nature Publishing Group, 30(1), pp. 13–19. doi: 10.1038/ng0102-13.
- Monclair, T. *et al.* (2009) 'The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. J Clin Oncol, 27(2), pp. 298–303. doi: 10.1200/JCO.2008.16.6876.
- Monshipouri, M., Jiang, H. and Lazarovici, P. (2000) 'NGF stimulation of erk phosphorylation is impaired by a point mutation in the transmembrane domain of trkA

receptor', *Journal of Molecular Neuroscience*. Humana Press, 14(1–2), pp. 69–76. doi: 10.1385/JMN:14:1-2:069.

Mullassery, D. and Losty, P. D. (2016) 'Neuroblastoma', *Paediatrics and Child Health (United Kingdom)*. Churchill Livingstone, 26(2), pp. 68–72. doi: 10.1016/j.paed.2015.11.005.

Nakazawa, A. (2021) 'Biological categories of neuroblastoma based on the international neuroblastoma pathology classification for treatment stratification', *Pathology international*. *Pathol Int*, 71(4), pp. 232–244. doi: 10.1111/PIN.13085.

National Cancer Institute (2023) *PDQ® Pediatric Treatment Editorial Board. PDQ Neuroblastoma Treatment*. Available at: <https://www.cancer.gov/types/neuroblastoma/patient/neuroblastoma-treatment-pdq> (Accessed: 23 March 2023).

Otte, J. *et al.* (2021) 'MYCN Function in Neuroblastoma Development', *Frontiers in oncology*. *Front Oncol*, 10. doi: 10.3389/FONC.2020.624079.

Oulès, B. *et al.* (2012) 'Ryanodine receptor blockade reduces amyloid- β load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. *J Neurosci*, 32(34), pp. 11820–11834. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0875-12.2012.

Pacenta, H. L. and Macy, M. E. (2018) 'Entrectinib and other ALK/TRK inhibitors for the treatment of neuroblastoma', *Drug design, development and therapy*. *Drug Des Devel Ther*, 12, pp. 3549–3561. doi: 10.2147/DDDT.S147384.

Patapoutian, A. and Reichardt, L. F. (2001) 'Trk receptors: mediators of neurotrophin action', *Current opinion in neurobiology*. *Curr Opin Neurobiol*, 11(3), pp. 272–280. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00208-7.

PDQ Pediatric Treatment Editorial Board (2002) *Childhood Esthesioneuroblastoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version, PDQ Cancer Information Summaries*. Available at: <https://www.cancer.gov/types/neuroblastoma/hp/neuroblastoma-treatment-pdq/HealthProfessional> (Accessed: 23 March 2023).

Peirce, S. K. *et al.* (2011) 'The PI-3 kinase-Akt-MDM2-survivin signaling axis in high-risk neuroblastoma: a target for PI-3 kinase inhibitor intervention', *Cancer chemotherapy*

and pharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol*, 68(2), pp. 325–335. doi: 10.1007/S00280-010-1486-7.

Peng, X. *et al.* (1995) ‘Deletion of a conserved juxtamembrane sequence in Trk abolishes NGF-promoted neuritogenesis’, *Neuron*, 15(2), pp. 395–406. doi: 10.1016/0896-6273(95)90043-8.

Petljak, M. *et al.* (2022) ‘Mechanisms of APOBEC3 mutagenesis in human cancer cells’, *Nature*. *Nature*, 607(7920), pp. 799–807. doi: 10.1038/S41586-022-04972-Y.

Peuchmaur, M. *et al.* (2003) ‘Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: Confirmation of Favorable and Unfavorable Prognostic Subsets in Ganglioneuroblastoma, Nodular’, *Cancer*, 98(10), pp. 2274–2281. doi: 10.1002/cncr.11773.

Pommier, Y. and Cherfils, J. (2005) ‘Interfacial inhibition of macromolecular interactions: Nature’s paradigm for drug discovery’, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 26(3), pp. 138–145. doi: 10.1016/j.tips.2005.01.008.

Ponzoni, M. *et al.* (2022a) ‘Recent advances in the developmental origin of neuroblastoma: an overview’, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. doi: 10.1186/s13046-022-02281-w.

Ponzoni, M. *et al.* (2022b) ‘Recent advances in the developmental origin of neuroblastoma: an overview’, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. *J Exp Clin Cancer Res*. doi: 10.1186/s13046-022-02281-w.

Del Prete, D., Checler, F. and Chami, M. (2014) ‘Ryanodine receptors: Physiological function and deregulation in Alzheimer disease’, *Molecular Neurodegeneration*. BioMed Central Ltd., 9(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/1750-1326-9-21/TABLES/2.

Raabe, E. H. *et al.* (2008) ‘Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma’, *Oncogene*. *Oncogene*, 27(4), pp. 469–476. doi: 10.1038/SJ.ONC.1210659.

Rebbaa, A., Chou, P. M. and Mirkin, B. L. (2001) ‘Factors Secreted by Human Neuroblastoma Mediate Doxorubicin Resistance by Activating STAT3 and Inhibiting Apoptosis’, *Molecular Medicine*. University of Michigan, 7(6), pp. 393–400. doi: 10.1007/BF03402185/FIGURES/6.

- Rivankar, S. (2014) 'An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy', *Journal of cancer research and therapeutics*. *J Cancer Res Ther*, 10(4), pp. 853–858. doi: 10.4103/0973-1482.139267.
- Rolfo, C. *et al.* (2015) 'Entrectinib: a potent new TRK, ROS1, and ALK inhibitor', *Expert opinion on investigational drugs*. *Expert Opin Investig Drugs*, 24(11), pp. 1493–1500. doi: 10.1517/13543784.2015.1096344.
- Ross, R. A., Spengler, B. A. and Biedler, J. L. (1983) 'Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. Oxford Academic, 71(4), pp. 741–747. doi: 10.1093/JNCI/71.4.741.
- Ruggeri, P. *et al.* (2014) 'The TrkAIII oncoprotein inhibits mitochondrial free radical ROS-induced death of SH-SY5Y neuroblastoma cells by augmenting SOD2 expression and activity at the mitochondria, within the context of a tumour stem cell-like phenotype', *PLoS one*. *PLoS One*, 9(4). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0094568.
- Russo, A. *et al.* (2021) 'The tumor-agnostic treatment for patients with solid tumors: a position paper on behalf of the AIOM- SIAPEC/IAP-SIBioC-SIF Italian Scientific Societies.', *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* Elsevier Ireland Ltd, 165, p. 103436. doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2021.103436.
- Saeki, K. *et al.* (2002) 'Doxorubicin directly binds to the cardiac-type ryanodine receptor', *Life Sciences*. Pergamon, 70(20), pp. 2377–2389. doi: 10.1016/S0024-3205(02)01524-2.
- Sbaffone, M. *et al.* (2022) 'Nutraceutical Preventative and Therapeutic Potential in Neuroblastoma: From Pregnancy to Early Childhood', *Life* 2022, Vol. 12, Page 1762. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 12(11), p. 1762. doi: 10.3390/LIFE12111762.
- Scaruffi, P. *et al.* (1999) 'Detection of DNA polymorphisms and point mutations of high-affinity nerve growth factor receptor (TrkA) in human neuroblastoma', *International journal of oncology*. *Int J Oncol*, 14(5), pp. 935–938. doi: 10.3892/IJO.14.5.935.
- Schecterson, L. C. *et al.* (2010) 'Trk activation in the secretory pathway promotes Golgi fragmentation', *Molecular and Cellular Neuroscience*. Academic Press, 43(4), pp. 403–413. doi: 10.1016/J.MCN.2010.01.007.

- Schell M, B. C. (2003) 'Neuroblastoma', *Orphanet Encyclopedia*.
- Scott, L. J. (2019) 'Larotrectinib: First Global Approval', *Drugs*. *Drugs*, 79(2), pp. 201–206. doi: 10.1007/S40265-018-1044-X.
- Shabbir, M. and Stuart, R. (2010) 'Lestaurtinib, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor: from bench to bedside', *Expert opinion on investigational drugs*. *Expert Opin Investig Drugs*, 19(3), pp. 427–436. doi: 10.1517/13543781003598862.
- Spletstoeser, F., Florea, A. M. and Büsselberg, D. (2007) 'IP(3) receptor antagonist, 2-APB, attenuates cisplatin induced Ca²⁺-influx in HeLa-S3 cells and prevents activation of calpain and induction of apoptosis', *British journal of pharmacology*. *Br J Pharmacol*, 151(8), pp. 1176–1186. doi: 10.1038/SJ.BJP.0707335.
- Sritharan, S. and Sivalingam, N. (2021) 'A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin', *Life sciences*. *Life Sci*, 278. doi: 10.1016/J.LFS.2021.119527.
- Stafman, L. L. and Beierle, E. A. (2016) 'Cell Proliferation in Neuroblastoma', *Cancers*. *Cancers (Basel)*, 8(1). doi: 10.3390/CANCERS8010013.
- Stolarz, A. J. *et al.* (2019) 'Doxorubicin activates ryanodine receptors in rat lymphatic muscle cells to attenuate rhythmic contractions and lymph flow', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapy*, 371(2), pp. 278–289. doi: 10.1124/JPET.119.257592/-/DC1.
- Sunada, S. *et al.* (2021) 'CDK1 inhibitor controls G2/M phase transition and reverses DNA damage sensitivity', *Biochemical and biophysical research communications*. *Biochem Biophys Res Commun*, 550, pp. 56–61. doi: 10.1016/J.BBRC.2021.02.117.
- Szul, T. *et al.* (2007) 'Dissecting the role of the ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 in Golgi biogenesis and protein trafficking', *Journal of Cell Science*. *Company of Biologists Ltd*, 120(22), pp. 3929–3940. doi: 10.1242/JCS.010769.
- Tacconelli, A. *et al.* (2004) 'TrkA alternative splicing: A regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma', *Cancer Cell*. *Cell Press*, 6(4), pp. 347–360. doi: 10.1016/J.CCR.2004.09.011.
- Thorn, C. F. *et al.* (2011) 'Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects', *Pharmacogenetics and genomics*. *Pharmacogenet Genomics*, 21(7), pp. 440–446. doi:

10.1097/FPC.0B013E32833FFB56.

Tognon, C. *et al.* (2001) 'The chimeric protein tyrosine kinase ETV6-NTRK3 requires both Ras-Erk1/2 and PI3-kinase-Akt signaling for fibroblast transformation', *Cancer Research*, 61(24), pp. 8909–8916. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/61/24/8909> (Accessed: 23 March 2023).

Tolbert, V. P. *et al.* (2017) 'Genetic susceptibility to neuroblastoma', *Current opinion in genetics & development*. *Curr Opin Genet Dev*, 42, pp. 81–90. doi: 10.1016/J.GDE.2017.03.008.

Tolbert, V. P. and Matthay, K. K. (2018) 'Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment', *Cell and tissue research*. *Cell Tissue Res*, 372(2), pp. 195–209. doi: 10.1007/S00441-018-2821-2.

Tonini, G. P. and Capasso, M. (2020) 'Genetic predisposition and chromosome instability in neuroblastoma', *Cancer and Metastasis Reviews*. *Cancer Metastasis Rev*, pp. 275–285. doi: 10.1007/s10555-020-09843-4.

Treis, D. *et al.* (2022) 'Sustained Response to Entrectinib in an Infant With a Germline ALKAL2 Variant and Refractory Metastatic Neuroblastoma With Chromosomal 2p Gain and Anaplastic Lymphoma Kinase and Tropomyosin Receptor Kinase Activation', *JCO Precision Oncology*. American Society of Clinical Oncology, 6(6). doi: 10.1200/PO.21.00271.

Tuffery, L., Halasz, M. and Fey, D. (2020) 'Model-based identification of the crosstalks and feedbacks that determine the doxorubicin response dynamics of the JNK-p38-p53 network', *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 2020.03.10.985994. doi: 10.1101/2020.03.10.985994.

Uren, R. T. and Turnley, A. M. (2014) 'Regulation of neurotrophin receptor (Trk) signaling: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) is a new player', *Frontiers in molecular neuroscience*. *Front Mol Neurosci*, 7(MAY). doi: 10.3389/FNMOL.2014.00039.

Vaishnavi, A. *et al.* (2013) 'Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer', *Nature medicine*. *Nat Med*, 19(11), pp. 1469–1472. doi: 10.1038/NM.3352.

Vaishnavi, A., Le, A. T. and Doebele, R. C. (2015) 'TRKing down an old oncogene in a

new era of targeted therapy', *Cancer Discovery*. *Cancer Discov*, pp. 25–34. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0765.

Vantaku, V. *et al.* (2019) 'Correction: Expression of ganglioside GD2, reprogram the lipid metabolism and EMT phenotype in bladder cancer', *Oncotarget*. *Oncotarget*, 10(63), pp. 6843–6844. doi: 10.18632/ONCOTARGET.27311.

Vassilev, L. T. *et al.* (2006) 'Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 103(28), p. 10660. doi: 10.1073/PNAS.0600447103.

Vega, J. A. *et al.* (2003) 'Neurotrophins and the immune system', *Journal of anatomy*. *J Anat*, 203(1), pp. 1–19. doi: 10.1046/J.1469-7580.2003.00203.X.

Vigil, D. *et al.* (2010) 'Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?', *Nature reviews. Cancer*. *Nat Rev Cancer*, 10(12), pp. 842–857. doi: 10.1038/NRC2960.

Wang, Q. L., Lin, M. and Liu, G. T. (2001) 'Antioxidative Activity of Natural Isorhapontigenin', *Japanese Journal of Pharmacology*. Elsevier, 87(1), pp. 61–66. doi: 10.1254/JJP.87.61.

Weier, H. U. G. *et al.* (1995) 'Rapid physical mapping of the human trk protooncogene (NTRK1) to human chromosome 1q21–q22 by P1 clone selection, fluorescence in situ hybridization (FISH), and computer-assisted microscopy', *Genomics*. Academic Press, 26(2), pp. 390–393. doi: 10.1016/0888-7543(95)80226-C.

Whittle, S. B. *et al.* (2017) 'Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma', *Expert review of anticancer therapy*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 17(4), pp. 369–386. doi: 10.1080/14737140.2017.1285230.

Windisch, J. M., Marksteiner, R. and Schneider, R. (1995) 'Nerve growth factor binding site on TrkA mapped to a single 24-amino acid leucine-rich motif', *The Journal of biological chemistry*. *J Biol Chem*, 270(47), pp. 28133–28138. doi: 10.1074/JBC.270.47.28133.

Wright, J. H. (1910) 'NEUROCYTOMA OR NEUROBLASTOMA, A KIND OF TUMOR NOT GENERALLY RECOGNIZED', *The Journal of experimental medicine*. *J*

Exp Med, 12(4), pp. 556–561. doi: 10.1084/JEM.12.4.556.

Wulf, A. M. *et al.* (2021) ‘Defining Pathological Activities of ALK in Neuroblastoma, a Neural Crest-Derived Cancer’, *International journal of molecular sciences*. Int J Mol Sci, 22(21). doi: 10.3390/IJMS222111718.

Yamamoto, K. *et al.* (2002) ‘Marginal decrease in mortality and marked increase in incidence as a result of neuroblastoma screening at 6 months of age: Cohort study in seven prefectures in Japan’, *Journal of Clinical Oncology*, 20(5), pp. 1209–1214. doi: 10.1200/JCO.20.5.1209.

Yamamoto, W. R. *et al.* (2019) ‘Endoplasmic reticulum stress alters ryanodine receptor function in the murine pancreatic β cell’, *The Journal of biological chemistry*. J Biol Chem, 294(1), pp. 168–181. doi: 10.1074/JBC.RA118.005683.

Yu, Y. P. *et al.* (2019) ‘Identification of recurrent fusion genes across multiple cancer types’, *Scientific Reports 2019 9:1*. Nature Publishing Group, 9(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-019-38550-6.

Yu, Z. H. and Zhang, Z. Y. (2018) ‘Regulatory Mechanisms and Novel Therapeutic Targeting Strategies for Protein Tyrosine Phosphatases’, *Chemical reviews*. Chem Rev, 118(3), pp. 1069–1091. doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.7B00105.

Zhao, F. *et al.* (2001) ‘Dantrolene Inhibition of Ryanodine Receptor Ca^{2+} Release Channels’, *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier BV, 276(17), pp. 13810–13816. doi: 10.1074/jbc.m006104200.

Zhao, H. *et al.* (2019) ‘AMPK-mediated activation of MCU stimulates mitochondrial Ca^{2+} entry to promote mitotic progression’, *Nature cell biology*. Nat Cell Biol, 21(4), pp. 476–486. doi: 10.1038/S41556-019-0296-3.