

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

*Effetti dell'inibizione dell'ALDH1A3 in modelli di co-culture 3D di cellule di
mesotelioma pleurico e neutrofili*

Relatore

Prof.ssa Giulia PINTON

Candidato

Davide PATRONO

Anno Accademico 2022-2023

Sessione Straordinaria

INDICE

1.INTRODUZIONE.....	1
1.1 Aldeidi tossiche: produzione, metabolismo e meccanismi molecolari di tossicità	3
1.2 Le Aldeidi deidrogenasi (ALDH).....	4
1.2.1 Le Aldeidi deidrogenasi della famiglia 1A.....	5
1.2.2 L'Aldeide deidrogenasi 1A3 (ALDH1A3).....	6
1.3 Espressione dell'enzima ALDH1A3 nei tumori	7
1.3.1 Ruolo dell'ALDH1A3 nella progressione tumorale e nella chemioresistenza.....	8
1.3.2 Ruolo dell'ALDH1A3 nella staminalità.....	11
1.4 L'ALDH1A3 come bersaglio terapeutico.....	12
Inibitori selettivi per l'ALDH1A3.....	12
1.5 Il mesotelioma pleurico maligno.....	13
1.5.1 L'asbesto.....	14
1.5.1.1 I meccanismi di carcinogenesi dell'asbesto.....	14
1.5.2 Sottotipi istologici e stadiazione TNM del mesotelioma pleurico maligno.....	15
1.6 Approcci terapeutici.....	17
1.7 ALDH1A3 nel MPM	18
1.8 I neutrofili nel microambiente tumorale.....	19
2.SCOPO DEL LAVORO.....	21
3.MATERIALI e METODI.....	25
3.1 Colture cellulari.....	27
3.2 Conta cellulare.....	27
3.3 Colture cellulari 3D: sferoidi multicellulari (MCS).....	28
3.4 Estrazione delle proteine.....	28

3.5 Lettura allo spettrofotometro.....	29
3.6 Analisi western blot.....	29
3.7 Estrazione dell'RNA.....	33
3.8 RT-Polymerase chain reaction (PCR).....	34
3.9 Elettroforesi su gel di agarosio.....	36
3.10 Immunocolorazione con dapi.....	37
3.11 Isolamento dei neutrofilo umani.....	38
3.12 Quantificazione di IL-8 secreta.....	38
3.13 Quantificazione della malondialdeide.....	38
4.RISULTATI.....	41
4.1 NR6, un inibitore selettivo dell'ALDH1A3, riduce la crescita di MCS MSTO 211-H e causa accumulo di malondialdeide.....	42
4.2 Il trattamento degli MCS MSTO-211H con NR6 induce l'espressione di <i>CDKN2A</i> e <i>IL-6</i> , mentre riduce l'espressione di <i>CXCL8</i>	44
4.3 Il trattamento degli MCS con NR6 determina un comportamento differente dei neutrofilo in co-coltura.....	46
4.4 I neutrofilo in co-coltura con MCS MSTO-211H inducono apoptosi negli MCS trattati con NR6.....	48
5.DISCUSSIONE e CONCLUSIONI	51
7.BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA.....	57

1. INTRODUZIONE

1.1 ALDEIDI TOSSICHE: PRODUZIONE, METABOLISMO E MECCANISMI MOLECOLARI DI TOSSICITÀ

Fonti e produzione di aldeidi

Le aldeidi, molecole organiche reattive ed elettrofile, sono rintracciabili in acqua, suolo, aria, alimenti e materiali presenti nelle abitazioni. Vengono prodotte anche nell'organismo attraverso il metabolismo di amminoacidi, lipidi, carboidrati, vitamine, neurotrasmettitori e steroidi; la perossidazione lipidica (LPO); la detossificazione di xenobiotici a livello epatico e l'auto-ossidazione di carboidrati. Anche la biotrasformazione di alcuni farmaci come ad esempio la ciclofosfamide, l'ifosfamide, il misonidazolo, il felbamato e il sudoxicam (ritirato dal commercio) sono metabolizzati a composti carbonilici ed aldeidici. I composti aldeidici tossici sono la 4-idrossi-2-nonenale (4-HNE), l'acroleina, l'acetaldeide, la malondialdeide (MDA), il gliossale, il metilgliossale, la gliceraldeide, la glutammato γ -semialdeide e la lattaldeide [1, 2].

Metabolismo delle aldeidi

Nell'organismo sono presenti differenti enzimi che catalizzano la conversione delle aldeidi in diversi metaboliti (acido retinoico, acido γ -amminobutirrico, betaina, gliossale, cis-2-butene-1,4-diolo, ecc...) non tossici. Tali enzimi riducono i livelli intracellulari delle aldeidi tossiche mediante reazioni di ossidoriduzione. Gli enzimi presenti nell'uomo che metabolizzano le aldeidi sono i seguenti: aldeidi ossidasi (AOX), aldo-cheto reduttasi (AKR), proteine appartenenti alla famiglia del citocromo P450 (CYP450), deidrogenasi/reducenti a corta catena (SDR), alcol deidrogenasi (ADH) e aldeidi deidrogenasi (ALDH) [3].

Meccanismi molecolari di tossicità

Le aldeidi reagiscono rapidamente con nucleofili cellulari generando addotti di vario genere e causando effetti di citotossicità, genotossicità, eventi di mutagenesi e carcinogenesi negli organismi viventi. La reazione delle aldeidi con acidi nucleici, proteine, carboidrati, lipidi e componenti delle membrane cellulari ha come conseguenza il blocco o l'impedimento delle normali funzioni cellulari. Gli effetti cancerogeni e di citotossicità sono causati, nella maggior parte dei casi, dalla formazione di addotti con DNA e proteine. Inoltre, le aldeidi sono una delle cause di stress ossidativo che può portare a morte cellulare (Figura 1) [3].

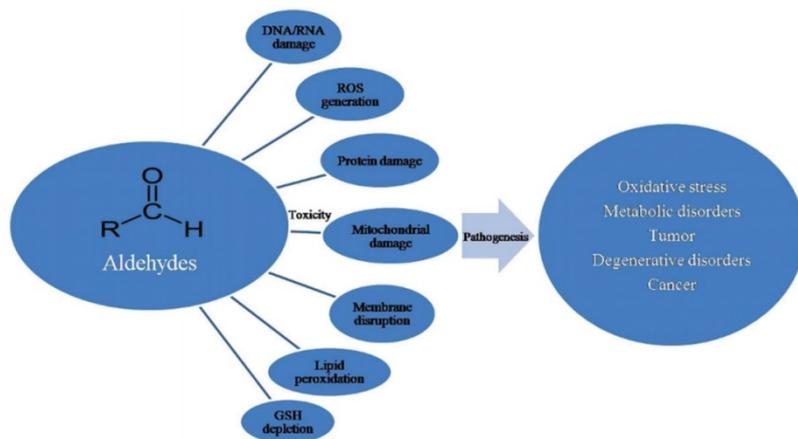


Figura 1. Tossicità correlata alle aldeidi e patogenesi nell'uomo [3]

1.2 LE ALDEIDI DEIDROGENASI (ALDH)

Alla superfamiglia delle aldeidi deidrogenasi (ALDH) appartengono 19 isoforme (riportate in Tabella 1) le quali catalizzano in maniera irreversibile la reazione di ossidazione, dipendente da NAD(P)^+ , delle aldeidi (esogene ed endogene) nei corrispettivi acidi carbossilici.

ALDH1A1	ALDH1A2	ALDH1A3	ALDH1B1	ALDH1L1
ALDH1L2	ALDH2	ALDH3A1	ALDH3A2	ALDH3B1
ALDH3B2	ALDH4A1	ALDH5A1	ALDH6A1	ALDH7A1
ALDH8A1	ALDH9A1	ALDH16A1	ALDH18A1	

Tabella 1. 19 isoforme della famiglia ALDH [3]

Le ALDH contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi cellulare tramite il metabolismo di substrati aldeidici, sono enzimi coinvolti in proliferazione, differenziamento, sopravvivenza cellulare e risposta allo stress ossidativo.

I livelli di espressione delle differenti isoforme di ALDH sono diversi nei vari organi e tessuti (fegato, cuore, reni, cervello, stomaco e retina) così come la loro distribuzione all'interno dei compartimenti subcellulari (nucleo, citosol, reticolo endoplasmatico e mitocondri). Alcune isoforme si localizzano

spesso in più di un compartimento. Rispettivamente alla loro funzione possiedono differente specificità di substrato [3].

Il meccanismo cinetico di reazione delle ALDH prevede: **i) l'interazione con il cofattore (NAD(P)⁺)** che nella prima fase della reazione porta alla diminuzione della pKa della cisteina catalitica situata nel sito di legame per il substrato. In questo modo il gruppo sulfidrilico della cisteina può essere deprotonato da parte di uno ione idrossido (OH⁻) generato in precedenza dalla deprotonazione di una molecola di H₂O per mezzo di un residuo di acido glutammico; **ii) successivamente avviene una reazione nucleofila tra il gruppo tiolato della cisteina e l'aldeide** che porta alla formazione di un intermedio tioemiacetale, seguito da un trasferimento di un idruro al cofattore in modo tale da formare NAD(P)H e un intermedio tioestere; **iii) il tioestere viene idrolizzato ad acido carbossilico** da una molecola di H₂O attivata per mezzo dell'estrazione di un protone da parte del residuo di acido glutammico; **iv) il cofattore ridotto è rilasciato dal sito catalitico**, in questo modo l'enzima libero può iniziare un nuovo ciclo di catalisi enzimatica (Figura 2) [4].

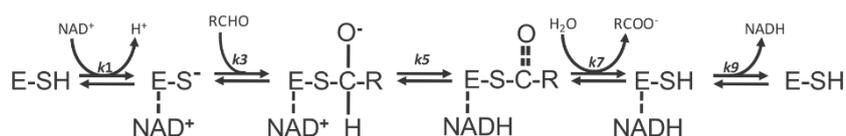


Figura 2. Meccanismo cinetico generale di ossidazione delle aldeidi da parte delle ALDH. Le costanti di velocità per le fasi coinvolte nella catalisi sono k_1 , legame del coenzima ossidato; k_3 , legame dell'aldeide; k_5 , trasferimento dell'idruro; k_7 , deacilazione; k_9 , rilascio del coenzima ridotto [4]

In letteratura sono descritti processi fisiologici e patologici mediati da differenti tipologie di aldeidi (alifatiche e aromatiche) che vengono ossidate da numerose isoforme appartenenti alla superfamiglia delle ALDH. Ad esempio le isoforme ALDH5A1, ALDH9A1, ALDH1A3, ALDH3A1, ALDH3A2 e ALDH1L1 sono coinvolte rispettivamente nel metabolismo dell'acido γ -aminobutirrico (GABA); nel metabolismo della colina; nella detossificazione cellulare da aldeidi citotossiche e citostatiche e nell'ossidazione del retinale [2].

1.2.1 LE ALDEIDI DEIDROGENASI DELLA FAMIGLIA 1A

Le tre isoforme di aldeidi deidrogenasi appartenenti alla sottofamiglia 1A sono gli enzimi ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3. Le tre isoforme condividono circa il 70% degli amminoacidi che compongono la loro struttura primaria e possiedono topologie di struttura molto simili tra di loro. **ALDH1A1** è espressa ad alti livelli nei neuroni dopaminergici il cui differenziamento e sviluppo

dipende strettamente dall'acido retinoico (RA); questo enzima svolge un ruolo fondamentale nel sistema nervoso centrale (SNC) nel mantenere bassi i livelli di 3,4-diidrossifenilacetaldeide (DOPAL, metabolita neurotossico aldeidico della dopamina). Inoltre, ha un ruolo nel promuovere il differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche, è coinvolta nel metabolismo dell'acetaldeide e nella resistenza ad alcuni farmaci antitumorali poiché detossifica le cellule da alcuni dei loro metaboliti aldeidici attivi. **ALDH1A2** ha la più alta specificità di substrato per l'acido all-trans retinoico (ATRA) e svolge un ruolo protettivo dalla tossicità indotta dall'acetaldeide nelle cellule epiteliali del cristallino. **ALDH1A3** ha un ruolo nel contrastare lo stress ossidativo a livello cellulare detossificando aldeidi alifatiche per le quali ha un'affinità molto elevata. *In vitro* è stato dimostrato che possiede elevata attività nell'ossidazione dell'ATRA, ma non nei confronti dell'acetaldeide [3,5].

1.2.2 L' ALDEIDE DEIDROGENASI 1A3 (ALDH1A3)

L'ALDH1A3 è un omodimero funzionale che catalizza la reazione di ossidazione dell'all-trans-retinale e del 9-cis-retinale ad acido retinoico. Nell'uomo l'espressione di questa isoforma è stata descritta nella ghiandola salivare, nello stomaco, nella mammella, nel rene e nella retina ventrale. L'ALDH1A3 è coinvolta nello sviluppo dei bulbi olfattivi, delle unità follicolari pilifere, del prosencefalo e della corteccia cerebrale. Modelli murini *aldh1a3 knockout* muoiono alla nascita poiché presentano gravi difetti di sviluppo delle vie aeree superiori e dell'occhio dovute alla carenza di acido retinoico durante alcune fasi critiche dell'embriogenesi. Mutazioni a carico del gene codificante l'ALDH1A3 provocano infatti uno sviluppo anomalo dell'occhio e/o anoftalmia sia nell'uomo che in modelli animali [3].

I recettori dell'acido retinoico (RAR α , RAR β e RAR γ) vengono attivati dall'acido all-trans retinoico, dal 9-cis acido retinoico, dal 13-cis acido retinoico e possono formare eterodimeri con i recettori dei retinoidi X (RXR α , RXR β e RXR γ). Questi ultimi sono attivati dall'interazione preferenziale con il 9-cis acido retinoico. A livello del DNA sono presenti sequenze specifiche denominate *Retinoic Acid Responsive Elements* (RARE) che vengono riconosciute dall'eterodimero RAR/RXR, attivato dall'interazione con l'acido retinoico, il quale si lega ad esse e promuove la trascrizione genica. L'interazione dell'acido retinoico con il complesso RAR/RXR ha come conseguenza il cambio conformazionale dell'eterodimero che recluta dei co-attivatori tra cui SRC-1, SRC-2, SRC-3 (Co-attivatori dei Recettori Steroidei) [6].

1.3 ESPRESSIONE DELL'ENZIMA ALDH1A3 NEI TUMORI

L'elevata espressione dell'ALDH1A3 è stata riscontrata in diversi tumori tra cui: carcinoma mammario triplo negativo, mesotelioma pleurico maligno, carcinoma prostatico, adenocarcinoma del pancreas e dello stomaco, NSCLC (*Non Small Cell Lung Cancer*), colangiocarcinoma, melanoma e glioblastoma; è associata a prognosi sfavorevole, progressione di malattia e rischio di recidiva. In letteratura è riportato che elevati livelli di espressione di ALDH1A3, in pazienti affette da carcinoma mammario, sono associati ad una maggiore incidenza di metastasi e ad una prognosi peggiore rispetto alle pazienti con bassi livelli di espressione [7].

Chen M. H. et al. hanno valutato l'espressione di ALDH1A3 in 77 pazienti affetti da colangiocarcinoma intraepatico reseccabile e hanno riportato che i pazienti con un'elevata espressione dell'enzima avevano una minore sopravvivenza globale [8].

Kawakami R et al. hanno analizzato i livelli di espressione di ALDH1A3 in numerosi tumori gastrici e hanno osservato che i livelli più alti di espressione dell'enzima erano presenti nei campioni biotici provenienti da pazienti con tumore gastrico dal terzo stadio. Un'ulteriore analisi di sopravvivenza Kaplan-Meier ha dimostrato che l'elevata espressione di *ALDH1A3* correlava con una prognosi sfavorevole [9].

Nie S. et al. hanno analizzato l'espressione di ALDH1A3 mediante analisi immunocitochimica (IHC) in una coorte di 88 pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico duttale (PDAC). L'analisi IHC ha permesso di identificare i pazienti con elevata oppure bassa espressione di ALDH1A3. L'analisi Kaplan-Meier ha evidenziato che nei pazienti con alta espressione di ALDH1A3 la sopravvivenza diminuiva da 21 a 14 mesi [10].

Gan C. et al. hanno analizzato i dati TCGA (The Cancer Genome Atlas) di espressione genica in campioni biotici di glioblastoma (GBM). Attraverso un'analisi Kaplan-Meier è stato riscontrato che i pazienti con alti livelli di espressione di *ALDH1A3* presentavano una sopravvivenza globale mediana di 10 mesi rispetto ai 16 mesi dei pazienti con bassa espressione [11].

1.3.1 RUOLO DELL'ALDH1A3 NELLA PROGRESSIONE TUMORALE E NELLA CHEMIORESISTENZA

In letteratura è stato descritto che l'elevata espressione dell'ALDH1A3 è implicata nella progressione tumorale attraverso la regolazione di diversi meccanismi molecolari.

L'espressione di ALDH1A3 nel cancro del colon-retto diminuisce i livelli del miR-200 up-regolando indirettamente l'espressione di ZEB1, ZEB2 (*Zinc finger E-box-Binding homebox 1/2*) e SNAI2 (*Snail Family transcriptional repressor 2*) implicati nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e coinvolti nella progressione tumorale e nella metastatizzazione [12].

In vitro, nella linea cellulare umana di PDAC, PANC-1, è stato dimostrato che la sovra-espressione di ALDH1A3 aumenta la capacità migratoria e l'invasione promuovendo la glicolisi mediante attivazione delle vie di segnalazione PI3K/AKT/mTOR, PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) ed HK2 (*Hexokinase 2*). *In vivo*, il silenziamento di *ALDH1A3* nella linea cellulare HPAC (*Human Pancreatic Adenocarcinoma*) causa una significativa riduzione delle metastasi polmonari in topi nudi atimici inoculati nella vena caudale [13].

Feng H. et al. hanno analizzato in linee cellulari di tumore al polmone (A549) e al colon-retto (HCT116) il ruolo di ALDH1A3 nella proliferazione e invasione. Il silenziamento di *ALDH1A3* sia nella linea cellulare A549 che nella linea HCT116 riduce sia la proliferazione cellulare che la capacità di invasione. Gli autori hanno dimostrato che il silenziamento di *ALDH1A3* causa la riduzione dei livelli di espressione di CXCR4 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*), recettore per il CXCL12/SDF-1 (*Stromal Cell-Derived Factor-1*), coinvolto nella proliferazione, migrazione e invasione cellulare. La ri-espressione di CXCR4 nelle cellule silenziate *ALDH1A3* ripristina la proliferazione cellulare [14].

Mao P et al. e *Luo Y. et al.* hanno riportato che il silenziamento di *ALDH1A3* rispettivamente in linee cellulari di glioblastoma [15] e di melanoma [16] causa l'inibizione della proliferazione cellulare e l'aumento dell'apoptosi.

Marcato P. et al. hanno descritto che in modelli murini NOD/SCID di adenocarcinoma mammario triplo negativo l'elevata espressione di ALDH1A3 determina l'aumento delle metastasi polmonari [17]. Gli autori riportano che l'aumento del numero di metastasi polmonari potrebbe essere ricondotto ad un aumento di espressione dei geni codificanti la mucina 4 (MUC4) e l'homeobox A1 (HOXA1) indotti dall'acido retinoico [7].

In letteratura, è stato descritto un ruolo di ALDH1A3 oltre che nella progressione neoplastica, anche nella farmacoresistenza.

I meccanismi di chemioresistenza mediati da ALDH1A3 non sono riconducibili ad un suo ruolo diretto nel mediare la detossificazione dei farmaci, piuttosto questo enzima è implicato nella regolazione di diverse vie di segnalazione correlate alla resistenza ai farmaci antitumorali. Al contrario, le isoforme ALDH1A1 e 3A1 attuano un meccanismo diretto di detossificazione enzimatica ad esempio delle oxazafosforine (ciclofosfamide, 4-idrossiciclofosfamide, ifosfamide) [5].

i) Nel carcinoma mammario sono note resistenze ai chemioterapici associate all'up-regolazione dell'ALDH1A3, tra cui la resistenza al paclitaxel (agente antineoplastico appartenente al gruppo dei taxani che interferisce nel processo di divisione cellulare) e al cisplatino (agente alchilante che crea addotti al DNA e interferisce nei processi di duplicazione e trascrizione).

ii) *Reynolds D. S. et al.* hanno dimostrato che in linee cellulari di carcinoma mammario (MDA-MB-231 e MCF7), coltivate in monostrato e in modelli tridimensionali (3D) incorporati in una matrice di collagene, il trattamento con paclitaxel o cisplatino causa l'insorgenza di una sottopopolazione cellulare con fenotipo staminale farmacoresistente che esprime alti livelli di *ALDH1A3* [18].

iii) In colture cellulari di colangiocarcinoma umano (HuCC1, KKKU-213A KKKU-213/B) l'aumento dell'espressione dell'ALDH1A3, causato dall'attivazione delle vie di segnalazione STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) e ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) come conseguenza dell'iperattivazione di EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), determina la resistenza alla gemcitabina (agente antineoplastico appartenente al gruppo degli antimetaboliti pirimidinici) [8, 19].

iv) Nel carcinoma gastrico l'elevata espressione di ALDH1A3 media la resistenza al 5-fluorouracile (5-FU, agente chemioterapico appartenente al gruppo degli antimetaboliti pirimidinici), al cisplatino e al paclitaxel.

v) *Kawakami R. et al.* hanno dimostrato che in cellule di tumore gastrico (JSC15-3, JSC17-2 e JSC17-7) il silenziamento di *ALDH1A3* riduce l'attivazione di mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) e la fosforilazione di p70 S6 chinasi (*ribosomal protein S6 Kinase*), effettore a valle di mTOR, causando la riduzione della proliferazione cellulare [9].

vi) *Lang T. et al.* hanno osservato una correlazione positiva tra i livelli di espressione di ALDH1A3 e KDM4C (*lysine-specific demethylase 4C*) in tessuti tumorali gastrici scarsamente differenziati. KDM4C demetila la lisina 9 trimetilata dell'istone 3 (H3K9me3) e la lisina 9 dimetilata dell'istone 3 (H3K9me2) nelle regioni del promotore del gene *ALDH1A3*, causando un aumento della sua espressione. A sua volta l'ALDH1A3 aumenta l'espressione di KDM4C attraverso la segnalazione

mediata dall'acido retinoico in un meccanismo di regolazione a *feedback*. Esperimenti di silenziamento genico di *KDM4C* e *ALDH1A3* hanno dimostrato che la riduzione della loro espressione sensibilizza modelli cellulari tridimensionali di carcinoma gastrico al trattamento con 5-FU o cisplatino [20].

vii) *Bauzone M. et al.* hanno dimostrato che in colture cellulari di cancro del colon-retto resistenti al 5-FU, 5F31, l'attivazione costitutiva di YAP (*Yes-Associated Protein*) causa un aumento dell'espressione di *ALDH1A3*, rispetto alla linea parentale, ed è responsabile della farmacoresistenza [21].

viii) *Corominas-Faja B. et al.* hanno generato un modello preclinico di cellule di NSCLC con resistenza acquisita all'erlotinib (inibitore selettivo reversibile dell'attività tirosin-chinasica di EGFR) e con delezione dell'esone 19 ($\Delta E746-A750$) a livello del gene codificante EGFR, in presenza continua di alte dosi di erlotinib. Attraverso analisi trascrittomiche gli autori hanno identificato l'*ALDH1A3* tra i geni maggiormente espressi dalle cellule farmaco-resistenti. Le cellule resistenti all'erlotinib infatti avevano una maggiore attività deidrogenasica rispetto alla linea parentale responsiva al farmaco. Pertanto, è stato osservato per la prima volta che la perdita di responsività all'erlotinib in cellule di NSCLC con mutazione in *EGFR* è associata ad una elevata espressione ed attività di *ALDH1A3* [22].

ix) l'*ALDH1A3* è stata implicata anche in fenomeni di resistenza alla radioterapia. Il silenziamento di *ALDH1A3* in cellule squamose del tumore testa-collo (HNSCC) causa una maggior sensibilità all'irradiazione [23].

1.3.2 RUOLO DELL'ALDH1A3 NELLA STAMINALITÀ

Le cellule cancerose staminali (CSC) sono una sottopopolazione di cellule tumorali che presentano un caratteristico fenotipo staminale, possiedono capacità di auto-rinnovamento e sono resistenti ai farmaci. Le CSC esprimono livelli elevati di alcuni marcatori di membrana tra cui CD133, CD44, CD24, CD29 ed EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*) [24]. Notoriamente l'elevata espressione e attività delle ALDH della famiglia 1A è considerata marcatore di staminalità [25].

Una metodologia utilizzata per identificare popolazioni cellulari tumorali arricchite in CSC è il saggio Aldefluor.

Il saggio rileva la conversione del substrato BODIPY™-aminoacetaldeide (BAAA) nel prodotto BODIPY™ aminoacetato (fluorescente). La corretta identificazione delle cellule positive al saggio viene confermata con l'aggiunta di dietilaminobenzaldeide (DEAB) che inibisce l'attività enzimatica delle ALDH e causa la diminuzione della conversione di BAAA nel prodotto fluorescente. Le popolazioni cellulari che mostrano positività al saggio sono indicate come ALDH^{bright} o ALDH^{high} [25, 26].

Luo Y et al. hanno dimostrato che in linee cellulari di melanoma vi è una elevata attività all'Aldefluor test determinata dall'isoforma 1A3 e che l'espressione dell'enzima contribuisce al mantenimento di un fenotipo staminale ed immuno-evasivo [27].

Nelle *Mes GSCs* (CSC di glioblastoma di origine mesenchimale) il fattore di trascrizione FOXD1 (*Foxhead box D1*) è espresso ad alti livelli e regola positivamente la trascrizione di *ALDH1A3*. È stato dimostrato, attraverso saggi *in vitro* di formazione di neurosfere, che l'elevata espressione di ALDH1A3 è fondamentale per la proliferazione cellulare ed il mantenimento del fenotipo staminale [28, 29].

Linee cellulari di NSCLC testate mediante saggio Aldefluor hanno mostrato elevata attività ALDH mediata dall'isoforma 1A3. Il silenziamento di *ALDH1A3* in queste cellule determina una significativa riduzione della clonogenicità e tumorigenicità (testata mediante *liquid colony formation assay*), dovuta alla diminuzione dei livelli di pSTAT3 (Phospho-STAT3 tyr705). L'espressione di ALDH1A3 e l'attivazione della via di segnalazione di STAT3 sono essenziali nel mantenimento del fenotipo staminale in linee cellulari di NSCLC [30].

Feng H. et al., mediante colorazione Aldefluor e separazione attraverso citofluorimetria a flusso, hanno isolato da linee cellulari di cancro al colon (HCT116, SW480, SW620, LOVO) due distinte popolazioni cellulari: ALDH^{high/+} e ALDH^{low/-}. Gli autori hanno dimostrato che la popolazione ALDH^{high/+} esprime alti livelli di ALDH1A3 e possiede proprietà tipiche delle CSC, infatti, le cellule crescono *in vitro* in modo più rapido e possiedono un elevato potenziale clonogenico [14].

1.4 L'ALDH1A3 COME BERSAGLIO TERAPEUTICO

Numerosi composti chimici hanno mostrato un'inibizione delle ALDH anche se non selettiva (pan-inibitori), questi includono: DEAB (Dietilaminobenzaldeide), diadzina, pargilina, idrato di cloralio, citrale, coprina, gossipolo, e Antabuse (disulfiram) [5].

Nel 2016 è stata risolta la struttura cristallina dell'ALDH1A3 in complesso con NAD⁺ e ATRA, ciò ha permesso la progettazione di inibitori selettivi e specifici per questa isoforma che creano impedimento nella tasca di legame per il substrato [31]. Lo sviluppo di inibitori altamente selettivi per questa isoforma è di rilevante interesse poiché l'enzima è preferenzialmente over-espresso nelle cellule tumorali e la loro selettività eviterebbe l'inibizione delle isoforme 1A1 e 1A2.

Inibitori selettivi per l'ALDH1A3

MCI-INI3 è un inibitore competitivo dell'ALDH1A3, la selettività del composto deriva dal suo anello pirazolo-pirimidinico in posizione centrale che interagisce con N469 (Asparagina in posizione 469) e dal gruppo estere che interagisce con T315 (Treonina 315). MCI-INI3 è stato testato *in vitro* in colture cellulari di *Mes GSC* (GSC-326 e GSC-83) nelle quali è stato riscontrato un blocco dell'attività deidrogenasica con la conseguente riduzione della biosintesi di acido retinoico e riduzione della proliferazione cellulare. Saggi biochimici hanno rilevato che la K_i e l' IC_{50} di questo inibitore per l'ALDH1A3 umana ricombinante corrispondono rispettivamente a 556 nM e 0.46 μ M [32].

YD1701 (*dibenzo-30-crown10-ether*) è un inibitore selettivo dell'ALDH1A3, esplica la sua funzione interagendo con amminoacidi idrofobici o attraverso legami idrogeno con amminoacidi contenuti nel sito attivo dell'enzima, tutte queste interazioni favoriscono la stabilità del complesso con la conseguente inibizione dell'attività enzimatica. YD1701 è stato testato sia *in vitro*, in linee cellulari di cancro al colon-retto nelle quali ha ridotto la capacità di invasione, che *in vivo* in modelli murini dove è stato dimostrato diminuire il numero di metastasi ed aumentare la sopravvivenza dei topi. YD1701 ha un IC_{50} 12,84 mg/mL calcolata biochimicamente attraverso saggi di termoforesi su microscala con ALDH1A3 umana ricombinante [12].

NR6 è stato ottenuto attraverso l'ottimizzazione di GA11. **GA11** è un analogo della diazina (molecola naturale), ma con migliori proprietà farmacocinetiche ed è selettivo per le ALDH della famiglia 1A. Possiede un nucleo eterociclico imidazo-[1,2- α]-pirimidinico a cui sono state aggiunte due porzioni planari, aromatiche e lipofile in posizione 2 e 6. GA11 ha dimostrato una buona inibizione *in vitro*

della proliferazione in modelli 3D di cellule di glioma e ha mostrato una potente efficacia *in vivo* in modelli murini di glioblastoma (GBM) xenotrapiantati mediante iniezione intracranica di neurosfere generate dalla linea cellulare MES83 (linea cellulare di *Mes GSC*) [29]. Attraverso dati strutturali ottenuti dalla co-cristallizzazione di GA11 e le 3 isoforme ALDH1A umane *Quattrini L. et al.* hanno ipotizzato che lo spostamento dell'anello fenilico dalla posizione 8 alla 6 avrebbe portato ad un miglioramento della molecola ed hanno quindi sintetizzato nuovi composti: 3a-t [32].

NR6 è un potente inibitore competitivo che ha come bersaglio selettivo l'ALDH1A3 con valori di IC_{50} di $5,3 \pm 1,5 \mu M$ e K_i $3,7 \pm 0,4$, che sono stati stabiliti biochimicamente. NR6 lega l'enzima in una sola posizione; infatti, il gruppo cianidrico blocca la molecola in una posizione rigida. La tirosina in posizione 472 (residuo non conservato nelle altre isoforme ALDH1A) lega saldamente e coordina l'anello piridinico di NR6 con un'interazione π - π stacking *edge-to-face*. Queste interazioni sono ulteriormente stabilizzate da un legame idrogeno tra il gruppo ossidrilico dell'Y472 e l'N¹ di NR6. Il composto testato in saggi *in vitro* su cellule HCT-116 e U87MG ha dimostrato un efficace effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare, l'invasività, il potenziale metastatico ed un cruciale effetto nella down-regolazione di marcatori di staminalità (Nes, Nanog1, CD44, Prom1) [33,34].

1.5 IL MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO

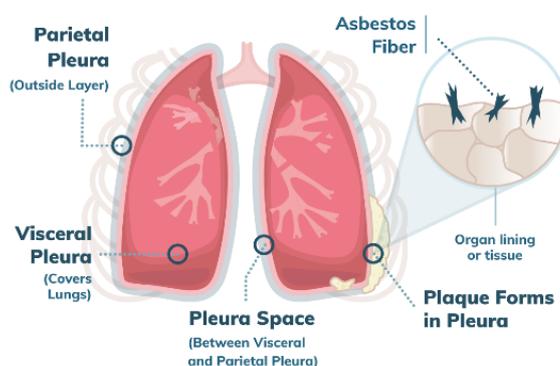


Figura 3. Mesotelioma pleurico maligno [S1]

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è una neoplasia aggressiva che origina dalle cellule mesoteliali che rivestono la membrana sierosa della cavità pleurica (Figura 3). L'insorgenza del MPM è associata all'inalazione delle fibre di amianto. I pazienti affetti da MPM purtroppo hanno una prognosi infausta ed hanno una sopravvivenza media di circa 8-14 mesi dalla diagnosi. Questo tumore, prima della manifestazione clinica, ha un lungo periodo di latenza, ovvero quello che intercorre tra l'esposizione alle fibre di amianto e la comparsa della sintomatologia, di circa 40 anni.

Il numero di decessi associati al MPM è in continua crescita in tutto il mondo nonostante le numerose contromisure adottate riguardo la produzione e l'utilizzo dell'amianto. Ad oggi, in Paesi come la Russia, l'India e il Brasile l'uso di quest'ultimo non è ancora regolamentato, pertanto rappresenta un grave problema per la salute pubblica globale [35-38].

1.5.1 L'ASBESTO

Con il termine asbesto (o amianto) vengono indicati alcuni minerali con struttura microcristallina ed aspetto fibroso che appartengono alla classe chimica dei silicati, suddivisi in due classi mineralogiche: anfiboli e serpentini. Gli anfiboli sono silicati contenenti calcio e magnesio e a questa classe appartengono l'actinolite, l'amosite, l'antofillite, la crocidolite e la tremolite. Nella categoria dei serpentini rientra invece il crisotilo (silicato di magnesio). La pericolosità dell'asbesto deriva soprattutto dalla liberazione nell'aria delle sue fibre, che una volta inalate sono in grado di raggiungere principalmente i polmoni e causare la formazione di placche pleuriche o di patologie come: asbestosi, tumori polmonari e MPM. Ad oggi, tutti questi minerali sono stati classificati dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) facente parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come sostanze sicuramente cancerogene per gli esseri umani [S2-S4].

1.5.1.1 I MECCANISMI DI CARCINOGENESI DELL'ASBESTO

Quando le fibre minerali di asbesto vengono inalate migrano verso la pleura, dove permangono per lungo tempo e innescano un processo infiammatorio cronico. La risposta infiammatoria è caratterizzata dalla migrazione *in situ* dei leucociti, dalla secrezione di citochine pro-infiammatorie e dall'iper-produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), le quali favoriscono l'accumulo di danni al DNA nelle cellule mesoteliali (MC). In risposta al processo infiammatorio le MC secernono HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) che attiva l'inflammasoma, il quale a sua volta induce l'attivazione della via di segnalazione di NF- κ B (*Nuclear factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), di PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*) e delle MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). Inoltre, le MC in risposta all'asbesto secernono TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) ed esprimono elevati livelli del suo recettore (TNF-R1). I macrofagi reclutati nei siti di infiammazione rilasciano a loro volta TNF- α innescando così un circolo paracrino ed autocrino che attiva nuovamente la via di segnalazione di NF- κ B. L'insieme di tutti questi fattori crea un microambiente che favorisce la trasformazione delle MC [39-41].

1.5.2 SOTTOTIPI ISTOLOGICI E STADIAZIONE TNM DEL MPM

Nel 2015 l'OMS ha stilato una classificazione dei sottotipi istologici di MPM: epitelioide (60-80%), bifasico (10-15%), sarcomatoide (10%) e desmoplastico (2%) che rientra nel sottotipo sarcomatoide (Figura 4).

1. MPM epiteliodi (5a) hanno caratteristiche architetturiche, citologiche e stromali che consentono la diagnosi differenziale rispetto ad altre neoplasie polmonari, sono caratterizzati dalla presenza di cellule cuboidali uniformi con citoplasma eosinofilo e nucleoli centrali ben distinti. Presentano solitamente un grado elevato di atipia nucleare e aree di necrosi.

2. MPM sarcomatoidi (5b) sono caratterizzati dalla presenza di cellule con morfologia fusata, distribuite in fasci o con una disposizione architetturica disordinata e con un'atipia nucleare classificata da lieve a grave. I MPM desmoplastici (5d) possiedono almeno il 50% di stroma fibroso ialinizzato.

3. MPM bifasici (5c) sono caratterizzati dalla presenza di entrambe le componenti descritte precedentemente. Per essere definito tale il MPM deve contenere almeno il 10% di cellule con caratteristiche epiteliodi o sarcomatoidi e aree intermedie di transizione.

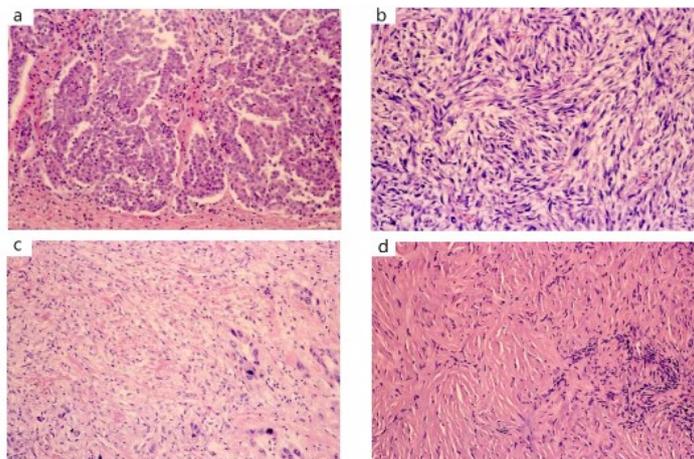


Figura 4. Analisi immunoistochimica dei diversi istotipi di MPM

Pazienti con MPM sarcomatoide o bifasico hanno una sopravvivenza significativamente minore rispetto a quelli affetti da MPM di tipo epitelioide [42,43].

Stadiazione

La sintesi dei descrittori **T** (estensione del tumore primario), **N** (coinvolgimento linfonodale) ed **M** (presenza di metastasi) in stadi appropriati è indispensabile al fine di definire le strategie terapeutiche da adottare al momento della diagnosi, a seconda dello stadio del tumore. Gli stadi della malattia secondo i descrittori TNM sono mostrati in Tabella 2 insieme alle relative aspettative di vita [42, S5]:

Stadio	Descrittori	Aspettativa di vita
Ia Ib	T1a,N0,M0 T1b,N0,M0	21-40 mesi
II	T2,N0,M0	19 mesi
III	T3,N1/2,M0	16 mesi
IV	T4,N3,M1	12 mesi

Tabella 2. Stadi del MPM con i corrispettivi descrittori e aspettative di vita [42, S5]

Le prime e più comuni manifestazioni cliniche nel MPM sono la dispnea progressiva e la formazione di un versamento pleurico, associato o meno a dolore toracico. Sono comuni anche tosse secca (non produttiva), febbre, ipossia, astenia, sudorazione notturna e perdita di peso. La diagnosi nella maggior parte dei casi è tardiva ed avviene, a seguito della comparsa di uno o più sintomi, per mezzo delle seguenti tecniche: radiografia del torace, tomografia computerizzata del torace (CT), risonanza magnetica toracica (MR), tomografia ad emissione di positroni/CT con FDG, toracentesi e biopsia percutanea o toracoscopica. La biopsia permette un'analisi più approfondita dei campioni attraverso tecniche di immunohistochimica (IHC) per valutare la presenza di marcatori utili alla diagnosi del MPM: Calretinina, WT-1 (*Wills Tumor Protein 1*), Citocheratina 5, Podoplanina, Mesotelina, Merlina e BAP1 (*BRCA-1 Associated Protein-1*) [42, S2, S6].

1.6 APPROCCI TERAPEUTICI

Attualmente non esiste un trattamento curativo per il MPM; le opzioni terapeutiche disponibili includono la resezione chirurgica, la chemioterapia e la radioterapia. Tali trattamenti sono somministrati separatamente o facenti parte di un regime terapeutico trimodale.

Chirurgia: purtroppo solo un numero limitato di pazienti è eleggibile per la chirurgia, infatti, la resezione chirurgica è eseguita nelle fasi iniziali della malattia. L'intervento consiste in una

pneumonectomia extrapleurica (EPP), decorticazione pneumonectomica (P/D) o pleurectomia parziale tramite VATS (*Video-Assisted Thoracoscopy Surgery*).

Terapia farmacologia: il trattamento farmacologico di prima linea per pazienti con MPM non resecabile chirurgicamente è la combinazione di pemetrexed (antimetabolita con funzione inibitoria nei confronti di enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati) e cisplatino (agente alchilante che esplica la sua azione creando addotti al DNA ed interferendo nei processi di duplicazione e trascrizione). Negli individui anziani, in quelli con comorbidità o che mostrano effetti avversi al cisplatino, può essere utilizzato il carboplatino come sostituto, maggiormente tollerato.

Ad oggi, l'immunoterapia rappresenta un'opzione terapeutica per i pazienti con MPM non resecabile. L'utilizzo della combinazione di anticorpi inibitori dei *checkpoint* immunitari (ICI) anti-PD-1 (*Programmed Cell Death Protein 1*) e anti-CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) rispettivamente il nivolumab e ipilimumab, è stato approvato dall'FDA (*Food and Drug Administration*) come terapia di prima linea per il MPM non resecabile precedentemente non trattato e dal settembre 2022 in Italia è possibile l'impiego dei due ICI sopracitati per il trattamento di prima linea di individui adulti affetti da MPM non resecabile ad istologia non epitelioide [35, 38, 43, S5].

Attualmente in corso ci sono numerosi studi clinici, purtroppo però, non vi è nessun trattamento di seconda linea approvato. C'è quindi l'urgenza della ricerca di nuove strategie terapeutiche o bersagli molecolari verso cui indirizzare terapie mirate, al fine di migliorare la sopravvivenza dei pazienti affetti da MPM. In questo contesto recenti studi sul ruolo di ALDH1A3 nel MPM dimostrano che questo enzima è un potenziale bersaglio terapeutico.

1.7 ALDH1A3 nel MPM

Cioce M. et al. hanno dimostrato nel loro studio la correlazione tra l'espressione dell'*ALDH1A3* e la sopravvivenza globale (*Overall Survival*, OS) dei pazienti affetti da MPM. I dati analizzati mostrano come un'elevata espressione del gene *ALDH1A3* correli con una minore OS negli 84 pazienti della coorte analizzata (Figura 5) [44].

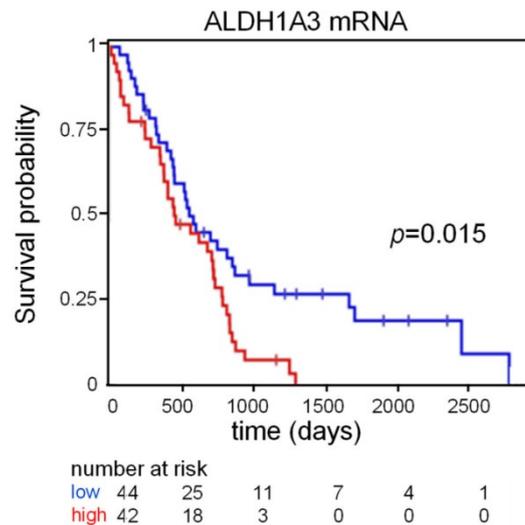


Figura 5. Curva di sopravvivenza Kaplan-Meier che correla i livelli di mRNA di *ALDH1A3* e OS [44]

Canino et al. hanno riportato che in linee cellulari di MPM (MSTO-211H, H-2452, H-2461, H-2373, H-28, H-2052 e H-2818) a seguito del trattamento con pemetrexed e cisplatino si selezionano sottopopolazioni cellulari (ALDH^{bright}) chemioresistenti con fenotipo mesenchimale. Gli autori hanno dimostrato che l'isoforma 1A3 è espressa in maniera preponderante rispetto alle altre isoforme nella sottopopolazione cellulare ALDH^{bright} [45].

Nello studio gli autori hanno riportato che la sovraespressione di *ALDH1A3* è dovuta all'attivazione delle vie di segnalazione NF- κ B, STAT3 e C/EBP β (*CCAAT/ Enhancer Binding Protein β*).

Il silenziamento dell'*ALDH1A3* riduce la sopravvivenza delle cellule ALDH^{bright} soprattutto dopo il trattamento con pemetrexed e cisplatino. Gli autori hanno riportato, per la prima volta, che un complesso molecolare composto da STAT3 fosforilata (pY705)-NF- κ B (p65) è necessario per la repressione dell'mRNA di *DDIT3* (*DNA Damage-Inducible Transcript 3*), questo permette la trascrizione di *ALDH1A3*-CEBP β -dipendente. L'inibizione dell'attività di STAT3-NF- κ B causa una significativa riduzione dell'espressione di *ALDH1A3* e di conseguenza della sopravvivenza delle cellule ALDH^{bright}. Inoltre, gli autori hanno dimostrato che *in vivo*, in modelli murini NOD/SCID di MPM, il trattamento con un inibitore dell'asse STAT3-NF κ B è in grado di ridurre la chemioresistenza indotta da pemetrexed e cisplatino [44, 45].

1.8 I NEUTROFILI nel microambiente tumorale

I neutrofili sono la specie leucocitaria maggiormente presente nel torrente circolatorio e vengono rilasciati dal midollo osseo grazie al G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) che concorre alla loro maturazione. Svolgono un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria innata e nell'eliminazione di patogeni durante le infezioni. I neutrofili sono le prime cellule del sistema immunitario che vengono mobilitate verso i siti di infiammazione ed esplicano numerose funzioni tra cui: degranolazione, fagocitosi, secrezione di citochine pro-infiammatorie e produzione di ROS.

Il microambiente tumorale è contraddistinto da un'inflammatione cronica persistente e i neutrofili in questo contesto esplicano effetti che possono essere a danno o beneficio nella lotta contro il tumore. Numerosi studi hanno dimostrato come i neutrofili associati al tumore (TAN) contribuiscano alla progressione tumorale, alla metastatizzazione e all'angiogenesi attraverso la produzione di MMP9 (Metalloproteasi di matrice 9) in grado di degradare la matrice extracellulare ed il collagene di tipo IV della membrana basale. I TAN possono anche svolgere un ruolo anti-tumorale, attivando e promuovendo la risposta immunitaria rivolta all'eliminazione delle cellule tumorali. Infatti, i neutrofili sono caratterizzati da una grande plasticità e possono essere polarizzati verso due differenti fenotipi: **i) antitumorale N1** guidato da IFN- γ (*Interferon-gamma*) e GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), **ii) protumorale N2** guidato invece da TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*).

Il valore ematico NLR (*Neutrophils-to-Lymphocyte Ratio*) è stato utilizzato come predittore di malattia, infatti, alti valori di NLR sono stati correlati a prognosi sfavorevoli, in quanto si ipotizza che una marcata infiltrazione di neutrofili nel microambiente tumorale possa sopprimere le cellule T-attivate. Nel MPM l'elevato NLR è un predittore indipendente di prognosi peggiore, non sono però presenti in letteratura informazioni circa i meccanismi molecolari attraverso i quali i TAN agiscono mediando effetti pro- o anti-tumorali [46-48].

2. SCOPO DEL LAVORO

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore aggressivo e chemioresistente la cui insorgenza è associata all'esposizione alle fibre di asbesto. I pazienti affetti da MPM purtroppo hanno una prognosi infausta e la loro sopravvivenza media è di circa 8-14 mesi dalla diagnosi.

Le opzioni terapeutiche disponibili sono limitate, il trattamento farmacologico di prima linea, ovvero la chemioterapia con cisplatino e pemetrexed è scarsamente efficace, infatti il tasso di risposta è molto basso, circa del 30%. Nonostante, più di recente, sia stata approvata un'ulteriore opzione terapeutica di prima linea, la combinazione di nivolumab e ipilimumab, il MPM rimane una neoplasia ad elevato impatto sociale. Non esistono per il MPM terapie di seconda linea approvate, vi è quindi una necessità urgente di identificare nuovi bersagli molecolari e approcci terapeutici efficaci.

Il mio progetto di tesi, che si inserisce in un lavoro più ampio di ricerca preclinica sul MPM, ha avuto come scopo quello di valutare ed analizzare gli effetti dell'inibizione dell'enzima aldeide deidrogenasi 1A3, ALDH1A3, in modelli *in vitro* di sferoidi multicellulari (MCS) di MPM in coltura con neutrofili.

3. MATERIALI e METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

In questo lavoro di tesi sperimentale è stata utilizzata la linea cellulare di MPM MSTO-211H (derivata da paziente con istotipo bifasico).

Per il mantenimento delle colture cellulari è stato utilizzato terreno RPMI 1640 (PAN BIOTECH) al quale sono stati aggiunti antibiotici (streptomicina e penicillina) per un volume pari all'1% e FBS (*Fetal Bovine Serum*-GIBCO B.R.L.) al 10%. Le cellule sono state cresciute in piastre Petri, in incubatore con temperatura di 37°C, ambiente umido e concentrazione di CO₂ del 5%. Ogni 2 giorni le piastre Petri a confluenza sono state suddivise 1 a 3 o 1 a 4 in piastre addizionate di terreno fresco. Il terreno di coltura contiene il rosso fenolo, indicatore che viene utilizzato per monitorare le variazioni di pH dovute al metabolismo cellulare o causate da fattori ambientali esterni. Il terreno presenta una colorazione rossastra al valore di pH 7.3-7.6, che vira al giallo quando si acidifica.

La suddivisione delle cellule in piastra è stata eseguita attraverso le seguenti azioni: **i)** aspirazione del terreno di coltura; **ii)** lavaggio della piastra con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1X; **iii)** aggiunta di una soluzione tripsina/EDTA (GIBCO B.R.L.) incubata a 37°C per 5 minuti; **iv)** precipitazione delle cellule attraverso centrifugazione a 900 rpm per 5 minuti; **v)** aspirazione del sovrantante e risospensione del *pellet* cellulare in terreno RPMI 1640 completo; **vi)** prelievo delle cellule e trasferimento in nuove piastre Petri; **vii)** ri-posizionamento delle piastre Petri in incubatore.

3.2 CONTA CELLULARE

La conta cellulare viene effettuata mediante l'utilizzo della camera di Burker. La camera di Burker è costituita da una griglia suddivisa in 9 quadrati a loro volta suddivisi in 16 quadrati di misure minori.

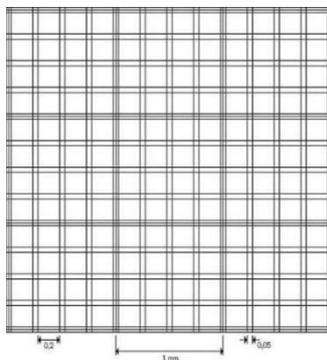


Figura 6. Camera di Burker [S7]

La conta cellulare viene effettuata attraverso i seguenti passaggi: **i)** preparazione di una sospensione cellulare staccando le cellule dalla piastra con tripsina/EDTA; **ii)** centrifugazione a 900 rpm per 5 minuti; **iii)** risospensione in un volume di terreno RPMI 1640 fresco e completo; **iv)** prelievo di 15 μ L di sospensione cellulare e inserimento nella camera di Burkner; **v)** conta del numero di cellule totali all'interno di un minimo di 3 dei 9 quadrati e calcolo della media aritmetica, che successivamente viene moltiplicata per il fattore di diluizione 10^4 per ricavare il numero di cellule/mL

3.3 COLTURE CELLULARI 3D: SFEROIDI MULTICELLULARI (MCS)

Nel mio lavoro di tesi sperimentale ho utilizzato gli sferoidi multicellulari (MCS) come modello di colture cellulari 3D. Tale coltura è costituita da un aggregato tridimensionale di cellule, che dopo 24 ore, mostra un centro ipossico nella parte più interna ed una corona ossigenata nella parte più esterna.

Per questo tipo di coltura cellulare si utilizza una piastra a 96 pozzetti con il fondo a U. In ogni pozzetto vengono depositati 100 μ L di soluzione di agarosio all'1% in H₂O sterile, l'agarosio viene prontamente rimosso in modo tale da formare un sottilissimo film omogeneo sul fondo di ciascun pozzetto, in cui verranno poi piastrate 10.000 cellule in un volume finale di 100 μ L di terreno RPMI 1640 completo.

3.4 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

Per l'analisi di espressione delle proteine, le cellule vengono raccolte e sottoposte a lisi per mezzo di una soluzione contenente: NP40 1%, NaCl 150 mM, Tris-HCl pH 8.8 50 mM, EDTA 5 mM, NaF 10 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, Na₃VO₄ 4 mM a cui sono aggiunti inibitori delle proteasi quali pepstatina 4 μ g/mL, leupeptina 10 μ g/mL e aprotinina 0,1 unità inibenti tripsina/mL.

Il campione viene incubato alla temperatura di 4°C per 20 minuti e successivamente centrifugato a 13.000 rpm per 10 minuti. Le proteine estratte presenti nel sovrantante vengono quantificate mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro.

3.5 LETTURA ALLO SPETTROFOTOMETRO

La concentrazione proteica è valutata tramite lettura allo spettrofotometro seguendo il metodo Bradford, basato sul principio dello spostamento della lunghezza d'onda di assorbimento massima da 465 nm a 595 nm dovuto alla presenza di proteine in una soluzione di Blu di Comassie brillante G-250 (*Dye reagent*). Per ogni campione viene preparata una provetta contenente: 1 mL *Dye reagent* e 2,5 µL di campione proteico. Viene preparata inoltre una provetta necessaria per la taratura dello spettrofotometro, contenente solo 1 mL di *Dye reagent* e 2,5 µL di tampone di lisi. Lo spettrofotometro rileva i valori di assorbanza di ciascun campione, attraverso i quali è possibile risalire alla concentrazione proteica di ognuno grazie all'applicazione della legge di Lambert-Beer ($A = \epsilon \times l \times [C]$).

3.6 ANALISI WESTERN BLOT

L'analisi Western blot è un procedimento immuno-elettroforetico utilizzato per individuare la presenza di una distinta proteina in un campione. Tale tecnica si basa sulla separazione fisica delle proteine in base al loro peso molecolare all'interno di un gel di poliacrilammide contenente sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE). Il procedimento è caratterizzato da diversi passaggi elencati qui di seguito:

I) PREPARAZIONE DEL GEL DI POLIACRILAMMIDE

Si distinguono due differenti fasi del gel con composizioni differenti.

Il *Running gel* permette la corsa delle proteine tra i due elettrodi della camera elettroforetica. In base al peso molecolare della proteina in analisi viene preparato un *Running gel* a differente concentrazione. Gel più concentrati garantiscono la separazione di proteine con un basso peso molecolare e viceversa. Nella Tabella 3 sono indicate le differenti composizioni dei gel a diverse concentrazioni:

Componente	6%	8%	10%	12%
H ₂ O	7,5 mL	6,7 mL	5,7 mL	4,8 mL
Tris 1,5 pH 8.8	3,4 mL	3,4 mL	3,4 mL	3,4 mL
SDS 10%	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
Acrilamide	2,9 mL	3,7 mL	4,7 mL	5,6 mL
APS	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Temed	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Tabella 3. Composizioni del *Running gel*

La soluzione preparata in provetta, successivamente viene versata dentro una cavità di spessore pari a 1,5 mm formata da due vetri bloccati in un supporto di plastica. Al di sopra dello strato di gel, viene aggiunto uno strato di acqua MilliQ rimossa successivamente alla polimerizzazione del gel, in modo tale che quest'ultimo si compatti adeguatamente in orizzontale e non si disidrati.

Lo *Stacking gel* ha una composizione tale da garantire, successivamente al caricamento dei campioni, la compattazione delle proteine in modo tale che queste possano accedere nel medesimo istante al *Running gel*. La preparazione dei pozzetti di caricamento per i campioni è effettuata per mezzo di un apposito pettine di plastica che viene inserito nel gel dopo averlo versato nell'intercapedine tra i due vetrini.

La composizione dello *Stacking gel* è riportata in Tabella 4:

Componenti	Volume
H ₂ O	3 mL
Tris 1,5 pH 6.8	1,25 mL
SDS 10%	50 µL
Acrilammide	500 µL
APS 10%	50 µL
Temed	5 µL

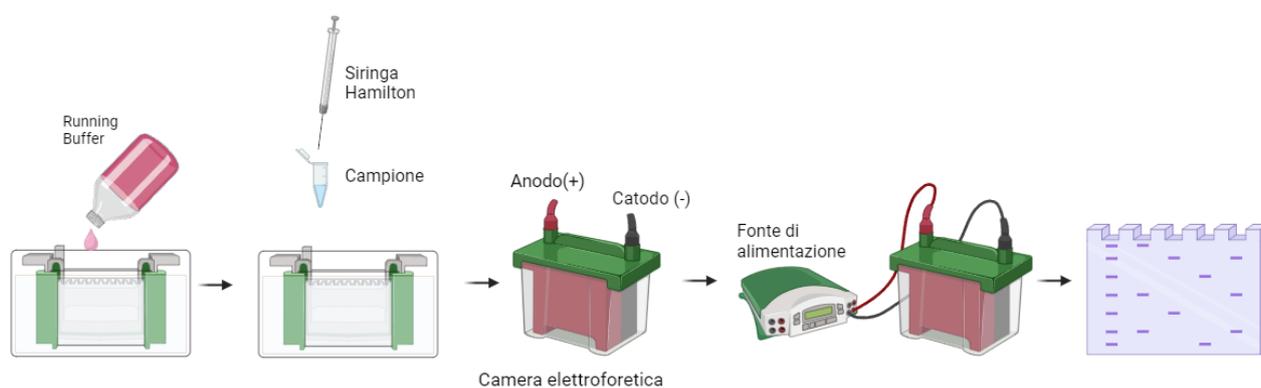
Tabella 4. Composizione dello *Stacking gel*

Il sodio dodecil-solfato (SDS) è un detergente anionico in grado di denaturare le proteine e conferire a tutte una carica elettrica negativa omogenea, in modo tale che corrano verso il polo positivo della camera elettroforetica una volta applicato il potenziale elettrico. L'ammonio persolfato (APS) è un agente ossidante catalizzatore della reazione di polimerizzazione dell'acrilammide. La tetrametiletildiammina (Temed) stabilizza i radicali liberi che si generano durante la

decomposizione dello ione persolfato e attaccano i doppi legami presenti nelle molecole di acrilammide favorendone la polimerizzazione.

II) ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE

A conclusione della polimerizzazione del gel viene preparata la camera elettroforetica in cui verrà posto il gel ed il *Running Buffer* (soluzione composta da glicina 2 M, SDS 10%, Tris 250 mM e Acqua MilliQ) (Figura 7). Per denaturare i campioni proteici viene addizionato il *Leamly 5X* (Tris HCl 1,5 M pH 6.8, β -mercaptoetanololo, glicerolo, 1% di blu di bromofenolo, acqua MilliQ e SDS 10%) che rompe i ponti disolfuro presenti nelle catene polipeptidiche. I campioni vengono sottoposti a riscaldamento controllato a 100°C per 1 minuto e, attraverso l'utilizzo di una siringa Hamilton, vengono caricati nei pozzetti. A questo punto si esegue la corsa elettroforetica per circa 30 minuti a 150-200 Volt tramite il PowerPac TM Basic Power Supply (Bio-Rad).



Created in BioRender.com bio

Figura 7. Schema dell'elettroforesi su gel di poliacrilammide

III) TRASFERIMENTO SU MEMBRANA DI NITROCELLULOSA

Al termine della corsa elettroforetica, attraverso l'uso di un ulteriore campo elettrico, le proteine vengono trasferite dal gel ad una membrana di nitrocellulosa (Figura 8). Questo passaggio prevede l'utilizzo di un tampone di trasferimento (*Transfer Buffer*) composto da Tris 25 mM, metanolo 20%, glicina 20 mM, SDS 0,5% e H₂O MilliQ, utilizzando lo strumento Trans-Blot[®] SD/Semi Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Il trasferimento avviene mediante la preparazione di un "sandwich" composto da 2 fogli di *blotting paper* imbevuti di tampone di trasferimento, la membrana di nitrocellulosa, imbevuta

anch'essa, il gel ed altri 2 ulteriori fogli di *blotting paper*. Il trasferimento inizia con l'applicazione di un campo elettrico pari a 10 Volt per 40 minuti.

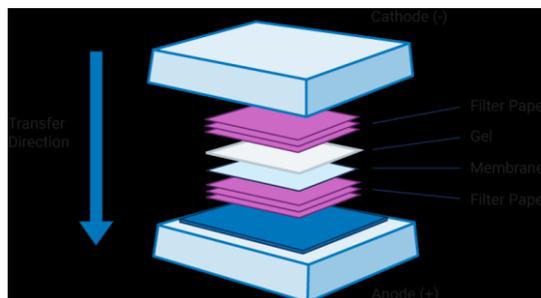


Figura 8. Schema del trasferimento con sistema Semi-dry [S8]

Alla fine del trasferimento la membrana di nitrocellulosa viene immersa in una soluzione di Rosso Ponceau composta da: 0,1% Rosso Ponceau, H₂O MilliQ e CCl₃COOH 5%; la soluzione è in grado di colorare la membrana e constatare che il trasferimento delle proteine sia avvenuto correttamente. Successivamente, dopo lavaggio con PBS 1X, la membrana viene incubata con BSA 5% (*Bovine Serum Albumin*) in PBS per un minimo di 60 minuti a 37°C in modo tale da saturare tutti i siti di legame sulla membrana. La membrana viene poi incubata *over night* in una soluzione all'1% di BSA in PBS contenente l'anticorpo primario specifico per la proteina di interesse. Al termine dell'incubazione si elimina la soluzione contenente l'anticorpo e la membrana viene lavata con PBS 0,3% TWEEN20 per un totale di 30 minuti. Successivamente viene incubata a temperatura ambiente per 2 ore con l'anticorpo secondario specifico per il frammento cristallizzabile (Fc) dell'anticorpo primario utilizzato. Al termine di quest'ultima incubazione seguono lavaggi della durata di 30 minuti con PBS 0,3% TWEEN20. Al termine dei lavaggi è possibile rilevare sulla membrana di nitrocellulosa le proteine in analisi attraverso una metodica di chemiluminescenza.

IV) RILEVAMENTO DELLE PROTEINE TRAMITE CHEMILUMINESCENZA

Il rilevamento delle proteine avviene tramite l'utilizzo del Kit ECL Western Blot Detection System (Amersham). La membrana di nitrocellulosa viene posta in un'opportuna vaschetta, ricoperta con la soluzione ECL e poi collocata tra due film trasparenti di plastica. Il segnale è visualizzabile attraverso l'utilizzo della strumentazione ChemiDoc Imaging System. La visualizzazione del segnale UV allo strumento è resa possibile dalla reazione chimica fra luminolo e H₂O₂ in presenza della perossidasi (HRP, *Horseradish Peroxidase*) coniugata all'anticorpo secondario. La reazione chimica tra l'HRP e

il substrato genera un prodotto ossidato in uno stato elettronico eccitato che decade allo stato fondamentale con emissione di luce (425 nm).

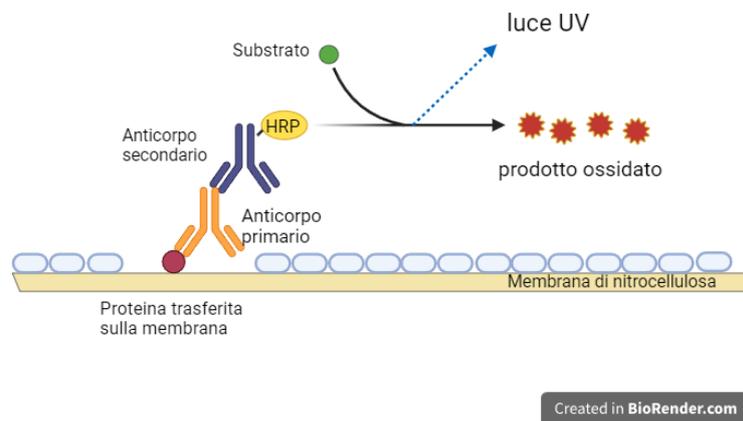


Figura 9. Schema di rilevazione del segnale tramite chemiluminescenza

REAGENTI E ANTICORPI UTILIZZATI

Gli anticorpi primari utilizzati per gli studi sperimentali sono: anti-PARP1 e anti- α -Tubulina, comprati da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) e anti-ALDH1A3 da Abcam (Cambridge, UK). Gli anticorpi secondari anti-rabbit e anti-mouse sono stati acquisiti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.7 ESTRAZIONE DELL'RNA

Il procedimento di estrazione dell'RNA dalle cellule viene effettuato tramite i seguenti passaggi: **i)** le cellule vengono raccolte in una provetta e sottoposte a centrifugazione a 900 rpm per 5 minuti; **ii)** il terreno in eccesso viene aspirato ed il *pellet* cellulare risospeso in una soluzione di PBS per poi essere sottoposto nuovamente a centrifugazione; **iii)** il PBS viene rimosso e vengono addizionati ad ogni provetta 500 μ L di *TRIZOL* (composto da una miscela di guanidina isotiocianato e fenolo); **iv)** i campioni vengono sottoposti, tramite l'uso del vortex, ad agitazione in modo tale da garantire la rottura delle membrane cellulari; **v)** a ciascuna provetta vengono addizionati 100 μ L di cloroformio. La provetta viene nuovamente vortexata ed incubata per 3 minuti a temperatura ambiente; **vi)** i campioni vengono sottoposti a centrifugazione a freddo (4°C) a 12.000 rpm per 15 minuti in modo

tale da ottenere 3 fasi ben separate e visibili ad occhio nudo; **vii)** la fase acquosa viene prelevata e riposta in un'apposita provetta alla quale viene addizionato un volume di 250 μL di isopropanolo; **viii)** i campioni vengono incubati per 10 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugati per 10 minuti a 4°C a 12.000 rpm; **ix)** viene aspirato il sovrantante e viene aggiunto un volume di 0,5 mL di etanolo 70% freddo e i campioni sottoposti ad un'ulteriore fase di centrifuga a 10.000 rpm per 10 minuti; **x)** il sovrantante viene eliminato ed il *pellet* ottenuto viene fatto disidratare sotto cappa chimica per poi essere risospeso in H₂O DEPEC RNasi free; **xi)** alla fine del processo di estrazione dell'RNA le provette vengono scaldate per 15 minuti a 65°C.

Retrotrascrizione

Attraverso lettura allo spettrofotometro l'RNA estratto viene quantificato. Per conservare la giusta efficienza nel processo di retrotrascrizione è essenziale utilizzare un massimo di 5.000 ng/ μL . La retrotrascrizione a cDNA è stata eseguita utilizzando il kit iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad).

All'interno della provetta in cui viene posto l'mRNA (estratto e quantificato) vengono addizionati sequenzialmente: 4 μL di iScript RT Supermix, 1 μL di retrotrascrittasi, H₂O DEPEC RNasi free fino ad un volume finale di 15 μL . Le provette vengono poi poste nel termociclatore e viene impostato il programma seguente: **i)** 25°C per 10 minuti; **ii)** 42°C per 15 minuti; **iii)** 85°C per 15 minuti.

3.8 RT-POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

La reazione a catena della polimerasi o PCR è una tecnica in grado di replicare in modo veloce e selettivo una corta sequenza di DNA attraverso l'utilizzo di una DNA polimerasi (TAQ polimerasi) estratta da un noto batterio estremofilo, il *Thermophilus Aquaticus*. Il procedimento di questa tecnica prevede l'allestimento del campione e la sua amplificazione.

La concentrazione desiderata di cDNA da utilizzare è di 1.000 ng/ μL , pertanto, i campioni precedentemente retrotrascritti sono stati diluiti 1:5 con H₂O DEPEC RNasi free.

Allestimento del campione

Il campione viene allestito nel seguente ordine: 1 μ L di *primer forward* 0.5 μ M (diluito 1:10), 1 μ L di *primer reverse* 0,5 μ M (diluito 1:10), 10 μ L di iProofTM Master Mix (Bio-Rad) che contiene la DNA Polimerasi, 6 μ L di H₂O MilliQ autoclavata e 2 μ L di cDNA (diluito 1:5).

Amplificazione

i) denaturazione dei campioni sottoposti a temperature alte di 94-95°C, le quali permettono l'apertura del doppio filamento di DNA; **ii)** i campioni vengono poi sottoposti a temperature variabili (*T melting*) che agevolano l'interazione ed il legame tra i *primers* e le sequenze di interesse; **iii)** avviene l'estensione, ovvero la sintesi del filamento di DNA complementare al DNA stampo ad opera della TAQ polimerasi, il campione è sottoposto ad una temperatura pari a 72°C.

I *primers* utilizzati in questo studio sperimentale sono stati acquistati da Eurofins e sono riportati in Tabella 5.

Gene	Primers
<i>18s rRNA</i>	FW 5'- AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG -3' RV 5'- CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA -3'
<i>CDKN2A</i>	FW 5'- AGC CTT CGG CTG ACT GGC TGG -3' RV 5'- CTG CCC ATC ATC ATG ACC TGG -3'
<i>IL-6</i>	FW 5'- GTG TGA AAG CAG CAA AGA GGC -3' RV 5'- CTG GAG GTA CTC TAG GTA TAC -3'
<i>CXCL8</i>	FW 5'- ATG ACT TCC AAG CTG GCC CGTGCT -3' RV 5'- TCT CAG CCC TCT TCA AAA AAC TTC TC -3'

Tabella 5. *Primers utilizzati*

I programmi di PCR utilizzati per i geni di interesse sono riportati nella tabella sottostante.

	Denaturazione	Appaiamento	Numero di cicli	Estensione
<i>18s rRNA</i>	98°C x 1'	98°C x 10'' 54°C x 10'' 72°C x 5''	25	72°C x 1'
<i>CDKN2A</i>	98°C x 1'	98°C x 10'' 60°C x 10'' 72°C x 5''	30	72°C x 1'
<i>IL-6</i>	98°C x 1'	98°C x 10'' 55,9°C x 10'' 72°C x 5''	30	72°C x 1'
<i>CXCL8</i>	98°C x 1'	98°C x 10'' 55,3°C x 10'' 72°C x 5''	30	72°C x 1'

Tabella 6. Programmi di PCR utilizzati

3.9 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

Questa tecnica viene utilizzata per la separazione di molecole per mezzo di un campo elettrico. Si basa sul movimento di particelle aventi una carica, sia essa negativa o positiva, verso il polo opposto alla carica posseduta. Specie chimiche cationiche si sposteranno verso l'anodo, viceversa quelle anioniche verso il catodo. I gruppi fosfato presenti sul DNA gli conferiscono una carica negativa, pertanto migrerà verso il polo positivo. La velocità alla quale avviene la separazione dei frammenti di DNA dipende dal peso molecolare di quest'ultimi: frammenti di DNA corti migreranno a velocità più alte rispetto a frammenti di lunghezza maggiore. Per la corsa nella camera elettroforetica viene utilizzata una cella all'interno della quale è presente un tampone di corsa (Tris-acetato, TAE 1X).

Il gel di agarosio nel quale si separano i campioni viene preparato in precedenza con agarosio 1% in TAE 1X (Tris-acetato pH 8.8, acido acetico glaciale, acqua MilliQ e EDTA) ad una temperatura di 45°C. Ad esso viene addizionato Gel Red Nucleic Acid Staining (Biotium) per assicurare la visualizzazione dei frammenti di DNA. La soluzione che si ottiene viene raffreddata e versata in un'apposita vaschetta nella quale è stato posizionato un pettine in plastica per garantire la creazione

dei pozzetti all'interno dei quali verranno caricati i campioni, a cui viene aggiunto *Loading Dye 5X GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher) necessario per la visualizzazione delle bande per esposizione a raggi UV. Nel primo pozzetto solitamente viene caricato il *marker* di riferimento per constatare la lunghezza del frammento di DNA amplificato. La camera elettroforetica viene chiusa e a questo punto può iniziare la corsa elettroforetica a 110 V. Attraverso l'utilizzo del ChemiDoc Imaging System è possibile visualizzare le bande di interesse.

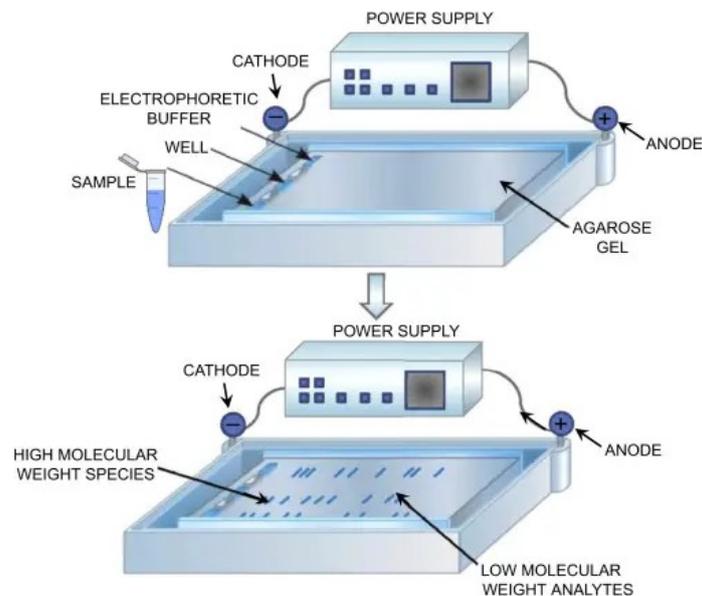


Figura 10. Elettroforesi su gel di agarosio [S9]

3.10 IMMUNOCOLORAZIONE con DAPI

Gli sferoidi multicellulari (MCS) sono stati fatti aderire a vetrini trattati con poli-L-lisina (agente di adesione per le cellule a substrati solidi che sfrutta il potenziamento delle interazioni elettrostatiche degli ioni negativi presenti sulla membrana cellulare ed il vetrino) e successivamente fissati con paraformaldeide 4% (PFA) per 30 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state permeabilizzate con Triton-X100 0,5% in PBS. Gli sferoidi multicellulari sono stati colorati con DAPI (diamino-2-fenilindolo), lavati con PBS e montati su vetrini utilizzando un *mountaing medium* acquoso fluorescente (Agilent dako, Santa Clara, CA, USA). L'acquisizione delle immagini è stata eseguita con un microscopio a fluorescenza.

3.11 ISOLAMENTO DEI NEUTROFILI UMANI

In collaborazione con la Prof. Silvia Fallarini del Laboratorio di immuno-farmacologia del Dipartimento di Scienze del Farmaco (UPO) i neutrofili umani sono stati raccolti e isolati da campioni di sangue venoso di volontari sani. 20 mL di sangue vengono diluiti con 10 mL di soluzione fisiologica 0,9% con destrano 500 e lasciati a temperatura ambiente per 30 minuti in modo tale da consentire la sedimentazione degli eritrociti. Il sovranatante contenente leucociti viene recuperato e sottoposto a centrifugazione a 1.200 rpm per 10 minuti. Il *pellet* cellulare viene diluito in 8 mL di PBS e stratificato delicatamente su Ficoll-Paque Plus, poi centrifugato a 1.800 rpm per 15 minuti. Il sovrinatante, contenente cellule mononucleate viene prelevato e scartato. Per effettuare la lisi degli eritrociti, il *pellet* cellulare viene risospeso in NaCl 0,2% per 30 secondi e poi miscelato con un uguale volume di NaCl 1,6%. I neutrofili vengono successivamente lavati, pellettati e risospesi in RPMI 1640 completo. Attraverso analisi citofluorimetriche viene determinata la percentuale di neutrofili mediante la marcatura con anticorpi anti-CD14 (identifica i monociti), anti-CD3 (identifica i linfociti T) e anti-CD66 (identifica i neutrofili). La percentuale di neutrofili isolati viene considerata soddisfacente quando la positività all'anticorpo anti-CD66 è maggiore del 90% sul totale del segnale rilevato. Per l'allestimento delle co-culture con gli MCS sono stati aggiunti 40.000 neutrofili a ciascun pozzetto.

3.12 QUANTIFICAZIONE DI IL-8 SECRETA

La concentrazione di interleuchina 8 (IL-8) secreta dagli MCS è stata quantificata, in collaborazione con la Prof.ssa Fallarini, attraverso un saggio E.L.I.S.A. (kit anti-human IL-8 ELISA MAX Deluxe set, BioLegend Global Headquarters, San Diego, CA) disponibile in commercio, in accordo con le istruzioni del produttore. La concentrazione minima di IL-8 rilevabile da questo kit è pari a 8 pg/mL.

3.13 QUANTIFICAZIONE della MALONDIALDEIDE

In collaborazione con il gruppo di Analitica Farmaceutica del Dipartimento di Scienze del Farmaco (UPO) del Prof. Silvio Aprile è stata effettuata la quantificazione della malondialdeide (MDA) attraverso reazione di derivatizzazione con DCHD e analisi LC-HRMS (*Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry*).

Il procedimento di preparazione del campione è descritto di seguito: **i)** preparazione della soluzione tampone di lavoro tramite dissoluzione di 2,5 g di acetato di ammonio triidrato e 2,5 mL di acido acetico glaciale in 25 mL di H₂O deionizzata; **ii)** aggiunta di 50 µL della soluzione DCHD (5,5-dimetilcicloesano-1,3-dione) 20 mM ad un volume pari di lisato di sferoidi multicellulari; **iii)** incubazione della miscela per 1 ora a 60°C in un bagno termostatico; **iv)** diluizione dei campioni per aggiunta di 200 µL di acetonitrile; **v)** centrifugazione dei campioni a 13.000 rpm per 10 minuti; **vi)** iniezione del sovrantante in colonna cromatografica Kinetex C18 (150 x 2.1 mm, 2.6 µm *dp*) + C18 RP-Security Guard™ (Phenomenex). L'analisi cromatografica è stata effettuata applicando un gradiente di concentrazione della fase mobile, costituita da 2 soluzioni: fase mobile A (acido formico 0,1% in acqua) e fase mobile B (acido formico 0,1% in metanolo).

4. RISULTATI

4.1 NR6, un inibitore selettivo dell'ALDH1A3, riduce la crescita di MCS MSTO 211-H e causa accumulo di malondialdeide

La linea cellulare di MPM MSTO-211H, rappresentativa dell'istotipo bifasico, è stata coltivata in 3D come sferoidi multicellulari (MCS) per 72 ore in una piastra da 96 pozzetti con il fondo a U. Gli MCS sono stati trattati o meno con NR6 1 μ M per 72 ore. Le immagini rappresentative, ottenute al microscopio ottico a contrasto di fase, riportate in Figura 1A mostrano che il trattamento con NR6 causa una riduzione significativa della dimensione degli MCS, coerentemente con questo risultato anche il numero di cellule degli MCS trattati con NR6 è significativamente ridotto (Figura 1C). I risultati sono espressi con la media aritmetica di tre esperimenti \pm la deviazione standard ($p \leq 0.05$).

Al termine delle 72 ore gli MCS sono stati prelevati e sottoposti a lisi cellulare per ottenere l'estratto proteico. Per valutare l'espressione dell'ALDH1A3 è stata effettuata un'analisi Western Blot. In Figura 1B si osserva una lieve diminuzione dell'espressione negli MCS trattati con NR6 rispetto a quelli di controllo.

ALDH1A3, come precedentemente descritto, è coinvolta nella detossificazione da aldeidi tossiche. Per questa ragione abbiamo eseguito un'analisi LC-HRMS al fine di valutare i livelli intracellulari di malondialdeide (MDA) a seguito di trattamento con NR6 1 μ M per 72 ore. Nel grafico riportato in Figura 1D si osserva che il trattamento con NR6 causa un aumento significativo dei livelli di MDA nel lisato cellulare degli MCS trattati rispetto ai controlli.

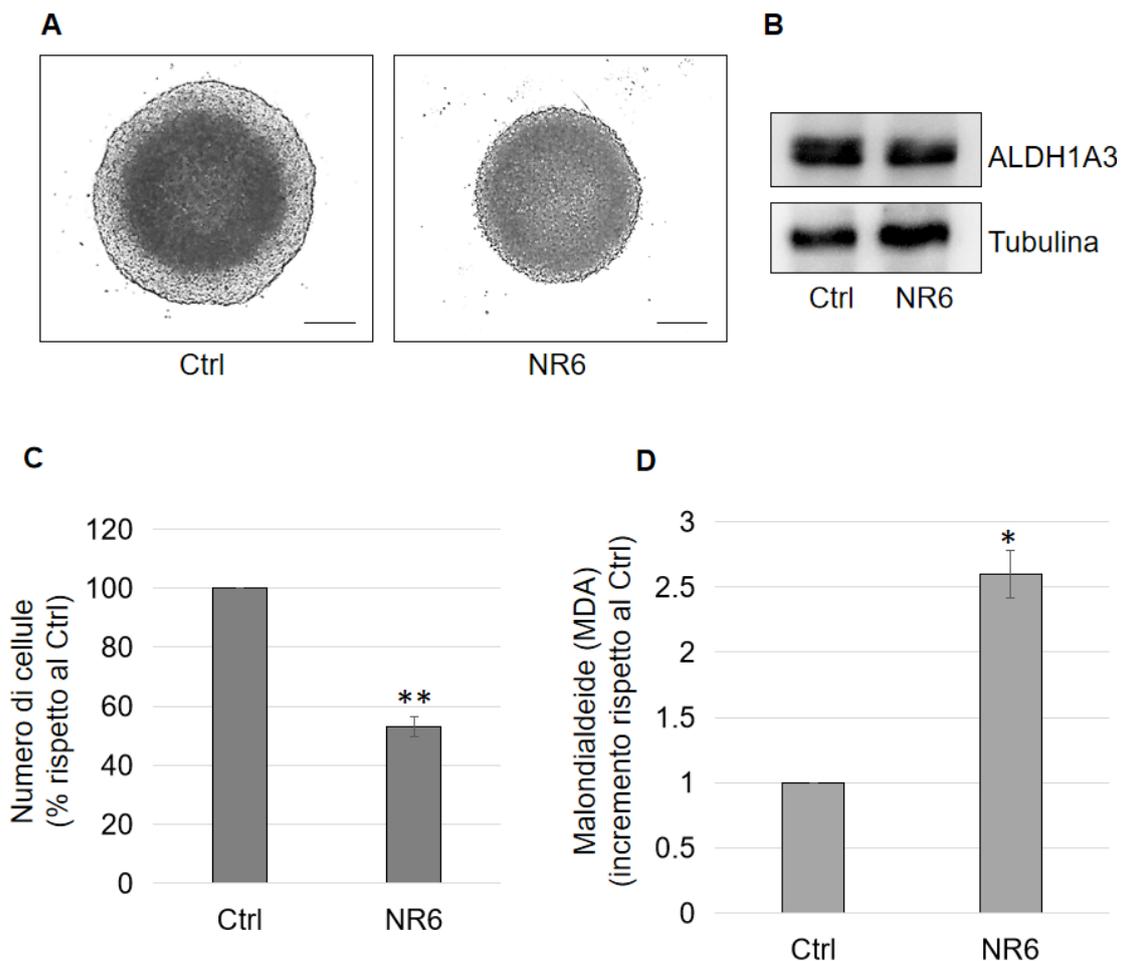


Figura 1. Gli esperimenti sono stati condotti in cellule MSTO 211-H coltivate come sferoidi multicellulari (MCS). **A)** Immagini rappresentative di microscopia ottica a contrasto di fase di MCS-MSTO-211H di controllo (Ctrl) e trattati con NR6 1 μ M (NR6) per 72 ore. Barra di scala: 100 μ m. **B)** Analisi Western Blot di ALDH1A3 in MCS-MSTO-211H di controllo (Ctrl) e trattati con NR6 1 μ M (NR6) per 72 ore. **C)** Grafico a barre della conta cellulare espressa come % rispetto al controllo. **D)** Grafico a barre che mostra il livello intracellulare di malondialdeide (MDA) in MCS trattati per 72 ore con NR6, espresso come incremento rispetto al controllo non trattato (Ctrl). La Tubulina è stata utilizzata come proteina normalizzatore. I valori sono espressi come media aritmetica \pm deviazione standard (SD) di 3 esperimenti (** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$).

4.2 Il trattamento degli MCS MSTO-211H con NR6 induce l'espressione di *CDKN2A* e *IL-6*, mentre riduce l'espressione di *CXCL8*

In Figura 2A, mediante un'analisi Western Blot, abbiamo valutato se la riduzione del numero di cellule degli MCS a seguito di trattamento con NR6 1 μ M fosse da attribuire a morte apoptotica.

Dopo 72 ore di coltura gli MCS sono stati raccolti e lisati per ottenere l'estratto proteico. Come si osserva dall'immagine rappresentativa di analisi Western Blot il trattamento con NR6 non causa morte apoptotica, in quanto è assente il taglio proteolitico della proteina PARP1 (frammento clivato a 89 kDalton).

L'analisi RT-PCR semiquantitativa, mostrata in Figura 2B, riporta che il trattamento con NR6 induce l'espressione di *CDKN2A* (gene che codifica per p16^{INK4A}, marcatore di senescenza) e *IL-6* (gene codificante Interleuchina 6) mentre causa la riduzione dell'espressione di *CXCL8* (gene codificante Interleuchina 8).

Mediante saggio E.L.I.S.A. abbiamo valutato i livelli di IL-8 secreta. Come si può osservare in Figura 2C, coerentemente con i dati dell'espressione genica, abbiamo osservato una significativa diminuzione della secrezione di IL-8 nel terreno di coltura degli MCS trattati con NR6 rispetto al controllo. Da questi dati si evince che, differentemente da quanto atteso, la senescenza indotta da NR6 non è una *SASP* (*senescenza associata a fenotipo secretorio*) poiché a fronte di un'induzione di *IL-6*, i livelli di espressione e rilascio di IL-8 sono significativamente ridotti.

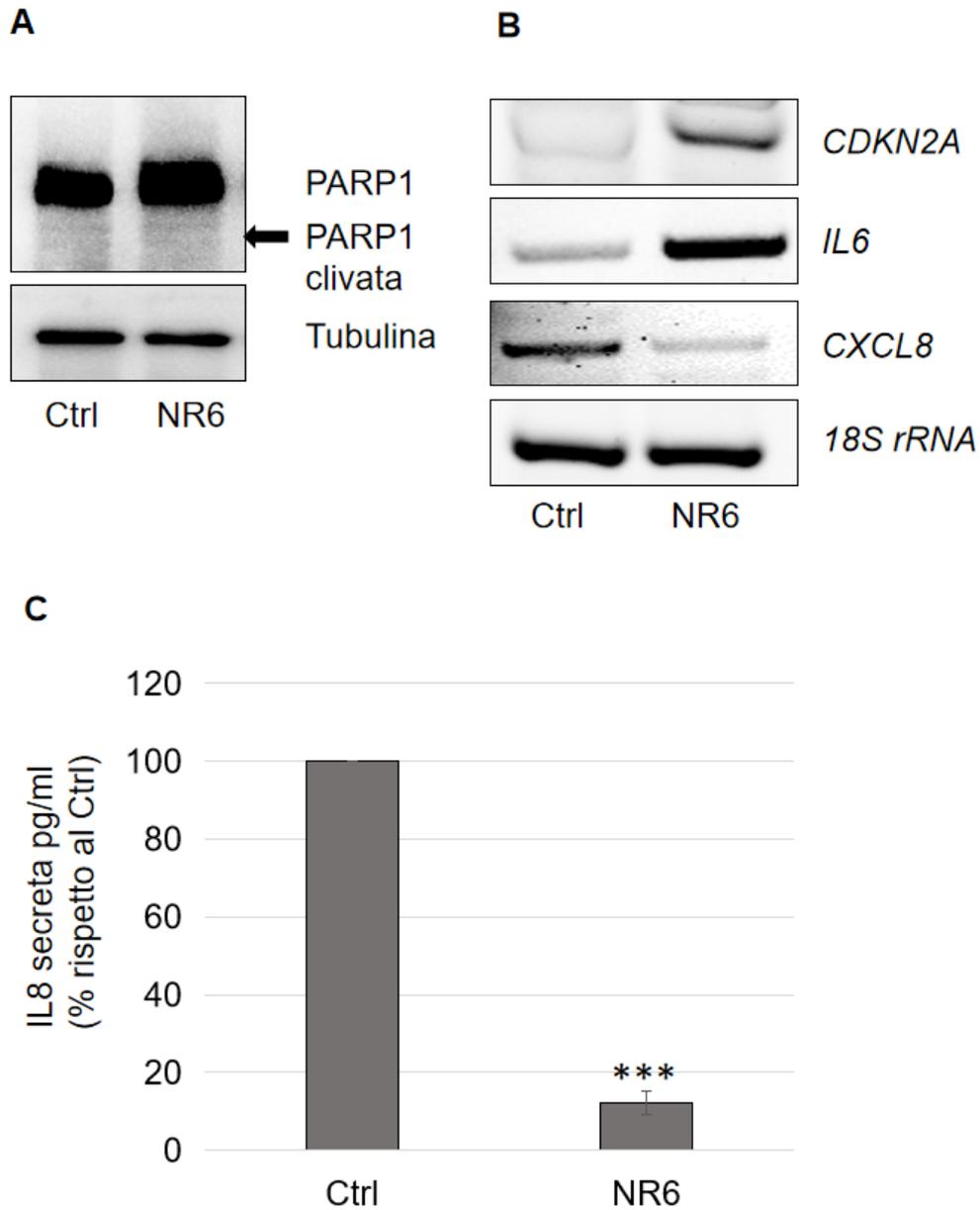


Figura 2. **A)** Analisi Western Blot della proteina PARP1 in MCS-MSTO-211H di controllo (Ctrl) e trattati con NR6 1 μ M (NR6) per 72 ore. **B)** Analisi RT-PCR semiquantitativa dei geni *CDKN2A*, *IL-6* e *CXCL8*. La Tubulina e il *18S rRNA* sono stati utilizzati come proteina e gene normalizzatori. (***) $p \leq 0.001$. **C)** Grafico a barre che mostra i livelli di IL-8 (pg/mL) secreta, espressi come % rispetto ai MCS-MSTO-211H di controllo (Ctrl), dagli MCS trattati con NR6 1 μ M (NR6) per 72 ore.

4.3 Il trattamento degli MCS con NR6 determina un comportamento differente dei neutrofilii in co-coltura

Le immagini rappresentative di microscopia ottica a contrasto di fase riportate in Figura 3A mostrano una diversa disposizione dei neutrofilii (isolati da soggetti sani) dopo 3 ore di co-coltura con MCS MSTO-211H trattati o meno con NR6 1 μ M per 48 ore. Negli MCS di controllo i neutrofilii tendono a disporsi in prossimità dello sferoide; viceversa, negli MCS trattati con NR6 i neutrofilii tendono ad aggregare e formare dei *clusters*.

Per escludere che le differenze osservate siano dovute ad un effetto diretto di NR6 sui neutrofilii è stata effettuata un'analisi Western Blot per valutare l'espressione di ALDH1A3 in questi ultimi. Come si evince dalla Figura 3B i neutrofilii non esprimono ALDH1A3, come controllo positivo abbiamo utilizzato cellule MSTO-211H.

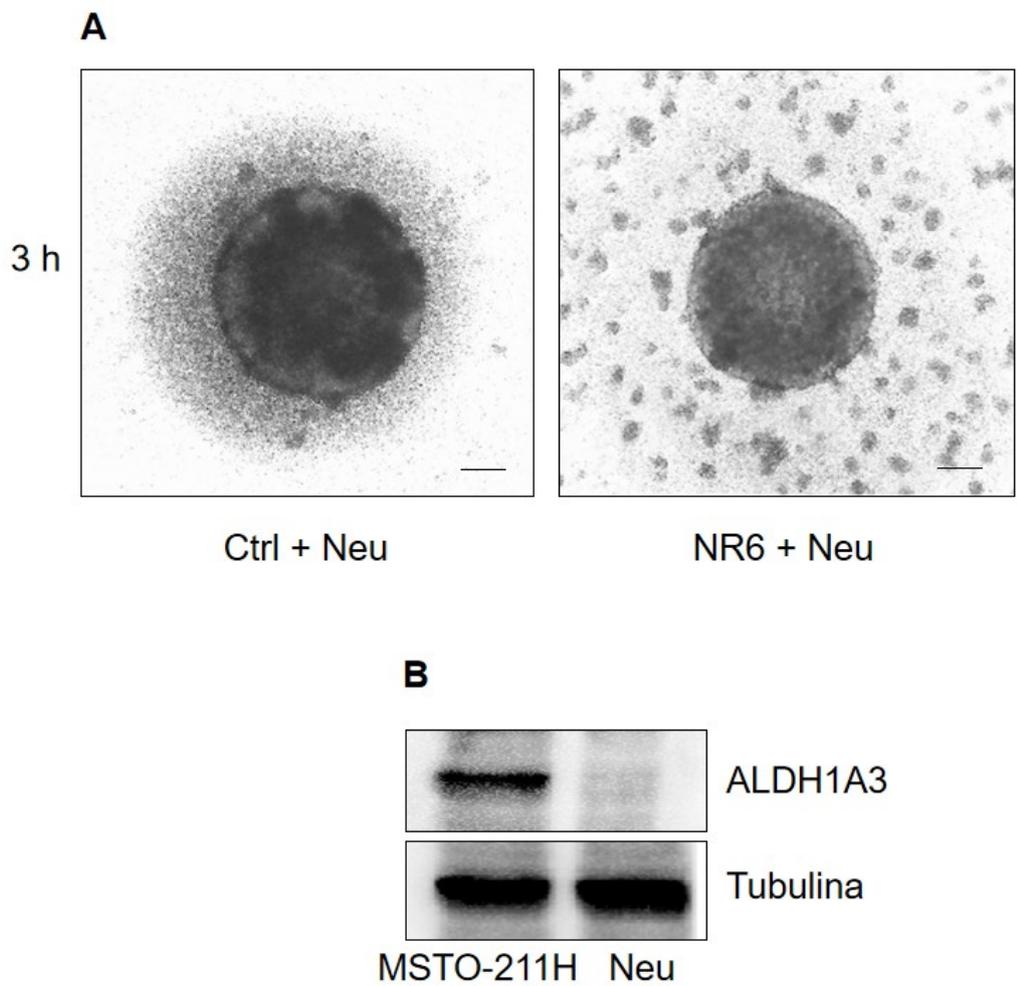


Figura 3. A) Immagini rappresentative di microscopia ottica a contrasto di fase di MCS-MSTO-211H di controllo (Ctrl + Neu) e trattati con NR6 1 μ M (NR6 + Neu) per 48 ore, successivamente co-coltivati con neutrofilo per 3 ore. Barra di scala: 100 μ m. **B)** Analisi Western Blot dell'espressione di ALDH1A3 in neutrofilo e cellule MSTO-211H. La Tubulina è stata utilizzata come proteina normalizzatore.

4.4 I neutrofili in co-coltura con MCS MSTO-211H inducono apoptosi negli MCS trattati con NR6

Le immagini rappresentative di microscopia ottica a contrasto di fase riportate in Figura 4A mostrano co-culture di MCS MSTO-211H, pre-trattati o meno con NR6, con neutrofili per 24 ore.

Come si può osservare dalle immagini riportate in Figura 4A gli MCS pre-trattati con NR6 e successivamente co-coltivati per 24 ore con i neutrofili presentano un'architettura molto diversa dagli sferoidi di controllo, si osservano aree più scure e una maggiore tendenza a disgregarsi.

Un'ulteriore analisi al microscopio confocale degli MCS, dopo colorazione con DAPI, ha permesso di evidenziare la presenza di numerosi corpi apoptotici negli MCS trattati con NR6 in co-coltura con neutrofili.

Grazie ad un'analisi Western Blot è stata valutata l'induzione di apoptosi mediante analisi della presenza o meno del taglio proteolitico di PARP1 negli MCS Ctrl+Neu e MCS NR6+Neu. Come si può osservare in Figura 4B, PARP1 è clivata solo negli MCS pre-trattati con NR6 in co-coltura con i neutrofili.

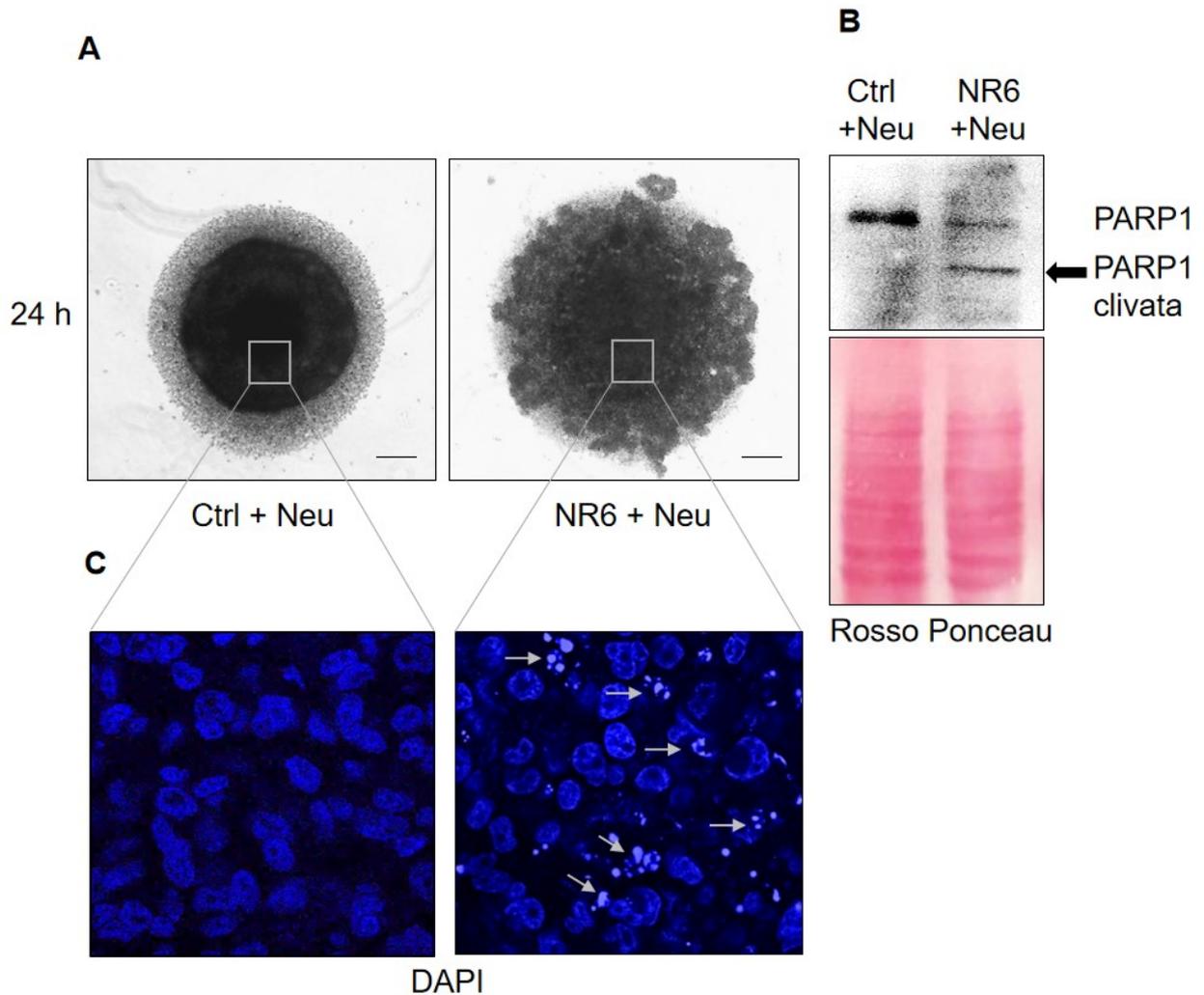


Figura 4. A) Immagini rappresentative di microscopia ottica a contrasto di fase di MCS MSTO-211H di controllo (Ctrl + Neu) e trattati con NR6 1 μ M (NR6 + Neu) per 48 ore e poi co-coltivati con neutrofili per successive 24 ore. Barra di scala: 100 μ m. **B)** Analisi Western Blot di PARP1 in MCS-MSTO-211H di controllo (Ctrl + Neu) e trattati con NR6 1 μ M (NR6 + Neu) per 48 ore e poi co-coltivati con neutrofili per 24 ore aggiuntive. L'immagine rosso ponceu è utilizzata per la normalizzazione delle bande. **C)** MCS osservati al microscopio confocale dopo colorazione con DAPI (ingrandimento 60X).

5. DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Il MPM è un tumore aggressivo e chemioresistente. I pazienti affetti da MPM infatti hanno un basso tasso di risposta al trattamento chemioterapico di prima linea. In letteratura è riportato che l'elevata espressione di *ALDH1A3* nei pazienti affetti da MPM è associata ad una minore sopravvivenza e che la sottopopolazione cellulare tumorale che esprime alti livelli dell'enzima ($ALDH^{High}$) è resistente al trattamento con cisplatino e pemetrexed.

L'*ALDH1A3* è una aldeide deidrogenasi appartenente alla sottofamiglia 1A. Questo enzima è coinvolto nella biosintesi di acido retinoico, in processi di detossificazione cellulare da specie chimiche reattive ed è espresso ad alti livelli in numerose patologie tumorali nelle quali ha un ruolo cruciale nel promuovere la progressione tumorale e la farmacoresistenza.

Durante il mio lavoro di tesi ho testato *in vitro*, in modelli cellulari 3D (MCS) di MPM, NR6 un inibitore potente e selettivo di *ALDH1A3*.

I modelli di coltura 3D, seppur avascolarizzati, mimano meglio il microambiente tumorale rispetto alle colture in monostrato 2D, infatti gli MCS simulano in modo più fedele il gradiente di ossigeno e di nutrienti presente nei tumori *in vivo*.

Nella sezione risultati di questo elaborato di tesi ho riportato che il trattamento degli MCS con NR6 riduce la crescita cellulare e causa un accumulo di malondialdeide, senza indurre apoptosi. La malondialdeide è una α -ossialdeide genotossica che modifica covalentemente il DNA attraverso una reazione a più passaggi (multistadio) formando prodotti finali di glicazione avanzata (AGE).

Indagando quale fosse la causa della riduzione della proliferazione cellulare, abbiamo dimostrato che il trattamento con NR6 induce senescenza. La senescenza è un processo caratterizzato da arresto del ciclo cellulare a favore del riparo dei danni al DNA, resistenza all'apoptosi, secrezione di chemochine, citochine e fattori di crescita [49].

Il trattamento con NR6 induce l'espressione di *CKDN2A* che codifica per la proteina p16^{INK4A}, regolatore negativo del complesso delle CDK 4-6/ciclina D1 (*Cyclin-Dependent Kinase*), marcatore indotto in senescenza.

L'espressione di *CDKN2A* a seguito del trattamento con NR6 ha confermato che le cellule fossero andate incontro ad arresto del ciclo cellulare.

Le cellule senescenti possono acquisire un fenotipo secretorio (SASP, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) caratterizzato, oltre che dall'induzione di *CDKN2A*, anche dal rilascio delle citochine IL-6 e IL-8 [49]. Se da un lato l'induzione della senescenza è una strategia utile per

interferire con la proliferazione cellulare, e grazie all'utilizzo di farmaci senolitici è possibile eradicare le cellule senescenti, dall'altro, soprattutto la SASP può favorire l'angiogenesi, la migrazione e l'immuno-evasione delle cellule tumorali.

Indagando se la senescenza indotta da NR6 fosse SASP abbiamo valutato l'espressione di *IL-6* e *CXCL8*. Diversamente da quanto atteso, abbiamo osservato che l'espressione di *IL-6* è up-regolata, al contrario, quella di *CXCL8* viene significativamente ridotta. A conferma di quest'ultimo risultato abbiamo dimostrato che anche i livelli di IL-8 secreta diminuiscono a seguito del trattamento con NR6. Ad oggi non abbiamo ancora approfondito quale sia il meccanismo coinvolto nella regolazione trascrizionale di *CXCL8*, ma sicuramente rappresenta un interessante oggetto d'indagine.

IL-8 è nota per essere un fattore chemo-attrattivo per i neutrofili, pertanto abbiamo allestito delle co-culture 3D con MCS e neutrofili. Dagli esperimenti effettuati abbiamo osservato che i neutrofili in co-cultura per 3 ore con MCS pre-trattati con NR6 si disponevano diversamente dai controlli formando degli aggregati.

Abbiamo dimostrato che non si tratta di un effetto diretto di NR6 sui neutrofili poiché, come si osserva nei risultati, questi ultimi non esprimono ALDH1A3. Questo dato suggerisce che la loro differente disposizione è da ricondurre a fattori rilasciati dalle cellule tumorali.

Durante l'allestimento di vetrini per analisi di immunofluorescenza degli MCS abbiamo osservato che i neutrofili in co-cultura con gli MCS pre-trattati con NR6 per 24 ore inducono apoptosi. Questo risultato è rilevante e merita ulteriori approfondimenti perché suggerisce il ruolo cruciale dei neutrofili nell'indurre apoptosi di cellule senescenti. Una caratteristica dei neutrofili è la loro plasticità nel microambiente tumorale, in questo contesto, seppur non ancora caratterizzati in modo approfondito, sembrano acquisire un fenotipo citotossico anti-tumorale N1.

In futuro sarà sicuramente interessante indagare quali fattori rilasciati dalle cellule tumorali trattate con NR6 inducano l'attivazione dei neutrofili e di conseguenza caratterizzare il fenotipo di questi ultimi. Ad oggi, non ci sono dati in letteratura sulla caratterizzazione e il ruolo dei neutrofili nel microambiente del MPM.

I dati riportati nel mio lavoro di tesi indicano che l'ALDH1A3 è un promettente bersaglio molecolare nel contesto del MPM, certamente ulteriori studi sia *in vitro* che *in vivo* saranno necessari per poter approfondire il suo ruolo e quindi sviluppare strategie terapeutiche efficaci.

6. BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit Rev Toxicol.* 2005 Aug;35(7):609-62. doi: 10.1080/10408440591002183. PMID: 16417045.
2. Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008 Jun;4(6):697-720. doi: 10.1517/17425255.4.6.697. PMID: 18611112; PMCID: PMC2658643.
3. Ahmed Laskar A, Younus H. Aldehyde toxicity and metabolism: the role of aldehyde dehydrogenases in detoxification, drug resistance and carcinogenesis. *Drug Metab Rev.* 2019 Feb;51(1):42-64. doi: 10.1080/03602532.2018.1555587. Epub 2019 Apr 22. PMID: 30514131.
4. Rodríguez-Zavala JS, Calleja LF, Moreno-Sánchez R, Yoval-Sánchez B. Role of Aldehyde Dehydrogenases in Physiopathological Processes. *Chem Res Toxicol.* 2019 Mar 18;32(3):405-420. doi: 10.1021/acs.chemrestox.8b00256. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30628442.
5. McLean ME, MacLean MR, Cahill HF, Arun RP, Walker OL, Wasson MD, Fernando W, Venkatesh J, Marcato P. The Expanding Role of Cancer Stem Cell Marker ALDH1A3 in Cancer and Beyond. *Cancers (Basel).* 2023 Jan 13;15(2):492. doi: 10.3390/cancers15020492. PMID: 36672441; PMCID: PMC9857290.
6. Coyle KM, Sultan M, Thomas ML, Vaghar-Kashani A, Marcato P (2013) Retinoid Signaling in Cancer and Its Promise for Therapy. *J Carcinog Mutagen S7: 006.* doi:10.4172/2157-2518.S7-006
7. Marcato P, Dean CA, Liu RZ, Coyle KM, Bydoun M, Wallace M, Clements D, Turner C, Mathenge EG, Gujar SA, Giacomantonio CA, Mackey JR, Godbout R, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. *Mol Oncol.* 2015 Jan;9(1):17-31. doi: 10.1016/j.molonc.2014.07.010. Epub 2014 Jul 24. PMID: 25106087; PMCID: PMC5528683.
8. Chen MH, Weng JJ, Cheng CT, Wu RC, Huang SC, Wu CE, Chung YH, Liu CY, Chang MH, Chen MH, Chiang KC, Yeh TS, Su Y, Yeh CN. ALDH1A3, the Major Aldehyde Dehydrogenase Isoform in Human Cholangiocarcinoma Cells, Affects Prognosis and Gemcitabine Resistance in Cholangiocarcinoma Patients. *Clin Cancer Res.* 2016 Aug 15;22(16):4225-35. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1800. Epub 2016 Apr 13. PMID: 27076629.
9. Kawakami R, Mashima T, Kawata N, Kumagai K, Migita T, Sano T, Mizunuma N, Yamaguchi K, Seimiya H. ALDH1A3-mTOR axis as a therapeutic target for anticancer drug-tolerant persister

- cells in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2020 Mar;111(3):962-973. doi: 10.1111/cas.14316. Epub 2020 Feb 11. PMID: 31960523; PMCID: PMC7060474.
10. Nie S, Qian X, Shi M, Li H, Peng C, Ding X, Zhang S, Zhang B, Xu G, Lv Y, Wang L, Friess H, Kong B, Zou X, Shen S. ALDH1A3 Accelerates Pancreatic Cancer Metastasis by Promoting Glucose Metabolism. *Front Oncol.* 2020 Jun 16;10:915. doi: 10.3389/fonc.2020.00915. PMID: 32612951; PMCID: PMC7308463.
 11. Gan C, Pierscianek D, El Hindy N, Ahmadipour Y, Keyvani K, Sure U, Zhu Y. The predominant expression of cancer stem cell marker ALDH1A3 in tumor infiltrative area is associated with shorter overall survival of human glioblastoma. *BMC Cancer.* 2020 Jul 17;20(1):672. doi: 10.1186/s12885-020-07153-0. PMID: 32680476; PMCID: PMC7368792.
 12. Duan JJ, Wang D, Cai J, Chen JJ, Zheng XX, Chen TQ, Wang J, Zhang X, Yang QK, Yu SC. An aldehyde dehydrogenase 1A3 inhibitor attenuates the metastasis of human colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2022 Jun 28;536:215662. doi: 10.1016/j.canlet.2022.215662. Epub 2022 Mar 22. PMID: 35331786.
 13. Nie S, Qian X, Shi M, Li H, Peng C, Ding X, Zhang S, Zhang B, Xu G, Lv Y, Wang L, Friess H, Kong B, Zou X, Shen S. ALDH1A3 Accelerates Pancreatic Cancer Metastasis by Promoting Glucose Metabolism. *Front Oncol.* 2020 Jun 16;10:915. doi: 10.3389/fonc.2020.00915. PMID: 32612951; PMCID: PMC7308463.
 14. Feng H, Liu Y, Bian X, Zhou F, Liu Y. ALDH1A3 affects colon cancer in vitro proliferation and invasion depending on CXCR4 status. *Br J Cancer.* 2018 Jan;118(2):224-232. doi: 10.1038/bjc.2017.363. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29235568; PMCID: PMC5785736.
 15. Mao P, Joshi K, Li J, Kim SH, Li P, Santana-Santos L, Luthra S, Chandran UR, Benos PV, Smith L, Wang M, Hu B, Cheng SY, Sobol RW, Nakano I. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 21;110(21):8644-9. doi: 10.1073/pnas.1221478110. Epub 2013 May 6. PMID: 23650391; PMCID: PMC3666732.
 16. Luo Y, Dallaglio K, Chen Y, Robinson WA, Robinson SE, McCarter MD, Wang J, Gonzalez R, Thompson DC, Norris DA, Roop DR, Vasiliou V, Fujita M. ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells.* 2012 Oct;30(10):2100-13. doi: 10.1002/stem.1193. PMID: 22887839; PMCID: PMC3448863.
 17. Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is

- primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells*. 2011 Jan;29(1):32-45. doi: 10.1002/stem.563. PMID: 21280157.
18. Reynolds DS, Tevis KM, Blessing WA, Colson YL, Zaman MH, Grinstaff MW. Breast Cancer Spheroids Reveal a Differential Cancer Stem Cell Response to Chemotherapeutic Treatment. *Sci Rep*. 2017 Sep 4;7(1):10382. doi: 10.1038/s41598-017-10863-4. PMID: 28871147; PMCID: PMC5583341.
 19. Thamrongwarangoon U, Detarya M, Seubwai W, Saengboonmee C, Hino S, Koga T, Nakao M, Wongkham S. Lactic acidosis promotes aggressive features of cholangiocarcinoma cells via upregulating ALDH1A3 expression through EGFR axis. *Life Sci*. 2022 Aug 1;302:120648. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120648. Epub 2022 May 19. PMID: 35598658.
 20. Lang T, Xu J, Zhou L, Zhang Z, Ma X, Gu J, Liu J, Li Y, Ding D, Qiu J. Disruption of KDM4C-ALDH1A3 feed-forward loop inhibits stemness, tumorigenesis and chemoresistance of gastric cancer stem cells. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Sep 22;6(1):336. doi: 10.1038/s41392-021-00674-5. PMID: 34548470; PMCID: PMC8455594.
 21. Bauzone M, Souidi M, Dessein AF, Wisztorski M, Vincent A, Gimeno JP, Monté D, Van Seuning I, Gespach C, Huet G. Cross-talk between YAP and RAR-RXR Drives Expression of Stemness Genes to Promote 5-FU Resistance and Self-Renewal in Colorectal Cancer Cells. *Mol Cancer Res*. 2021 Apr;19(4):612-622. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0462. Epub 2021 Jan 20. PMID: 33472949.
 22. Corominas-Faja B, Oliveras-Ferreros C, Cuyàs E, Segura-Carretero A, Joven J, Martin-Castillo B, Barrajon-Catalán E, Micol V, Bosch-Barrera J, Menendez JA. Stem cell-like ALDH(bright) cellular states in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: a novel mechanism of acquired resistance to erlotinib targetable with the natural polyphenol silibinin. *Cell Cycle*. 2013 Nov 1;12(21):3390-404. doi: 10.4161/cc.26417. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24047698; PMCID: PMC3895428.
 23. Kurth I, Hein L, Mäbert K, Peitzsch C, Koi L, Cojoc M, Kunz-Schughart L, Baumann M, Dubrovskaja A. Cancer stem cell related markers of radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Oct 27;6(33):34494-509. doi: 10.18632/oncotarget.5417. PMID: 26460734; PMCID: PMC4741468.
 24. Murar M, Vaidya A. Cancer stem cell markers: premises and prospects. *Biomark Med*. 2015;9(12):1331-42. doi: 10.2217/bmm.15.85. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26612591.

25. Duan JJ, Cai J, Gao L, Yu SC. ALDEFLUOR activity, ALDH isoforms, and their clinical significance in cancers. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2023 Dec;38(1):2166035. doi: 10.1080/14756366.2023.2166035. PMID: 36651035; PMCID: PMC9858439.
26. Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*. 2016 Mar 8;7(10):11018-32. doi: 10.18632/oncotarget.6920. PMID: 26783961; PMCID: PMC4905455.
27. Luo Y, Dallaglio K, Chen Y, Robinson WA, Robinson SE, McCarter MD, Wang J, Gonzalez R, Thompson DC, Norris DA, Roop DR, Vasiliou V, Fujita M. ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells*. 2012 Oct;30(10):2100-13. doi: 10.1002/stem.1193. PMID: 22887839; PMCID: PMC3448863.
28. Mao P, Joshi K, Li J, Kim SH, Li P, Santana-Santos L, Luthra S, Chandran UR, Benos PV, Smith L, Wang M, Hu B, Cheng SY, Sobol RW, Nakano I. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 21;110(21):8644-9. doi: 10.1073/pnas.1221478110. Epub 2013 May 6. PMID: 23650391; PMCID: PMC3666732.
29. Cheng P, Wang J, Waghmare I, Sartini S, Coviello V, Zhang Z, Kim SH, Mohyeldin A, Pavlyukov MS, Minata M, Valentim CL, Chhipa RR, Bhat KP, Dasgupta B, La Motta C, Kango-Singh M, Nakano I. FOXD1-ALDH1A3 Signaling Is a Determinant for the Self-Renewal and Tumorigenicity of Mesenchymal Glioma Stem Cells. *Cancer Res*. 2016 Dec 15;76(24):7219-7230. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2860. Epub 2016 Aug 28. PMID: 27569208; PMCID: PMC5161538.
30. Shao C, Sullivan JP, Girard L, Augustyn A, Yenerall P, Rodriguez-Canales J, Liu H, Behrens C, Shay JW, Wistuba II, Minna JD. Essential role of aldehyde dehydrogenase 1A3 for the maintenance of non-small cell lung cancer stem cells is associated with the STAT3 pathway. *Clin Cancer Res*. 2014 Aug 1;20(15):4154-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3292. Epub 2014 Jun 6. PMID: 24907115; PMCID: PMC4438754.
31. Moretti A, Li J, Donini S, Sobol RW, Rizzi M, Garavaglia S. Crystal structure of human aldehyde dehydrogenase 1A3 complexed with NAD⁺ and retinoic acid. *Sci Rep*. 2016 Oct 19;6:35710. doi: 10.1038/srep35710. PMID: 27759097; PMCID: PMC5069622.
32. Li J, Garavaglia S, Ye Z, Moretti A, Belyaeva OV, Beiser A, Ibrahim M, Wilk A, McClellan S, Klyuyeva AV, Goggans KR, Kedishvili NY, Salter EA, Wierzbicki A, Migaud ME, Mullett SJ, Yates NA, Camacho CJ, Rizzi M, Sobol RW. A specific inhibitor of ALDH1A3 regulates retinoic

- acid biosynthesis in glioma stem cells. *Commun Biol.* 2021 Dec 21;4(1):1420. doi: 10.1038/s42003-021-02949-7. PMID: 34934174; PMCID: PMC8692581.
33. Quattrini L, Gelardi ELM, Coviello V, Sartini S, Ferraris DM, Mori M, Nakano I, Garavaglia S, La Motta C. Imidazo[1,2-*a*]pyridine Derivatives as Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: Novel Chemotypes to Target Glioblastoma Stem Cells. *J Med Chem.* 2020 May 14;63(9):4603-4616. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01910. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32223240.
34. Gelardi ELM, Colombo G, Picarazzi F, Ferraris DM, Mangione A, Petrarolo G, Aronica E, Rizzi M, Mori M, La Motta C, Garavaglia S. A Selective Competitive Inhibitor of Aldehyde Dehydrogenase 1A3 Hinders Cancer Cell Growth, Invasiveness and Stemness In Vitro. *Cancers (Basel).* 2021 Jan 19;13(2):356. doi: 10.3390/cancers13020356. PMID: 33478031; PMCID: PMC7835878.
35. Sahu RK, Ruhi S, Jeppu AK, Al-Goshae HA, Syed A, Nagdev S, Widyowati R, Ekasari W, Khan J, Bhattacharjee B, Goyal M, Bhattacharya S, Jangde RK. Malignant mesothelioma tumours: molecular pathogenesis, diagnosis, and therapies accompanying clinical studies. *Front Oncol.* 2023 Jul 4;13:1204722. doi: 10.3389/fonc.2023.1204722. PMID: 37469419; PMCID: PMC10353315.
36. Bibby AC, Tsim S, Kanellakis N, Ball H, Talbot DC, Blyth KG, Maskell NA, Psallidas I. Malignant pleural mesothelioma: an update on investigation, diagnosis and treatment. *Eur Respir Rev.* 2016 Dec;25(142):472-486. doi: 10.1183/16000617.0063-2016. PMID: 27903668; PMCID: PMC9487555.
37. Wadowski B, De Rienzo A, Bueno R. The Molecular Basis of Malignant Pleural Mesothelioma. *Thorac Surg Clin.* 2020 Nov;30(4):383-393. doi: 10.1016/j.thorsurg.2020.08.005. Epub 2020 Sep 12. PMID: 33012428; PMCID: PMC7536355.
38. Carbone M, Adusumilli PS, Alexander HR Jr, Baas P, Bardelli F, Bononi A, Bueno R, Felley-Bosco E, Galateau-Salle F, Jablons D, Mansfield AS, Minaai M, de Perrot M, Pesavento P, Rusch V, Severson DT, Taioli E, Tsao A, Woodard G, Yang H, Zauderer MG, Pass HI. Mesothelioma: Scientific clues for prevention, diagnosis, and therapy. *CA Cancer J Clin.* 2019 Sep;69(5):402-429. doi: 10.3322/caac.21572. Epub 2019 Jul 8. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2020 Jul;70(4):313-314. PMID: 31283845; PMCID: PMC8192079.
39. Hajj GNM, Cavarson CH, Pinto CAL, Venturi G, et al. Malignant pleural mesothelioma: an update. *J Bras Pneumol.* 2021;47(6):e20210129; doi:10.36416/1806-3756/e20210129
40. Yang H, Gao Y, Xu D, Xu K, Liang SQ, Yang Z, Scherz A, Hall SRR, Forster S, Berezowska S, Yao F, Ochsenbein AF, Marti TM, Kocher GJ, Schmid RA, Dorn P, Peng RW. MEK1 drives

- oncogenic signaling and interacts with PARP1 for genomic and metabolic homeostasis in malignant pleural mesothelioma. *Cell Death Discov.* 2023 Feb 10;9(1):55. doi: 10.1038/s41420-023-01307-2. PMID: 36765038; PMCID: PMC9918536.
41. Inai K. Pathology of mesothelioma. *Environ Health Prev Med.* 2008 Mar;13(2):60-4. doi: 10.1007/s12199-007-0017-6. Epub 2008 Feb 28. PMID: 19568882; PMCID: PMC2698271.
 42. Nickell LT Jr, Lichtenberger JP 3rd, Khorashadi L, Abbott GF, Carter BW. Multimodality imaging for characterization, classification, and staging of malignant pleural mesothelioma. *Radiographics.* 2014 Oct;34(6):1692-706. doi: 10.1148/rg.346130089. PMID: 25310424.
 43. Rondon L, Fu R, Patel MR. Success of Checkpoint Blockade Paves the Way for Novel Immune Therapy in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancers (Basel).* 2023 May 27;15(11):2940. doi: 10.3390/cancers15112940. PMID: 37296902; PMCID: PMC10251855.
 44. Cioce M, Sacconi A, Pass HI, Canino C, Strano S, Blandino G, Fazio VM. Insights into Intra-Tumoral Heterogeneity: Transcriptional Profiling of Chemoresistant MPM Cell Subpopulations Reveals Involvement of NFkB and DNA Repair Pathways and Contributes a Prognostic Signature. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 8;22(21):12071. doi: 10.3390/ijms222112071. PMID: 34769499; PMCID: PMC8585077.
 45. Canino C, Luo Y, Marcato P, Blandino G, Pass HI, Cioce M. A STAT3-NFkB/DDIT3/CEBPβ axis modulates ALDH1A3 expression in chemoresistant cell subpopulations. *Oncotarget.* 2015 May 20;6(14):12637-53. doi: 10.18632/oncotarget.3703. PMID: 25868979; PMCID: PMC4494963.
 46. Arpinati, L.; Kaisar-Iluz, N.; Shaul, M.E.; Groth, C.; Umansky, V.; Fridlender, Z.G. Tumor-Derived Factors Differentially Affect the Recruitment and Plasticity of Neutrophils. *Cancers* 2021, 13, 5082. <https://doi.org/10.3390/cancers13205082>
 47. Powell DR, Huttenlocher A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* 2016 Jan;37(1):41-52. doi: 10.1016/j.it.2015.11.008. Epub 2015 Dec 14. PMID: 26700397; PMCID: PMC4707100.
 48. Boumya S, Fallarini S, Siragusa S, Petrarolo G, Aprile S, Audrito V, La Motta C, Garavaglia S, Moro L, Pinton G. A Selective ALDH1A3 Inhibitor Impairs Mesothelioma 3-D Multicellular Spheroid Growth and Neutrophil Recruitment. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 3;24(7):6689. doi: 10.3390/ijms24076689. PMID: 37047661; PMCID: PMC10094992.
 49. Wang B, Kohli J, Demaria M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends Cancer.* 2020 Oct;6(10):838-857. doi: 10.1016/j.trecan.2020.05.004. Epub 2020 May 29. PMID: 32482536.

SITOGRAFIA

S1 www.mesothelioma.com

S2 <https://www.airc.it/>

S3 <https://puntoamianto.com>

S4 <https://www.aimac.it/>

S5 <https://www.sifoweb.it/>

S6 <https://www.aiom.it/linee-guida-aiom/>

S7 <https://www.biogenerica.it/>

S8 <https://www.licor.com/>

S9 <https://microbiologynote.com/>