

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

Ruolo di FSP1 nella resistenza alla ferroptosi del mesotelioma pleurico

Relatore

Prof. Chiara Porta



Firmato digitalmente da Chiara Porta
Data: 28.09.2026 14:08:44 CEST
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI
STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE/01943490027

Candidato

Elena Montana Lampo

Correlatore

Gaia Cassinari

Anno Accademico 2025-2026

Sessione Autunnale

Lista delle abbreviazioni

MPM	Mesotelioma Pleurico Maligno
EMM	Mesotelioma Maligno Epitelioide
SMM	Mesotelioma Maligno Sarcomatoide
BMM	Mesotelioma Maligno Bifasico
AP-1	Proteina attivatrice 1
NLRP3	Proteina contenente domini NOD, LRR e pirina 3
TFRC	Recettore della transferrina
SLC7A11	Trasportatore soluti famiglia 7 membro 11
SLC3A2	Trasportatore soluti famiglia 3 membro 2
ALOX	Lipossigenasi dell'acido arachidonico
PUFA	Acidi grassi polinsaturi
GPX4	Glutathione perossidasi 4
GSH	Glutathione
RSL3	Ras-Selective Lethal 3
ACSL4	Acil-CoA sintetasi a catena lunga 4
AKR1C	Reduttasi aldo-cheto famiglia 1 membro C
4-HNE	4-idrossi-2-nonenale
FSP1	Proteina soppressoria della ferroptosi 1
NCOA4	Nuclear Receptor Coactivator 4
FTH1	Ferritin Heavy Chain 1
TFR1	Recettore 1 della transferrina

Indice

1.	<i>INTRODUZIONE</i>	5
1.1	<i>MECCANISMI MOLECOLARI DELLA FERROPTOSI</i>	5
1.2	<i>SISTEMI ANTIOSSIDANTI INDIPENDENTI DA GPX4</i>	7
1.3	<i>MANIFESTAZIONE CLINICA E CLASSIFICAZIONE DEL MPM</i>	9
1.4	<i>PATOGENESI DEL MPM</i>	10
1.5	<i>MICROAMBIENTE TUMORALE (TME) DEL MPM</i>	13
1.6	<i>LE TERAPIE PER IL MPM</i>	15
1.7	<i>RISPOSTA IMMUNITARIA ASSOCIATA ALLA FERROPTOSI</i>	17
2.	<i>SCOPO DEL LAVORO</i>	20
3.	<i>RISULTATI E DISCUSSIONE</i>	21
3.1	<i>LINEE CELLULARI DI MESOTELIOMA UMANO MOSTRANO UNA SENSIBILITÀ ALLA FERROPTOSI ISTOTIPO-DIPENDENTE</i>	21
3.2	<i>IL PROFILO TRASCRIZIONALE DI FSP1, AKR1C1-4 E GPX4 VARIA NELLE DIVERSE LINEE DI MPM UMANO</i>	24
3.3	<i>LE CELLULE DI MPM EPITELIOIDE NCI-H2452 ESPRIMONO LIVELLI PIÙ ALTI DI MOLECOLE ANTI-OSSIDANTI DELLE LINEE NON EPITELIOIDI MSTO-211H E NCI-H2052</i>	26
3.4	<i>LA NEUTRALIZZAZIONE DI FSP1 AUMENTA LA SENSIBILITÀ ALLA FERROPTOSI, SOPRATTUTTO NELLE CELLULE EPITELIODI NCI-H2452</i>	30
3.5	<i>LA NEUTRALIZZAZIONE DI AKR1C1 È INSUFFICIENTE PER SENSIBILIZZARE LE CELLULE ALLA FERROPTOSI INDOTTA DA RSL3</i>	35
3.6	<i>LE CELLULE SARCOMATOIDI NCI-H2052 MOSTRANO, BASALMENTE, UNA PECULIARE ABBONDANZA CITOPLASMATICA DI FERRO FERROSO LABILE</i>	38
3.7	<i>IL PROFILO DI ESPRESSIONE DELLE PROTEINE CHE REGOLANO L'OMEOSTASI DEL FERRO È COERENTE CON IL DIVERSO PROFILO DI LIP DELLE CELLULE DI MPM</i>	40

4.	CONCLUSIONE E SVILUPPI FUTURI	43
5.	MATERIALI E METODI	45
5.1	COLTURE CELLULARI	45
5.2	SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE CON FDA TRAMITE CITOFLUORIMETRIA IN MODELLI 2D	45
5.3	VALUTAZIONE DELL'OSSIDAZIONE LIPIDICA MEDIANTE BODIPY IN MODELLI 2D	46
5.4	ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA IN MODELLI 2D	47
5.4.1	Trattamento con RSL3 in modelli 2D	47
5.4.2	Estrazione dell'RNA	47
5.4.3	Quantificazione RNA	48
5.4.4	Retrotrascrizione di RNA a cDNA	48
5.4.5	Real-Time PCR	49
5.5	ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT	50
5.5.1	Trattamento con RSL3 in modelli 2D	50
5.5.2	Estrazione delle proteine totali	50
5.5.3	Quantificazione delle proteine mediante saggio di Bradford	50
5.5.4	Separazione elettroforetica delle proteine mediante SDS-PAGE	51
5.5.5	Trasferimento delle proteine su membrana	51
5.5.6	Immunodetenzione delle proteine	52
5.6	TRASFEZIONE DI SIRNA MEDIANTE LIPOFECTAMINE RNAIMAX	52
6.	BIBLIOGRAFIA	54

1. Introduzione

La ferroptosi è una forma di morte cellulare programmata descritta per la prima volta nel 2012, il cui meccanismo cardine risiede in un profondo e incontrollato accumulo di perossidi lipidici a livello delle membrane cellulari. Dal punto di vista biochimico, questo processo è guidato dalla disponibilità di ferro libero intracellulare, il quale agisce come catalizzatore per la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Quando l'ossidazione dei lipidi di membrana supera la capacità di detossificazione dei sistemi di difesa antiossidanti della cellula, l'integrità strutturale del doppio strato fosfolipidico viene irreparabilmente compromessa, conducendo alla morte della cellula stessa. Questa peculiare sequenza di eventi biochimici si traduce in una serie di cambiamenti morfologici che distinguono la ferroptosi dalle altre forme di morte cellulare. Nello specifico a differenza dell'apoptosi, la ferroptosi non comporta la frammentazione del DNA, la condensazione della cromatina o la formazione dei classici corpi apoptotici. Analogamente, si differenzia dalla necrosi e dall'autofagia per la presenza di alterazioni ultrastrutturali specifiche a carico dei mitocondri, che mostrano una visibile riduzione di volume, l'aumento della densità di membrana, la riduzione o scomparsa delle creste e la rottura della membrana esterna. La ferroptosi ha assunto un interesse crescente in ambito oncologico. Lo stato metabolico e il bilancio Redox che caratterizza le cellule neoplastiche aumenta la loro suscettibilità alla morte ferroptotica mettendo in luce un punto di vulnerabilità che potrebbe essere sfruttato terapeuticamente per colpire, in particolare, le neoplasie refrattarie ai trattamenti convenzionali [1].

1.1 Meccanismi molecolari della ferroptosi

Per comprendere l'innescò della ferroptosi è necessario analizzare innanzitutto i meccanismi che regolano l'omeostasi cellulare del ferro. Rispetto ai tessuti sani, le cellule tumorali presentano un fabbisogno del metallo notevolmente aumentato, indispensabile per sostenere i loro elevati ritmi di proliferazione. Per far fronte a questa esigenza, le cellule neoplastiche riprogrammano i propri meccanismi di import, stoccaggio ed esport del ferro [2]. L'ingresso del metallo avviene prevalentemente attraverso il legame del ferro veicolato dalla transferrina al suo recettore specifico, il recettore della transferrina 1 (TfR1), il quale risulta

altamente espresso sulla superficie delle cellule tumorali e ne promuove l'internalizzazione per endocitosi [3, 4].

Una volta all'interno della cellula, il ferro in eccesso viene normalmente sequestrato all'interno della ferritina, la principale proteina deputata al suo stoccaggio sicuro. Tuttavia, in specifiche condizioni di stress, si assiste a un incremento della ferritinofagia, un processo autofagico selettivo guidato dal coattivatore recettoriale nucleare 4 (NCOA4). Questo meccanismo porta alla degradazione della ferritina e al conseguente rilascio di grandi quantità di ferro ferroso libero (Fe^{2+}) nel citoplasma, aumentando il cosiddetto pool di ferro labile [5]. Il ferro ferroso così liberato è in grado di innescare la reazione di Fenton, interagendo con il perossido di idrogeno (H_2O_2) per generare ferro ferrico (Fe^{3+}) e radicali idrossilici ($\cdot\text{OH}$). Questi ultimi sono specie reattive dell'ossigeno estremamente citotossiche che avviano il processo di perossidazione a carico dei lipidi.

Affinché la cascata ferroptotica si realizzi, non è sufficiente la sola presenza di ferro libero, ma è richiesta la presenza nelle membrane di specifici substrati lipidici, quali l'acido arachidonico, l'acido linoleico e l'acido adrenico [6]. L'incorporazione di questi acidi grassi polinsaturi (PUFA) nei fosfolipidi di membrana è finemente regolata da specifici enzimi, tra cui il membro 4 della famiglia della sintetasi dell'acil-CoA a catena lunga (ACSL4). Questo enzima, catalizzando l'attivazione dei PUFA liberi, permette alla lisofosfatidilcolina aciltrasferasi di esterificarli per ottenere i fosfolipidi di membrana [7, 8]. Una volta inseriti nella struttura del doppio strato fosfolipidico, i PUFA costituiscono il bersaglio ideale per la cascata ossidativa, che può avvenire sia in modo non enzimatico, guidato dai radicali derivati dal ferro, sia in modo enzimatico attraverso l'azione delle lipossigenasi (ALOX) [6, 9, 10].

L'accumulo progressivo di idroperossidi lipidici (LOOH) altera profondamente la fluidità e la permeabilità della membrana, fino a provocarne la rottura fisica [11]. In condizioni fisiologiche, la cellula evita questo esito letale grazie all'intervento di efficienti sistemi di difesa antiossidante, tra i quali il principale è rappresentato dalla glutathione perossidasi 4 (GPX4) [12]. Quest'enzima riduce gli idroperossidi lipidici in alcoli lipidici innocui, bloccando sul nascere la reazione a catena della perossidazione. Per svolgere la propria attività detossificante, GPX4 necessita del glutathione ridotto (GSH), la cui sintesi dipende strettamente dalla disponibilità di cisteina. Quest'amminoacido che viene importato

dall'ambiente extracellulare sotto forma di cistina mediante il sistema di antiporto di membrana Xc^- che, costituito dalle subunità SLC7A11 e SLC3A2, scambia la cistina extracellulare con il glutammato intracellulare [13].

Quando la funzionalità del sistema Xc^- viene inibita o compromessa, la cellula va incontro a un rapido depauperamento delle riserve di cistina e alla conseguente impossibilità di sintetizzare il glutathione. La deplezione di GSH priva l'enzima GPX4 del suo cofattore essenziale, inattivando la principale barriera di protezione contro lo stress ossidativo lipidico. Senza l'azione neutralizzante di GPX4, le vie antiossidanti secondarie (come quella mediata da FSP1) sono solitamente insufficienti per mantenere lo stato redox, pertanto i perossidi lipidici e i ROS si accumulano in maniera incontrollata, superando la soglia di tolleranza della cellula e portandola inevitabilmente alla morte per ferroptosi [9, 12, 13] (*Figura 1*).

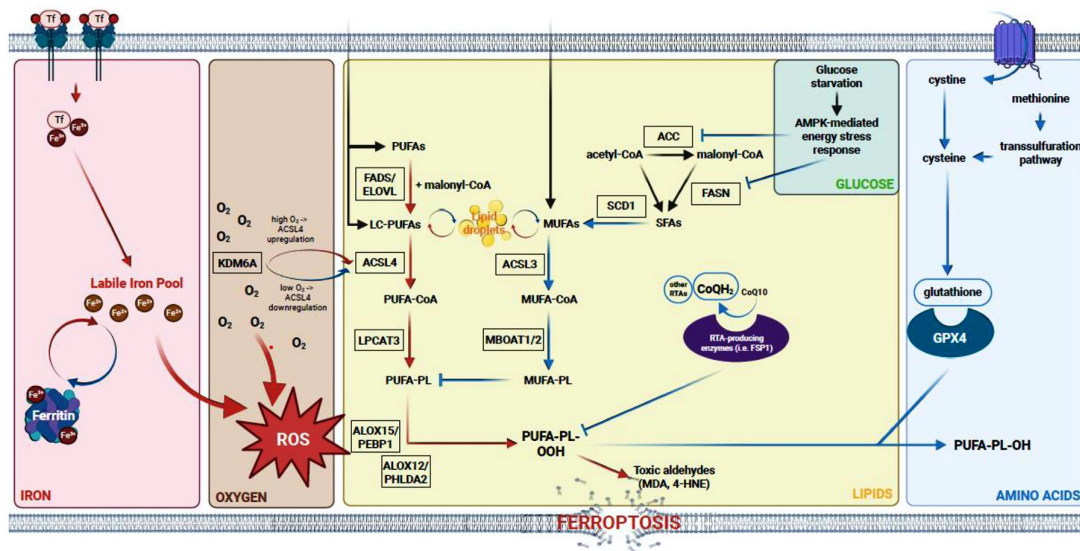


Figura 1: La figura mostra come la ferroptosi coinvolge vie chiave nel metabolismo del ferro, dei lipidi e degli amminoacidi. Riprodotto da Jin J, Hu J, Li M, Gu W, Jiang X, Stockwell BR. Ferroptosis as an approach to leverage cancer metabolism. Trends Cell Biol. 2026 Jul;36(7):545-560. doi: 10.1016/j.tcb.2026.03.008. Epub 2026 Apr 9. PMID: 41963164; PMCID: PMC13078707 [14].

1.2 Sistemi antiossidanti indipendenti da GPX4

Studi recenti hanno dimostrato che diverse linee cellulari hanno sviluppato meccanismi di resistenza alla ferroptosi, per cui l'inibizione di GPX4 non è sufficiente a indurre morte

cellulare. La ricerca di meccanismi di protezione autonomi e alternativi a GPX4 ha messo in luce diverse molecole antiossidanti cruciali. Ad esempio, attraverso studi di screening genetico, il gene "Apoptosis-Inducing Factor Mitochondrial-Associated 2" (AIFM2), così chiamato perchè inizialmente associato alla via di morte apoptotica, è stato rinominato Ferroptosis Suppressor Protein 1 (FSP1) in virtù del suo primario protettivo contro la morte per ferroptosi [15]. L'attività anti-ferroptotica di FSP1 si inserisce nell'asse metabolico FSP1-CoQ10-NAD(P)H. In questo sistema, FSP1 agisce reclutando NAD(P)H come donatore di elettroni per ridurre l'ubichinone (CoQ10) a ubichinolo (CoQ10H₂), ovvero la forma ridotta e lipofila del Coenzima Q10 che, dotato di un'elevata capacità antiossidante, neutralizza i radicali perossidici bloccando la perossidazione lipidica che distrugge le membrane. La via FSP1-CoQ10-NAD(P)H costituisce quindi una linea di difesa autonoma e parallela a quella guidata da GPX4 e dal glutathione, sopprimendo la perossidazione dei fosfolipidi indipendentemente dai livelli di espressione di GPX4 [16]. Infatti, studi preclinici dimostrano che l'elevata espressione di FSP1 riduce drasticamente l'accumulo di specie reattive indotto da molecole come RSL3, garantendo la sopravvivenza di diversi tipi di linee di cellule tumorali anche in totale assenza di GPX4 [15]. Coerentemente, studi clinici dimostrano che FSP1 è iperespresso in numerosi tipi di tumori e i suoi elevati livelli di espressione correlano generalmente con una prognosi sfavorevole. Di conseguenza, l'inibizione farmacologica di FSP1 si prospetta come una valida strategia per sensibilizzare le cellule tumorali alla ferroptosi, potenziando l'efficacia degli inibitori di GPX4. L'attuabilità di questa potenziale terapia di combinazione è limitata dalla tollerabilità degli inibitori di FSP1. Essendo ampiamente espresso, per evitare di colpire i tessuti sani sarà necessario progettare strategie per un trasporto specifico nelle cellule tumorali. Questi approcci potrebbero quindi essere combinati con trattamenti antineoplastici convenzionali o con inibitori dei checkpoint immunitari (ICI), migliorandone l'efficacia clinica [17].

Oltre a FSP1, un secondo sistema antiossidante indipendente da GPX4 è rappresentato dagli enzimi appartenenti alla famiglia delle aldo-keto reduttasi 1C (AKR1C1-4). Le aldo-keto reduttasi della famiglia 1 (AKR1) sono enzimi NAD(P)H-dipendenti che catalizzano la riduzione di aldeidi e chetoni ai corrispondenti alcoli. Nello specifico, i membri della sottofamiglia AKR1C, in particolare AKR1C1, contrastano la ferroptosi grazie alla loro

capacità di detossificare i prodotti secondari della perossidazione lipidica, tra cui la 4-idrossinonenale (4-HNE). La sovraespressione di AKR1C1 promuove la rapida eliminazione di tali aldeidi reattive generate dalla degradazione dei PUFA, limitando la propagazione della reazione a catena e il conseguente danno citotossico [18]. Infine, l'espressione aberrante degli enzimi AKR1C è stata frequentemente correlata all'insorgenza di fenomeni di chemioresistenza e alla progressione tumorale in diversi quadri patologici. La capacità di questi enzimi di modulare lo stress ossidativo li rende bersagli molecolari promettenti per sensibilizzare le cellule alla ferroptosi, superare le resistenze terapeutiche e ripristinare la risposta ai trattamenti antitumorali [19].

1.3 Manifestazione clinica e classificazione del MPM

Le alterazioni dei meccanismi di morte cellulare e l'insorgenza di resistenze ai sistemi antiossidanti trovano un riscontro di notevole rilevanza traslazionale nello studio di specifiche neoplasie ad alta aggressività, tra le quali spicca il Mesotelioma Pleurico Maligno (MPM). Dal punto di vista eziologico, l'insorgenza dell'MPM è fortemente legata all'esposizione professionale o ambientale alle fibre di amianto (o asbesto) [20]. Una delle caratteristiche cliniche più complesse di questa patologia è rappresentata dal suo lungo periodo di latenza, che può estendersi dai 20 fino ai 50 anni tra la prima esposizione alle fibre minerali e la comparsa dei sintomi clinici [21].

La manifestazione clinica più frequente è la dispnea progressiva, generalmente conseguente a versamento pleurico e talvolta associata a dolore toracico. Altri sintomi che possono accompagnare il quadro clinico comprendono tosse non produttiva, febbre, astenia, ipossiemia e calo ponderale [22]. Nel 95% dei casi la malattia si presenta in forma unilaterale, con un interessamento prevalente dell'emittoce destro, mentre un versamento bilaterale lo si riscontra solo nel 5% dei casi [21].

L'esordio della sintomatologia è generalmente graduale e aspecifico, con un intervallo di tempo compreso tra 3 e 6 mesi dalla comparsa dei primi sintomi alla diagnosi effettiva. Tale ritardo prognostico comporta frequentemente l'identificazione della malattia in uno stadio avanzato e una prognosi sfavorevole. L'assenza di un metodo di screening efficace per l'identificazione precoce del MPM rappresenta quindi uno dei principali ostacoli ad una

diagnosi tempestiva [22]. La raccolta e analisi istologica di una biopsia della pleura rappresenta il metodo diagnostico d'elezione, caratterizzato da elevata sensibilità [23].

Dal punto di vista istologico il MPM viene classificato in tre principali sottotipi: epitelioide, sarcomatoide e bifasico (o misto). Il sottotipo epitelioide rappresenta la forma più frequente, essendo riscontrato in circa il 50% dei casi, ed è associato alla prognosi più favorevole. Il sottotipo sarcomatoide, che costituisce approssimativamente il 15% dei casi, è invece caratterizzato da un comportamento biologico più aggressivo ed è correlato alla prognosi peggiore [20].

Il mesotelioma pleurico maligno epitelioide (EMM) è caratterizzato da una proliferazione diffusa e infiltrante di cellule con morfologia epitelioide sulla superficie pleurica ed è noto per la sua elevata eterogeneità morfologica [24].

Il mesotelioma pleurico maligno sarcomatoide (SMM) è invece caratterizzato dalla presenza di cellule fusiformi allungate, organizzate in fasci o in una disposizione disordinata. Tali cellule possono presentare diversi gradi di atipicità citologica, da lieve a marcata [22].

Il mesotelioma pleurico maligno bifasico (BMM) è definito dalla presenza di almeno il 10% sia della componente epitelioide sia di quella sarcomatoide. Questo sottotipo rappresenta circa il 10-15% di tutti i casi di MPM ed è associato ad una prognosi intermedia tra quella del sottotipo epitelioide e quella del sottotipo sarcomatoide. Alcuni studi suggeriscono che la percentuale della componente sarcomatoide costituisca un importante fattore prognostico.

È infatti noto che i pazienti affetti da EMM possono beneficiare del trattamento chirurgico, mentre nel SMM la chirurgia non determina un significativo miglioramento della sopravvivenza. Alla luce di queste evidenze è stato ipotizzato che la proporzione della componente epitelioide nel BMM possa influenzare la prognosi e, di conseguenza, orientare le scelte terapeutiche [24].

1.4 Patogenesi del MPM

La patogenesi del mesotelioma è il risultato di un processo complesso e multifattoriale, nel quale l'esposizione all'amianto rappresenta il principale fattore eziologico nella stragrande maggioranza dei casi. L'amianto comprende un gruppo di silicati idrati classificati in due principali categorie strutturali: gli anfiboli e i serpentinei. Tra gli anfiboli rientrano l'amosite e

la crocidolite, quest'ultima considerata la varietà dotata del maggior potenziale cancerogeno. Il crisotilo rappresenta invece l'unico esponente del gruppo dei serpentini ed è associato a una minore attività cancerogena rispetto agli anfiboli [25] (*Figura 2*).

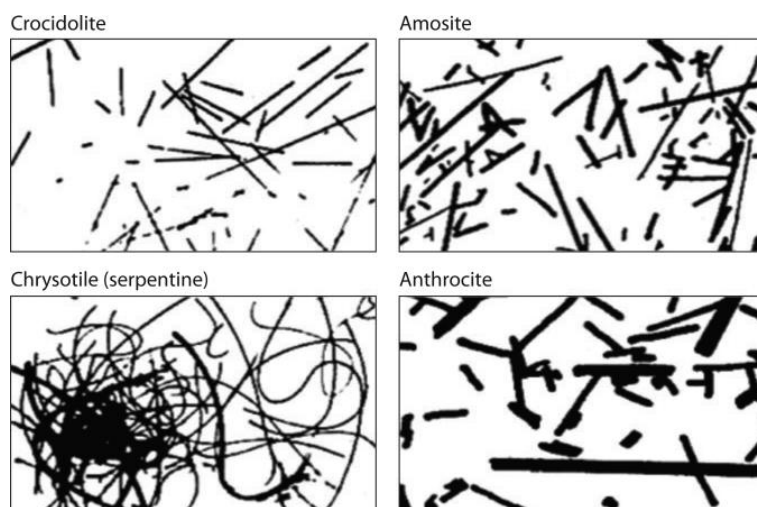


Figura 2: Tipologie di fibre di amianto. Riprodotto da Liu G, Cheres P, Kamp DW. Molecular basis of asbestos-induced lung disease. *Annu Rev Pathol.* 2013 Jan 24;8:161-87. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-163942. PMID: 23347351; PMCID: PMC3900296 [26].

Il bersaglio principale delle fibre di amianto inalate è il mesotelio pleurico, un tessuto che riveste i polmoni. Nello specifico, dal punto di vista anatomico, la pleura parietale è costituita da uno strato continuo di cellule mesoteliali aderente alla parete toracica, mentre i polmoni sono rivestiti dalla pleura viscerale, formata da un monostrato di cellule mesoteliali strettamente connesso al parenchima polmonare. La stretta aderenza anatomica tra queste due membrane fa sì che la pleura parietale e quella viscerale siano separate solo da un sottile spazio virtuale, la cavità pleurica, all'interno del quale è presente una minima quantità di liquido pleurico con funzione lubrificante per ridurre l'attrito durante gli atti respiratori [27]. La pericolosità delle fibre di amianto è strettamente correlata alle loro caratteristiche morfologiche e chimico-fisiche: le fibre più lunghe e sottili risultano le più patogene, poiché tendono a persistere più a lungo nei tessuti e a penetrare più profondamente nel parenchima polmonare [28].

Una volta inalate, le fibre migrano e traslocano attraverso le vie respiratorie inferiori fino a raggiungere l'interstizio polmonare [29].

Successivamente, esse vengono veicolate nello spazio pleurico prevalentemente mediante il drenaggio linfatico e, in misura minore, attraverso il circolo ematico. La biopersistenza delle fibre a livello della pleura determina l'innescò di una risposta irritativa e infiammatoria cronica, caratterizzata da continui cicli di lesione e riparazione tissutale [28, 30].

Nel tentativo di eliminare i corpi estranei, i macrofagi alveolari e le stesse cellule mesoteliali fagocitano le fibre di amianto. Tuttavia, a causa delle dimensioni delle fibre e della loro resistenza alla degradazione enzimatica, la fagocitosi risulta incompleta e frustrata. Questo fenomeno provoca svariati effetti citotossici, tra cui l'aumento dello stress ossidativo intracellulare, danni diretti al DNA, alterazioni della progressione del ciclo cellulare e il rilascio massivo di specie reattive dell'ossigeno (ROS), specie reattive dell'azoto (RNS) e citochine pro-infiammatorie.

Nel tentativo di rispondere a tale insulto, i macrofagi rilasciano citochine come il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), il quale attiva la via di segnalazione del fattore nucleare κ B (NF- κ B) nelle cellule mesoteliali. In condizioni fisiologiche, le cellule che accumulano alterazioni genomiche andrebbero incontro ad apoptosi; tuttavia, la prolungata attivazione di NF- κ B mediata dal TNF- α inibisce la morte cellulare, favorendo la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule mesoteliali danneggiate dall'amianto e rappresentando uno dei principali driver della trasformazione neoplastica [28].

Infine, le fibre di crocidolite e amosite sono caratterizzate, oltre che da un'elevata biopersistenza, anche da un significativo contenuto di ferro strutturale. Questo metallo svolge un ruolo chiave nella catalisi delle reazioni ossidative a livello tissutale: attraverso le reazioni di Fenton e Haber-Weiss, il ferro presente sulle fibre incrementa drasticamente la conversione del perossido di idrogeno nel radicale ossidrilico ($\cdot$ OH), una potente molecola ossidante e citotossica. Lo stress ossidativo cronico così generato attiva cascate di segnalazione intracellulare come quelle mediate dalle MAPK, da AP-1 e da NF- κ B, le quali inducono l'espressione di proto-oncogeni quali c-Jun e c-Fos. La persistente attivazione di questi pathway trascrizionali consolida il microambiente pro-oncogenico, guidando progressivamente le cellule mesoteliali verso la trasformazione neoplastica [26].

1.5 Il microambiente tumorale (TME) del MPM

L'eziopatologia del MPM è strettamente correlata alla formazione di un infiltrato immunitario, che si sviluppa in seguito al danno cronico indotto dalle fibre di amianto. E al background genetico, che definisce la predisposizione individuale allo sviluppo del mesotelioma.

Il TEM è costituito da un sistema complesso ed eterogeneo formato da cellule stromali, tra cui cellule endoteliali e immunitarie, molecole solubili e proteine strutturali della matrice extracellulare (ECM). La composizione e le caratteristiche del TME possono variare considerevolmente tra i pazienti e in funzione del sottotipo istologico. Numerosi studi hanno evidenziato un'aumentata espressione dei geni coinvolti nella produzione e nel rimodellamento della ECM, soprattutto nelle varianti istologiche bifasica e sarcomatoide. Sebbene le cellule della linea linfoide e mieloide rappresentino una componente rilevante del TME del MPM, la composizione dell'infiltrato immunitario differisce tra i diversi sottotipi istologici. Il mesotelioma epitelioide è generalmente caratterizzato da un TME con una più elevata presenza di cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC), linfociti B, linfociti T helper CD4⁺ e linfociti CD8⁺ infiltranti il tumore (TIL) "esauriti". Al contrario, le varianti non epitelioide presentano un TME prevalentemente arricchito in macrofagi, linfociti T regolatori (Treg) e neutrofili [31]. I sottotipi istologici non epitelioide sono quindi generalmente caratterizzati da un fenotipo fortemente immunosoppressivo, associato a una prognosi meno favorevole e a una ridotta sopravvivenza dei pazienti [32].

I macrofagi rappresentano una componente fondamentale del TME e, quando infiltrano il tessuto neoplastico, vengono definiti macrofagi associati al tumore (TAM). In base al loro stato di attivazione, i TAM possono essere distinti in due principali fenotipi: i macrofagi M1, caratterizzati da un'attività prevalentemente immunomodulante e antitumorale, e i macrofagi M2, che producendo citochine anti-infiammatorie e diversi fattori di crescita creano un ambiente immunosoppressivo e pro-angiogenico che favorisce la crescita tumorale [33]. Le cellule di MPM sono in grado di secernere elevate quantità della chemochina CCL2, un potente fattore chemotattico per i monociti che ne favorisce l'accumulo nel TEM [34]. Nel MPM, i TAM presentano prevalentemente un fenotipo M2-like, la cui polarizzazione è

regolata da diverse citochine prodotte principalmente dai linfociti infiltranti il tumore. L'aumento di macrofagi polarizzati M2, che producono grosse quantità di fattori immunosoppressivi come IL-10 e TGF- sostiene la creazione di un TME favorevole all'evasione da parte della sorveglianza immunitaria [31, 34].

Oltre ai TAM, anche le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) costituiscono una popolazione di cellule mieloidi immature dotate di una marcata attività immunosoppressiva. Le MDSC promuovono la crescita neoplastica stimolando l'angiogenesi e inibendo la risposta immunitaria antitumorale. In virtù della loro attività immunosoppressiva le MDSC costituiscono uno dei principali fattori responsabili della ridotta efficacia dell'immunoterapia e della resistenza primaria e secondaria al trattamento agli ICI [35].

Per quanto riguarda la componente linfoide, i linfociti T CD3+ rappresentano la seconda popolazione di cellule immunitarie più abbondanti nel microambiente del MPM, costituendo mediamente il 20-42% dell'infiltrato immunitario tumorale. Tra questi, i linfociti T helper CD4+ promuovono l'attivazione e la funzione dei linfociti T citotossici CD8+ infiltranti il tumore e delle cellule natural killer (NK) [31]. Al contrario, i linfociti Treg esercitano un effetto inibitorio sia sui linfociti T helper CD4+ sia sui linfociti T citotossici CD8+, attenuando la risposta immunitaria antitumorale [33]. Inoltre, l'esposizione alle fibre di amianto può compromettere selettivamente la funzione delle cellule NK, contribuendo ulteriormente all'alterazione della risposta immunitaria e alla patogenesi del MPM. [36]

Infine, le cellule dendritiche (DC) rappresentano le principali cellule presentanti l'antigene (APC). Nello stato immaturo esse catturano ed elaborano gli antigeni, inclusi quelli di origine tumorale; successivamente, in seguito a maturazione, migrano nei linfonodi dove presentano gli antigeni ai linfociti T naive. Nei pazienti affetti da MPM, rispetto ai soggetti sani, è stata osservata una riduzione del numero di DC circolanti, suggerendo una compromissione della presentazione dell'antigene e dell'attivazione della risposta immunitaria antitumorale [37].

Nel complesso, il MPM emerge essere un tumore immunologicamente "freddo", le cellule immunitarie infiltranti sono scarse, disfunzionali e dotate di proprietà immunosoppressive. Evidenze sempre più numerose indicano, però, una marcata variabilità sia tra pazienti diversi

sia all'interno dello stesso tumore. Questa eterogeneità influenza il comportamento biologico del tumore, la prognosi e la risposta alle diverse strategie terapeutiche. Di conseguenza, una comprensione più approfondita dei meccanismi molecolari e cellulari responsabili delle differenze tra i sottotipi epitelioide e non epitelioide, ma anche all'interno dello stesso sottotipo rappresenta un presupposto fondamentale per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici.

1.6 Le terapie per il MPM

L'attuale approccio terapeutico al MPM è prevalentemente orientato a finalità palliative, con l'obiettivo principale di controllare la progressione della malattia, alleviare la sintomatologia e migliorare la qualità di vita dei pazienti [38]. Nei casi in cui sia applicabile, l'approccio terapeutico prevede una strategia trimodale che integra il trattamento chirurgico, la chemioterapia (impiegata in ambito neoadiuvante o adiuvante) e la radioterapia [22]. Tuttavia, la chirurgia rappresenta un'opzione praticabile solo per una quota limitata di pazienti. La complessità anatomica delle procedure chirurgiche dovute alla sede anatomica, lo stadio, spesso avanzato della patologia e la diagnosi in pazienti anziani con comorbidità, situazioni che rendono la neoplasia non resecabile [38, 39].

Nei pazienti con MPM resecabile, le principali opzioni chirurgiche comprendono la toracosopia con pleurodesi, la pleurectomia/decorticazione (P/D) e la pneumectomia extrapleurica (EPP), la cui scelta dipende dall'estensione della malattia, dalle condizioni generali del paziente e dagli obiettivi terapeutici [22]. L'EPP è un intervento ad elevata morbidità che prevede la resezione in blocco del polmone omolaterale, della pleura parietale e viscerale, del diaframma e del pericardio. La P/D, al contrario, consiste nell'asportazione completa della sola pleura parietale e viscerale con l'obiettivo di rimuovere la malattia macroscopicamente visibile preservando il parenchima polmonare [39].

Va sottolineato che i pazienti con istotipo non epitelioide (sarcomatoide o bifasico) mostrano esiti clinici e sopravvivenza nettamente inferiori in seguito a intervento chirurgico rispetto a quelli con istotipo epitelioide [40]. Per la maggior parte dei pazienti non candidabili alla

chirurgia, il trattamento si basa quindi sulla terapia sistemica e sulla radioterapia con intenti prevalentemente palliativi [38, 41].

Per lungo tempo, il regime di prima linea standard per il MPM epitelioide è stato rappresentato dalla combinazione di Pemetrexed e cisplatino (o carboplatino nei pazienti anziani o con tossicità rilevanti al cisplatino) [29]. Una svolta fondamentale nel trattamento dei pazienti con MPM non resecabile si è avuta a partire da Settembre 2022, quando è stata approvata l'immunoterapia di combinazione basata su ipilimumab (inibitore del checkpoint immunitario CTLA-4) e nivolumab (inibitore di PD-1). Questo schema terapeutico è diventato lo standard di prima linea in particolare per i pazienti con istologia non epitelioide (bifasica e sarcomatoide), storicamente caratterizzata da maggiore aggressività e chemioresistenza. L'indicazione deriva dai risultati dello studio randomizzato di fase III CheckMate 743, che ha dimostrato una superiorità significativa della doppietta immunoterapica rispetto alla chemioterapia standard, con un aumento della sopravvivenza globale mediana da 16,7 a 18,2 mesi [40, 42]. I dati di follow-up a 5 anni dello studio CheckMate 743 hanno confermato la durata del beneficio clinico: nei pazienti con istotipo epitelioide la sopravvivenza globale (OS) a 5 anni è risultata del 14% con immunoterapia contro l'8% con chemioterapia, mentre nei pazienti con istologia non epitelioide i tassi di OS a 5 anni sono stati rispettivamente del 12% e dell'1% [43].

Ciononostante, molti pazienti sono resistenti, per cui c'è un'urgente necessità di identificare biomarcatori predittivi in grado di selezionare preventivamente i pazienti che trarranno reale beneficio dai checkpoint immunitari [44].

In caso di progressione della malattia dopo l'immunoterapia, la gestione delle seconde linee rappresenta un'ulteriore sfida clinica, basandosi prevalentemente sul riuso di regimi chemioterapici a base di Pemetrexed e platino, oppure sulla somministrazione di vinorelbina o gemcitabina [38, 45].

Nonostante i recenti progressi legati all'introduzione dell'immunoterapia, il MPM rimane quindi una patologia dalla prognosi infausta, caratterizzata da un'elevata resistenza primaria ed acquisita ai farmaci tradizionali [21].

Si rende pertanto indispensabile lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche integrate. In questo scenario, la modulazione della ferroptosi emerge come un approccio estremamente

promettente: evidenze recenti indicano che l'induzione della ferroptosi possa agire in modo sinergico con l'immunoterapia, sensibilizzando le cellule tumorali e potenziando la risposta immunitaria antitumorale per superare le attuali resistenze farmacologiche [46] (Figura 3).

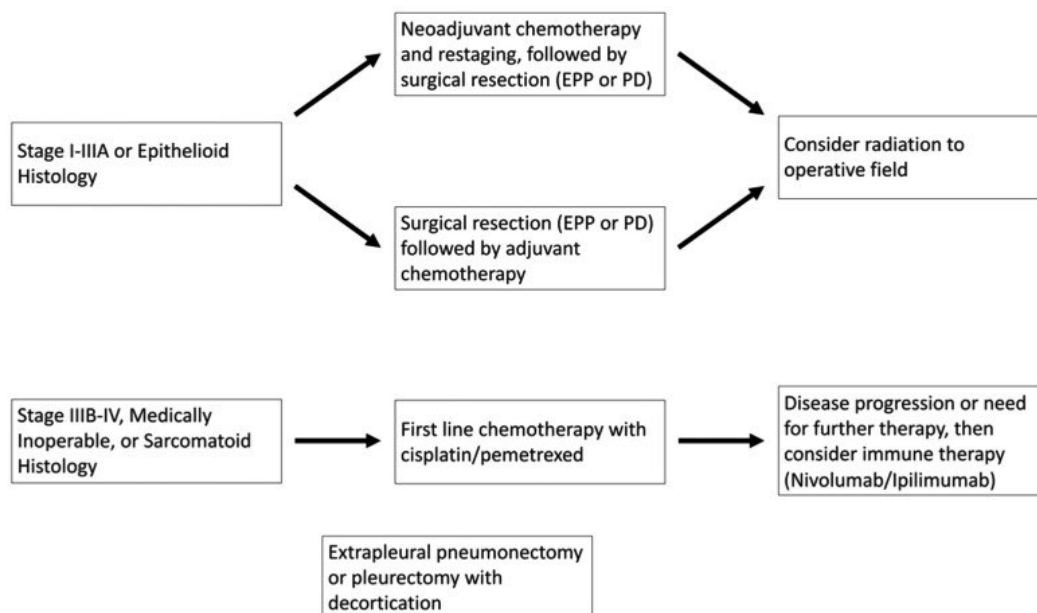


Figura 3: Diagramma che riassume l'attuale regime di trattamento del MPM. Criteri attualmente utilizzati per la scelta del percorso terapeutico per il MPM. EPP, pneumonectomia extrapleurica; PD, pleurectomia con decorticazione. Riprodotto da Tedesco J, Jaradeh M, Vigneswaran WT. Malignant Pleural Mesothelioma: Current Understanding of the Immune Microenvironment and Treatments of a Rare Disease. *Cancers (Basel)*. 2022 Sep 11;14(18):4415. doi: 10.3390/cancers14184415. PMID: 36139575; PMCID: PMC9496741 [20].

1.7 Risposta immunitaria associata alla ferroptosi

Negli ultimi anni, la crescente comprensione del ruolo del sistema immunitario nel controllo della progressione tumorale ha favorito lo sviluppo di nuove strategie immunoterapiche. In questo contesto, è stato proposto un approccio terapeutico innovativo basato sulla capacità di alcuni agenti antitumorali di indurre contemporaneamente la morte delle cellule neoplastiche e l'attivazione della risposta immunitaria antitumorale. Tale effetto è mediato dal rilascio, da parte delle cellule tumorali morenti, di specifici segnali molecolari noti come Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP), che promuovono il reclutamento e la maturazione

delle DC. Queste ultime, a loro volta, attivano i linfociti T citotossici, favorendo l'eliminazione delle cellule tumorali residue e garantendo una protezione immunitaria a lungo termine. Questo processo prende il nome di morte cellulare immunogenica (ICD) [47].

La ferroptosi è una forma di morte cellulare regolata non apoptotica con caratteristiche proprie della ICD. Nelle fasi precoci della ferroptosi la perdita dell'integrità della membrana è accompagnata dal rilascio di DAMP come la proteina HMGB1, l'ATP e la calreticulina (CRT), che svolgono un ruolo fondamentale nell'attivazione della risposta immunitaria anti-tumorale [48, 49]. Oltre a colpire le cellule neoplastiche, i farmaci in grado di indurre la ferroptosi possono esercitare effetti diretti anche sul TME, modulando l'attività delle diverse popolazioni di cellule immunitarie infiltranti o inducendone l'eliminazione. Diverse evidenze indicano che i macrofagi M2 siano particolarmente sensibili alla ferroptosi. Inoltre, i metaboliti e i DAMP rilasciati dalle cellule ferroptotiche possono stimolare la risposta delle cellule immunitarie infiltranti e favorire la riprogrammazione dei TAM dal fenotipo pro-tumorale M2 verso un fenotipo M1 anti-tumorale. Nel complesso, questi effetti suggeriscono che gli induttori della ferroptosi possano modulare il TME, riducendo la presenza di macrofagi immunosoppressivi M2 e favorendo l'accumulo di cellule mieloidi con attività effettrice e immunostimolante.

Studi preclinici hanno dimostrato inoltre che la delezione genetica di GPX4 nelle cellule Treg determina un eccessivo accumulo di perossidi lipidici e l'induzione della ferroptosi in questa specifica popolazione immunosoppressiva, con conseguente inibizione della crescita tumorale e potenziamento della risposta immunitaria antitumorale [50]. D'altra parte, GPX4 svolge un ruolo importante anche nella detossificazione e nel mantenimento dell'omeostasi dei linfociti T citotossici CD8+, per cui, la sua inibizione indesiderata in queste cellule compromette la risposta citotossica e mette in luce l'importanza di sviluppare strategie capaci di colpire selettivamente le cellule tumorali [51].

Oltre a rappresentare un bersaglio degli induttori della ferroptosi, è stato dimostrato che gli stessi linfociti T CD8+ attivati sono in grado di promuovere la perossidazione lipidica nelle cellule neoplastiche, contribuendo all'efficacia antitumorale dell'immunoterapia. I linfociti T CD8+ esercitano la loro attività citotossica sia attraverso il rilascio di perforina e granzimi,

sia mediante la via Fas/FasL. Inoltre, l'interferone-gamma (IFN- γ) secreto da queste cellule sopprime l'espressione di SLC3A2 e SLC7A11, limitando l'assorbimento della cistina da parte delle cellule tumorali e favorendo, di conseguenza, l'accumulo di ROS lipidici e l'induzione della ferroptosi [52].

Nel complesso, le evidenze disponibili indicano che l'associazione tra induttori della ferroptosi e immunoterapia rappresenta una strategia terapeutica particolarmente promettente e meritevole di ulteriori approfondimenti. L'induzione selettiva della ferroptosi nelle cellule tumorali potrebbe favorire il rilascio di antigeni tumorali e DAMP, contribuendo alla rimodulazione del TME e al potenziamento della risposta immunitaria antitumorale. Parallelamente, le immunoterapie potrebbero amplificare e sostenere indirettamente l'induzione della ferroptosi nelle cellule neoplastiche. L'interazione tra questi due meccanismi potrebbe generare un effetto sinergico, con un incremento dell'efficacia antitumorale complessiva e potenziali benefici clinici rispetto all'impiego dei singoli trattamenti in monoterapia.

2. Scopo del lavoro

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) continua a rappresentare una delle neoplasie con prognosi più sfavorevole, a causa della diagnosi tardiva, dell'elevata aggressività biologica e della resistenza alle terapie attualmente disponibili. Per i pazienti con sottotipo epitelioide, il beneficio clinico dell'immunoterapia non è chiaramente superiore alla chemioterapia standard, mentre per i sottotipi istologici non epitelioidei (sarcomatoide e bifasico), altamente aggressivi e refrattari alla chemioterapia che all'immunoterapia, la combinazione ipilinumab con nivolumab ha migliorato le prospettive di vita dei pazienti, portandole al livello di quelli con tumore di sottotipo epitelioide. Ne consegue che, per tutti i pazienti con MPM, la malattia continua ad avere un esito fatale e l'identificazione di nuove strategie terapeutiche capaci di portare un beneficio clinico significativo sia come monoterapia che in combinazione con l'immunoterapia è necessità insoddisfatta.

Negli ultimi anni, la ferroptosi è emersa come una vulnerabilità delle cellule tumorali sfruttabile terapeuticamente per colpire anche le cellule resistenti ai tipi farmaci chemioterapici. Sulla base di queste premesse, studi preliminari condotti dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che l'inibizione di GPX4 causa la morte ferroptotica di diverse linee cellulari umane di MPM, con una sensibilità variabile a seconda dell'istotipo di origine. Alla luce di queste premesse, il presente lavoro di tesi si propone di identificare i meccanismi molecolari alla base della sensibilità alla ferroptosi nei diversi istotipi di MPM al fine di sviluppare strategie che, neutralizzando inibitori cruciali del processo di morte ferroptotica, possano aumentare l'efficacia dell'inibizione di GPX4 gettando le basi per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

3. Risultati e discussione

3.1 Linee cellulari di mesotelioma umano mostrano una sensibilità alla ferroptosi isotipo-dipendente

Studi preliminari condotti dal nostro gruppo di ricerca hanno valutato la risposta di cellule di MPM umano a RSL3, un agente pro-ferroptotico che inibendo la glutatione perossidasi 4 (GPX4), favorisce lo stress ossidativo e la conseguente morte cellulare. L'analisi citofluorimetrica delle cellule di MPM trattate con concentrazioni crescenti di RSL3 (1-10 μ M) ha mostrato una riduzione significativa della vitalità cellulare (cellule FDA⁺/7-AAD⁻) in tutte e tre le linee di MPM (*Figura 4*). Confrontando le tre linee, è stata notata una sensibilità a RSL3 crescente tra cellule epitelioidi (NCI-H2452), bifasiche (MSTO-211H) e sarcomatoidi (NCI-H2052). Nello specifico, la linea epitelioide NCI-H2452 (*Figura 4*), che è risultata essere la più resistente, ha dimostrato una riduzione della vitalità (circa il 20%) solo in risposta a concentrazioni più elevate (5 μ M) di RSL3. La linea bifasica MSTO-211H (*Figura 4*) ha presentato una sensibilità intermedia, con una riduzione significativa della vitalità già a partire da 2,5 μ M di RSL3, mentre la linea sarcomatoide NCI-H2052 (*Figura 4*) è risultata la più vulnerabile al trattamento, raggiungendo una riduzione della vitalità di circa il 60% già alla concentrazione di 1 μ M.

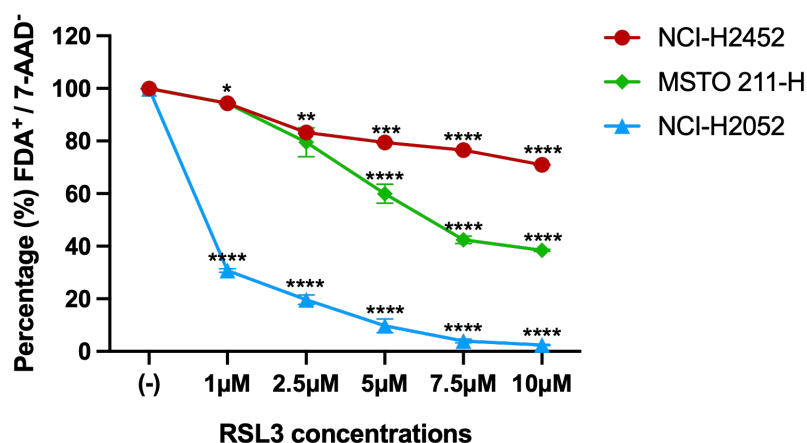


Figura 4: RSL3 riduce la vitalità di cellule di MPM umane. La vitalità delle linee NCI-H2452, MSTO-211H e NCI-H2052 è stata valutata dopo 24 ore di trattamento con RSL3 (1–10 μ M) o veicolo (DMSO 0,1%) mediante colorazione con FDA e 7-AAD analisi al FACS. I risultati sono espressi come percentuale di vitalità relativa rispetto al controllo non trattato

(CTR) e riportati come media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti. (* $p < 0,05$, $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ RSL3 rispetto a CTR; one-way ANOVA).

Per verificare che la citotossicità indotta da RSL3 effettivamente riconducibile a una via di morte ferroptotica, è stato analizzato se il trattamento inducesse la perossidazione lipidica delle membrane. L'aumento dell'intensità media di fluorescenza (MFI) delle cellule marcate con la sonda fluorescente BODIPY 581/591 C11 indica che l'inibizione di GPX4 porta a un accumulo significativo di lipidi perossidi (lipidROS) in tutte le linee cellulari di MPM (Figura 5). In linea con la loro diversa sensibilità alla ferroptosi, la quantità di lipidROS è risultata maggiore nelle cellule di MPM sarcomatoide NCI-H2052 (Figura 5C) e bifasico MSTO-211H (Figura 5B), rispetto a quelle di MPM epitelioide NCI-H2452 (Figura 5A). Per tutte le linee cellulari, la co-somministrazione della Ferrostatina-1 (Fer-1, 10 μ M), una Ossola molecola antiossidante sintetica in grado di neutralizzare la perossidazione lipidica [53], ha protetto le cellule dall'accumulo dei lipidROS (Figura 5) e della morte (Figura 6). Infatti, l'analisi citofluorimetrica delle cellule FDA+/7-AAD- ha dimostrato che il co-trattamento con RSL3 (2,5 μ M e 5 μ M) e Fer-1 (10 μ M) protegge tutte le linee cellulari di MPM dalla morte indotta dall'inibizione di GPX4 (Figura 6).

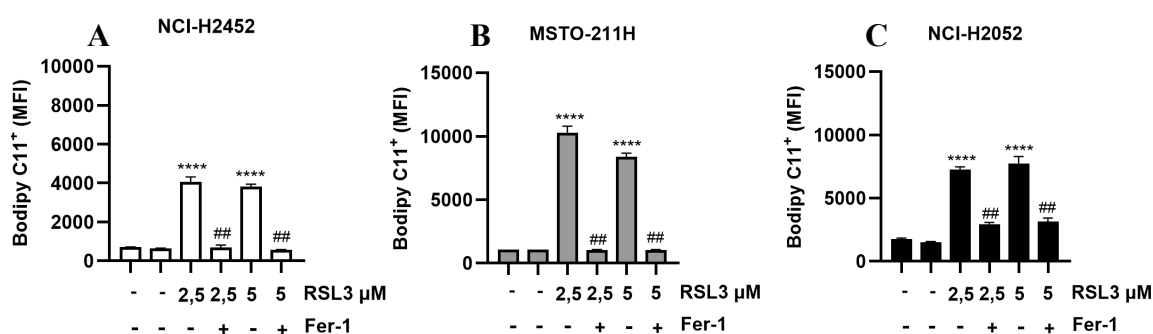


Figura 5: RSL3 induce accumulo di radicali lipidici in cellule di MPM umane. La perossidazione lipidica delle linee cellulari NCI-H2452 (A), MSTO- 211H (B) e NCI-H2052 (C) è stata valutata mediante sonda BODIPY 581/591 C11 e analisi citofluorimetrica (FACS) dopo 4 ore di trattamento con RSL3 (2,5 e 5 μ M) in presenza o assenza di Fer-1 (10 μ M) o veicolo (DMSO 0,1%). I risultati sono espressi come Intensità Media di Fluorescenza (MFI) rispetto al controllo (CTR) e riportati come media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti.

(* $p < 0,05$, $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ RSL3 rispetto a CTR; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ RSL3 + Fer-1 rispetto a RSL3; one-way ANOVA).

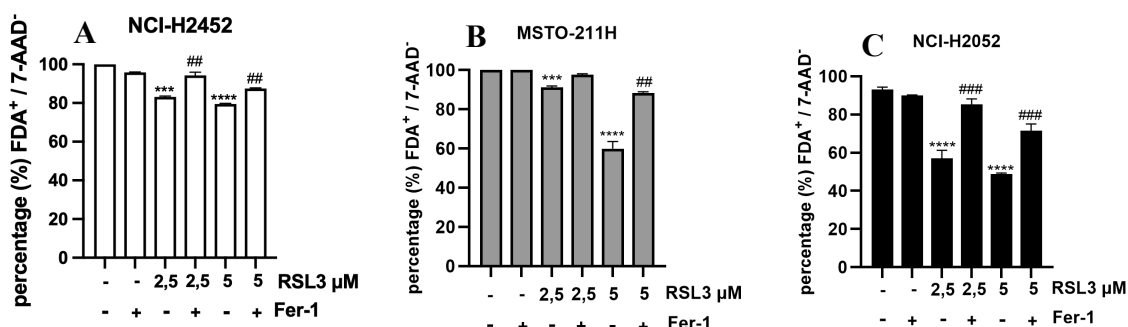


Figura 6: La ferrostatina è in grado di revertire l'effetto di RSL3 ristabilendo la vitalità cellulare. La vitalità cellulare delle linee cellulari NCI-H2452 (A), MSTO-211H (B) e NCI-H2052 (C) è stata valutata mediante colorazione FDA/7-AAD e analisi FACS dopo 24 ore di trattamento con RSL3 (2,5 e 5 μ M) in presenza o assenza di Fer-1 (10 μ M) o veicolo (DMSO 0,1%). I risultati sono espressi come percentuale di vitalità relativa rispetto al controllo (CTR) e riportati come media SD di tre esperimenti indipendenti. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ RSL3 rispetto a CTR; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ RSL3 + Fer-1 rispetto a RSL3; one-way ANOVA).

Nel loro insieme, questi risultati dimostrano che RSL3 induce le cellule di MPM a morire per ferroptosi con una sensibilità variabile tra le tre diverse linee. Questa variabilità suggerisce che l'istotipo di origine possa avere una vulnerabilità intrinseca alla ferroptosi e giustifica l'interesse verso la comprensione dei meccanismi molecolari che la regolano. Per queste ragioni, gli studi condotti durante il mio progetto di tesi hanno esplorato le basi molecolari della sensibilità alla ferroptosi in modelli cellulari di MPM epiteloide, bifasico e sarcomatoide con lo scopo finale di identificare strategie capaci di potenziare l'efficacia di RSL3 nelle cellule più resistenti.

3.2 Il profilo trascrizionale di FSP1, AKR1C1-4 e GPX4 varia nelle diverse linee di MPM umano

Per valutare se la maggior resistenza della linea epitelioide NCI-H2452 alla ferroptosi fosse riconducibile a una maggior capacità di contrastare lo stress ossidativo, abbiamo analizzato i livelli di espressione dei geni che codificano per i principali sistemi anti-ossidanti cellulari. In primo luogo, abbiamo valutato i livelli del trascritto di GPX4, che oltre a essere il bersaglio molecolare primario di RSL3, è il principale enzima selenio-dipendente deputato alla riduzione diretta degli idroperossidi lipidici all'interno delle membrane. Usando come substrato il glutathione ridotto (GSH), GPX4 converte gli idroperossidi lipidici nei corrispondenti alcoli non citotossici [54]. I risultati ottenuti attraverso PCR quantitativa hanno dimostrato che la linea epitelioide NCI-H2452 esprime livelli di GPX4 significativamente più elevati rispetto alle altre due linee cellulari sia in condizioni basali che in seguito a esposizione a RSL3 (2,5 μ M) (*Figura 7A*).

In seguito abbiamo analizzato i livelli di FSP1, una flavoproteina ad attività CoQ-riduttasi localizzata sulla membrana plasmatica che, utilizzando NAD(P)H, catalizza la riduzione dell'ubichinone (CoQ10) a ubichinolo (CoQH2). L'ubichinolo agisce come antiossidante lipofilo che intrappola i radicali lipidici, bloccando la propagazione della perossidazione lipidica in modo del tutto indipendente dall'asse GPX4/GSH [16]. L'analisi trascrizionale ha evidenziato differenze marcate tra le linee: in condizioni basali, la linea epitelioide NCI-H2452 (*Figura 7B*) ha mostrato livelli di mRNA di FSP1 significativamente superiori rispetto sia alla linea bifasica MSTO-211H, sia a quella sarcomatoide NCI-H2052, che esprimono livelli di FSP1 simili tra loro. L'espressione di FSP1 aumenta dopo il trattamento con RSL3, ma i livelli di trascritto si mantengono più alti nella linea epitelioide NCI-H2452 rispetto a quelle non epitelioidi (*Figure 7*).

Successivamente, abbiamo analizzato i membri della famiglia delle aldo-cheto reduttasi (AKR1C1-4). Gli enzimi AKR1C svolgono un ruolo cruciale nella neutralizzazione dei sottoprodotti citotossici che derivano dalla perossidazione dei lipidi polinsaturi di membrana (PUFA). Durante la cascata ferroptotica, l'ossidazione dei PUFA porta alla formazione di idroperossidi lipidici instabili; la frammentazione spontanea di queste catene lipidiche ossidate genera aldeidi elettrofile altamente tossiche, quali il 4-idrossinonenale (4-HNE) e la

malondialdeide (MDA). Tali aldeidi reagiscono con le proteine e il DNA cellulare formando addotti covalenti che ne compromettono la funzione. Gli enzimi AKR1C detossificano tali prodotti, catalizzando la riduzione NADPH-dipendente del gruppo aldeidico di 4-HNE e MDA nei corrispondenti alcoli non citotossici (come il 1,4-diidrossinonene), bloccano la propagazione del danno macromolecolare [18, 55].

Sia in condizioni basali che in seguito al trattamento con RSL3, la linea epitelioide NCI-H2452 ha mostrato livelli di espressione di AKR1C1 significativamente più elevati, rispetto alle linee non-epitelioidi (MSTO-211H e NCI-H2052) (*Figura 7C*). Le tre linee hanno mostrato livelli basali di espressione di AKR1C2 comparabili, mentre in seguito a trattamento con RSL3, NCI-H2452 esprime livelli di trascritto più elevati rispetto alle MSTO-211H e alle NCI-H2052 (*Figura 7D*). AKR1C3 (*Figura 7E*) ha dimostrato un profilo di espressione analogo ad AKR1C1, ovvero i livelli del trascritto sono significativamente più alti nella linea epitelioide NCI-H2452 sia nelle cellule non trattate che dopo stimolazione con RSL3. Infine, nonostante non sia modulato da trattamento con RSL3, anche AKR1C4 è maggiormente espresso nella linea epitelioide NCI-H2452 rispetto alle MSTO-211H e alle NCI-H2052 (*Figura 7F*).

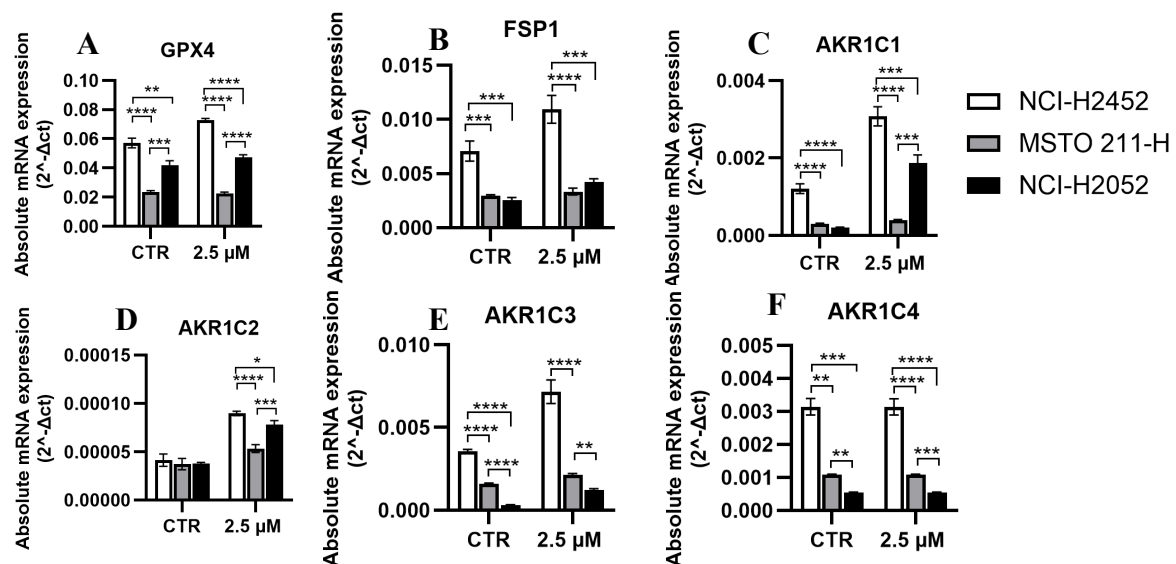


Figura 7: Profilo di espressione genica dei sistemi di difesa antiossidante in condizioni basali e in risposta a RSL3. Valutazione mediante qPCR dei livelli di mRNA di GPX4 (A), FSP1 (B), AKR1C1 (C), AKR1C2 (D), AKR1C3 (E) e AKR1C4 (F) nelle linee cellulari NCI-H2452, MSTO-211H e NCI-H2052 (in coltura 2D) trattate con veicolo (CTR: DMSO 0,1%) o

con RSL3 (2,5 μ M) per 8 ore. L'abbondanza dei trascritti è espressa come espressione relativa rispetto al gene di riferimento β -actina (2- Δ Ct)). I dati rappresentano la media $\pm$ SD di due esperimenti indipendenti. La significatività statistica indica le differenze tra le diverse linee cellulari all'interno della medesima condizione sperimentale (* $p < 0,05$, $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; one-way ANOVA).

Nel complesso, questi risultati indicano in modo consistente che la linea epitelioidale esprime livelli più alti di geni che codificano per molecole anti-ossidanti. Questo profilo suggerisce una maggior capacità di detossificare i ROS e identifica un potenziale meccanismo di resistenza ad agenti pro-ferroptotici. Nello specifico, l'espressione più elevata di GPX4, potrebbe di per se richiedere concentrazioni più alte di RSL3 per ottenere la sua inibizione, inoltre l'elevata espressione di FSP1 e di alcuni membri della famiglia AKR1C potrebbe rappresentare dei meccanismi aggiuntivi capaci di contrastare efficacemente lo stress ossidativo, quindi di proteggere le cellule dalla ferroptosi anche in caso di effettiva inibizione di GPX4.

3.3 Le cellule di MPM epitelioidale NCI-H2452 esprimono livelli più alti di molecole anti-ossidanti delle linee non epitelioidali MSTO-211H e NCI-H2052

Poiché i livelli delle proteine sono regolati anche attraverso meccanismi che intervengono a livello traduzionale e post-traduzionale abbiamo deciso di valutare se il profilo di espressione genica osservato tra le diverse linee fosse mantenuto anche a livello proteico, mediante analisi Western Blot (WB). Abbiamo innanzitutto analizzato i livelli di GPX4, cioè il bersaglio molecolare primario di RSL3. In condizioni basali (CTR), la linea epitelioidale NCI-H2452 ha mostrato un'espressione proteica di GPX4 nettamente superiore rispetto alle linee MSTO-211H (bifasica) e NCI-H2052 (sarcomatoide). Quando le cellule sono state trattate con RSL3 (2,5 μ M), le cellule NCI-H2452 hanno mostrato un ulteriore e significativo incremento della proteina GPX4, mentre i livelli dell'enzima non sono risultati modulati dal trattamento nelle cellule MSTO-211H e NCI-H2052 (Figure 8A-B). Questi risultati confermano che la linea epitelioidale esprime livelli significativamente più elevati di GPX4, sia costruttivamente che dopo trattamento con RSL3. In particolare, l'aumento della proteina, ma non del trascritto, in risposta a RSL3, suggerisce che le sole cellule epitelioidali potrebbero

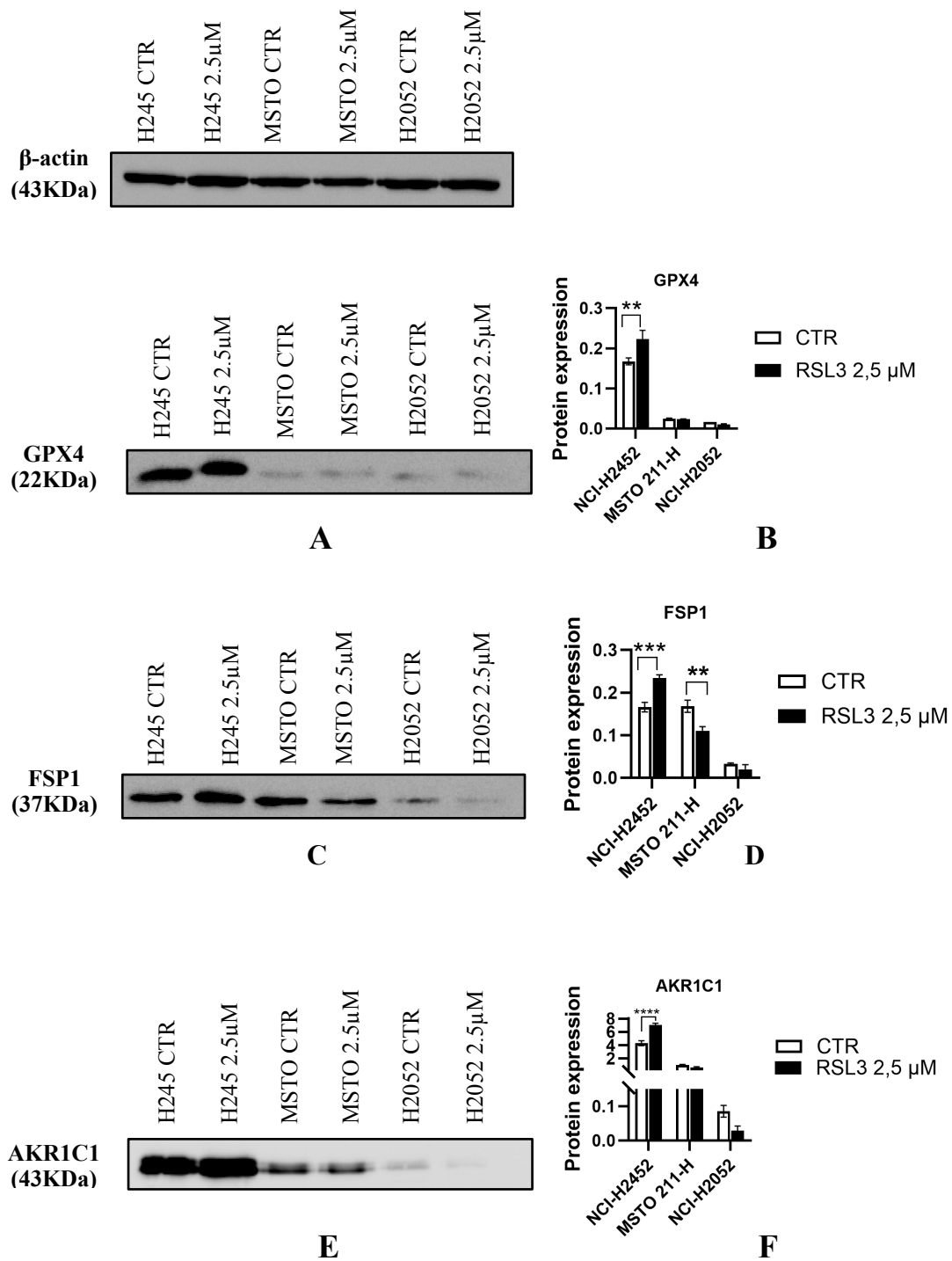
attivare dei meccanismi di regolazione post-trascrizionali che, portando a una maggior sintesi o a un minor turnover della proteina, renderebbero le stesse più capaci di contrastare lo stress ossidativo. D'altro canto, considerando che RSL3 inattiva in modo irreversibile la funzione catalitica di GPX4 [56], l'aumento dei livelli della proteina potrebbero non essere sufficienti per avere una quantità di enzima attivo tale da limitare efficacemente lo stress ossidativo. Per questo è importante integrare questi risultati con quelli dei sistemi antiossidanti GPX4-indipendenti.

I livelli della proteina FSP1 nella linea epitelioide NCI-H2452 risultano coerenti con quanto osservato a livello trascrizionale, infatti il livello basale di FSP1 è marcatamente maggiore delle altre linee. Inoltre, l'incremento di FSP1 indotto da RSL3 riflette l'aumento del trascritto suggerendo che l'attivazione dell'espressione genica sia il principale meccanismo responsabile dell'aumento della proteina. L'attivazione di questo circuito rappresenta un potenziale meccanismo finalizzato a compensare l'aumento dei lipidROS, così da ridurre lo stress ossidativo e resistere alla ferroptosi. In modo analogo, nella linea bifasica MSTO-211H e nella linea sarcomatoide NCI-H2052 i dati dell'analisi WB confermano in gran parte quelli di espressione genica, ma indicano che le cellule non-epitelioide non sono in grado di aumentare i livelli di espressione di FSP1, quindi di rispondere allo stress ossidativo potenziando i meccanismi di difesa anti-ossidanti (*Figure 8C-D*).

Nel complesso i dati ottenuti mediante WB confermano la presenza di un'elevata espressione di FSP1 nella linea epitelioide NCI-H2452 e mostrano una differente modulazione della proteina in risposta a RSL3 nelle tre linee cellulari.

Per completare il quadro dei sistemi GPX4-indipendenti, abbiamo analizzato i livelli dei membri della famiglia delle AKR, in particolare AKR1C1 ed AKR1C3, che dall'analisi di espressione genica, sono emersi essere i più espressi nella linea epitelioide e quelli maggiormente indotti dal trattamento con RSL3. I risultati confermano che entrambe le isoforme, AKR1C1 e AKR1C3 sono notevolmente più espresse nelle cellule epitelioide che nelle non epitelioide sia in condizioni basali che in seguito al trattamento con RSL3 2,5 μ M. (*Figura 8E-G*). Il profilo di espressione proteica delle isoforme AKR1C1-3 rispecchia quindi fedelmente quello trascrizionale, consolidando un fenotipo di cellule epitelioide caratterizzato

da una marcata attività antiossidante. Questo fenotipo è coerente con il minore accumulo di lipidROS e la maggior resistenza alla ferroptosi.



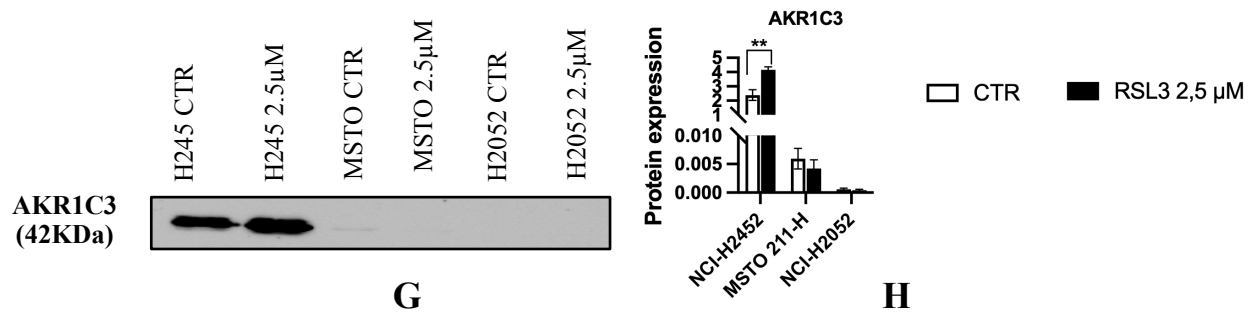


Figura 8: *Analisi dell'espressione proteica dei principali sistemi di difesa antiossidante in risposta a RSL3: valutazione mediante Western-blot dei livelli proteici di GPX4 (A), FSP1 (C), AKR1C1 (E) e AKR1C3 (G) nelle linee cellulari NCI-H2452, MSTO-211H e NCI-H2052 (in coltura 2D) trattate con veicolo (CTR: DMSO 0,1%) o con RSL3 (2,5 μM) per 8 h. La β-tubulina e la Beta-actina è stata utilizzata come controllo interno di carico. I grafici (B, D, F, H) riportano la quantificazione densitometrica delle rispettive bande, espressa come variazione relativa normalizzata rispetto ai livelli del controllo (CTR). I dati rappresentano la media ± SD di due esperimenti indipendenti (* $p < 0,05$, $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs CTR; one-way ANOVA).*

Nel complesso, l'analisi Western Blot ha confermato l'esistenza di un profilo proteico nettamente differenziato tra i modelli di MPM analizzati. La linea epitelioide NCI-H2452, caratterizzata dal fenotipo più resistente alla ferroptosi, dispone di un assetto proteico antiossidante basale particolarmente robusta, comprendente GPX4, FSP1, AKR1C1 e AKR1C3, e mostra una spiccata capacità di incrementare ulteriormente questi fattori in risposta allo stress indotto da RSL3.

La presenza contemporanea di questi sistemi cooperativi spiega in modo coerente il minore accumulo di lipidROS e la superiore sopravvivenza della linea epitelioide.

Per verificare se FSP1 svolga un ruolo protettivo indispensabile, gli esperimenti successivi sono stati orientati all'inibizione funzionale di FSP1, con l'obiettivo di determinare se la sua inattivazione sia sufficiente a risensibilizzare la linea epitelioide NCI-H2452 alla morte per ferroptosi.

3.4 La neutralizzazione di FSP1 aumenta la sensibilità alla ferroptosi, soprattutto nelle cellule epitelioidei NCI-H2452

I risultati ottenuti dalle analisi di espressione genica e proteica hanno suggerito che l'aumentata espressione di FSP1 nelle cellule epitelioidei NCI-H2452 potesse contribuire in modo determinante alla capacità delle cellule di contrastare lo stress ossidativo indotto dall'inibizione di GPX4. Abbiamo quindi deciso di analizzare se l'inibizione funzionale di FSP1, potesse potenziare la risposta a RSL3 e aumentare, in particolare, la sensibilità della linea epitelioide NCI-H2452 alla ferroptosi.

A tal fine le tre linee cellulari sono state trattate con l'inibitore iFSP1 (6 μ M), con RSL3 (2,5 μ M) e con la combinazione di entrambi. Come controlli, alcune cellule sono state trattate con il solo veicolo (CTR) e altre sono state co-trattate con la Ferrostatina-1 (Fer-1), un inibitore aspecifico della morte ferroptotica. Dopo 24 ore di trattamento la vitalità cellulare è stata analizzata mediante citometria a flusso (FACS), impiegando la doppia marcatura con fluoresceina diacetato (FDA), che marca le cellule vive, e il 7-aminoactinomicina D (7-AAD), che colora, invece quelle morte. I risultati ottenuti hanno dimostrato che, per tutte le linee cellulari, la somministrazione di iFSP1 (6 μ M) da solo non ha determinato alcuna riduzione della percentuale di cellule vitali rispetto alla condizione di controllo (CTR), indicando che, alla concentrazione testata, l'inibitore non è citotossico (*Figura 9A*). Analogamente e in perfetto accordo con i risultati precedenti, la vitalità delle cellule della linea epitelioide NCI-H2452 trattate con RSL3 alla concentrazione di 2,5 μ M, è risultata solo moderatamente ridotta (*Figura 9A*). In modo analogo, le cellule della linea bifasica MSTO-211H (*Figura 9B*) e sarcomatoide NCI-H2052 (*Figura 9C*) non hanno mostrato alcuna riduzione della vitalità cellulare in risposta al solo iFSP1 (6 μ M), il trattamento con RSL3 (2,5 μ M) da solo ha confermato un effetto citotossico significativo che è risultato ulteriormente potenziato dalla co-somministrazione di RSL3 e iFSP1. La sinergie tra iFSP1 e RSL3 è più marcata nelle cellule bifasiche che in quelle sarcomatoidi, le quali essendo molto sensibili a RSL3, muoiono considerevolmente anche in risposta alla sola inibizione di GPX4 (*Figura 9C*). È interessante notare che la combinazione tra iFSP1 e RSL3 annulla le differenze tra le diverse linee, confermando il ruolo cruciale di FSP1 nel modulare la resistenza alla ferroptosi dopo l'inibizione di GPX4.

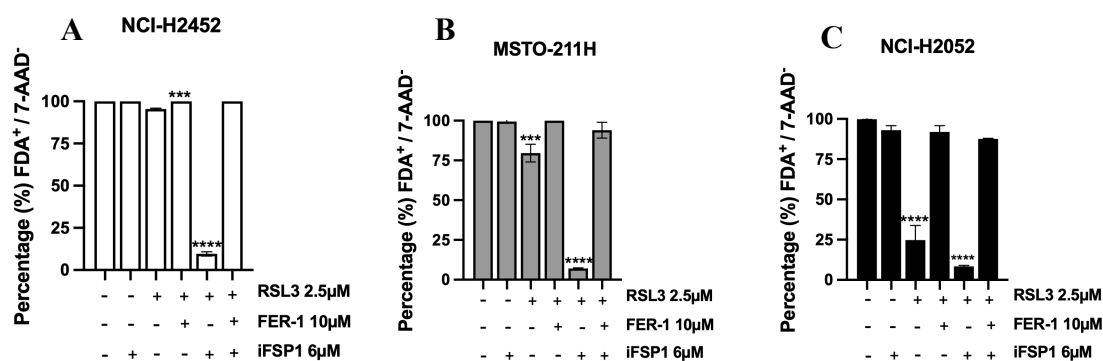


Figura 9: L'inibizione di FSP1 aumenta la sensibilità delle cellule di MPM alla ferroptosi indotta da RSL3. La vitalità delle linee cellulari NCI-H2452 (A), MSTO-211H (B) e NCI-H2052 (C) è stata valutata dopo trattamento per 24h ore con RSL3 (2,5 µM), iFSP1 (6 µM), Fer-1 (10µM) oppure con il veicolo (DMSO, 0,1%). La vitalità cellulare è stata misurata tramite colorazione con FDA/7-AAD e analisi citofluorimetrica (FACS). I risultati sono espressi come percentuale di vitalità rispetto al CT e riportati come media $\pm$ SD di tre repliche indipendenti. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ RSL3 rispetto al CTR; one-way ANOVA).

Alla luce di questi risultati abbiamo valutato se l'inibizione di FSP1 fosse in grado di sensibilizzare le cellule a basse concentrazioni di RSL3. A tale scopo, le tre linee cellulari sono state trattate con concentrazioni crescenti di RSL3, comprese tra 50 nM e 2,5 µM, in presenza o assenza di iFSP1. In linea con la loro diversa sensibilità alla ferroptosi l'analisi al FACS della vitalità cellulare (FDA⁺/7-AAD⁻) ha mostrato che iFSP1 riduce la vitalità delle cellule epitelioidei trattate con una concentrazione di RSL3 di 500 nM (Figura 10A), mentre le cellule della linea bifasica MSTO-211H (Figura 10B) diventano marcatamente sensibili a partire da una concentrazione di RSL3 10 volte più bassa (50 nM). Infine le cellule della linea sarcomatoide NCI-H2052 (Figura 10C), che già sono sensibili a basse concentrazioni di RSL3 (50 nM), mostrano un ulteriore incremento della mortalità in caso di co-trattamento con iFSP1. Nel complesso, questi risultati provano l'importanza di FSP1 come sistema anti-ossidante GPX4-indipendente e dimostrano che la sua inibizione farmacologica è una strategia efficace per sensibilizzare le cellule di MPM alla ferroptosi, anche quelle più resistenti (cellule epitelioidei NCI-H2452) che esprimono alti livelli di FSP1.

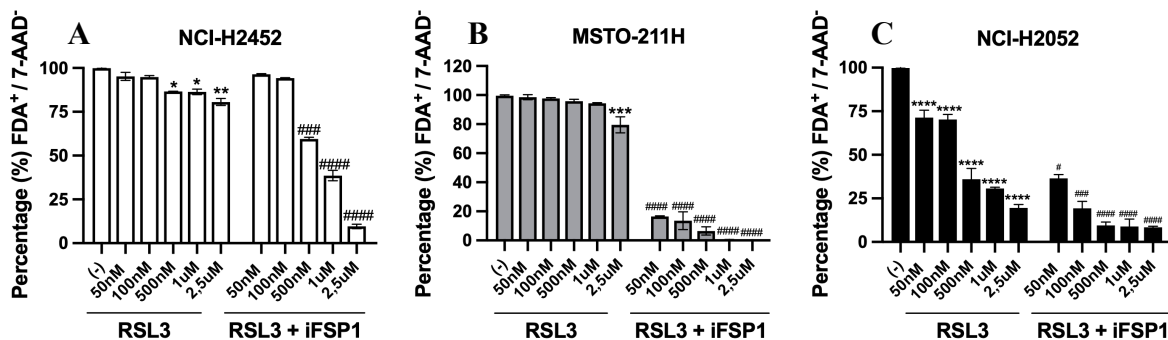


Figura 10: La combinazione con *iFSP1* mantiene l'efficacia citotossica anche a concentrazioni nanomolari di *RSL3*. La vitalità delle linee cellulari NCI-H2452 (A), MSTO-211H (B) e NCI-H2052 (C) è stata valutata dopo trattamento per 24 h con concentrazioni crescenti di *RSL3* (da 50 nM a 2,5 μM), in presenza o in assenza di *iFSP1* (6 μM), oppure con il veicolo (DMSO, 0,1%). La vitalità cellulare è stata determinata mediante citometria a flusso (FACS) con doppia marcatura FDA/7-AAD. I risultati sono espressi come percentuale di cellule vitali rispetto CTR e riportati come media ± SD di tre esperimenti indipendenti (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ *RSL3* vs CTR ; *RSL3* + *iFSP1* vs *RSL3* # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$; one-way ANOVA).

Per corroborare l'importanza di FSP1, come bersaglio terapeutico, abbiamo condotto degli esperimenti di silenziamento genico transitorio attraverso l'uso di "small interfering RNA" (siRNA) commercialmente disponibili e validati per essere specifici per FSP1. Per verificare l'efficienza del processo di trasfezione nelle tre linee cellulari, alcune cellule sono state trasfettate con un siRNA di controllo (siCTR) marcato con GFP. L'analisi FACS delle cellule fluorescenti hanno dimostrato un'efficienza di trasfusione pari o superiore all'80% per tutte e tre le linee cellulari (Figura 11).

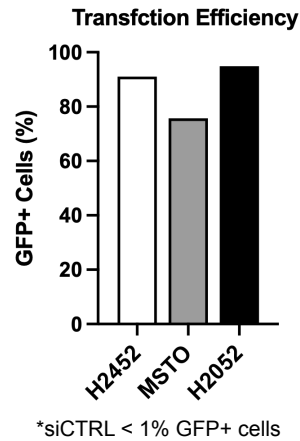


Figura 11: Efficienza di trasfezione mediante espressione del gene reporter GFP nelle linee cellulari di MPM. Valutazione citofluorimetrica della percentuale di cellule GFP-positive nelle linee NCI-H2452, MSTO-211H e NCI-H2052 a 24 ore dalla trasfezione condotta con Lipofectamine™ RNAiMAX. I valori sono espressi come percentuale di cellule fluorescenti rispetto alla popolazione totale.

Utilizzando lo stesso protocollo sperimentale, abbiamo valutato l'effettiva capacità del siRNA specifico per FSP1 (siFSP1) di abbattere i livelli della proteina. L'analisi Western Blot delle proteine estratte 48 ore successive alla trasfezione ha mostrato un'evidente riduzione dell'espressione proteica di FSP1 in tutte e tre le linee trattate con siFSP1 rispetto ai relativi controlli trasfettati con siCTR (*Figura 11 A, B*). Sebbene l'anticorpo marchi anche una proteina aspecifica di peso molecolare minore, a conferma della sua aspecificità i livelli di tale banda non sono stati alterati dalla trasfezione con siFSP. Come controllo di caricamento uniforme abbiamo analizzato i livelli della β -tubulina, che abbiamo utilizzato come normalizzatore per l'analisi densitometrica (*Figura 12B*).

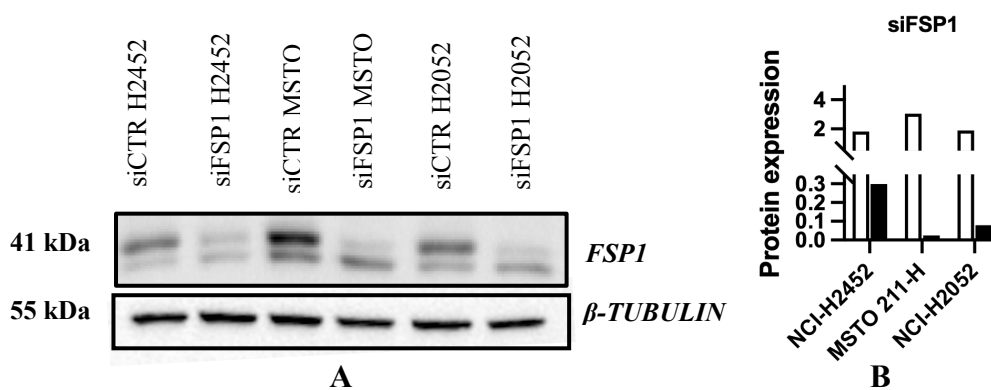


Figura 12: Validazione dell'efficienza di silenziamento di FSP1 nelle linee di MPM mediante Western Blot. Analisi mediante Western-Blot e relativa quantificazione densitometrica dei livelli proteici di FSP1 nelle linee NCI-H2452, MSTO-211H e NCI-H2052 a 48 ore dalla trasfezione con siRNA di controllo (siCTR) o siRNA specifico per FSP1 (siFSP1). La -tubulina è stata impiegata come controllo interno di carico. La densitometria è espressa come variazione relativa rispetto alla condizione siCTR.

Confermata l'efficacia del silenziamento di FSP1 a livello proteico, è stato valutato se la riduzione dell'espressione di FSP1 fosse in grado di modificare funzionalmente la risposta delle cellule di MPM all'inibizione di GPX4. A tale scopo, le cellule trasfettate con siFSP1 o con il corrispondente siRNA di controllo (siCTR) sono state trattate con RSL3 (2,5 μ M) e la vitalità cellulare è stata valutata mediante citometria a flusso utilizzando la doppia marcatura FDA⁺/7-AAD⁻. Considerato l'aumento della sensibilità osservato con la combinazione di RSL3 e iFSP1 abbiamo deciso di trattare le cellule con la concentrazione di RSL3 (2,5 μ M) capace di indurre, da sola, un effetto citotossico misurabile in tutte e tre le linee, ma, monitorando al microscopio ottico la morfologia delle cellule trasfettate con siFSP1, abbiamo deciso di analizzare mortalità dopo 5 ore di trattamento invece che dopo le classiche 24 ore. Come controllo di morte ferroptotica, alcune cellule trasfettate con siFSP1 sono state trattate con RSL3 2,5 μ M in presenza di Fer-1 (10 μ M).

Per tutte le linee cellulari, i risultati dell'analisi al FACS hanno dimostrato che la vitalità delle cellule trasfettate con il siCTR o con il siFSP1 e trattate con il solo veicolo era complessivamente preservata. Il trattamento con RSL3 (2,5 μ M) nelle cellule trasfettate con siCTR ha determinato una riduzione della popolazione vitale FDA⁺/7-AAD⁻, speculare al grado di resistenza intrinseco di ciascuna linea (*Figure 13A-B-C*). Nelle cellule silenziate per FSP1 e trattate con RSL3, invece, si è registrata una riduzione della vitalità significativamente più pronunciata rispetto alla condizione siCTR + RSL3 (*Figure 13A-B-C*). Tale andamento è stato riscontrato in tutte e tre le linee cellulari di MPM, indicando che la riduzione dell'espressione di FSP1 aumenta la vulnerabilità cellulare all'inibizione di GPX4. Come atteso l'aggiunta di Fer-1 alla combinazione di siFSP1 e RSL3 ha determinato un pieno recupero della vitalità cellulare (*Figure 13A-B-C*).

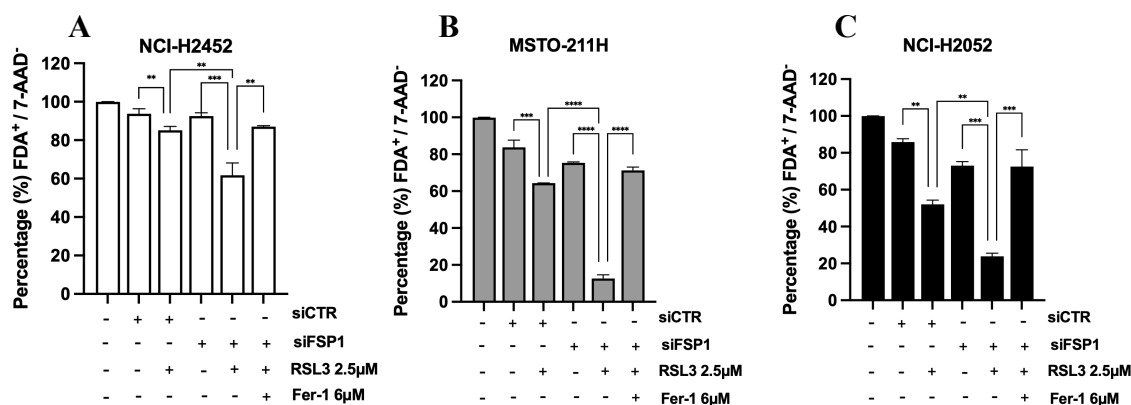


Figura 13: Il silenziamento di FSP1 sensibilizza le cellule di MPM alla ferroptosi indotta da RSL3. Valutazione citofluorimetrica della vitalità cellulare mediante marcatura FDA/7-AAD nelle linee NCI-H2452 (A), MSTO-211H (B) e NCI-H2052 (C) sottoposte a silenziamento transitorio (siCTR o siFSP1) e trattate per 5 ore con veicolo (DMSO 0,1%), RSL3 (2,5 μM) o con la combinazione RSL3 + Fer-1 (10 μM). I grafici riportano la percentuale di cellule vitali (FDA/7-AAD) espressa come media ± SD di tre repliche tecniche di un esperimento rappresentativo ($p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ siCTR + RSL3 vs siCTR, siFSP1 + RSL3 vs siFSP1, siFSP1 + RSL3 vs siCTR + RSL3, siFSP1 + RSL3 + Fer-1 vs siFSP1 + RSL3; one-way ANOVA).

Tale andamento è stato riscontrato in tutte e tre le linee cellulari di MPM, confermando che la riduzione dell'espressione di FSP1 aumenta la vulnerabilità cellulare all'inibizione di GPX4, ma non compromette la vitalità delle cellule non trattate con RSL3. Questi risultati suggeriscono che il contributo protettivo di FSP1 diventi particolarmente rilevante solo quando il sistema anti-ossidante GPX4-dipendente è compromesso e confermano FSP1 come un valido bersaglio terapeutico per approcci di combinazione con inibitori di GPX4.

3.5 La neutralizzazione di AKR1C1 è insufficiente per sensibilizzare le cellule alla ferroptosi indotta da RSL3

Per valutare il potenziale delle AKR, come ulteriori bersagli terapeutici per approcci di combinazione con gli inibitori di GPX4, abbiamo iniziato ad analizzare l'impatto funzionale del silenziamento di AKR1C1, che è uno dei membri della famiglia delle AKR maggiormente espresso dalle cellule più resistenti alla ferroptosi indotta da RSL3. L'efficacia del

silenziamento è stata valutata mediante WB, confrontando le cellule trasfettate con un siRNA specifico per AKR1C1 (siAKR1C1) con le rispettive cellule trattate con un siRNA di controllo (siCTR). I risultati hanno dimostrato una riduzione specifica dei livelli proteici di AKR1C1 (*Figura 14*) in particolare nella linea epitelioide NCI-H2452, caratterizzata da un'elevata espressione basale di AKR1C1. Anche nella linea bifasica MSTO-211H, abbiamo potuto osservare una riduzione significativa di AKR1C1, mentre nella linea sarcomatoide NCI-H2052 AKR1C1 esprime livelli basali così bassi che sono difficili da rilevare anche nelle cellule trasfettate con il siCTR, anche in questo caso è importante sottolineare che l'anticorpo utilizzato per la rilevazione di AKR1C1 marca in modo aspecifico una proteina con peso molecolare inferiore i cui livelli restano inalterati dal siAKR1C1. L'espressione della β -tubulina è stata usata come proteina housekeeping per controllare l'uniformità del caricamento.

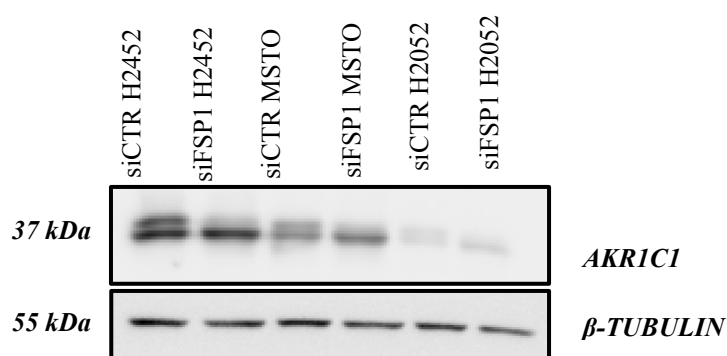


Figura 14: Analisi dell'efficienza di silenziamento di AKR1C1 nelle linee di MPM mediante Western Blot. Western-Blot dei livelli proteici di AKR1C1 nelle linee NCI-H2452, MSTO-211H e NCI-H2052 trasfettate per 48 ore con siRNA di controllo (siCTR) o con siRNA specifico per AKR1C1 (siAKR1C1). La β -tubulina è stata impiegata come controllo interno di carico.

Per valutare l'effetto del silenziamento di AKR1C1 sulla sensibilità delle cellule di MPM alla ferroptosi, dopo 48 ore dalla trasfusione con siAKR1C1 o con il corrispondente siCTR le cellule sono state trattate con RSL3 (2,5 μ M) e la vitalità cellulare è stata valutata dopo 5 ore tramite analisi al citofluorimetro delle cellule marcate con FDA e 7-AAD. Anche in questo caso un gruppo di cellule trattate con la combinazione siAKR1C1 e RSL3 sono state co-

trattate con Fer-1 (10 μ M). I risultati dimostrano, in condizioni basali, che la vitalità cellulare è risultata complessivamente preservata sia nelle cellule trasfettate con siCTR sia in quelle silenziate per AKR1C1 e trattate con il solo veicolo (*Figure 15A-B-C*).

Il trattamento con RSL3 ha determinato una riduzione della percentuale di cellule vitali rispetto alle rispettive condizioni non trattate (*Figure 15A-B-C*). Tuttavia, diversamente da quanto osservato in seguito al silenziamento di FSP1, la riduzione dell'espressione di AKR1C1 non ha determinato un ulteriore aumento della citotossicità indotta da RSL3 (*Figure 15A-B-C*). Come atteso, l'aggiunta di Fer-1, protesse le cellule dalla morte ferroptotica indotta da RSL3 indipendente dall'assenza di AKR1C1 (*Figure 15A-B-C*).

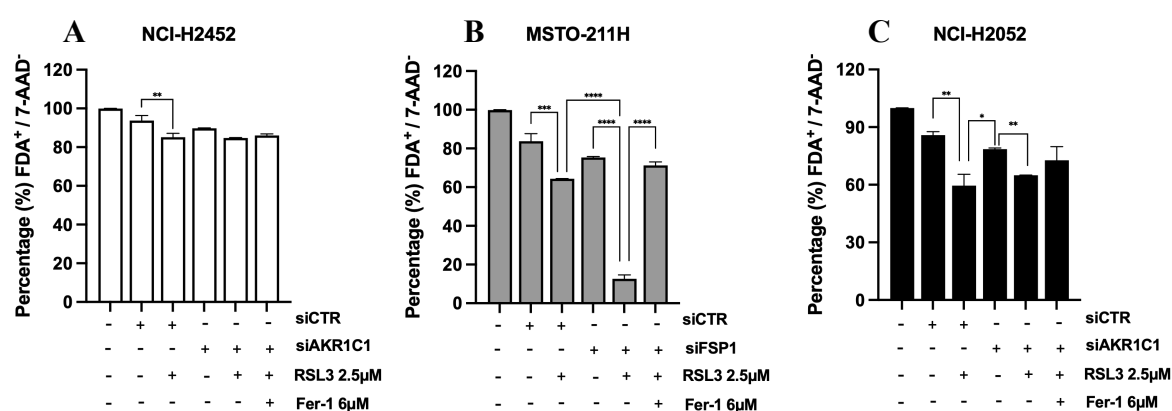


Figura 15: Valutazione della vitalità cellulare nelle linee di MPM silenziate per AKR1C1 in risposta a RSL3. Valutazione citofluorimetrica della vitalità cellulare mediante marcatura FDA/7-AAD nelle linee NCI-H2452 (A), MSTO-211H (B) e NCI-H2052 (C) sottoposte a silenziamento transitorio (siCTR o siAKR1C1) e trattate per 5 ore con veicolo (DMSO 0,1%), RSL3 (2,5 μ M) o con la combinazione RSL3 + Fer-1 (10 μ M). I grafici riportano la percentuale di cellule vitali (FDA/7-AAD) espressa come media $\pm$ SD di tre repliche tecniche di un esperimento rappresentativo ($p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ siCTR + RSL3 vs siCTR, iFSP1 + RSL3 vs siFSP1, siFSP1 + RSL3 vs siCTR + RSL3 iFSP1 + RSL3 + Fer-1 vs siFSP1 + RSL3; one-way ANOVA).

Questi risultati suggeriscono che, nelle condizioni sperimentali analizzate, il silenziamento di AKR1C1, possa essere compensato da altri membri della famiglia, in particolare da AKR1C3 (Figura 8G e H), che è similmente molto espresso dalle cellule epitelioidi sia in condizioni basali che dopo trattamento con RSL3. Il silenziamento di più membri della famiglia delle

AKR è quindi necessario per valutare l'effetto di ciascuna e l'impatto complessivo di questi enzimi anti-ossidanti sulla sensibilità alla ferroptosi delle cellule di MPM.

3.6 Le cellule sarcomatoidi NCI-H2052 mostrano, basalmente, una peculiare abbondanza citoplasmatica di ferro ferroso labile

Oltre all'efficienza delle difese antiossidanti, la suscettibilità alla ferroptosi è strettamente legata alla disponibilità intracellulare di ferro, elemento catalitico fondamentale per l'innesco delle reazioni di Fenton e la propagazione del danno ossidativo a carico dei lipidi di membrana.

Alla luce della diversa sensibilità a RSL3 precedentemente riscontrata nelle tre linee di MPM, si è condotta un'analisi combinata e simultanea per valutare sia il pool di ferro ferroso labile (Fe^{2+}), mediante la sonda fluorescente FerroOrange, sia l'accumulo delle specie reattive dell'ossigeno derivate dai lipidi (lipidROS), impiegando la sonda C11-BODIPY 581/591.

I risultati hanno evidenziato un'interessante associazione tra il contenuto basale di ferro labile e il gradiente di sensibilità alla ferroptosi delle tre linee cellulari (*Figura 16A*). Nello specifico la linea sarcomatoide NCI-H2052 ha mostrato i livelli basali più elevati di fluorescenza FerroOrange, la linea bifasica MSTO-211H ha presentato valori intermedi, mentre il modello epitelioide NCI-H2452 è risultato caratterizzato dai livelli più contenuti. Tale profilo basale rispecchia fedelmente la gerarchia di vulnerabilità a RSL3 definita in precedenza, suggerendo che una maggiore quota basale di Fe^{2+} possa predisporre le cellule a una risposta ferroptotica più severa quando le difese antiossidanti vengono compromesse.

In seguito al trattamento con RSL3 (2,5 μM), i risultati hanno mostrato un progressivo e chiaro aumento del pool di ferro labile (LIP) nella linea epitelioide NCI-H2452, un incremento più contenuto nella bifasica MSTO-211H e sarcomatoide NCI-H2052, altamente sensibile alla ferroptosi (*Figura 16A*). Quest'ultimo dato, apparentemente paradossale, trova una possibile chiave interpretativa se integrato con i risultati della perossidazione lipidica (*Figura 16B*). Già dopo 30 minuti dalla somministrazione di RSL3, l'accumulo dei lipidROS raggiunge un picco nella linea sarcomatoide NCI-H2052 che è notevolmente più elevato rispetto all'aumento graduale che si osserva nel corso delle 4 ore di trattamento delle cellule epitelioide e bifasiche. Poiché l'avvio della perossidazione lipidica è un evento guidato dalla

presenza di un pool adeguato di ferro libero, questi dati suggeriscono che nelle cellule della linea sarcomatoide la quota LIP basalmente presente nella cellula è probabilmente sufficiente per catalizzare l'innesco e la propagazione del danno perossidativo successivo all'inibizione di GPX4. La successiva riduzione di lipidROS e LIP misurata dopo 4 ore di trattamento, verosimilmente riflette il fatto che, nella maggior parte delle cellule il processo di morte ferroptotica è già in corso. L'imponente accumulo di lipROS misurato dopo 30 minuti indica una rapida perdita dell'integrità strutturale della membrana plasmatica che, di conseguenza, porta alla perdita delle sonde fluorescenti usate per rilevare sia il LIP che i lipidROS.

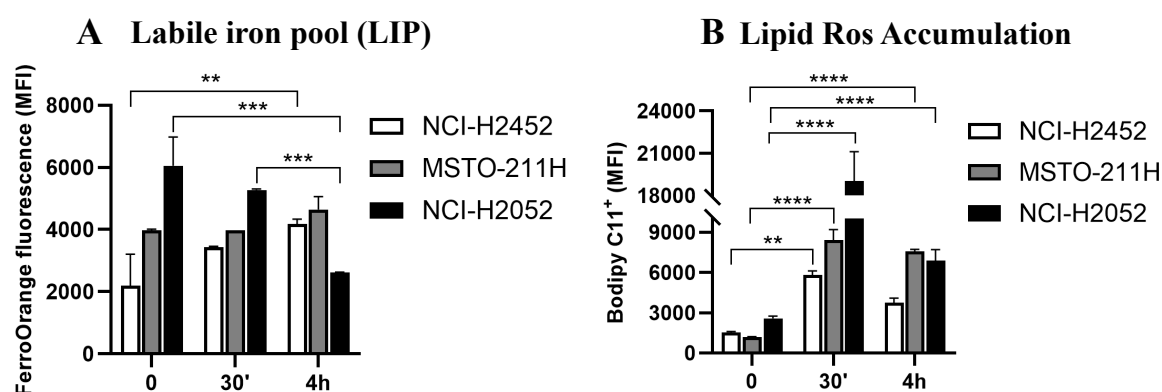


Figura 16: Valutazione cinetica del pool di ferro labile e della perossidazione lipidica nelle linee cellulari di MPM in risposta a RSL3. Analisi citofluorimetrica condotta nelle linee NCI-H2452, MSTO-211H e NCI-H2052 in condizioni basali (0 h) e dopo 30 minuti e 4 ore dal trattamento con RSL3 (2,5 μ M). (A) Misurazione del ferro ferroso labile (Fe^{2+}) espresso come intensità media di fluorescenza (MFI) della sonda FerroOrange. (B) Misurazione dell'accumulo di lipidROS espresso come incremento della fluorescenza associata all'ossidazione della sonda C11-BODIPY 581/591. I dati sono riportati come media $\pm$ SD di tre repliche tecniche di un esperimento rappresentativo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs rispettivo basale 0 h; one-way ANOVA).

Nel loro complesso, questi risultati mettono in luce un'ulteriore caratteristica alla base della diversa sensibilità delle linee di MPM alla ferroptosi. Nello specifico le cellule della linea sarcomatoide non solo esprimono livelli più bassi di molecole anti-ossidanti, ma presentano una peculiare abbondanza di LIP, che le rende verosimilmente più prone all'avvio della perossidazione lipidica e della ferroptosi.

3.7 Il profilo di espressione delle proteine che regolano l'omeostasi del ferro è coerente con il diverso profilo di LIP delle cellule di MPM

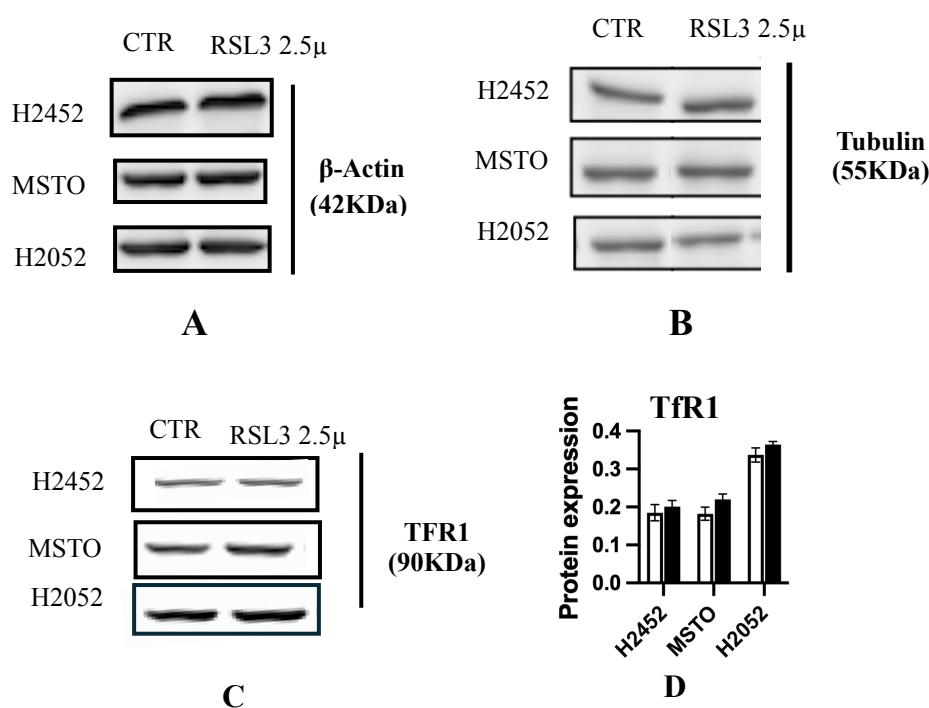
Per identificare le basi molecolari del diverso profilo di LIP, abbiamo analizzato i principali meccanismi coinvolti nella regolazione dell'omeostasi intracellulare del ferro, sia in condizioni basali che dopo il trattamento con RSL3. A tale scopo, abbiamo analizzato i livelli delle proteine coinvolte nell'internalizzazione (recettore per la transferrina di tipo 1), nello stoccaggio (ferritina) e nella mobilizzazione delle riserve intracellulari di ferro (Coattivatore del Recettore Nucleare 4).

Le tre linee cellulari sono state analizzate in condizioni basali e in seguito al trattamento con RSL3 (2,5 μ M) e i livelli proteici dei target di interesse sono stati valutati mediante WB, utilizzando α -tubulina e la β -actina come proteine housekeeping (*Figura 17A-B*). Nello specifico, le cellule della linea sarcomatoide NCI-H2052 hanno mostrato livelli del recettore per la transferrina di tipo 1 (TfR1) marcatamente più elevati delle cellule epitelioidi NCI-H2452 e bifasiche MSTO-211H (*Figura 17C-D*). Questo dato indica che il sottotipo sarcomatoide possiede una spiccata e potenziata capacità intrinseca di importare ferro dall'ambiente extracellulare. Infatti TfR1 è una glicoproteina transmembrana di tipo II, che rappresenta uno dei principali meccanismi di importo del ferro extracellulare. Lega sulla superficie cellulare la transferrina carica di ferro ferrico (Fe^{3+}) e ne promuove l'internalizzazione mediante endocitosi contribuendo al pool intracellulare di ferro labile [57].

Parallelamente, anche i livelli del Coattivatore del Recettore Nucleare 4 (NCOA4) sono risultati più elevati nella linea NCI-H2052 rispetto alle altre linee cellulari (*Figura 17E-F*). L'abbondanza di NCOA4 suggerisce un'attiva e costante stimolazione della via ferritinofagica, un processo che mobilita continuamente ferro dalle riserve intracellulari riversando ioni Fe^{2+} cataliticamente attivi all'interno del citosol. NCOA4 rappresenta un recettore cargo selettivo dell'autofagia che media la degradazione lisosomiale della ferritina, il principale complesso citosolico deputato allo stoccaggio del ferro, attraverso un processo definito ferritinofagia. La ferritinofagia mediata da NCOA4 svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi intracellulare del ferro, regolando la mobilizzazione delle riserve del ferro contenute nella ferritina in funzione delle esigenze cellulari. Tale processo è

inoltre coinvolto nella regolazione di diversi meccanismi cellulari ferro-dipendenti, tra cui la ferroptosi [58].

In netto e speculare contrasto con i dati di importo e mobilizzazione, i livelli della ferritina (FTH1) sono significativamente più bassi nelle cellule sarcomatoidi NCI-H2052 rispetto alla linea epitelioide e a quella bifasica (*Figura 17G-H*). Poiché la ferritina rappresenta il principale presidio di stoccaggio e neutralizzazione del ferro citoplasmatico, la sua carenza rispecchia una ridotta capacità di sequestrare il metallo in eccesso. L’FTH1 rappresenta la subunità pesante della ferritina, il principale complesso intracellulare deputato allo stoccaggio del ferro. Inoltre FTH1 è dotata di attività ferrossidasica, attraverso la quale catalizza l’ossidazione del ferro ferroso (Fe^{2+}) a ferro ferrico (Fe^{3+}), favorendone il successivo deposito all’interno della ferritina. Tale processo contribuisce al mantenimento dell’omeostasi del ferro e limita la disponibilità di Fe^{2+} in grado di promuovere la produzione di specie reattive dell’ossigeno attraverso la reazione di Fenton, esercitando pertanto un effetto protettivo nei confronti della ferroptosi [59].



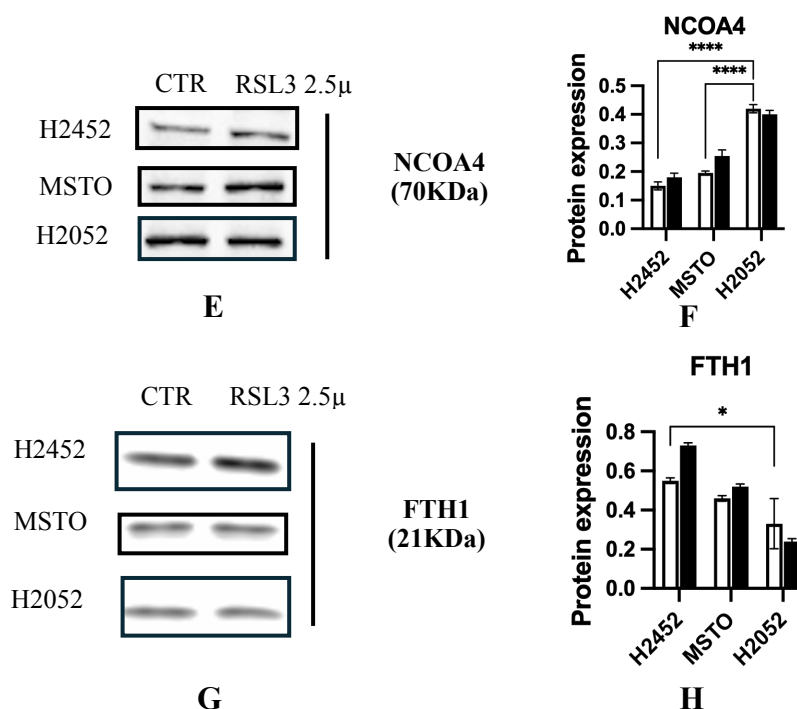


Figura 17: Caratterizzazione dei livelli proteici basali dei regolatori dell'omeostasi del ferro TfR1, NCOA4 e FTH1 nelle linee di MPM. Western-blot rappresentativi dell'espressione proteica basale del recettore della transferrina 1 (TfR1, C-D), del recettore della ferritinofagia NCOA4 (E-F) e della catena pesante della ferritina 1 (FTH1, G-H) nelle linee cellulari NCI-H2452, MSTO-211H e NCI-H2052. La B-actina e la B-tubulina sono state impiegate come controllo interno di caricamento. (A-B)

Nell'insieme, questo profilo proteico sostiene perfettamente il maggior accumulo di ferro libero osservato nelle cellule sarcomatoidi NCI-H2052. L'elevata espressione di TfR1 e NCOA4 sostengono sia l'internalizzazione del ferro dall'ambiente extracellulare che la sua mobilizzazione attraverso la ferritinofagia che, di fatto, si associa a una diminuzione dei livelli di FTH1 basso. Questa condizione di "pre-carico" di ferro reattivo costituisce un verosimile elemento d'innescio che rende la linea sarcomatoide intrinsecamente predisposta e altamente sensibile all'accumulo di lipidROS e alla conseguente morte per ferroptosi in seguito all'inibizione di GPX4.

4. Conclusione e sviluppi futuri

Il lavoro svolto ha caratterizzato la risposta alla ferroptosi in modelli di mesotelioma pleurico maligno (MPM), evidenziando una vulnerabilità eterogenea all'inibitore di GPX4 (RSL3): spiccata nella linea sarcomatoide (NCI-H2052), intermedia nella bifasica (MSTO-211H) e ridotta nella epitelioide (NCI-H2452). L'aumento della perossidazione lipidica indotto da RSL3 e la capacità del soppressore specifico Ferrostatina-1 (Fer-1) di prevenire l'accumulo di lipidROS e ripristinare la vitalità cellulare confermano inequivocabilmente il primario coinvolgimento della ferroptosi nella risposta citotossica osservata. L'analisi molecolare evidenzia che la vulnerabilità delle cellule di MPM alla ferroptosi dipende dal bilanciamento tra metabolismo del ferro e difese antiossidanti. La resistenza alla ferroptosi (NCI-H2452) correla con l'iper-espressione di meccanismi anti-ossidanti (GPX4, FSP1, AKR1C). Nello specifico l'inibizione farmacologica di FSP1 (tramite iFSP1) ri-sensibilizza le cellule, emergendo come bersaglio terapeutico chiave per approcci di combinazione con inibitori di GPX4. Dall'altro lato, la suscettibilità (NCI-H2052) è determinata da un elevato pool di ferro labile basale, sostenuto da un alto import di ferro (TfR1 alto), un'intensa ferritinofagia (NCOA4 alto) e un ridotto stoccaggio (FTH1 basso). Nel complesso i risultati ottenuti gettano le basi per approfondire la vulnerabilità delle cellule di MPM alla ferroptosi. In prospettiva, le fasi successive del progetto prevedono di:

1. Validare la dipendenza dall'istotipo: ampliare il pannello di linee cellulari ed esplorare dataset genomici nei repository per verificare se la signature ferroptotica sia legata al fenotipo istologico.
2. Implementare N6F11: superare i limiti farmacocinetici e tossicologici di RSL3 tramite l'impiego di N6F11, induttore di nuova generazione che promuove la degradazione proteasomiale di GPX4 (via E3 ligasi TRIM25), risparmiando le cellule immunitarie e garantendo un profilo idoneo alla somministrazione in vivo.
3. Traduzione preclinica: verificare in vitro l'efficacia di N6F11 e la sinergia con inibitori di FSP1, fase propedeutica alla validazione in vivo su modelli animali ortotopici di MPM in topi immunocompetenti.

Nel loro insieme, questi studi mirano a porre le basi per lo sviluppo di una nuova strategia terapeutica combinata, offrendo una concreta prospettiva traslazionale per il trattamento di una neoplasia ad oggi caratterizzata da spiccata chemioresistenza e limitate opzioni di cura.

5. Materiali e metodi

5.1 Colture cellulari

Gli studi sperimentali sono stati condotti utilizzando linee cellulari rappresentative dei tre principali istotipi di MPM: l'istotipo epitelioide, rappresentato dalla linea NCI-H2452; l'istotipo bifasico rappresentato dalla linea MSTO-211H, e l'istotipo sarcomatoide rappresentato dalla linea NCI-H2052. Le linee NCI-H2452 e NCI-H2052 sono state acquistate presso l'American Type Culture Collection (ATCC). La linea MSTO-211H è stata invece gentilmente fornita dal Laboratorio di Biologia Cellulare diretto dalla Prof.ssa Laura Moro (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università del Piemonte Orientale) e autenticate dall'unità di "Genomics & Transcriptomics" del Centro di Ricerca Traslationale sulle Malattie Autoimmuni e Allergiche (CAAD), Università del Piemonte Orientale (UPO).

Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Euroclone®) supplementato con 1% di L-Glutamina (Euroclone®), 1% di Penicillina-Streptomicina (Euroclone®) e 10% di siero fetale bovino (FBS) (ThermoFisher™), e mantenute in incubatore a 37°C, al 5% di CO₂. Quando è stata raggiunta una confluenza pari a circa il 90%, le cellule sono state staccate utilizzando Tripsina-EDTA 1x (Euroclone®) e piastrate seguendo una diluizione specifica per ogni linea cellulare. Per escludere la contaminazione da ceppi di Mycoplasma, le linee cellulari sono state periodicamente testate mediante test colorimetrico per la rilevazione del Mycoplasma (Vazyme™).

Le linee impiegate presentano mutazioni in geni frequentemente alterati nel MPM, in particolare: la linea NCI-H2052 presenta mutazioni per i geni NF2 e CDKN2A; la linea NCI-H2452 presenta mutazioni nei geni BAP1 e CDKN2A; mentre MSTO-211H risulta mutata per il gene CDKN2A.

Per quanto riguarda la preservazione delle linee cellulari, aliquote di 2 milioni di cellule raccolte entro il 5° passaggio dall'acquisto o dall'autenticazione, sono state risospese in FBS (66) contenente 10% di DMSO (CarloErba) e criocongelate in azoto liquido.

5.2 Saggio di vitalità cellulare con FDA tramite citofluorimetria a flusso in modelli 2D

Per la valutazione della vitalità cellulare in 2D mediante citometria a flusso (FACS), le cellule sono state inizialmente seminate in multiwell da 6 pozzetti (Euroclone®) alla densità

di $1,5 \times 10^5$ cellule/pozzetto e lasciate aderire per 24 ore. Successivamente, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di RSL3 (1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M e 10 μ M) e incubate per ulteriori 24 ore. Per distinguere la ferroptosi da altre forme di morte cellulare, sono stati allestiti alcuni pozzetti di controllo con la combinazione di RSL3 + Ferrostatina-1 (Fer-1) (10 μ M), un inibitore specifico della perossidazione lipidica. Al termine del trattamento, il terreno di coltura è stato trasferito nelle provette per FACS corrispondenti, i pozzetti sono stati lavati con PBS 1x e le cellule aderenti staccate dalla piastra mediante incubazione con tripsina-EDTA 1x. La sospensione cellulare risultante è stata raccolta e trasferita in tubi di polistirene per FACS. I campioni sono stati centrifugati a 1700 rpm per 6 minuti al fine di rimuovere il surnatante, quindi le cellule sono state risospese in 200 μ l di staining costituito da FDA (ThermoFisher™) 1:10.000 in PBS 1x. La fluoresceina diacetato (FDA) è una sonda fluorescente utilizzata per valutare la vitalità cellulare: le cellule vitali, sono in grado di metabolizzare l'FDA in fluoresceina, una molecola fluorescente seguito dall'eccitazione del laser; al contrario, le cellule non vitali non subiscono questa trasformazione e non vengono perciò rilevate. I campioni sono stati incubati per 10 minuti al buio in ghiaccio, quindi analizzati al FACS (FACSymphony™) valutando la positività delle cellule per FDA a 488 nm (blue laser). Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in duplicato tecnico e ripetuti in due esperimenti biologici indipendenti. I risultati sono rappresentati come percentuale di cellule morte (FDA-), al fine di evidenziare l'effetto dose-dipendente dell'induzione della ferroptosi da parte di RSL3 e la protezione conferita da Ferrostatina-1 (Fer-1).

5.3 Valutazione dell'ossidazione lipidica mediante BODIPY™ in modelli 2D

Per la valutazione dell'ossidazione lipidica tramite BODIPY™ 581/591 C11 (Lipid Peroxidation Sensor) (ThermoFisher™), le cellule sono state seminate in multiwell da 6 alla densità di 2×10^5 cellule/pozzetto in 2 ml di terreno completo (RPMI) e trattate con RSL3 alla concentrazione 2,5 μ M e 5 μ M per 4h in assenza o in presenza di Ferrostatina-1 (10 μ M). Il BODIPY™ si incorpora nelle membrane lipidiche e subisce un cambiamento spettrale quando i lipidi vengono ossidati: in forma ridotta emette fluorescenza rossa (~590 nm), mentre quando i lipidi sono ossidati la fluorescenza cambia verso il verde (488/510 nm). La

scelta delle concentrazioni si è basata sui dati ottenuti dai precedenti saggi di vitalità cellulare. Prima dell'incubazione con il fluoroforo, il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state lavate con PBS 1X per eliminare eventuali residui di siero o metaboliti. Successivamente, è stata aggiunta una quantità di soluzione di BODIPY™ sufficiente a coprire uniformemente il fondo di ciascun pozzetto (500 µl). La soluzione di BODIPY™ è stata preparata diluendo la stock madre (2mM) di 1:1000 in RPMI, ottenendo una concentrazione finale di 2 µM. Le cellule sono state incubate con il fluoroforo a 37 °C al buio per 30 minuti, in modo da consentire l'integrazione del colorante nei lipidi delle membrane cellulari e l'ossidazione selettiva dei lipidi sensibili. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state nuovamente lavate con PBS 1x per rimuovere il colorante in eccesso, e staccate dal fondo dei pozzetti mediante trattamento con tripsina-EDTA 1x. Le cellule sono state risospese in PBS 1x e mantenute in ghiaccio e al buio per preservare l'integrità e lo stato ossidativo dei lipidi fino alla loro acquisizione al FACS (FACSymphony™). Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in duplicato e ripetuti in due esperimenti biologici indipendenti. I risultati sono stati rappresentati come Median Fluorescence Intensity (MFI) per il BODIPY™.

5.4 Analisi dell'espressione genica in modelli 2D

5.4.1 Trattamento con RSL3 in modelli 2D

Le cellule sono state trattate con RSL3 per valutare l'espressione genica in modelli bidimensionali (2D) impiegando concentrazioni di 2,5 µM e 5 µM.

La scelta delle concentrazioni si è basata sui dati ottenuti dai saggi di vitalità cellulare. Le cellule sono state seminate a una densità di circa 2×10^5 cellule/pozzetto in piastre multiwell da 6 pozzetti.

5.4.2 Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA dalle colture cellulari 2D è stata eseguita utilizzando PureZOL™ (Bio-Rad). Sotto cappa chimica e mantenendo le piastre su ghiaccio, il terreno di coltura è stato eliminato e i pozzetti sono stati lavati con PBS 1×, rimuovendo completamente il liquido residuo. Successivamente, è stato aggiunto 1 ml di PureZOL™ freddo a ciascun

pozzetto e il contenuto è stato trasferito nei rispettivi microtubi da 1,5 ml precedentemente siglati. A ciascun campione è stato aggiunto cloroformio puro freddo in rapporto 1:5 rispetto al volume di PureZOLTM (200 µl per 1 ml di PureZOLTM). I microtubi sono stati chiusi e miscelati manualmente con movimenti verticali, seguiti da vortex per almeno 30 secondi. I campioni sono stati quindi centrifugati a 13.000 rcf per 15 minuti a 4 °C. La fase acquosa sovrastante, contenente l'RNA, è stata prelevata (500 µl), evitando di aspirare la fase sottostante. Per la precipitazione dell'RNA, è stato aggiunto un volume equivalente alla fase acquosa di isopropanolo puro freddo (1:1), seguito da miscelazione verticale manuale e incubazione sul ghiaccio per 5 minuti. Successivamente, i campioni sono stati centrifugati a 13.000 rpm per 15 minuti a 4 °C per ottenere il pellet di RNA. Il pellet è stato lavato due volte con 1 ml di etanolo freddo al 75%, centrifugando a 11.000 rpm per 10 minuti a 4 °C tra un lavaggio e l'altro. Dopo la rimozione attenta del surnatante, i pellet sono stati lasciati asciugare sotto cappa chimica fino a completa evaporazione dell'etanolo. Infine, l'RNA è stato risospeso in acqua RNasi-free fredda in volumi proporzionati alla dimensione del pellet. I campioni sono stati mantenuti a -20 °C fino alla successiva quantificazione.

5.4.3 *Quantificazione RNA*

La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state valutate mediante spettrofotometro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). La qualità dell'RNA è stata valutata considerando i rapporti 260/280 (indice di contaminazione proteica) e 260/230 (riflette la presenza di sostanze contaminanti come fenolo o sali residui). La qualità è considerata accettabile se i rapporti sono 3 1,5.

5.4.4 *Retrotrascrizione di RNA a cDNA*

Per la sintesi del cDNA, l'RNA totale quantificato è stato retrotrascritto utilizzando il kit commerciale High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisherTM). 1 µg/µl di RNA è stato retrotrascritto preparando una mix di reazione per un volume finale di 20 µL, composta da 10 µL di reaction mix e 10 µL di campione (campione + acqua RNasi free). La reaction mix è stata preparata aggiungendo Reverse Transcription Buffer, dNTPs, Random primer, Reverse Transcriptase e acqua priva di nucleasi. La mix è stata mantenuta in ghiaccio

fino all'uso e aliquotata in ciascuna provetta contenente RNA. Le provette sono state incubate in termoblocco a 37 °C per 2 ore per consentire la sintesi del cDNA. Al termine dell'incubazione, l'enzima è stato inattivato mediante riscaldamento a 95 °C per 5 minuti. Il cDNA ottenuto è stato quindi utilizzato direttamente per le successive reazioni di RT-PCR o conservato a -20 °C per usi successivi.

5.4.5 Real-Time PCR

La quantificazione dell'espressione genica è stata effettuata mediante PCR quantitativa (qPCR) utilizzando SYBR® Green (Bio-Rad) come sistema di rilevazione. La mix di reazione è stata preparata combinando 10 µL di Advanced Universal SYBR® Green Supermix, 1,2 µL di primer forward e reverse (5 µM ciascuno) e 4,8 µL di acqua priva di nucleasi per ciascun campione. Sono stati allestiti triplicati tecnici, in cui sono stati aggiunti 16 µL della mix di reazione e 4 µL di cDNA diluito 1:5 in acqua priva di RNasi. Sono stati inclusi anche controlli negativi (bianchi) per monitorare eventuali contaminazioni. Le piastre PCR (Bio-Rad) sono state chiuse con pellicola trasparente e centrifugate a 300 rcf per 5 minuti per favorire la precipitazione dei campioni all'interno della mix e rimuovere eventuali bolle d'aria. La qPCR è stata eseguita utilizzando il sistema CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad), adottando il programma di amplificazione SYBR Fast, che prevede: attivazione della polimerasi a 98 °C per 30 secondi, denaturazione del DNA a 98 °C per 10 secondi e annealing/estensione a 60 °C per 30 secondi. I livelli di espressione dei geni impiegati sono stati normalizzati rispetto alla β -actina, impiegata come gene di riferimento, quindi l'espressione è stata calcolata utilizzando il metodo $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Le sequenze nucleotidiche dei primer utilizzati sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1: sequenze primers utilizzate per qPCR

GENE	FORWARD	REVERSE
FSP1	CTGAACGTCCCCTTCATGCT	ATCCCCACTACTAGCCCCTG
AKR1C1	GCCGTGGAGAAGTGTAAG	CAGACAGGCTTGACTTGAG
AKR1C2	GGGTTCCACCATTATTGATT	CACTGCCATCTGCAATCT

GENE	FORWARD	REVERSE
AKR1C3	CAGAGGTTCCGAGAAGTAAAG	CCAACCTGCTCCTCATTATT
AKR1C4	AGATGGTCCAACCAGCCTTG	TGGCTTGAGAGCCATTGGG
GPX4	TGAGGCAAGACCGAAGTA	GAACTGGTTACACGGGAAG
β -ACTIN	CCCAAGGCCAACCGCGAGAAGAT	GTCCCGGCCAGCCAGGTCCAG

5.5 *Analisi dell'espressione proteica mediante Western Blot*

5.5.1 *Trattamento con RSL3 in modelli 2D*

Le cellule sono state trattate con RSL3 per valutare l'espressione genica in modelli bidimensionali (2D) impiegando concentrazioni di 2,5 μ M e 5 μ M.

La scelta delle concentrazioni si è basata sui dati ottenuti dai saggi di vitalità cellulare. Le cellule sono state seminate a una densità di circa 2×10^5 cellule/pozzetto in piastre multiwell da 6 pozzetti.

5.5.2 *Estrazione delle proteine totali*

L'espressione proteica è stata analizzata mediante Western blot. Le cellule sono state inizialmente lavate con PBS e mantenute in ghiaccio durante le successive fasi di estrazione proteica. La lisi cellulare è stata effettuata utilizzando 80 μ L di RIPA buffer, costituito da 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40 e 0,1% SDS, addizionato al momento dell'utilizzo con un cocktail di inibitori delle proteasi (PIC, Merck) in rapporto 1:100. Le cellule sono state staccate mediante cell scraper e sottoposte a lisi meccanica mediante pipettaggio. I lisati ottenuti sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 15 minuti a 4 °C e il surnatante contenente la frazione proteica solubile è stato recuperato e utilizzato per la successiva quantificazione proteica oppure conservato a -20 °C.

5.5.3 *Quantificazione delle proteine mediante saggio di Bradford*

La concentrazione proteica dei campioni è stata determinata mediante saggio di Bradford. Per ciascun campione, 1 μ L di lisato è stato aggiunto a 99 μ L di acqua Milli-Q autoclavata e 900 μ L di reagente Bradford. Come bianco è stato utilizzato il buffer di lisi contenente il cocktail di inibitori delle proteasi, mentre la curva di calibrazione è stata preparata utilizzando

concentrazioni crescenti di BSA (1 mg/mL). I campioni e gli standard sono stati quindi analizzati mediante NanoDrop. Sulla base della concentrazione proteica ottenuta, è stato calcolato il volume di campione necessario e i lisati sono stati preparati mediante aggiunta di acqua e Laemmli dye. I campioni sono stati successivamente denaturati mediante incubazione a 95 °C per 10 minuti, sottoposti a una breve centrifugazione e conservati a -20 °C fino all'utilizzo.

5.5.4 Separazione elettroforetica delle proteine mediante SDS-PAGE

Per la separazione elettroforetica delle proteine sono stati preparati gel di poliacrilammide alla percentuale appropriata, in funzione delle proteine di interesse, completati con uno stacking gel finalizzato a concentrare i campioni prima della separazione. I campioni sono stati caricati nei pozzetti insieme a un marker di peso molecolare (3 µL) e sottoposti a SDS-PAGE utilizzando un running buffer costituito da acqua distillata, Tris-glicina e 0,1% SDS. La corsa elettroforetica è stata avviata a 60 V; una volta raggiunto lo stacking gel, il voltaggio è stato progressivamente aumentato a 80 V, quindi a 100 V dopo 15 minuti e infine a 120 V dopo ulteriori 15 minuti. L'elettroforesi è stata proseguita fino alla migrazione del loading dye oltre il margine inferiore del gel.

5.5.5 Trasferimento delle proteine su membrana

Al termine della separazione elettroforetica, le proteine sono state trasferite dal gel a una membrana di nitrocellulosa. Il trasferimento è stato effettuato utilizzando un transfer buffer costituito da Tris-glicina, 20% metanolo e acqua distillata. Prima dell'assemblaggio del sistema di trasferimento, gel, carta Whatman, spugne e membrana sono stati equilibrati nel transfer buffer freddo. Il sandwich di trasferimento è stato assemblato assicurandosi di mantenere tutti i componenti immersi nel buffer e di eliminare eventuali bolle d'aria tra gel e membrana. Il trasferimento è stato quindi effettuato per 90 minuti, mantenendo il sistema in ghiaccio.

5.5.6 Immunodetenzione delle proteine

In seguito al trasferimento, nel caso della membrana di nitrocellulosa, l'efficienza del processo è stata verificata mediante colorazione con rosso Ponceau. La membrana è stata successivamente lavata con acqua distillata e TBS-Tween 1X fino alla completa rimozione del colorante. Per ridurre le interazioni aspecifiche degli anticorpi, la membrana è stata sottoposta a blocking per almeno 1 ora in agitazione utilizzando una soluzione di latte al 5% preparata in TBS-Tween.

La membrana è stata quindi incubata con l'anticorpo primario specifico per la proteina di interesse, opportunamente diluito in latte al 5%, overnight a 4 °C. Il giorno successivo, la membrana è stata sottoposta a tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con TBS-Tween e successivamente incubata con l'anticorpo secondario, diluito 1:5000 in latte, per 40–60 minuti in agitazione. Dopo tre ulteriori lavaggi da 10 minuti con TBS-Tween, il segnale è stato sviluppato mediante kit Clarity, utilizzando i due reagenti in rapporto 1:1, e acquisito mediante ChemiDoc.

Per la normalizzazione del segnale, la membrana è stata successivamente sottoposta a tre lavaggi da 10 minuti con TBS-Tween e incubata per 1 ora con un anticorpo diretto contro una proteina housekeeping, quale actina o tubulina. Dopo tre ulteriori lavaggi, la membrana è stata incubata con l'appropriato anticorpo secondario per 60 minuti, nuovamente lavata tre volte con TBS-Tween e infine acquisita mediante ChemiDoc.

5.6 Trasfezione di siRNA mediante Lipofectamine RNAiMAX

Il silenziamento dell'espressione genica è stato effettuato mediante transfezione di small interfering RNA (siRNA) utilizzando il reagente Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen), secondo le indicazioni fornite dal produttore. Le cellule sono state seminate 100×10^5 in modo da raggiungere una confluenza compresa tra il 60 e l'80% al momento della transfezione.

Per la preparazione dei complessi siRNA-lipide, Lipofectamine® RNAiMAX e il siRNA sono stati inizialmente diluiti separatamente in terreno Opti-MEM® Reduced Serum Medium. Le due soluzioni sono state successivamente miscelate in rapporto 1:1 e incubate per 5 minuti a temperatura ambiente, al fine di consentire la formazione dei complessi

siRNA-lipide. I complessi così ottenuti sono stati quindi aggiunti direttamente alle cellule in coltura.

Le cellule trasfettate sono state mantenute a 37 °C per un periodo compreso tra 1 e 3 giorni, al termine del quale sono state raccolte e sottoposte alle successive analisi sperimentali per valutare gli effetti del silenziamento genico.

6. Bibliografia

1. Zhou, Q., et al., Ferroptosis in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Signal Transduct Target Ther*, 2024. **9**(1): p. 55.
2. Wang, Y., et al., Iron Metabolism in Cancer. *Int J Mol Sci*, 2018. **20**(1).
3. Manz, D.H., et al., Iron and cancer: recent insights. *Ann N Y Acad Sci*, 2016. **1368**(1): p. 149–61.
4. Zhou, L., et al., Alterations in Cellular Iron Metabolism Provide More Therapeutic Opportunities for Cancer. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(5).
5. Hsu, M.Y., et al., Iron: An Essential Element of Cancer Metabolism. *Cells*, 2020. **9**(12).
6. Liang, D., A.M. Minikes, and X. Jiang, Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling. *Mol Cell*, 2022. **82**(12): p. 2215–2227.
7. Chen, X., et al., Characteristics and Biomarkers of Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 637162.
8. Lee, J.Y., et al., Lipid Metabolism and Ferroptosis. *Biology (Basel)*, 2021. **10**(3).
9. Chen, X., et al., Iron Metabolism in Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 590226.
10. Zhou, Q., et al., Ferroptosis: mechanisms and therapeutic targets. *MedComm (2020)*, 2024. **5**(12): p. e70010.
11. Feng, H. and B.R. Stockwell, Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? *PLoS Biol*, 2018. **16**(5): p. e2006203.
12. Qi, D. and M. Peng, Ferroptosis-mediated immune responses in cancer. *Front Immunol*, 2023. **14**: p. 1188365.
13. Hassannia, B., P. Vandenabeele, and T. Vanden Berghe, *Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer*. *Cancer Cell*, 2019. **35**(6): p. 830–849.
14. Jin, J., et al., Ferroptosis as an approach to leverage cancer metabolism. *Trends Cell Biol*, 2026. **36**(7): p. 545–560.
15. Ma, T., et al., GPX4-independent ferroptosis-a new strategy in disease's therapy. *Cell Death Discov*, 2022. **8**(1): p. 434.

16. Doll, S., et al., FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, 2019. **575**(7784): p. 693–698.
17. Dai, Q., et al., Inhibition of FSP1: A new strategy for the treatment of tumors (Review). *Oncol Rep*, 2024. **52**(2).
18. Punziano, C., et al., Antioxidant Systems as Modulators of Ferroptosis: Focus on Transcription Factors. *Antioxidants (Basel)*, 2024. **13**(3).
19. Matsunaga, T., et al., Pathophysiological roles of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) in development of cisplatin resistance in human colon cancers. *Chem Biol Interact*, 2013. **202**(1-3): p. 234–42.
20. Tedesco, J., M. Jaradeh, and W.T. Vigneswaran, Malignant Pleural Mesothelioma: Current Understanding of the Immune Microenvironment and Treatments of a Rare Disease. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(18).
21. Jain, M., et al., Malignant Pleural Mesothelioma: A Comprehensive Review. *J Clin Med*, 2024. **13**(19).
22. Hajj, G.N.M., et al., Malignant pleural mesothelioma: an update. *J Bras Pneumol*, 2021. **47**(6): p. e20210129.
23. van Zandwijk, N., et al., Guidelines for the diagnosis and treatment of malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Dis*, 2013. **5**(6): p. E254–307.
24. Brcic, L. and I. Kern, Clinical significance of histologic subtyping of malignant pleural mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res*, 2020. **9**(3): p. 924–933.
25. Febres-Aldana, C.A., et al., Diffuse Pleural Mesothelioma: Advances in Molecular Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Annu Rev Pathol*, 2024. **19**: p. 11–42.
26. Liu, G., P. Cheresch, and D.W. Kamp, Molecular basis of asbestos-induced lung disease. *Annu Rev Pathol*, 2013. **8**: p. 161–87.
27. Donaldson, K., et al., Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol*, 2010. **7**: p. 5.
28. Yang, H., J.R. Testa, and M. Carbone, Mesothelioma epidemiology, carcinogenesis, and pathogenesis. *Curr Treat Options Oncol*, 2008. **9**(2-3): p. 147–57.

29. Bibby, A.C., et al., Malignant pleural mesothelioma: an update on investigation, diagnosis and treatment. *Eur Respir Rev*, 2016. **25**(142): p. 472–486.
30. Broaddus, V.C., et al., Non-neoplastic and neoplastic pleural endpoints following fiber exposure. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2011. **14**(1-4): p. 153–78.
31. Napoli, F., et al., Pathological Characterization of Tumor Immune Microenvironment (TIME) in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(11).
32. Wadowski, B., R. Bueno, and A. De Rienzo, Immune Microenvironment and Genetics in Malignant Pleural Mesothelioma. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 684025.
33. Desage, A.L., et al., The Immune Microenvironment of Malignant Pleural Mesothelioma: A Literature Review. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(13).
34. Cersosimo, F., et al., Mesothelioma Malignancy and the Microenvironment: Molecular Mechanisms. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(22).
35. Minnema-Luiting, J., et al., Heterogeneity in Immune Cell Content in Malignant Pleural Mesothelioma. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(4).
36. Nishimura, Y., et al., Functional Alteration of Natural Killer Cells and Cytotoxic T Lymphocytes upon Asbestos Exposure and in Malignant Mesothelioma Patients. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 238431.
37. Cornwall, S.M., et al., Human mesothelioma induces defects in dendritic cell numbers and antigen-processing function which predict survival outcomes. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(2): p. e1082028.
38. Bertin, B., M. Zugman, and G. Schvartsman, The Current Treatment Landscape of Malignant Pleural Mesothelioma and Future Directions. *Cancers (Basel)*, 2023. **15**(24).
39. Sayan, M., et al., Current treatment strategies in malignant pleural mesothelioma with a treatment algorithm. *Adv Respir Med*, 2019. **87**(5): p. 289–297.
40. Kindler, H.L., et al., Treatment of Pleural Mesothelioma: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol*, 2025. **43**(8): p. 1006–1038.
41. Ai, J. and J.P. Stevenson, Current issues in malignant pleural mesothelioma evaluation and management. *Oncologist*, 2014. **19**(9): p. 975–84.
42. (AIOM), A.I.d.O.M., *Linee Guida Mesotelioma Pleurico*. 2025, Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM).

43. Scherpereel, A., et al., Five-Year Clinical Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab Versus Chemotherapy as First-Line Treatment for Unresectable Pleural Mesothelioma in CheckMate 743. *J Clin Oncol*, 2026. **44**(9): p. 742–749.
44. Chiec, L. and D.S. Bruno, Immunotherapy for Treatment of Pleural Mesothelioma: Current and Emerging Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*, 2024. **25**(19).
45. Kindler, H.L., et al., Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(13): p. 1343–1373.
46. Gong, D., et al., Role of ferroptosis on tumor progression and immunotherapy. *Cell Death Discov*, 2022. **8**(1): p. 427.
47. Gagliardi, M., et al., Ferroptosis: a new unexpected chance to treat metastatic melanoma? *Cell Cycle*, 2020. **19**(19): p. 2411–2425.
48. Tang, D., O. Kepp, and G. Kroemer, Ferroptosis becomes immunogenic: implications for anticancer treatments. *Oncoimmunology*, 2020. **10**(1): p. 1862949.
49. Demuyne, R., et al., Immunogenic ferroptosis and where to find it? *J Immunother Cancer*, 2021. **9**(12).
50. Cui, K., K. Wang, and Z. Huang, Ferroptosis and the tumor microenvironment. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024. **43**(1): p. 315.
51. Xu, S., et al., Uptake of oxidized lipids by the scavenger receptor CD36 promotes lipid peroxidation and dysfunction in CD8(+) T cells in tumors. *Immunity*, 2021. **54**(7): p. 1561–1577 e7.
52. Wang, W., et al., CD8(+) T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy. *Nature*, 2019. **569**(7755): p. 270–274.
53. Scarpellini, C., et al., Beyond ferrostatin-1: a comprehensive review of ferroptosis inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*, 2023. **44**(12): p. 902–916.
54. Weaver, K. and R. Skouta, The Selenoprotein Glutathione Peroxidase 4: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. *Biomedicines*, 2022. **10**(4).
55. Zuo, X., et al., AKR1C1 Protects Corneal Epithelial Cells Against Oxidative Stress-Mediated Ferroptosis in Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2022. **63**(10): p. 3.
56. Yang, W.S., et al., Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 2014. **156**(1-2): p. 317–331.

57. Guo, Q., et al., Transferrin receptors. *Exp Mol Med*, 2025. **57**(4): p. 724–732.
58. Santana-Codina, N. and J.D. Mancias, The Role of NCOA4-Mediated Ferritinophagy in Health and Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2018. **11**(4).
59. Battaglia, A.M., et al., Ferroptosis and Cancer: Mitochondria Meet the "Iron Maiden" Cell Death. *Cells*, 2020. **9**(6).

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la Prof.ssa Chiara Porta per avermi accolta e dato l'opportunità di svolgere il mio percorso di tesi all'interno del suo laboratorio. La ringrazio, inoltre, per la sua costante disponibilità e comprensione, che mi hanno permesso di affrontare questo percorso con serenità. La sua guida e il suo sostegno sono stati per me preziosi e hanno contribuito a rendere questa esperienza non solo formativa, ma anche piacevole e stimolante.

Un sentito ringraziamento va anche alla dottoranda Gaia, per il suo costante supporto e la pazienza che mi ha mostrato durante tutto questo percorso. Sei stata la dottoranda migliore che potessi desiderare e il tuo aiuto è stato per me fondamentale.

A voi, mamma e papà, va il ringraziamento più grande. Desidero ringraziarvi per il sostegno che mi avete dato durante questo lungo percorso e, soprattutto per l'infinita pazienza per tutte le ore passate ad ascoltarmi ripetere, per aver sopportato le mie ansie e le mie insicurezze come fossero le vostre. Siete stati la mia roccia, il mio posto sicuro, il mio rifugio, sempre pronti a spronarmi e a ricordarmi di non mollare mai. Non vi sarò mai grata abbastanza per tutto ciò che fate per me ogni giorno.

A te, Andrea, il mio fratellino, di poche parole ma sempre pronto ad ascoltarmi quando ne ho bisogno. Anche tu sei stato una parte importante di questo percorso: in questi anni mi hai visto trascorrere ore china sui libri e, qualche volta, è toccato anche a te ascoltarmi ripetere, senza quasi mai tirarti indietro. Grazie per esserci sempre, a modo tuo, e per essere il fratello migliore che potessi desiderare. Forse non te lo dico abbastanza, o forse non te lo dico proprio mai, ma spero tu sappia che ti voglio un bene infinito.

A te, Marco, che sei stato la spalla su cui piangere e che hai vissuto insieme a me i momenti più difficili di questo percorso. Senza che avessi bisogno di chiedertelo, sei sempre rimasto al mio fianco, anche quando starmi accanto non era semplice. Sei sempre stato il mio fan numero uno, indipendentemente dal risultato, pronto a gioire con me per ogni traguardo e a sostenermi davanti a ogni difficoltà. Grazie per ricordarmi ogni giorno quanto valgo, per credere in me anche quando io per prima faccio fatica a farlo e per esserci, sempre. Grazie per essere la mia persona, la mia metà e per rendermi felice ogni giorno. Ti amo più di ieri, ma meno di domani.

Grazie a tutti voi!