UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

"AMEDEO AVOGADRO"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

Dinamiche del $Ca2^+$ intracellulare nelle cellule di Adenocarcinoma Polmonare con silenziamento di DHTKD1

Relatore
Prof. Dmitry Lim

Candidato
Ionela Petronela Halevici

Firmato digitalmente da Dmitry Lim
Data: 28.03.2025 15:24:41 CET
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE/01943490027

Correlatore
Prof. Alessio Menga

Anno Accademico 2023-24

Sessione straordinaria

INFORMAZIONI GENERALI

Tipo di attività svolta in laboratorio:

Ricerca di base universitaria presso il laboratorio di Fisiologia Cellulare, Dipartimento di Scienze del Farmaco (DSF)

Tutore universitario:

Dmitry Lim

Nome dello studente:

Ionela Petronela Halevici

Indice

INTRODUZIONE ***1***

1.1. ADENOCARCINOMA POLMONARE: caratteristiche e impatto clinico **2**

1.1.1. Epidemiologia e rilevanza clinica dell'adenocarcinoma polmonare 2
1.1.2. Alterazioni molecolari associate alla progressione tumorale 3
1.1.3. Ruolo dei mitocondri e del metabolismo energetico nel cancro polmonare 4

1.2. DHTKD1: struttura, funzione e implicazioni patologiche **5**

1.2.1. Struttura e funzione dell'enzima DHTKD1 5
1.2.2. Ruolo di DHTKD1 nel metabolismo degli amminoacidi e nella produzione di energia 6

1.3. IL CALCIO INTRACELLULARE: regolazione e funzioni **7**

1.3.1. Omeostasi del calcio e sua regolazione nelle cellule 7
1.3.2. Toolkit di segnalazione del Ca^{2+} 8
1.3.3. Il meccanismo di Store-Operated Calcium Entry 10

1.4. MODELLO MURINO di LUAD **11**

SCOPO DEL LAVORO ***13***

RISULTATI E DISCUSSIONE ***15***

3.1. DATI PRELIMINARI 16

3.2. Valutazione dei segnali di Ca^{2+} citosolico nelle cellule DH3 in risposta all'ATP 18

3.3. Valutazione dei segnali di Ca^{2+} mitocondriale nelle cellule DH3 in risposta all'ATP 19

3.4. Valutazione dei segnali di Ca^{2+} generati dal meccanismo SOCE nelle cellule DH3 21

MATERIALI E METODI ***25***

4.1. Colture Cellulari 26

4.2. Imaging del Calcio 26

4.3. Analisi Statistica 29

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI ***30***

BIBLIOGRAFIA ***33***

ABBREVIAZIONI

- **Acetil-CoA**: Acetil-Coenzima A
- **ADP**: Adenosine diphosphate
- **ALK:** Anaplastic Lymphoma Kinase
- **ATP**: Adenosine TriPhosphate
- **BCAA:** Branched-chain amino acid
- **Ca^{2+}**: calcium ion
- **$CaCl_2$:** calcium chloride
- **cDNA:** complementary DNA
- **CRAC**: Calcium Release-Activated Channel
- **DAG:** Diacylglycerol
- **DHTKD1**: dehydrogenase E1 transketolase domain containing 1
- **DLD:** Dihydrolipoamide dehydrogenase
- **DLST:** Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase
- **EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor
- **EGTA:** ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
- **Glutaril-CoA**: Glutaril-Coenzima A
- **GPCR:** G protein-coupled receptor
- **IP_3**: Inositol 1,4,5-Trisphosphate
- **IP_3R**: Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor
- **KRAS**: Kristen Rat Sarcoma
- **KRB:** Krebs-Ringer Bicarbonate
- **LUAD**: Lung Adenocarcinoma
- **MCU:** Mitochondrial Calcium Uniporter

- **mPTP**: mitochondrial permeability transition pore
- **NCX**: Na^+/Ca^{2+} exchanger
- **NFAT:** nuclear factor of activated T cells
- **NSCLC**: Non-Small Cell Lung Cancer
- **OAA:** Oxaloacetic Acid
- **OADHc**: 2-oxoadipate dehydrogenase complex
- **PIP_2:** phosphatidylinnositol 4,5-bisphosphate
- **PLC:** Phospholipase C
- **PMCA**: Plasma Membrane Ca^{2+}-ATPase
- **RE**: Reticolo endoplasmatico
- **ROS:** Reactive oxyge4n species
- **ROS1:** ROS proto-oncogene 1
- **RYR**: Ryanodine Receptor
- **SCLS:** Small Cell Lung Cancer
- **SERCA**: Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase
- **ShRNA**: Short Hairpin RNA
- **siRNA**: Small Interfering RNA
- **SOCE**: Store-Operated Calcium Entry
- **STIM**: Stromal Interaction Molecule
- **tBHQ:** tert-butylhydroquinone
- **TCGA**: The Cancer Genome Atlas
- **TKR:** Tyrosine Kinase Receptor
- **TP53**: Tumor Protein p53
- **VDAC:** Voltage-dependent anion channel

- **VOC:** Voltage-Operated Calcium Channel

INTRODUZIONE

1.1. ADENOCARCINOMA POLMONARE: caratteristiche e impatto clinico

1.1.1. Epidemiologia e rilevanza clinica dell'adenocarcinoma polmonare

Il tumore polmonare è la neoplasia con la più alta incidenza e mortalità a livello globale, rappresentando una delle principali sfide in campo oncologico. Tradizionalmente, i tumori polmonari vengono classificati in due grandi gruppi: il carcinoma polmonare a piccole cellule (small cell lung cancer, SCLC) e il carcinoma polmonare non a piccole cellule (non-small cell lung cancer, NSCLC) (Thandra et al. 2021). Tra questi ultimi, l'adenocarcinoma polmonare (lung adenocarcinoma, LUAD) è la forma più comune (Couraud et al. 2012), rappresentando circa il 40% di tutti i casi di tumore polmonare (Zappa e Mousa 2016). Il LUAD deriva dalle epiteliali alveolari di tipo II delle piccole vie aeree, responsabili della produzione di muco, e si distingue per la sua localizzazione periferica e per una crescita relativamente lenta (Zappa e Mousa 2016). A livello epidemiologico, il tumore polmonare è la principale causa di morte per cancro, responsabile di circa il 27% di tutti i decessi oncologici (Liu et al. 2021). Secondo la statistica dell'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC), nel 2020 si sono registrati circa 2,2 milioni di nuovi casi e 1,8 milioni di morti correlate (Zheng, Min, e Zhou 2021), dati che sottolineano l'impatto devastante di questa patologia sulla salute pubblica.

La prognosi dei pazienti affetti da tumore polmonare varia significativamente in base allo stadio della malattia al momento della diagnosi. Nei pazienti con tumore diagnosticato in fase iniziale (stadio locale), il tasso di sopravvivenza raggiunge il 64%; tuttavia, questa percentuale si riduce drasticamente al 36% nei casi di malattia regionale e al 9% quando il tumore è già disseminato (stadio distale) (Anon 2025). Questi dati evidenziano le difficoltà nel trattamento dei tumori polmonari avanzati, nonostante i progressi terapeutici degli ultimi anni.

I principali fattori di rischio per l'adenocarcinoma polmonare comprendono il fumo di tabacco, responsabile di circa l'80% dei casi nei Paesi occidentali, e l'esposizione a inquinanti ambientali, come ad esempio l'amianto e il radon (Molina et al. 2008; Thandra et al. 2021). Inoltre, un ruolo cruciale è svolto dalle mutazioni genetiche, che possono influenzare significativamente la prognosi e la risposta ai trattamenti mirati. Tra le mutazioni più rilevanti vi sono quelle a carico dei geni KRAS, EGFR, ALK, ROS1 e TP53, ognuna delle quali è associata a differenti caratteristiche biologiche e cliniche del tumore (Anusewicz, Orzechowska, e Bednarek 2020).

1.1.2. Alterazioni molecolari associate alla progressione tumorale

Come precedentemente affermato, il LUAD è caratterizzato da un'elevata eterogeneità molecolare, con alterazioni genetiche che influenzano significativamente la progressione tumorale, la resistenza ai trattamenti e la prognosi dei pazienti. Tra le mutazioni più rilevanti si trovano quelle a carico dei geni KRAS (oncogene) e TP53 (gene oncosoppressore), che svolgono un ruolo cruciale nella tumorigenesi e nell'evoluzione del NSCLC (Zhao et al. 2024). Le mutazioni del gene KRAS sono presenti in circa il 10-25% dei tumori nei pazienti affetti da adenocarcinoma (Molina et al. 2008) e nel 35% circa dei casi di NSCLC, soprattutto nei pazienti fumatori (Deben et al. 2017). Queste mutazioni riguardano principalmente il codone 12 (ad esempio G12D), sebbene possano verificarsi anche nei codoni 13 e 61. Tali mutazioni determinano una forma costitutivamente attiva della proteina KRAS, che rimane legata al GTP indipendentemente dalla stimolazione recettoriale, portando a un'attivazione persistente delle vie di segnalazione MAPK/ERK e PI3K/AKT. L'attivazione costitutiva continua a promuovere la proliferazione cellulare incontrollata e conferisce resistenza ad alcuni trattamenti mirati, come gli inibitori di EGFR (Deben et al. 2017; Molina et al. 2008).

Il gene TP53 è il più frequentemente alterato nel cancro umano (Deben et al. 2017) e rappresenta la mutazione genetica più comune in tutti i tipi di tumore polmonare (Shang et al. 2022). In particolare, le mutazioni di TP53 sono altamente prevalenti nei diversi sottotipi di NSCLC, con tassi di mutazione riportati intorno al 39%-46% negli adenocarcinomi (Shepherd et al. 2017).

La proteina p53, codificata dal gene TP53, svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta cellulare a una vasta gamma di segnali di stress. Agisce come fattore di trascrizione, promuovendo l'espressione di numerosi geni a valle, tra cui p21 e la proteina X associata a BCL2 (BAX), e inducendo processi come la senescenza, l'arresto del ciclo cellulare e/o l'apoptosi. Grazie a queste funzioni essenziali, p53 è considerata una proteina oncosoppressore di fondamentale importanza (Deben et al. 2017; Gu et al. 2016).

1.1.3. Ruolo dei mitocondri e del metabolismo energetico nel cancro polmonare

Le cellule tumorali riprogrammano il loro metabolismo per sostenere l'elevata proliferazione cellulare, richiedendo quindi una maggiore produzione di energia (Dang e Semenza 1999). In tale contesto, una delle caratteristiche distintive è l'effetto Warburg, ovvero l'aumento della glicolisi aerobica, in cui le cellule tumorali privilegiano la conversione del glucosio in lattato nonostante la presenza di ossigeno, favorendo una rapida produzione di ATP e metaboliti utili alla biosintesi cellulare. Altra caratteristica distintiva è l'aumento dell'attività della piruvato carbossilasi, enzima fondamentale per la conversione del piruvato in ossalacetato (OAA), fondamentale per alimentare il ciclo di Krebs. L'inibizione di questa via riduce la crescita del NSCLC (Sellers et al. 2015).

Nel cancro polmonare, a differenza dell'adenocarcinoma pancreatico, la glutammina non gioca un ruolo rilevante nel metabolismo tumorale. Al contrario, gli amminoacidi a catena ramificata (BCAA), come leucina e valina, risultano fondamentali per la crescita tumorale, poiché vengono utilizzati per la biosintesi proteica e come fonte di azoto. L'eliminazione dei geni Bcat1 e Bcat2, coinvolti nella loro transaminazione, compromette la capacità delle cellule tumorali di proliferare, dimostrando l'importanza dei BCAA nello sviluppo dell'adenocarcinoma polmonare (Kerr e Martins 2018).

Oltre al metabolismo glucidico e amminoacidico, le cellule NSCLC sfruttano ampiamente la lipogenesi de novo, essenziale per la sintesi di membrane e la trasduzione di segnali pro-tumorali mediati da lipidi. L'enzima responsabile è l'acetil-CoA carbossilasi (ACC), che svolge un ruolo cruciale convertendo l'acetil-CoA in malonil-CoA, precursore chiave degli acidi grassi. L'inibizione farmacologica di ACC mediante composti come ND-646 ha soppresso la crescita tumorale in modelli preclinici, evidenziando l'importanza della biosintesi lipidica per la sopravvivenza delle cellule tumorali (Svensson et al. 2016).

1.2. DHTKD1: struttura, funzione e implicazioni patologiche

1.2.1. Struttura e funzione dell'enzima DHTKD1

La disfunzione mitocondriale è correlata a numerosi disturbi, in quanto i mitocondri, comunemente considerati come la fonte principale di produzione di energia della cellula, svolgono un ruolo cruciale anche in altre vie di segnalazione cellulare, come il bilanciamento degli ioni calcio e la regolazione dell'apoptosi. Proprio per questo, qualsiasi alterazione nelle proteine mitocondriali (circa 1500), ha conseguenze su molti aspetti del metabolismo e sulla sopravvivenza cellulare (Xu et al. 2013).

Una di queste proteine è la 2-oxoadipate dehydrogenase E1a (conosciuta anche come DHTKD1), codificata dal gene DHTKD1 (dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1). Costituisce la subunità E1 del complesso 2-oxoadipate dehydrogenase (OADHc), che include anche le subunità E2 (DLST) e E3 (DLD). Il complesso OADHc appartiene alla famiglia delle 2-ossoacido deidrogenasi, un gruppo di complessi multienzimatici mitocondriali essenziali per il metabolismo energetico e il catabolismo degli amminoacidi (Yeaman 1989). Il core del complesso è costituito dalla subunità E2, che funge da piattaforma centrale su cui si assemblano DHTKD1 e DLD, garantendo una stretta integrazione delle reazioni catalitiche e il rapido trasferimento dei prodotti intermedi tra le subunità (Bezerra et al. 2020).

Numerosi studi suggeriscono che DHTKD1 possa svolgere un ruolo significativo nella regolazione del metabolismo energetico, nella biogenesi mitocondriale e nell'attivazione precoce dei processi apoptotici. Inoltre, emergono evidenze di un potenziale legame tra la disfunzione di DHTKD1 e l'insorgenza di patologie metaboliche, disturbi neurologici e persino neoplasie (Hagen et al. 2015; Wang, Calcutt, e Ferguson 2021; Xu et al. 2012, 2013).

1.2.2. Ruolo di DHTKD1 nel metabolismo degli amminoacidi e nella produzione di energia

Il complesso OADHc contribuisce al catabolismo di amminoacidi come L-lisina, L-idrossilisina e L-triptofano, che convergono nella produzione di 2-ossoadipato come intermedio comune. In particolare, DHTKD1 riveste un ruolo centrale nella decarbossilazione del 2-ossoadipato in glutaril-CoA, che viene successivamente convertito in acetil-CoAA, fondamentale per l'ingresso nel ciclo di Krebs e per la produzione di energia (Nemeria et al. 2021).

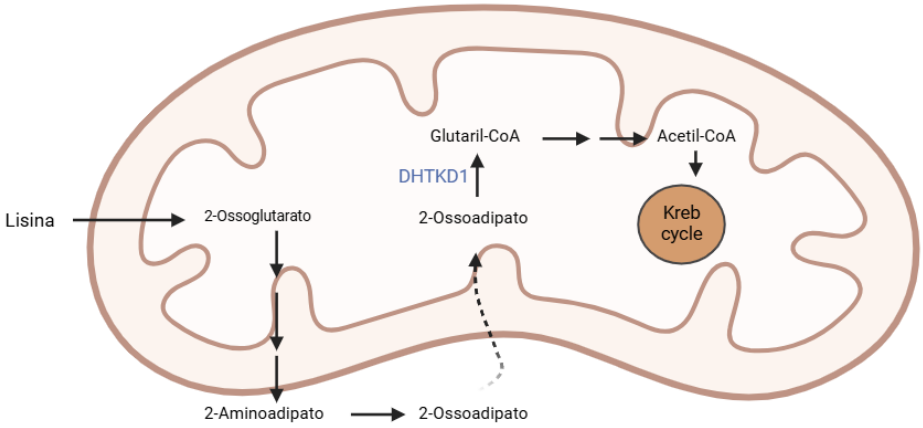

***Figura 1**. Schema del metabolismo della lisina all'interno del mitocondrio, con il coinvolgimento dell'enzima DHTKD1*

La conversione del 2-ossadipato in glutaril-CoA non solo rappresenta un passaggio chiave nella produzione di energia, ma contribuisce anche alla gestione dell'equilibrio redox mitocondriale tramite la riduzione di NAD^+ a NADH (Goncalves, Bunik, e Brand 2016).

Ulteriori studi hanno dimostrato che le cellule con DHTKD1 silenziato mostrano una diminuzione della respirazione mitocondriale e a un aumento di apoptosi, correlato alla ridotta produzione di ATP e all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Queste alterazioni sono accompagnate da significativi cambiamenti nella morfologia mitocondriale, come la riduzione del numero e della lunghezza delle creste, oltre a un aumento del numero di mitocondri morfologicamente anomali (Goncalves et al. 2016; Wang et al. 2021; Xu et al. 2013).

1.3. IL CALCIO INTRACELLULARE: regolazione e funzioni

1.3.1. Omeostasi del calcio e sua regolazione nelle cellule

Il calcio intracellulare (Ca^{2+}) rappresenta un secondo messaggero di cruciale importanza, coinvolto in numerose funzioni biologiche sia nelle cellule eccitabili che in quelle non eccitabili. Tra le principali attività vi sono la neurotrasmissione, la contrazione muscolare, il controllo della proliferazione cellulare e l'induzione della morte cellulare. Affinché questi processi possano svolgersi correttamente, è fondamentale mantenere un controllo rigoroso sulla concentrazione di Ca^{2+} nei vari compartimenti e organelli cellulari. Tale regolazione precisa permette di evitare condizioni di deplezione o sovraccarico di Ca^{2+}, che potrebbero alterare l'equilibrio fisiologico della cellula e portare a conseguenze patologiche (Moccia et al. 2023a).

In condizioni di riposo, le cellule non stimolate mantengono una concentrazione citosolica di Ca^{2+} generalmente compresa tra 50 e 100 nM, nota come concentrazione "basale" o "di riposo". Tuttavia, in risposta a stimoli di diversa natura, sia intrinseci che estrinseci, come l'interazione con ormoni, fattori di crescita o neurotrasmettitori, la concentrazione di Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]$) nel citosol può aumentare rapidamente e in modo transitorio. È essenziale, però, che tali incrementi siano seguiti da un rapido ritorno ai livelli basali, per prevenire effetti potenzialmente dannosi per la cellula e garantire il mantenimento dell'omeostasi cellulare (Bootman e Bultynck 2020).

Gli organelli cellulari rappresentano importanti riserve intracellulari di Ca^{2+}, con concentrazioni variabili a seconda della loro funzione. Il reticolo endoplasmatico (RE) e il reticolo sarcoplasmatico (RS) nelle cellule muscolari, insieme all'apparato di Golgi, presentano concentrazioni di comprese tra 200 e 2000 µM (Alonso et al. 2017). Nei lisosomi, invece, la concentrazione di Ca^{2+} libero si aggira intorno ai 500 µM (Tedeschi, Petrozziello, e Secondo 2019), mentre i perossisomi, che possono sequestrare temporaneamente il calcio in caso di aumento citosolico, mostrano a riposo una concentrazione libera compresa tra 0,1 e 2 µM (Lasorsa et al. 2008). Diversamente da altri organelli, la matrice mitocondriale in condizioni di riposo mantiene una concentrazione di Ca^{2+} simile a quella citosolica. Tuttavia, i mitocondri possiedono la capacità di accumulare elevate quantità di Ca^{2+}, arrivando a livelli micromolari (Bootman e Bultynck 2020). Quando RE e i mitocondri si trovano in stretta prossimità, stimoli intracellulari mediati da Inositolo 1,4,5-trifosfato (IP_3) possono generare

microdomini con alte [Ca^{2+}] locali all'interfaccia tra i due organelli (Rizzuto et al. 1992, 1993). Questo elevato carico di Ca^{2+} viene quindi trasferito alla matrice mitocondriale, e una volta all'interno gioca un ruolo cruciale nel supportare il metabolismo energetico della cellula, contribuendo alla produzione di ATP e al mantenimento dell'efficienza bioenergetica (Mammucari et al. 2018).

1.3.2. Toolkit di segnalazione del Ca^{2+}

La capacità del Ca^{2+} di trasmettere segnali all'interno della cellula è garantita da un insieme di componenti molecolari che possono combinarsi in modi diversi. Questa flessibilità genera schemi di segnalazione caratterizzati da variazioni di velocità, intensità e attivazione spazio-temporale. I vari elementi che partecipano al complesso scambio di questo ione, come canali, pompe, scambiatori e proteine che legano o tamponano il Ca^{2+}, sono complessivamente noti come *calcium signaling toolkit*. Ogni cellula, in funzione delle proprie esigenze specifiche, organizza un proprio Ca^{2+} toolkit su misura (Berridge, Bootman, e Roderick 2003).

I segnali di Ca^{2+} si manifestano sotto forma di rapidi incrementi della [Ca^{2+}] nel citosol, originati da stimoli intrinseci o estrinseci. Gli stimoli intrinseci derivano dal rilascio di Ca^{2+} dalle riserve intracellulari, come il RE e il RS nelle cellule muscolari. Al contrario, gli stimoli estrinseci sono associati a percorsi di segnalazione che si attivano attraverso recettori di superficie cellulare, come i recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) o i recettori tirosina-chinasi (TKRs), in seguito al legame con ligandi extracellulari come ormoni o fattori di crescita. Nelle cellule eccitabili, stimoli esterni come il legame dei neurotrasmettitori a canali regolati da voltaggio (VOCs) possono determinare aumenti diretti della [Ca^{2+}] citosolica, collegando la depolarizzazione della membrana plasmatica a eventi funzionali quali la contrazione muscolare e l'esocitosi (Petersen, Michalak, e Verkhratsky 2005).

Indipendentemente dalla loro origine, questi stimoli convergono nel generare un segnale che mobilizza il Ca^{2+}, dalle riserve intracellulari, per poi agire da attivatore per due famiglie di recettori localizzati sulla membrana dell'RE/SR: gli IP_3Rs e i RYRs. Questi recettori vengono attivati rispettivamente dall'IP_3 e dal Ca^{2+} stesso. L'attivazione di tali canali provoca un incremento della [Ca^{2+}] nel citosol, dove il Ca^{2+} libero viene rapidamente sequestrato dalle proteine di legame. Queste proteine possono svolgere sia una funzione di effettori (ad esempio, troponina C e calmodulina) sia di buffer (come calbindina D-28 e calretinina), garantendo che

solo una minima frazione dello ione rimanga libera nel citosol (Berridge, Lipp, e Bootman 2000). Sia i recettori GPCRs che i TKRs convergono nell'attivazione della fosfolipasi C (PLC), ma tramite meccanismi differenti: i GPCRs attivano le isoforme PLCβ1 e PLCβ2, mentre i TKRs stimolano l'isoforma PLCγ. La PLC, seguendo due vie alternative, idrolizza il fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP_2), producendo IP_3, un secondo messaggero solubile che si diffonde nel citoplasma. Una volta raggiunto il suo recettore specifico sul RE, l'IP_3 promuove il rilascio di Ca^{2+} dal deposito intracellulare verso il citoplasma e altri organelli cellulari, inclusi i mitocondri (Amaya e Nathanson 2013).

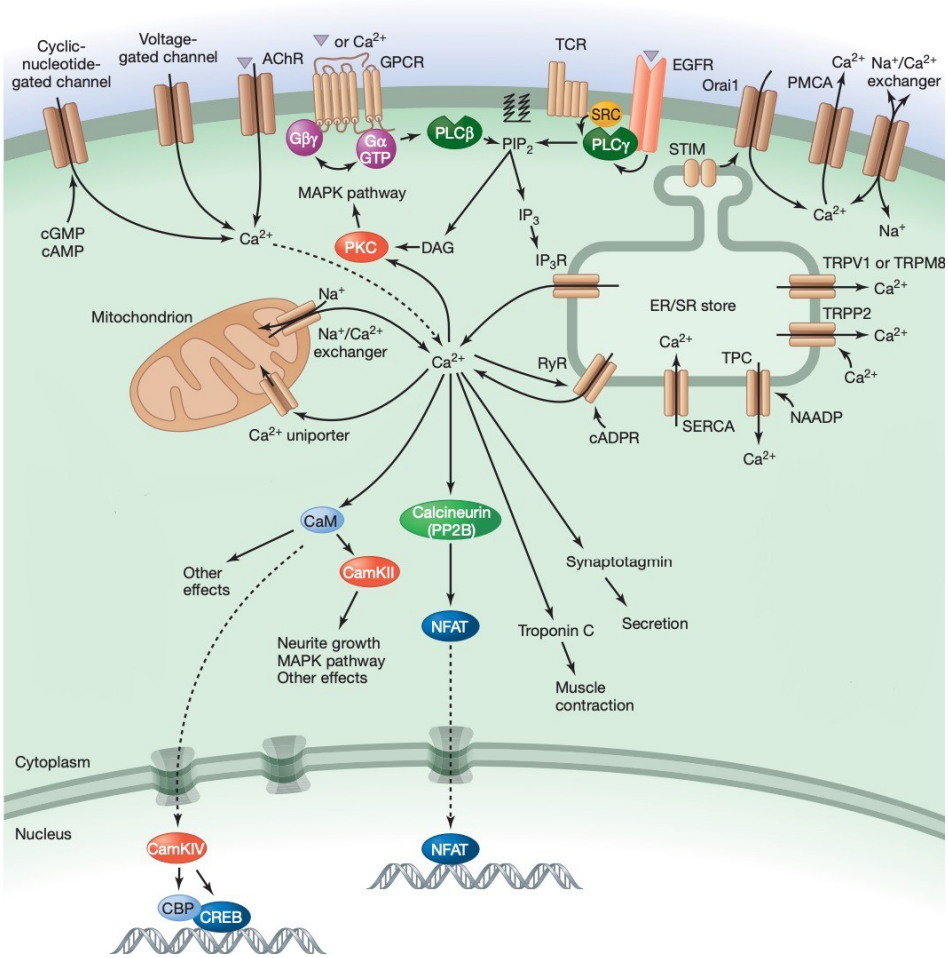

Figura 2. *Vie di segnalazione del Ca^{2+} intracellulare. I canali e i recettori di membrana regolano la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} e attivano numerosi meccanismi di trasduzione del segnale. Le fosfolipasi C (PLCβ e PLCγ) scindono il PIP_2 in IP_3 e DAG: l'IP_3 si lega ai recettori IP_3R sul reticolo endoplasmatico per il rilascio di Ca^{2+}, mentre il DAG attiva la PKC. I mitocondri partecipano all'assorbimento e al rilascio di Ca^{2+} tramite l'uniportatore mitocondriale del Ca^{2+} (MCU) e lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} (NCX), mentre a livello del reticolo endoplasmatico intervengono i recettori RYR e la pompa Ca^{2+}-ATPasi della membrana plasmatica (SERCA). Il Ca^{2+}, come secondo messaggero, attiva proteine effettrici tra cui la calmodulina (CaM), che regola enzimi come CaMKII e CaMKIV coinvolti nella crescita neuronale e nella trascrizione nucleare tramite CREB. Inoltre, la calcineurina (PP2B) de-fosforila NFAT, promuovendone la traslocazione nel nucleo per la regolazione genica (Bootman 2012).*

Al termine della sua funzione di segnalazione, il Ca^{2+} viene prontamente rimosso dal citoplasma tramite un sistema di pompe e scambiatori situati sulla membrana plasmatica. Tra questi, le principali sono le pompe Ca^{2+}-ATPasi della membrana plasmatica (PMCA) e gli NCX, il cui ruolo è favorire l'espulsione del Ca^{2+} verso l'ambiente extracellulare. Parallelamente, anche il RE, il RS e i mitocondri (con un contributo minore da parte dei perossisomi) partecipano al ripristino delle basse [Ca^{2+}]. Il sequestro del Ca^{2+} all'interno dell'RE/RS è garantito dalla pompa SERCA, mentre nei mitocondri il trasporto del calcio dal citosol alla matrice mitocondriale è affidato principalmente a due proteine: il canale anionico voltaggio-dipendente 1 (VDAC1), localizzato sulla membrana mitocondriale esterna (OMM), e l'uniportatore mitocondriale del calcio (MCU), situato sulla membrana mitocondriale interna (IMM) (de Ridder et al. 2023).

1.3.3. Il meccanismo di Store-Operated Calcium Entry

Il meccanismo di Store-Operated Calcium Entry (SOCE) rappresenta un processo fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare nelle cellule eucariotiche (Prakriya e Lewis 2015). Questo meccanismo si attiva quando la [Ca^{2+}] nel lume del RE diminuisce, solitamente in risposta a segnali di stimolazione cellulare che provocano il rilascio di Ca^{2+} tramite canali come gli IP_3R (Nguyen et al. 2018).

La proteina sensoriale Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1), localizzata nel RE, è in grado di rilevare la diminuzione dei livelli di Ca^{2+} e, a seguito di questo segnale, subisce un cambiamento conformazionale che provoca l'oligomerizzazione e la formazione di cluster nelle regioni del RE prossime alla membrana plasmatica. Questa aggregazione consente a STIM1 di interagire con il canale Orai1, situato sulla membrana plasmatica, promuovendone l'attivazione (Wang, Deng, e Gill 2010).

Una volta attivato il canale Orai1, il Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare entra nel citoplasma della cellula, venendo immediatamente captato dalle pompe SERCA localizzate in prossimità del complesso STIM1-Orai1. Queste pompe accelerano il processo di ricarica del Ca^{2+} nel RE, utilizzando l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP (Prakriya e Lewis 2015).

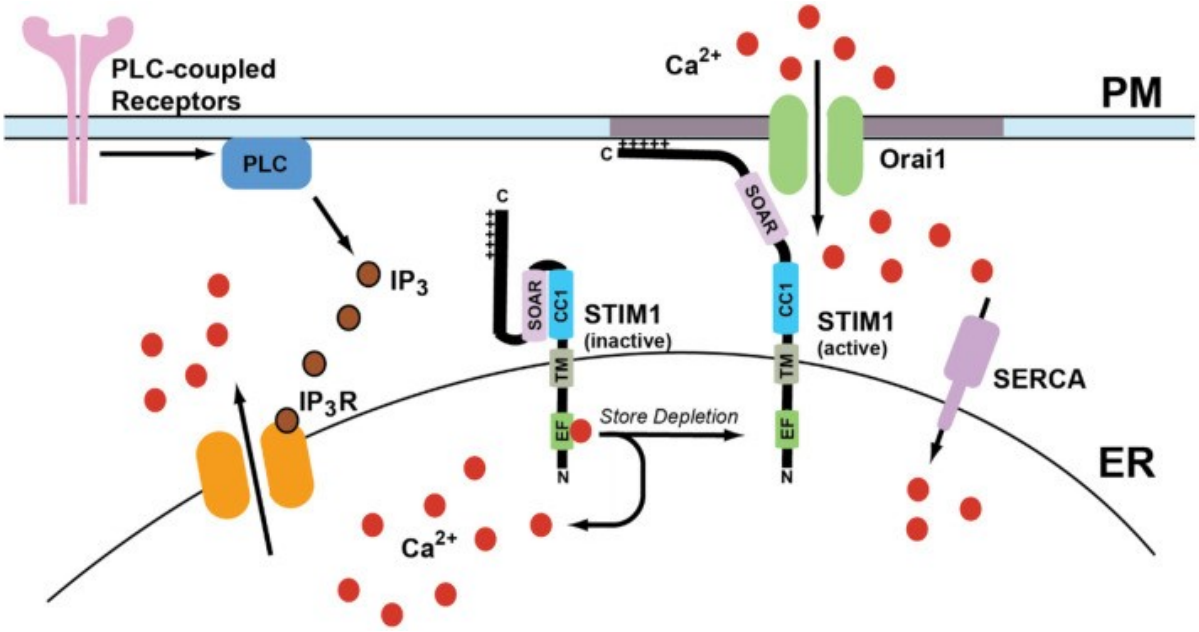

Figura 3. *Attivazione di STIM1 e formazione dei canali CRAC. In seguito alla stimolazione agonista-mediata dei recettori accoppiati a PLC, il rilascio di calcio mediato da IP_3 provoca la deplezione dei depositi di Ca^{2+} nel RE. Questo porta alla dissociazione del Ca^{2+} dal dominio EF-hand di STIM1, che si attiva e cambia conformazione, avvicinando il suo dominio C-terminale alla membrana plasmatica. Qui si lega ai canali Orai1, formando i canali CRAC, che permettono l'ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare nella cellula (Kodakandla, Akimzhanov, e Boehning 2023).*

L'aumento di Ca^{2+} intracellulare derivante dall'attivazione del SOCE è cruciale per numerose funzioni cellulari, tra cui la contrazione muscolare, la secrezione di ormoni e neurotrasmettitori, la modulazione dell'attività enzimatica e la regolazione della trascrizione genica (Nguyen et al. 2018).

1.4. MODELLO MURINO di LUAD

Per studiare le cellule di adenocarcinoma polmonare si utilizzano diversi modelli murini geneticamente modificati, attraverso la tecnica Cre/LoxP, combinata con l'utilizzo dei vettori adenovirali. La ricombinasi Cre è un enzima che riconosce specifiche sequenze di DNA, ovvero i siti LoxP (sequenza centrale asimmetrica fiancheggiata da due regioni palindrome). Si tratta di un sistema di ricombinazione sito-specifica che permette di attivare o disattivare i geni in modo specifico, permettendo di indurre lo sviluppo di tumori con le mutazioni desiderate (DuPage, Dooley, e Jacks 2009).

Il modello murino utilizzato in questo studio è $KRAS^{G12D}$ e $P53^{-/-}$, selezionate in quanto mutazioni maggiormente coinvolte nei NSCLS, in cui si ha l'attivazione dell'oncogene KRAS e l'inattivazione del gene oncosoppressore p53. Rispetto ai modelli con la sola mutazione di

KRAS, questi mostrano una progressione tumorale più rapida e un'aumentata invasività, risultando pertanto particolarmente adatti allo studio di adenocarcinomi polmonari già avanzati (DuPage et al. 2009; Shackelford et al. 2013).

SCOPO DEL LAVORO

Lo studio delle cellule di adenocarcinoma polmonare (LUAD) è cruciale per identificare nuovi bersagli prognostici e terapeutici, al fine di ridurre o bloccare lo sviluppo delle lesioni tumorali fin dalle fasi iniziali. Il LUAD rappresenta circa il 40% dei tumori polmonari non a piccole cellule, costituendo il sottogruppo più prevalente tra i tumori al polmone.
L'analisi dei database di LUAD (come il TCGA - The Cancer Genome Atlas) ha evidenziato una sovraespressione dell'enzima DHTKD1 nei pazienti, suggerendo il suo ruolo cruciale nel metabolismo mitocondriale della lisina e del triptofano. Per indagare l'impatto di questa sovraespressione, sono state sviluppate linee cellulari con DHTKD1 silenziato, al fine di studiare le alterazioni del metabolismo cellulare. Da queste analisi è emerso un significativo rimodellamento dell'espressione genica legata alla regolazione del calcio intracellulare.

Alla luce di tutte queste evidenze, lo scopo di questa tesi è stato quello di esaminare le dinamiche del Ca^{2+} intracellulare, al fine di identificare potenziali relazioni con l'espressione dell'enzima DHTKD1 e il metabolismo delle cellule di LUAD. Per raggiungere tale obiettivo, sono stati condotti esperimenti di imaging del Ca^{2+} sia nel citosol e che nella matrice mitochondriale, utilizzando una linea cellulare murina di Adenocarcinoma Polmonare modello di LUAD caratterizzata da mutazioni $KRAS^{G12D}$ e $P53^{-/-}$, con il silenziamento dell'enzima DHTKD1.

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. DATI PRELIMINARI

Per indagare la relazione tra LUAD e DHTKD1, presso il laboratorio del Professor Alessio Menga è stata eseguita un'analisi in silico TCGA, confrontando i tumori LUAD e i tessuti normali adiacenti. L'analisi ha rilevato un'espressione significativamente più elevata di DHTKD1 nei campioni tumorali rispetto ai tessuti normali ($p < 0,001$), indicando una chiara up-regolazione del gene (Figura 4). Questi risultati suggeriscono che DHTKD1 possa svolgere un ruolo chiave nella progressione tumorale, identificandolo anche come un potenziale biomarcatore prognostico negativo.

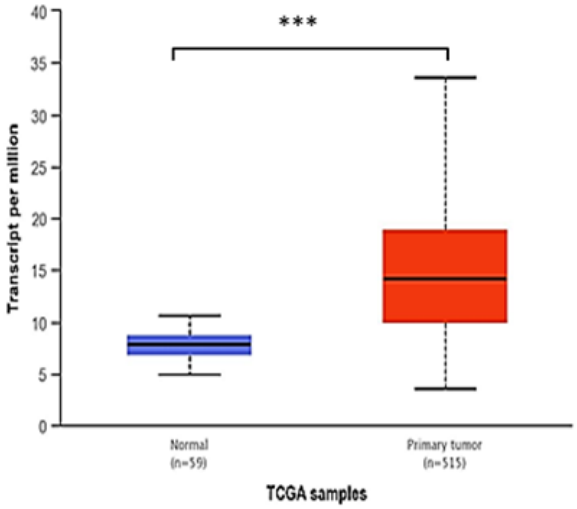

Figura 4. *Confronto dei livelli di espressione del gene DHTKD1 tra campioni non tumorali (N=59) e campioni di adenocarcinoma polmonare (LUAD) (N=515) ottenuti dal dataset TCGA. Analisi statistica: Test T a due code (*** = p < 0,001).*

Dalla letteratura era emerso che il silenziamento di DHTKD1 determinasse una riduzione della produzione energetica e della respirazione mitocondriale, accompagnata da una diminuzione del numero di copie di DNA mitocondriale e da un aumento dei livelli di ROS (Wang et al. 2021). A tale scopo, è stata utilizzata una linea cellulare murina caratterizzata da mutazioni $KRAS^{G12D}$ e $P53^{-/-}$, driver oncogenici clinicamente rilevanti noti per indurre nelle cellule di LUAD l'attivazione di percorsi metabolici differenti (Kerr e Martins 2018). Per cui, partendo da questa linea, sono state create tre linee cellulari silenziate per il gene DHTKD1 (denominate DH1, DH2, DH3) per indagare appunto i meccanismi metabolici e molecolari attraverso i quali DHTKD1 influenza l'invasività e il rimodellamento del microambiente tumorale.

I risultati di questi esperimenti avevano mostrato che l'amplificazione di DHTKD1 nelle cellule di LUAD promuove l'aggressività tumorale supportando il metabolismo energetico e prevenendo l'accumulo di metaboliti tossici. Il suo silenziamento provoca stress cellulare, aumento dei ROS e ipossia, rallentando la progressione del tumore e attivando la risposta immunitaria, suggerendo che l'inibizione di DHTKD1 possa rappresentare una strategia terapeutica innovativa per migliorare l'efficacia delle terapie oncologiche.

Successivamente tra le tre linee con l'enzima silenziato è stata selezionata per gli esperimenti solo la linea DH3 che ha dimostrato un maggior livello di silenziamento di DHTKD1.

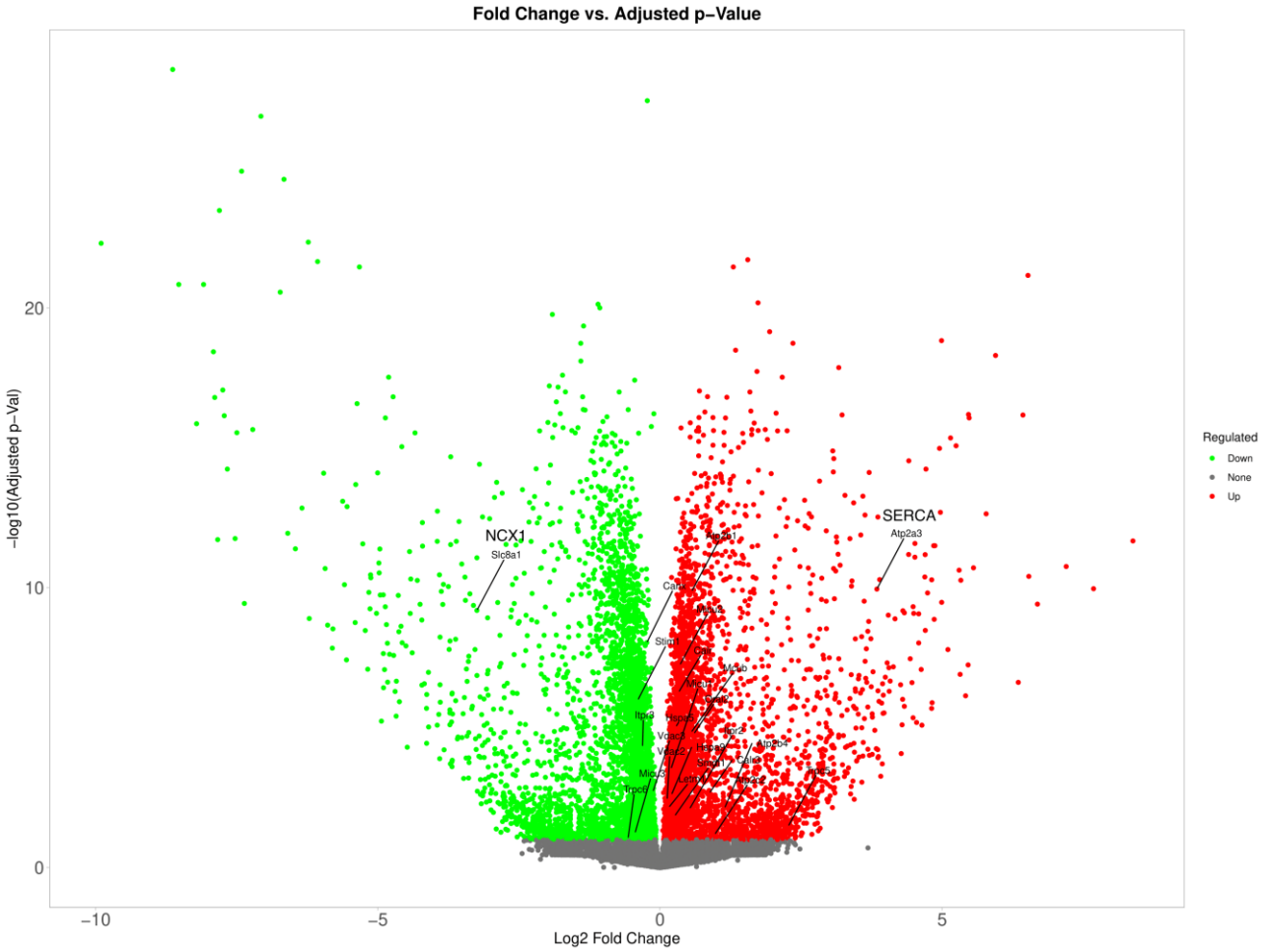

Figura 5. *Volcano plot che mostra l'analisi differenziale dell'espressione genica ottenuta mediante RNA sequencing di cellule silenziate per il gene DHTKD1 rispetto alle cellule di controllo. Asse delle ascisse: Log2 Fold Change. Asse delle ordinate: -log10(Adjusted p-value). I geni up-regolati nelle cellule silenziate sono rappresentati in rosso, mentre quelli down-regolati sono mostrati in verde. La significatività differenziale dell'espressione genica è stata determinata applicando una soglia di adjusted p-value < 0.05 e una soglia di |log2 Fold Change| > 1.*

Di conseguenza, sulla linea DH3 sono state condotte ulteriori analisi, tra cui l'analisi trascrittomica, che ha rivelato un significativo rimodellamento dell'espressione genica legata alla regolazione del Ca^{2+} intracellulare. In particolare, è stata osservata una sovraespressione della pompa SERCA, un'ATPasi del reticolo endoplasmatico, e una riduzione dell'espressione del trasportatore di membrana NCX, coinvolto nello scambio di Na^{+} e Ca^{2+} (Figura 5).

3.2. Valutazione dei segnali di Ca^{2+} citosolico nelle cellule DH3 in risposta all'ATP

Considerando i risultati ottenuti in seguito all'analisi della trascrittomica e del metabolismo delle cellule murine silenziate per l'enzima DHTKD1, in cui è emerso un rimodellamento dell'espressione di geni legati alla regolazione dei livelli di calcio intracellulare, tra cui la sovraespressione della pompa SERCA, ATPasi del reticolo endoplasmatico, e una diminuzione di NCX, trasportatore di membrana degli ioni Na^{+} e Ca^{2+}, sono stati eseguiti esperimenti di imaging del calcio, per indagare un'eventuale alterazione dell'omeostasi di questo ione. Un approccio complementare per indagare sui meccanismi delle alterazioni è stato overesprimere stabilmente, mediante trasduzione lentivirale, l'enzima DHTKD1 nelle cellule LUAD di controllo, per indagare se ulteriore overespressione dell'enzima potesse avere un effetto opposto rispetto al silenziamento (questa condizione di overespressione dell'enzima nelle cellule LUAD di partenza è indicata come OVER).

Il punto di partenza, quindi, è stato valutare la dinamica del calcio nel citosol in risposta alla stimolazione con ATP (200 µM), in tre condizioni ShCTR, ShDH3 e OVER. Le cellule sono state trattate con la sonda raziometrica Fura-2 per 20 minuti a temperatura ambiente e al buio. Le analisi sono state condotte al microscopio a fluorescenza. Le emissioni di questa sonda sono analizzate dal software nel tempo e si correlano alla $[Ca^{2+}]$ nel citosol.

L'aggiunta di ATP provoca un rapido aumento della $[Ca^{2+}]$ intracellulare, seguito da un decremento progressivo, caratteristico del rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari e della successiva ricaptazione. Le cellule ShDH3 mostrano un'ampiezza di risposta maggiore rispetto sia alle cellule ShCTR che alle cellule OVER, indicando che il silenziamento di DHTKD1 comporta un aumento della mobilizzazione del Ca^{2+} citosolico in risposta alla stimolazione con ATP (Figura 6). I risultati mostrano che le cellule ShDH3 presentano un valore

significativamente più alto rispetto sia alle cellule ShCTR che alle cellule OVER, con una differenza altamente significativa ($p < 0,0001$).

Questo suggerisce che la up-regolazione di DHTKD1 osservata nelle cellule tumorali possa essere correlata al rimodellamento del Ca^{2+} signaling toolkit osservato nell'analisi trascrittomica, e potrebbe indicare un potenziamento del meccanismo di svuotamento del RE in risposta agli stimoli esterni. Però, nelle cellule OVER non è stata osservata la diminuzione della risposta come ipotizzato, suggerendo che l'aumento ulteriore dei livelli dell'enzima non porti alla riversione della risposta.

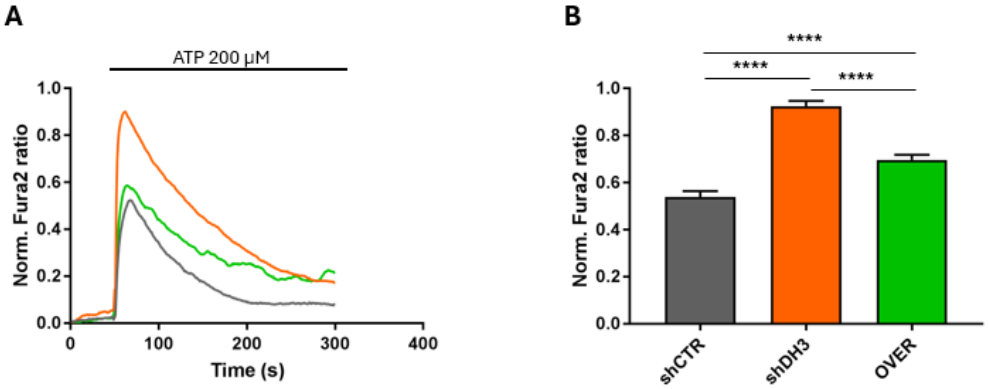

Figura 6. *Dinamiche di Ca^{2+} nel compartimento citosolico in seguito a stimolazione con ATP. (**A**) Grafico temporale della ratio normalizzata della sonda Fura-2AM nelle cellule ShCTR (grigio), ShDH3 (arancione) e OVER (verde) in risposta alla stimolazione con 200 µM di ATP. Sull'asse X è riportato il tempo (in secondi), mentre sull'asse Y è rappresentata la ratio normalizzata della fluorescenza. Le curve sono ottenute come media delle risposte di cellule provenienti da esperimenti indipendenti, mostrando l'andamento del Ca^{2+} citosolico in seguito alla stimolazione. (**B**) Rappresentazione grafica dei picchi delle curve di Ca^{2+}, calcolati come media dei valori massimi registrati in tutti gli esperimenti condotti. I dati sono espressi tramite l'analisi statisica di ANOVA (****= P. value <0.0001).*

Questi dati confermano che la perdita di DHTKD1 determina un aumento dell'ampiezza della risposta al Ca^{2+} citosolico, suggerendo un ruolo cruciale di questo enzima nel modulare la capacità delle cellule tumorali di rispondere agli stimoli.

3.3. Valutazione dei segnali di Ca^{2+} mitocondriale nelle cellule DH3 in risposta all'ATP

Successivamente sono state analizzate le dinamiche di Ca^{2+} all'interno della matrice mitocondriale, utilizzando sonda Mt-fura-2 (in collaborazione con Prof.ssa Diana Pendin, Università di Padova), sonda raziometrica specifica per la matrice mitocondriale con cui le

cellule sono state incubate per 40 minuti. In seguito, gli esperimenti sono stati condotti seguendo lo stesso protocollo utilizzato per Fura-2AM.

Anche in questo caso, le cellule ShDH3 mostrano risposte ATP-mediate significativamente più elevate e prolungate rispetto alle cellule ShCTR e OVER (Figura 7). Al contrario, e in linea con quello osservato nel compartimento citosolico, le cellule OVER, mostrano una curva significativamente inferiore rispetto ai ShDH3, simile a quella ottenuta con cellule controllo.

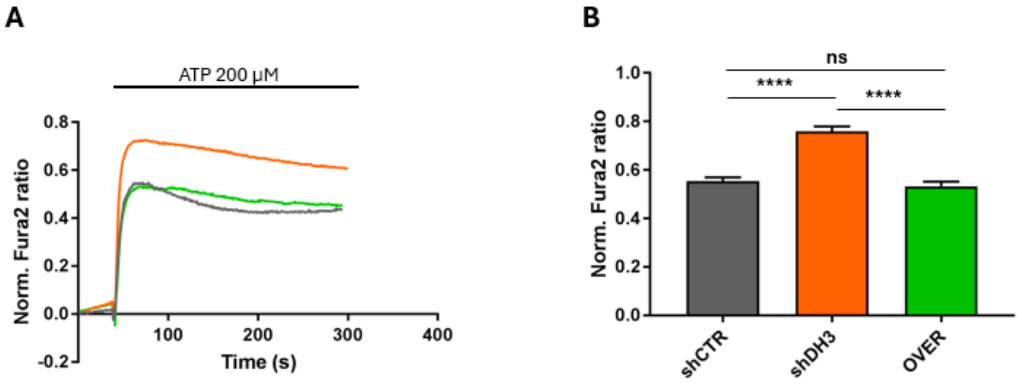

Figura 7. *Dinamiche di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale in seguito a stimolazione con ATP. (**A**) Grafico temporale della ratio normalizzata della sonda Mt-fura-2 nelle cellule ShCTR (grigio), ShDH3 (arancione) e OVER (verde) in risposta alla stimolazione con 200 µM di ATP. Sull'asse X è riportato il tempo (in secondi), mentre sull'asse Y è rappresentata la ratio normalizzata della fluorescenza. Le curve sono ottenute come media delle risposte di cellule provenienti da esperimenti indipendenti, mostrando l'andamento del Ca^{2+} mitocondriale in seguito alla stimolazione. (**B**) Rappresentazione grafica dei picchi delle curve di Ca^{2+}, calcolati come media dei valori massimi registrati in tutti gli esperimenti condotti. I dati sono espressi tramite l'analisi statisica di ANOVA (ns= P.value > 0.05; ****= P. value <0.0001).*

Questi dati suggeriscono che il silenziamento di DHTKD1 provochi un aumento della capacità dei mitocondri di accumulare Ca^{2+} in risposta alla stimolazione con ATP. Tale fenomeno potrebbe derivare da un aumentato uptake di Ca^{2+}, nelle cellule con DHTKD1 silenziato, oppure un maggiore rilascio dello ione dal reticolo endoplasmatico che entra direttamente nel mitocondrio, grazie all'interazione tra IP3R e VDAC. Inoltre, la mancata differenza tra cellule ShCTR e OVER suggerisce che l'over-espressione di DHTKD1 non influisce significativamente sulla capacità dei mitocondri di accumulare calcio. Questo dato potrebbe indicare che il controllo della dinamica mitocondriale del Ca^{2+} non sia direttamente correlato alla quantità di DHTKD1, ma piuttosto agli effetti a valle della sua sovrespressione o silenziamento, che a sua volta abbiano un effetto modulatorio sul metabolismo mitocondriale.

3.4. Valutazione dei segnali di Ca^{2+} generati dal meccanismo SOCE nelle cellule DH3

Un aspetto di grande interesse è il funzionamento dei canali SOCE, il cui ruolo principale, come già descritto, è quello di ripristinare le riserve di Ca^{2+} intracellulare prelevandolo dall'ambiente extracellulare, nonché stimolare le vie dei segnali Ca^{2+}-dipendenti, come per esempio via di attivazione della calcineurina → NFAT nei infociti. (Moccia et al. 2023b).

Per indurre un completo esaurimento delle riserve di $[Ca^{2+}]_{ER}$ e valutare il contenuto del Ca^{2+} nell'RE, è stato utilizzato tBHQ, un inibitore specifico della pompa SERCA, una famiglia di pompe ioniche che trasportano Ca^{2+} dal citoplasma al reticolo endoplasmatico, utilizzando l'energia derivata dall'idrolisi dell'ATP. Il trattamento con questo inibitore, in assenza del Ca^{2+} nel mezzo extracellulare, provoca un accumulo di Ca^{2+} nel citosol, derivante dal rilascio passivo dalle riserve di Ca^{2+} dell'ER (Lim et al. 2021). Questo fenomeno innesca l'attivazione del complesso proteico STIM-Orai, responsabile dell'ingresso di calcio nella cellula mediante il meccanismo SOCE. Infine, è stata effettuata una re-aggiunta del Ca^{2+} nel medium extracellulare, consentendo di misurare l'ingresso del Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica con il meccanismo SOCE e quindi valutare la capacità del sistema di ripristinare l'omeostasi dopo l'esaurimento delle riserve.

Come si può osservare nella Figura 8, il disegno sperimentale per valutare le riserve del Ca^{2+} nell'ER e l'attività del SOCE può essere suddiviso in due fasi principali. La prima fase consiste nel rilascio passivo di Ca^{2+} dal RE. In questa fase, le cellule vengono mantenute in assenza di calcio extracellulare (Ø Ca^{2+}). Viene quindi aggiunto il tBHQ (200 μM), un inibitore della pompa SERCA, per indurre il rilascio passivo di Ca^{2+} dal RE. L'inibizione della SERCA provoca un accumulo transitorio di Ca^{2+} nel citosol, evidenziato da un aumento della ratio Fura-2. Successivamente, la ratio diminuisce a causa del trasporto del Ca^{2+}, grazie all'attività della pompa PMCA, verso lo spazio extracellulare.

La seconda fase, invece, corrisponde alla valutazione dell'attivazione del meccanismo SOCE. Con l'aggiunta della soluzione KRB contenente 2 mM $CaCl_2$, viene ripristinata la concentrazione extracellulare di Ca^{2+}. La deplezione di Ca^{2+} nel RE attiva il complesso STIM-Orai, permettendo un massiccio afflusso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare. La ratio Fura-2 diminuisce gradualmente man mano che il Ca^{2+} viene sequestrato nei compartimenti intracellulari o eliminato dalla cellula.

Questa dinamica riflette il ruolo cruciale del SOCE nel ripristino delle riserve di Ca^{2+} intracellulare dopo l'esaurimento del RE, garantendo il mantenimento dell'omeostasi.

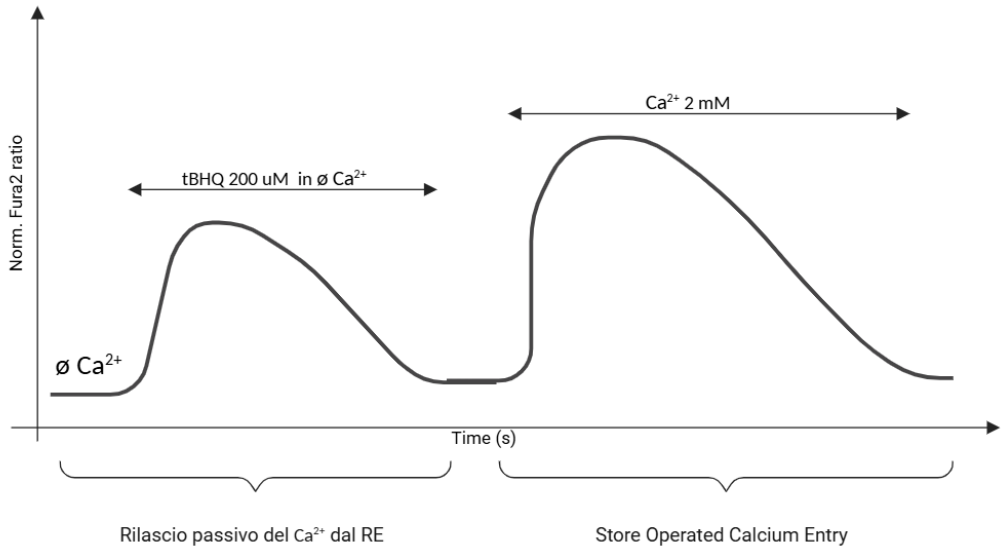

Figura 8. *Grafico temporale della ratio normalizzata di Fura-2 (asse Y) in funzione del tempo (asse X), utilizzata per monitorare la dinamica del Ca^{2+} intracellulare durante il processo di Store Operated Calcium Entry (SOCE).*

L'analisi delle curve è stata eseguita separando le due fasi sperimentali, ovvero la fase del rilascio passivo del Ca^{2+} dal RE e la fase dell'ingresso del Ca^{2+} mediante il SOCE.

Per prima è stata confrontata la concentrazione di Ca^{2+} citosolico dopo il blocco della pompa SERCA, presente sulla membrana plasmatica di RE, con tBHQ (Figura 9), dove si osserva che le cellule ShDH3 presentano un aumento significativamente superiore rispetto al controllo. Il maggiore accumulo di calcio osservato nelle cellule ShDH3 suggerisce che il silenziamento di DHTKD1 stimola la capacità del RE di trattenere il Ca^{2+}, rendendo più marcato il rilascio in seguito all'inibizione della SERCA.

Considerando anche i dati preliminari della trascrittomica in cui è stato trovato che il gene codificante la proteina SERCA sia up-regolato nelle cellule DH3, questa evidenza potrebbe indicare che DHTKD1 giochi un ruolo indiretto nel mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} nel RE.

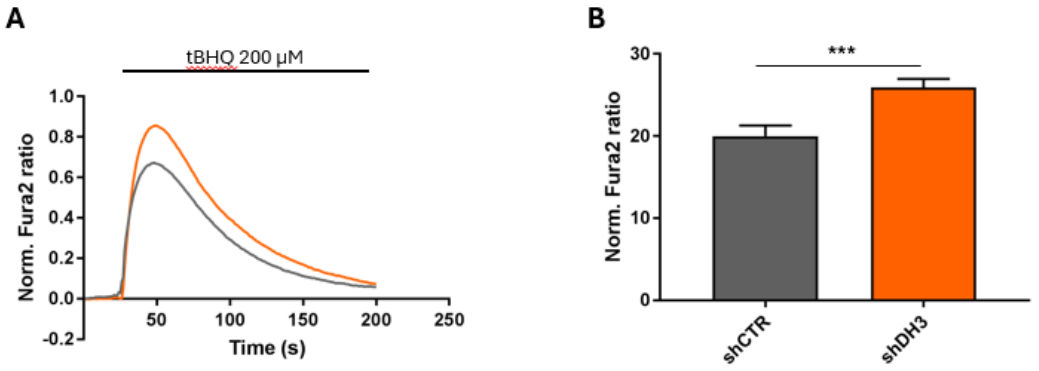

Figura 9. *Rilascio passivo di Ca^{2+} dal RE in seguito all'inibizione della pompa SERCA con tBHQ (200 µM). (**A**) Grafico della ratio normalizzata di Fura-2 in funzione del tempo nelle cellule ShCTR (grigio) e ShDH3 (arancione). Sull'asse X è riportato il tempo (in secondi), mentre sull'asse Y è rappresentata la ratio normalizzata della fluorescenza. Le curve sono ottenute come media delle risposte di cellule provenienti da esperimenti indipendenti, mostrando l'andamento del Ca^{2+} citosolico in seguito alla stimolazione con tBHQ. (**B**) Rappresentazione grafica dei picchi, calcolati come media dei valori massimi registrati in tutti gli esperimenti condotti. I dati sono espressi tramite l'analisi statisica di test t a due code per medie non appaiate (***= P. value <0.001).*

Infine, è stata analizzata la seconda fase del meccanismo SOCE, ovvero l'attivazione dell'ingresso di calcio extracellulare attraverso i canali STIM-Orai dopo la deplezione delle riserve di Ca^{2+} dal RE. In entrambe le condizioni si osserva un aumento rapido e significativo del Ca^{2+} intracellulare, che indica l'attivazione del meccanismo SOCE (Figura 10). Tuttavia, le cellule ShDH3 presentano un picco di Ca^{2+} significativamente più alto rispetto alle cellule ShCTR, suggerendo una maggiore capacità di ingresso del Ca^{2+} attraverso i canali SOCE.

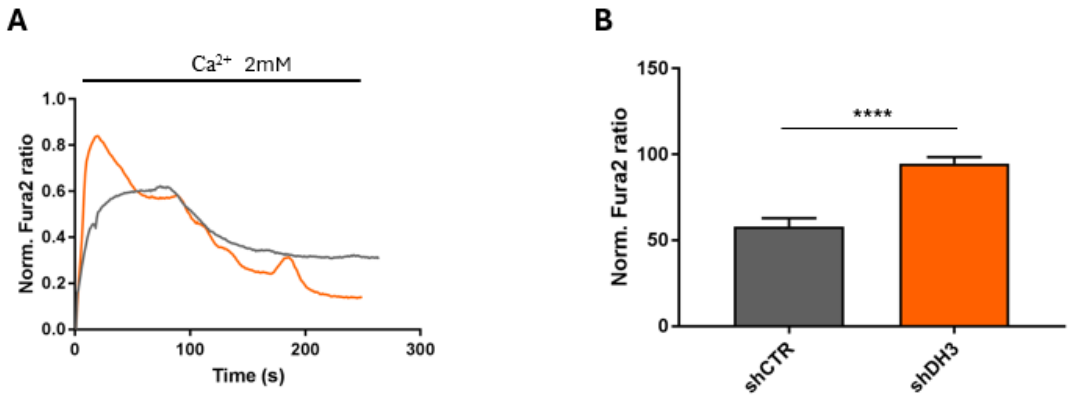

Figura 10. *Attivazione dei meccanismi del SOCE in seguito a deplezione di Ca^{2+} nel RE. (**A**) Grafico della ratio normalizzata di Fura-2AM in funzione del tempo nelle cellule ShCTR (grigio) e ShDH3 (arancione. Sull'asse X è riportato il tempo (in secondi), mentre sull'asse Y è rappresentata la ratio normalizzata della fluorescenza. Le curve sono ottenute come media delle risposte di cellule provenienti da esperimenti indipendenti, mostrando le dinamiche dell'ingresso di Ca^{2+} nel RE tramite meccanismo SOCE. (**B**) Rappresentazione grafica dei picchi, calcolati come media dei valori massimi registrati in tutti gli esperimenti condotti. I dati sono espressi tramite l'analisi statisica di test t a due code per medie non appaiate (****= P. value <0.0001).*

I risultati ottenuti suggeriscono un'alterazione nella gestione del Ca^{2+}, sia in termini di regolazione citosolica e mitocondriale, che di mantenimento del Ca^{2+} nel RE.

MATERIALI E METODI

4.1. Colture Cellulari

Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule isolate da lesioni tumorali di topo, appartenenti a una linea cellulare murina con mutazioni KRASG12D e P53-/-, ottenute dal laboratorio del Professor Alessio Menga, presso il Dipartimento di Scienze della Salute - Centro per la Ricerca Traslazionale sulle Malattie Autoimmuni e Allergiche (CAAD).
Le seguenti varianti cellulari sono state utilizzate nello studio, ottenute mediante il protocollo shRNA Lentiviral Particles Transduction (Santa Cruz Biotechnology):

- ShCTR: cellule di controllo generate tramite infezione con lentivirus contenenti scramble RNA.
- ShDH3: cellule silenziate per DHTKD1, mediante infezione con lentivirus contenenti shRNA diretto contro il gene d'interesse.
- OVER: cellule con ulteriore sovraespressione dell'enzima DHTKD1, ottenuta tramite trasduzione con il gene codificante DHTKD1.

Le cellule sono state coltivate in monostrato (2D), a 37°C in atmosfera umidificata con 5% di CO_2., utilizzando il terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich), arricchito con: 10% di siero fetale bovino (FBS) (Gibco), 2 mM di glutammina (Sigma-Aldrich), 10 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina (Sigma-Aldrich).

4.2. Imaging del Calcio

L'imaging del Ca^{2+} è stato eseguito per valutare le dinamiche del Ca^{2+} a livello del:

- Citosol, utilizzando la sonda raziometrica Fura-2 AM (Thermo Fisher Scientific Inc).
- Matrice mitocondriale, utilizzando la sona raziometrica Mt-fura-2 (Prof.ssa Diana Pendin, Università degli studi di Padova)
- Meccanismo SOCE, utilizzando sempre la sonda raziometrica Fura-2 AM (Thermo Fisher Scientific Inc).

Le cellule ShCTR, ShDH3 e OVER sono state seminate in piastre a 6 pozzetti sui vetrini di Ø24 mm, dopo il pretrattamento con 0,1 mg/ml di poli-D-lisina. Le cellule sono state seminate con una densità di 20×10^3 cellule/pozzetto nel centro del vetrino. Dopo 24h il flusso di Ca^{2+} nei due compartimenti e per il meccanismo SOCE è stato valutato misurando la concentrazione

di [Ca^{2+}] dopo stimolazione con 200 µM di ATP.
Per misurare le concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare è stata utilizzata la sonda fluorescente Fura-2-acetossimetil estere (Fura-2 AM), che rappresenta la forma inattiva del colorante. Una volta all'interno della cellula, le esterasi intracellulari rimuovono il gruppo acetossimetil, convertendo il Fura-2 AM nella sua forma attiva Fura-2 (Martínez, Martínez, e Silva 2017). Il Fura-2 è un sensore raziometrico, caratterizzato da una doppia lunghezza d'onda di eccitazione. In seguito al legame con il Ca^{2+} libero, si verifica uno spostamento del picco di assorbimento verso la regione blu dello spettro, mantenendo costante la lunghezza d'onda di emissione a 510 nm (verde). La forma legata allo ione calcio presenta un massimo di eccitazione a 340 nm, mentre la forma priva di Ca^{2+} ha un massimo di eccitazione a 380 nm. In entrambi i casi, il massimo di emissione si colloca intorno a 510 nm. I rapporti tra le emissioni a 510 nm/340 nm e 510 nm/380 nm sono direttamente correlati ai livelli di Ca^{2+} intracellulare, permettendo una misurazione quantitativa delle variazioni di calcio all'interno della cellula (Grynkiewicz, Poenie, e Tsien 1985; Martínez et al. 2017)).

Inizialmente, alle cellule adese al vetrino è stata aggiunta una soluzione KRB contenente 2 mM di $CaCl_2$, nella quale sono stati diluiti i seguenti componenti in rapporto 1:2000: Fura-2 AM (5 mM in DMSO), Pluronic F127 (2,5% in DMSO) e Sulfinpirazone (10 mM in DMSO). La soluzione KRB è una soluzione fisiologica a pH 7,4, isotonica e isoosmotica, che consente di mantenere le cellule in condizioni quasi fisiologiche per tutta la durata degli esperimenti. La sua composizione comprende: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na_3PO_4, 1 mM $MgSO_4$, 5,5 mM glucosio, 20 mM HEPES, addizionata con 2 mM $CaCl_2$ quando serve. Il Pluronic F127 al 2,5% svolge il ruolo di tensioattivo, migliorando la solubilità del Fura-2 AM nella fase lipidica e aumentando così l'efficienza di caricamento nelle cellule. Il Sulfinpirazone, invece, agisce inibendo l'efflusso del Fura-2 de-esterificato attraverso i canali anionici non specifici, impedendo la perdita dell'indicatore dalle cellule. Successivamente, le cellule sono state incubate per 20 minuti a temperatura ambiente e al buio, per garantire un caricamento ottimale del colorante.

Per quanto riguarda il protocollo Mt-fura-2 (generata e fornita dalla Prof.ssa Diana Pendin, Università degli studi di Padova), le cellule sono state caricate con una soluzione KRB contenente 2 mM di $CaCl_2$, nella quale sono stati diluiti i seguenti componenti: Mt-fura-2 (1 mM in DMSO) in rapporto 1:500 e Pluronic F127 (2,5% in DMSO) in rapporto 1:2000. Le

condizioni di incubazione sono state mantenute costanti, variando tuttavia il tempo di esposizione: le cellule sono state incubate per 40 minuti a temperatura ambiente e al buio. Il Mt-fura-2 è anch'esso un sensore per il Ca^{2+}, caratterizzato come indicatore raziometrico, ma specifico per la matrice mitocondriale. Questa sonda fluorescente è stata ottenuta mediante l'accoppiamento di due cationi trifenilfosfonio ($P^{+}Ph_3$) alla struttura di Fura-2, permettendo alla molecola di attraversare facilmente le membrane fosfolipidiche e di accumularsi selettivamente nella matrice mitocondriale (Pendin et al. 2019).

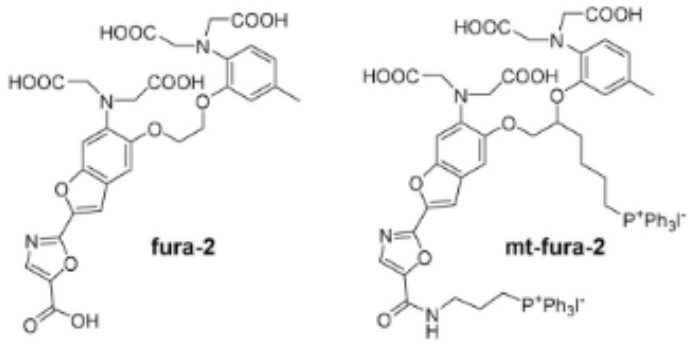

Figura 11. *Confronto tra la struttura molecolare di Fura-2 e Mt-Fura-2. L'immagine mostra la differenza strutturale tra l'indicatore raziometrico del calcio Fura-2 e la sua variante mitocondriale Mt-Fura-2 (Pendin et al. 2019).*

Allo scadere del tempo di incubazione, le cellule sono state lavate con una soluzione KRB contenente 2 mM di $CaCl_2$, al fine di rimuovere l'eccesso di colorante che potrebbe compromettere l'analisi al microscopio.
Per l'acquisizione dell'immagine del Ca^{2+}, i vetrini sono stati montati nella camera di acquisizione, alla quale sono stati aggiunti 500 µL di KRB con 2 mM di $CaCl_2$. Dopo aver registrato il segnale basale per 30-50 secondi, le cellule sono state stimolate con 200 µM di ATP e la risposta è stata monitorata per un periodo di 300 secondi.

Per valutare l'azione del SOCE, le cellule sono state caricate con una soluzione contenente la sonda fluorescente Fura-2, Pluronic e Sulfinpirazone, diluiti in rapporto 1:2000 nella soluzione KRB con 2 mM di $CaCl_2$. L'incubazione è stata effettuata per 20 minuti a temperatura ambiente e al buio. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate con la stessa soluzione priva della sonda fluorescente e mantenute in questa condizione fino al momento dell'analisi al microscopio. Successivamente, il vetrino è stato posizionato nella camera di acquisizione, dove è stato eseguito un lavaggio con soluzione KRB contenente 500 µM di Acido Etilen-

Glicolico Tetra Acetico (EGTA) per eliminare eventuali residui di $CaCl_2$. In seguito al lavaggio, sono stati aggiunti 500 µL della stessa soluzione contenente EGTA nella camera di acquisizione, al fine di chelare il Ca^{2+} citosolico, e la camera è stata posizionata sull'obiettivo del microscopio. Inizialmente è stato registrato il segnale basale per 30-50 secondi, e successivamente le cellule sono state stimolate con 200 µM di 2,5-ter-butilidrochinone (tBHQ), un inibitore selettivo della pompa SERCA, e la risposta è stata monitorata. Dopo 400 secondi, sono stati aggiunti 500 µL di KRB-$CaCl_2$ per garantire una concentrazione finale di 2 mM di Ca^{2+}, proseguendo il monitoraggio della risposta per altri 500 secondi.

L'eccitazione è stata eseguita alternativamente a 340 nm e 380 nm utilizzando il microscopio epifluorescente DMi8 equipaggiato con illuminazione a LEED CoolLED pE340FURA, un obiettivo HC PL FLUOTAR (340) 40X1.30 OIL e una camera Hamamatsu Flash 4.0 V3.
La fluorescenza emessa è stata rilevata ed elaborata tramite il software Leica LAS-X. Per valutare le differenze nell'ampiezza delle oscillazioni di Ca^{2+}, i valori del rapporto sono stati normalizzati applicando la formula $\Delta F/F_0$.

4.3. Analisi Statistica

I dati sono espressi come media ± SEM. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism. Per il confronto tra i gruppi sono stati applicati i seguenti test: t-test di Student a due code non appaiato e ANOVA a una via (*One-Way Analysis of Variance*) Le differenze sono state considerate statisticamente significative per un p-value < 0,05.

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

I principali obiettivi di questo lavoro sono stati la valutazione delle variazioni del Ca^{2+} intracellulare in risposta alla stimolazione con ATP nelle cellule di LUAD con differenti livelli di espressione dell'enzima DHTKD1. Per questo scopo, sono state utilizzate cellule in cui l'enzima era silenziato o sovraespresso, stimolate con ATP per monitorare i cambiamenti del Ca^{2+} sia nel citosol che nei mitocondri. Inoltre, è stata valutata l'efficacia del meccanismo SOCE nel ricaricare le riserve di Ca^{2+} intracellulare dopo la loro deplezione dal RE, indotta tramite l'inibizione della pompa SERCA con tBHQ.

Dalle analisi di imaging del Ca^{2+} è emerso che le cellule tumorali con il knock-down di DHTKD1 mostrano una risposta al Ca^{2+} significativamente aumentata rispetto alle cellule controllo. Successivamente è stato osservato un aumento significativo del rilascio del Ca^{2+} dall'RE dopo l'inibizione della pompa SERCA indicativo dell'aumentato contenuto del Ca2+ nel lume dell'RE. Per di più, dopo lo svuotamento dell'RE, l'ingresso del Ca^{2+} dallo spazio extracellulare mediante il meccanismo SOCE era anche significativamente aumentato. Questi risultati sono coerenti con quanto emerso dall'RNA sequencing delle cellule silenziate, che ha evidenziato un rimodellamento dell'espressione genica correlata alla regolazione del calcio intracellulare. In particolare, è stato osservato un aumento dell'espressione del gene codificante la pompa SERCA, un'ATPasi del reticolo endoplasmatico responsabile dell'accumulo di calcio nel RE, e una diminuzione dell'espressione del gene codificante NCX, un trasportatore di membrana che espelle Ca^{2+} fuori dalla cellula tramite lo scambio con Na^{+}. Si può ipotizzare che l'aumento dell'espressione della SERCA produca un sovra-caricamento dell'RE con il Ca^{2+} provocando un maggior rilascio in risposta all'ATP e l'inibizione della SERCA stessa. Si può anche speculare che la riduzione del NCX, in concomitanza con la sovraesperssione della SERCA possa deviare la rimozione del Ca2+ dal citosol prevalentemente verso l'RE.

Appare anche evidente, considerando i livelli già alti del DHTKD1 nelle cellule LUAD ShCTR, che un ulteriore sovraespressione dell'enzima non provochi un effetto significativo sulle dinamiche del Ca^{2+} intracellulari. Al contrario, si è osservato un leggero aumento della risposta citosolica nelle cellule OVER rispetto alle cellule ShCTR. Questo risultato suggerisce che le cellule LUAD ShCTR hanno raggiunto il livello massimo delle alterazioni.

Questi risultati suggeriscono che DHTKD1 svolga un ruolo cruciale nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare, influenzando la capacità delle cellule tumorali di adattarsi e sopravvivere in condizioni di stress.

In questo studio non sono state considerate le cellule “sane”, in quanto le linee LUAD derivanti dal tumore non hanno un analogo “sano”.
Ulteriori studi saranno necessari per approfondire i meccanismi molecolari alla base di questa regolazione, inclusa l’analisi funzionale e quantitativa, del livello delle proteine, dei singoli canali e pompe del Ca^{2+} coinvolti nella segnalazione intracellulare. Comprendere in modo dettagliato le alterazioni dei processi di rilascio e ingresso del Ca^{2+} attraverso le membrane rappresenta un passo fondamentale per identificare nuovi potenziali bersagli terapeutici per il trattamento del LUAD.

BIBLIOGRAFIA

Alonso, María Teresa, Jonathan Rojo-Ruiz, Paloma Navas-Navarro, Macarena Rodríguez-Prados, e Javier García-Sancho. 2017. «Measuring Ca2+ inside Intracellular Organelles with Luminescent and Fluorescent Aequorin-Based Sensors». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1864(6):894–99. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.12.003.

Amaya, Maria Jimena, e Michael H. Nathanson. 2013. «Calcium Signaling in the Liver». *Comprehensive Physiology* 3(1):515–39. doi: 10.1002/cphy.c120013.

Anon. 2025. «Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®) - NCI». Recuperato 28 marzo 2025 (https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq).

Anusewicz, Dorota, Magdalena Orzechowska, e Andrzej K. Bednarek. 2020. «Lung Squamous Cell Carcinoma and Lung Adenocarcinoma Differential Gene Expression Regulation through Pathways of Notch, Hedgehog, Wnt, and ErbB Signalling». *Scientific Reports* 10(1):21128. doi: 10.1038/s41598-020-77284-8.

Berridge, M. J., P. Lipp, e M. D. Bootman. 2000. «The Versatility and Universality of Calcium Signalling». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1(1):11–21. doi: 10.1038/35036035.

Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, e H. Llewelyn Roderick. 2003. «Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4(7):517–29. doi: 10.1038/nrm1155.

Bezerra, Gustavo A., William R. Foster, Henry J. Bailey, Kevin G. Hicks, Sven W. Sauer, Bianca Dimitrov, Thomas J. McCorvie, Jürgen G. Okun, Jared Rutter, Stefan Kölker, e Wyatt W. Yue. 2020. «Crystal Structure and Interaction Studies of Human DHTKD1 Provide Insight into a Mitochondrial Megacomplex in Lysine Catabolism». *IUCrJ* 7(Pt 4):693–706. doi: 10.1107/S205225252000696X.

Bootman, Martin D. 2012. «Calcium Signaling». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(7):a011171. doi: 10.1101/cshperspect.a011171.

Bootman, Martin D., e Geert Bultynck. 2020. «Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 12(1):a038802. doi: 10.1101/cshperspect.a038802.

Couraud, Sébastien, Gérard Zalcman, Bernard Milleron, Franck Morin, e Pierre-Jean Souquet. 2012. «Lung Cancer in Never Smokers--a Review». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 48(9):1299–1311. doi: 10.1016/j.ejca.2012.03.007.

Dang, C. V., e G. L. Semenza. 1999. «Oncogenic Alterations of Metabolism». *Trends in Biochemical Sciences* 24(2):68–72. doi: 10.1016/s0968-0004(98)01344-9.

Deben, Christophe, Jolien Van den Bossche, Nele Van Der Steen, Filip Lardon, An Wouters, Ken Op de Beeck, Christophe Hermans, Julie Jacobs, Marc Peeters, Guy Van Camp, Christian Rolfo, Vanessa Deschoolmeester, e Patrick Pauwels. 2017. «Deep Sequencing of the TP53 Gene Reveals a Potential Risk Allele for Non-Small Cell Lung Cancer and Supports the Negative Prognostic Value of TP53 Variants». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 39(2):1010428317694327. doi: 10.1177/1010428317694327.

DuPage, Michel, Alison L. Dooley, e Tyler Jacks. 2009. «Conditional Mouse Lung Cancer Models Using Adenoviral or Lentiviral Delivery of Cre Recombinase». *Nature Protocols* 4(7):1064–72. doi: 10.1038/nprot.2009.95.

Goncalves, Renata L. S., Victoria I. Bunik, e Martin D. Brand. 2016. «Production of Superoxide/Hydrogen Peroxide by the Mitochondrial 2-Oxoadipate Dehydrogenase Complex». *Free Radical Biology & Medicine* 91:247–55. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.020.

Grynkiewicz, G., M. Poenie, e R. Y. Tsien. 1985. «A New Generation of Ca2+ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties». *The Journal of Biological Chemistry* 260(6):3440–50.

Gu, Jincui, Yanbin Zhou, Lixia Huang, Weijun Ou, Jian Wu, Shaoli Li, Junwen Xu, Jinlun Feng, e Baomo Liu. 2016. «TP53 Mutation Is Associated with a Poor Clinical Outcome for Non-Small Cell Lung Cancer: Evidence from a Meta-Analysis». *Molecular and Clinical Oncology* 5(6):705–13. doi: 10.3892/mco.2016.1057.

Hagen, Jacob, Heleen te Brinke, Ronald J. A. Wanders, Alida C. Knegt, Esmee Oussoren, A. Jeannette M. Hoogeboom, George J. G. Ruijter, Daniel Becker, Karl Otfried Schwab, Ingo Franke, Marinus Duran, Hans R. Waterham, Jörn Oliver Sass, e Sander M. Houten. 2015. «Genetic Basis of Alpha-Aminoadipic and Alpha-Ketoadipic Aciduria». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 38(5):873–79. doi: 10.1007/s10545-015-9841-9.

Kerr, Emma M., e Carla P. Martins. 2018. «Metabolic Rewiring in Mutant Kras Lung Cancer». *The FEBS Journal* 285(1):28–41. doi: 10.1111/febs.14125.

Kodakandla, Goutham, Askar M. Akimzhanov, e Darren Boehning. 2023. «Regulatory Mechanisms Controlling Store-Operated Calcium Entry». *ArXiv* arXiv:2309.06907v3.

Lasorsa, Francesco Massimo, Paolo Pinton, Luigi Palmieri, Pasquale Scarcia, Hanspeter Rottensteiner, Rosario Rizzuto, e Ferdinando Palmieri. 2008. «Peroxisomes as Novel Players in Cell Calcium Homeostasis». *The Journal of Biological Chemistry* 283(22):15300–308. doi: 10.1074/jbc.M800648200.

Lim, Dmitry, Giulia Dematteis, Laura Tapella, Armando A. Genazzani, Tito Calì, Marisa Brini, e Alexei Verkhratsky. 2021. «Ca2+ handling at the mitochondria-ER contact sites in neurodegeneration». *Cell Calcium* 98:102453. doi: 10.1016/j.ceca.2021.102453.

Liu, Yangyang, Lu Liang, Liang Ji, Fuquan Zhang, Donglai Chen, Shanzhou Duan, Hao Shen, Yao Liang, e Yongbing Chen. 2021. «Potentiated Lung Adenocarcinoma (LUAD) Cell Growth, Migration and Invasion by lncRNA DARS-AS1 via miR-188-5p/ KLF12 Axis». *Aging* 13(19):23376–92. doi: 10.18632/aging.203632.

Mammucari, Cristina, Anna Raffaello, Denis Vecellio Reane, Gaia Gherardi, Agnese De Mario, e Rosario Rizzuto. 2018. «Mitochondrial Calcium Uptake in Organ Physiology: From Molecular Mechanism to Animal Models». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 470(8):1165–79. doi: 10.1007/s00424-018-2123-2.

Martínez, Magdiel, Namyr A. Martínez, e Walter I. Silva. 2017. «Measurement of the Intracellular Calcium Concentration with Fura-2 AM Using a Fluorescence Plate Reader». *Bio-Protocol* 7(14):e2411. doi: 10.21769/BioProtoc.2411.

Moccia, Francesco, Alessandra Fiorio Pla, Dmitry Lim, Francesco Lodola, e Andrea Gerbino. 2023a. «Intracellular Ca2+ Signalling: Unexpected New Roles for the Usual Suspect». *Frontiers in Physiology* 14:1210085. doi: 10.3389/fphys.2023.1210085.

Moccia, Francesco, Alessandra Fiorio Pla, Dmitry Lim, Francesco Lodola, e Andrea Gerbino. 2023b. «Intracellular Ca2+ signalling: unexpected new roles for the usual suspect». *Frontiers in Physiology* 14:1210085. doi: 10.3389/fphys.2023.1210085.

Molina, Julian R., Ping Yang, Stephen D. Cassivi, Steven E. Schild, e Alex A. Adjei. 2008. «Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship». *Mayo Clinic Proceedings* 83(5):584–94. doi: 10.4065/83.5.584.

Nemeria, Natalia S., Xu Zhang, Joao Leandro, Jieyu Zhou, Luying Yang, Sander M. Houten, e Frank Jordan. 2021. «Toward an Understanding of the Structural and Mechanistic Aspects of Protein-Protein Interactions in 2-Oxoacid Dehydrogenase Complexes». *Life (Basel, Switzerland)* 11(5):407. doi: 10.3390/life11050407.

Nguyen, Nhung T., Weidong Han, Wen-Ming Cao, Youjun Wang, Shufan Wen, Yun Huang, Minyong Li, Lupei Du, e Yubin Zhou. 2018. «Store-Operated Calcium Entry Mediated by ORAI and STIM». *Comprehensive Physiology* 8(3):981–1002. doi: 10.1002/cphy.c170031.

Pendin, Diana, Rosa Norante, Andrea De Nadai, Gaia Gherardi, Nicola Vajente, Emy Basso, Nina Kaludercic, Cristina Mammucari, Cristina Paradisi, Tullio Pozzan, e Andrea Mattarei. 2019. «A Synthetic Fluorescent Mitochondria-Targeted Sensor for Ratiometric Imaging of Calcium in Live Cells». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 58(29):9917–22. doi: 10.1002/anie.201902272.

Petersen, Ole H., Marek Michalak, e Alexei Verkhratsky. 2005. «Calcium Signalling: Past, Present and Future». *Cell Calcium* 38(3–4):161–69. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.023.

Prakriya, Murali, e Richard S. Lewis. 2015. «Store-Operated Calcium Channels». *Physiological Reviews* 95(4):1383–1436. doi: 10.1152/physrev.00020.2014.

de Ridder, Ian, Martijn Kerkhofs, Fernanda O. Lemos, Jens Loncke, Geert Bultynck, e Jan B. Parys. 2023. «The ER-Mitochondria Interface, Where Ca2+ and Cell Death Meet». *Cell Calcium* 112:102743. doi: 10.1016/j.ceca.2023.102743.

Rizzuto, R., M. Brini, M. Murgia, e T. Pozzan. 1993. «Microdomains with High Ca2+ Close to IP3-Sensitive Channels That Are Sensed by Neighboring Mitochondria». *Science (New York, N.Y.)* 262(5134):744–47. doi: 10.1126/science.8235595.

Rizzuto, R., A. W. Simpson, M. Brini, e T. Pozzan. 1992. «Rapid Changes of Mitochondrial Ca2+ Revealed by Specifically Targeted Recombinant Aequorin». *Nature* 358(6384):325–27. doi: 10.1038/358325a0.

Santa Cruz Biotechnology. «Santa Cruz Biotechnology». Recuperato 27 marzo 2025 (https://www.scbt.com/it/resources/protocols/shrna-lentiviral-particles-transduction).

Sellers, Katherine, Matthew P. Fox, Michael Bousamra, Stephen P. Slone, Richard M. Higashi, Donald M. Miller, Yali Wang, Jun Yan, Mariia O. Yuneva, Rahul Deshpande, Andrew N. Lane, e Teresa W. M. Fan. 2015. «Pyruvate Carboxylase Is Critical for Non-Small-Cell Lung Cancer Proliferation». *The Journal of Clinical Investigation* 125(2):687–98. doi: 10.1172/JCI72873.

Shackelford, David B., Evan Abt, Laurie Gerken, Debbie S. Vasquez, Atsuko Seki, Mathias Leblanc, Liu Wei, Michael C. Fishbein, Johannes Czernin, Paul S. Mischel, e Reuben J. Shaw. 2013. «LKB1 Inactivation Dictates Therapeutic Response of Non-Small Cell Lung Cancer to the Metabolism Drug Phenformin». *Cancer Cell* 23(2):143–58. doi: 10.1016/j.ccr.2012.12.008.

Shang, Kai, Hongxiang Huang, Yongkang Xu, Yangyang Liu, Zhihui Lu, e Li Chen. 2022. «Efficacy and safety analyses of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors combined with chemotherapy in the treatment of advanced non–small-cell lung cancer with an EGFR/TP53 co-mutation». *BMC Cancer* 22(1):1295. doi: 10.1186/s12885-022-10391-z.

Shepherd, Frances A., Benjamin Lacas, Gwénaël Le Teuff, Pierre Hainaut, Pasi A. Jänne, Jean-Pierre Pignon, Thierry Le Chevalier, Lesley Seymour, Jean-Yves Douillard, Stephen Graziano, Elizabeth Brambilla, Robert Pirker, Martin Filipits, Robert Kratzke, Jean-Charles Soria, Ming-Sound Tsao, e LACE-Bio Collaborative Group. 2017. «Pooled Analysis of the Prognostic and Predictive Effects of TP53 Comutation Status Combined With KRAS or EGFR Mutation in Early-Stage Resected Non-Small-Cell Lung Cancer in Four Trials of Adjuvant Chemotherapy». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35(18):2018–27. doi: 10.1200/JCO.2016.71.2893.

Svensson, Robert U., Seth J. Parker, Lillian J. Eichner, Matthew J. Kolar, Martina Wallace, Sonja N. Brun, Portia S. Lombardo, Jeanine L. Van Nostrand, Amanda Hutchins, Lilliana Vera, Laurie Gerken, Jeremy Greenwood, Sathesh Bhat, Geraldine Harriman, William F. Westlin, H. James Harwood, Alan Saghatelian, Rosana Kapeller, Christian M. Metallo, e Reuben J. Shaw. 2016. «Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase Suppresses Fatty Acid Synthesis and Tumor Growth of Non-Small-Cell Lung Cancer in Preclinical Models». *Nature Medicine* 22(10):1108–19. doi: 10.1038/nm.4181.

Tedeschi, Valentina, Tiziana Petrozziello, e Agnese Secondo. 2019. «Calcium Dyshomeostasis and Lysosomal Ca2+ Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis». *Cells* 8(10):1216. doi: 10.3390/cells8101216.

Thandra, Krishna Chaitanya, Adam Barsouk, Kalyan Saginala, John Sukumar Aluru, e Alexander Barsouk. 2021. «Epidemiology of Lung Cancer». *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)* 25(1):45–52. doi: 10.5114/wo.2021.103829.

Wang, Chuan, M. Wade Calcutt, e Jane F. Ferguson. 2021. «Knock-Out of DHTKD1 Alters Mitochondrial Respiration and Function, and May Represent a Novel Pathway in

Cardiometabolic Disease Risk». *Frontiers in Endocrinology* 12:710698. doi: 10.3389/fendo.2021.710698.

Wang, Youjun, Xiaoxiang Deng, e Donald L. Gill. 2010. «Calcium Signaling by STIM and Orai: Intimate Coupling Details Revealed». *Science Signaling* 3(148):pe42. doi: 10.1126/scisignal.3148pe42.

Xu, Wang-Yang, Ming-Min Gu, Lian-Hua Sun, Wen-Ting Guo, Hou-Bao Zhu, Jian-Fang Ma, Wen-Tao Yuan, Ying Kuang, Bao-Jun Ji, Xiao-Lin Wu, Yan Chen, Hong-Xin Zhang, Fu-Ting Sun, Wei Huang, Lei Huang, Sheng-di Chen, e Zhu-Gang Wang. 2012. «A Nonsense Mutation in DHTKD1 Causes Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2 in a Large Chinese Pedigree». *American Journal of Human Genetics* 91(6):1088–94. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.09.018.

Xu, Wangyang, Houbao Zhu, Mingmin Gu, Qingqiong Luo, Jieying Ding, Yuting Yao, Fuxiang Chen, e Zhugang Wang. 2013. «DHTKD1 Is Essential for Mitochondrial Biogenesis and Function Maintenance». *FEBS Letters* 587(21):3587–92. doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.047.

Yeaman, S. J. 1989. «The 2-Oxo Acid Dehydrogenase Complexes: Recent Advances». *The Biochemical Journal* 257(3):625–32. doi: 10.1042/bj2570625.

Zappa, Cecilia, e Shaker A. Mousa. 2016. «Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment and Future Advances». *Translational Lung Cancer Research* 5(3):288–300. doi: 10.21037/tlcr.2016.06.07.

Zhao, Bin, Bin Li, Haoxin Guo, Qingtao Zhao, Xiaopeng Zhang, Huanfen Zhao, Wenfei Xue, Wei Li, Guochen Duan, e Shun Xu. 2024. «The Correlation between KRAS and TP53 Gene Mutations and Early Growth of Pulmonary Nodules». *Journal of Cardiothoracic Surgery* 19(1):376. doi: 10.1186/s13019-024-02927-0.

Zheng, Qiangqiang, Shihui Min, e Qinghua Zhou. 2021. «Identification of Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers for LUAD Based on TCGA and GEO Databases». *Bioscience Reports* 41(6):BSR20204370. doi: 10.1042/BSR20204370.