



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

***Corso di Laurea Magistrale in Biologia
curriculum Biomedico-Biomolecolare***

TESI DI LAUREA

**Inibizione dell'asse EZH2 e COX-2/PGE2:
un approccio combinato contro la resistenza mieloide-mediata a
tazemetostat nel mesotelioma pleurico maligno**

Candidata: Elisa Rondina

Relatore: Prof.ssa Chiara Porta



Firmato digitalmente da Chiara Porta
Data: 06.10.2026 12:15:52 CEST
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI
STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE/01943490027

Correlatore: Martina Delsignore

ANNO 2025/2026

Sommario

INTRODUZIONE	6
MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO	6
Definizione e inquadramento generale	6
Dati epidemiologici	7
Classificazione istologica del MPM	7
Ruolo dell'asbesto	9
Base genetica della patologia	11
IL MICROAMBIENTE TUMORALE del MPM	12
Composizione del TME	13
I macrofagi associati al tumore (TAM)	14
I linfociti T	15
Le altre componenti del TME	16
OPZIONI TERAPEUTICHE	18
EPIGENETICA COME BERSAGLIO TERAPEUTICO	20
EZH2	22
EZH2 nell'MPM	23
Tazemetostat	24
La prostaglandina E2 (PGE2)	26
PGE2 nel microambiente tumorale soppressivo	30
PGE2 nel mesotelioma pleurico maligno	32
SCOPO DEL LAVORO	33
MATERIALI E METODI	34
Colture cellulari	34
Generazione di Sferoidi Tumoriali tridimensionali (MCS)	35
Allestimento modelli di co-cultura e isolamento di monociti e linfociti umani da sangue periferico (PBMC)	35
Isolamento dei monociti	37
Isolamento dei linfociti T	38
Attivazione dei linfociti T purificati	38
Saggio con sonda CSFE	39
Trattamento farmacologico con l'inibitore di EZH2 (Tazemetostat)	40
Trattamento con Prostaglandina E2 (PGE2)	40

Trattamento con antagonisti dei recettori EP2 ed EP4.....	41
Analisi dell'espressione genica in modelli 3D	41
Estrazione dell'RNA	41
Quantificazione dell'RNA	43
Retrotrascrizione dell'RNA	43
Real-time PCR.....	44
Acquisizione e analisi al microscopio confocale	45
Live imaging al microscopio Thunder	46
RISULTATI E DISCUSSIONE	47
Il tazemetostat modula il profilo trascrizionale infiammatorio nei diversi istotipi di MPM	48
Il tazemetostat promuove il richiamo dei monociti negli MCS epitelioidei e bifasici .	50
I monociti infiltranti antagonizzano l'efficacia del tazemetostat	51
Il trattamento con tazemetostat promuove il reclutamento dei linfociti attivati negli MCS di mesotelioma.....	53
Tazemetostat induce l'espressione della COX-2 negli MCS	56
La PGE2 promuove la crescita degli MCS in modo dipendente dai monociti	57
L'inibizione della segnalazione PGE2/EP2-EP4 potenzia l'attività di tazemetostat in presenza di monociti	59
CONCLUSIONE	62

INTRODUZIONE

MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO

Definizione e inquadramento generale

Il mesotelioma è una neoplasia rara che origina dalle cellule del mesotelio, la membrana sierosa deputata al rivestimento e alla protezione degli organi interni. In base alla sede anatomica di insorgenza, il mesotelioma viene distinto in diverse forme: il mesotelioma pleurico, che interessa la pleura; il mesotelioma peritoneale, che coinvolge la cavità addominale; il mesotelioma pericardico, che interessa il pericardio; e il mesotelioma della tunica vaginale, che colpisce la membrana sierosa che riveste il testicolo.. Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) rappresenta di gran lunga la variante più frequente costituendo oltre il 90% di tutti i casi di mesotelioma diagnosticati [1].

Il principale fattore eziologico responsabile dell'insorgenza del MPM è l'asbesto (detto anche amianto), le cui fibre sono classificate dalla International Agency for Research on Cancer (IARC) come agenti cancerogeni certi per l'uomo (Gruppo 1) [2]. L'esposizione ambientale o occupazionale alle fibre di amianto può portare al loro ingresso attraverso le vie aeree fino agli alveoli polmonari, da qui il drenaggio linfatico e la migrazione trans pleurica favoriscono il passaggio delle fibre nella cavità pleurica, dove si accumulano grazie alla loro elevata biopersistenza. Il tentativo fallimentare dei macrofagi di fagocitarle determina uno stato noto come *"frustrated phagocytosis"* caratterizzato dal rilascio continuo di specie reattive dell'ossigeno (ROS), specie reattive dell'azoto (RNS), citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita che alimentano uno stato di infiammazione cronica che promuove la trasformazione neoplastica [3].

Dal punto di vista clinico, il MPM è caratterizzato da un periodo di latenza estremamente prolungato: tra il momento dell'esposizione iniziale alle fibre di amianto e la manifestazione clinica della patologia può intercorrere un periodo di tempo compreso dai 20 fino ai 40 anni, con valori riportati in alcune casistiche anche superiori. Questo spiega perché, nonostante l'Italia e numerosi paesi europei abbiano messo al bando l'uso dell'amianto negli anni novanta, il numero di nuovi casi rimane ancora elevato e si prevede un ulteriore incremento del numero di nuove diagnosi nei prossimi anni [2,4] .

La lunga fase di latenza preclinica comporta un progressivo accumulo di alterazioni genetiche ed epigenetiche che si traduce clinicamente in un esordio insidioso e in una diagnosi tardiva. Dal punto di vista sintomatologico, infatti, la malattia si manifesta in modo generalmente aspecifico, con i segni clinici delle malattie polmonari quali la dispnea, il dolore toracico, la tosse persistente e il versamento pleurico. Alla diagnosi, la malattia si presenta già in stadio avanzato, ne consegue un decorso clinico ingravescente con una sopravvivenza media stimata tra 4-12 mesi in assenza di trattamento che tende ad aumentare a 12-19 mesi nei pazienti sottoposti a terapie multimodali. Nonostante i progressi terapeutici degli ultimi anni, la sopravvivenza oggi rimane inferiore al 12-15% [5].

Dati epidemiologici

Secondo i dati più recenti riportati dal VIII Rapporto del Registro Nazionale dei Mesoteliomi (ReNaM) il MPM rappresenta il 93,1 % di tutti i casi di mesotelioma registrati in Italia, segue quello peritoneale (6,4%), mentre la forma pericardica e della tunica vaginale del testicolo non superano l'1% dei casi complessivi ¹. Dal punto di vista della distribuzione geografica interna, oltre la metà dei casi italiani si concentra in quattro regioni ovvero Lombardia, Piemonte, Liguria ed Emilia-Romagna, che insieme rappresentano il 56,7% del totale nazionale, correlazione associata alla storica localizzazione dei principali insediamenti industriali legati alla lavorazione dell'amianto (cantieristica navale, industria del cemento-amianto, settore ferroviario). Sul piano dell'incidenza annuale, i dati AIOM-AIRTUM più recenti stimano per il 2024 circa 1.779 nuove diagnosi di mesotelioma in Italia (1.328 negli uomini e 451 nelle donne) [6]. Nel complesso, i dati nazionali confermano una netta prevalenza maschile (72,1 % dei casi) e un'età media alla diagnosi di 71 anni.

Classificazione istologica del MPM

Storicamente il MPM è classificato in 3 sottotipi istologici principali chiamati epitelioide, sarcomatoide e bifasico². Tuttavia, studi più recenti hanno messo in luce un'eterogeneità morfologica e molecolare molto più complessa. Studi di trascrittomica su larga scala hanno identificato quattro principali sottogruppi: epitelioide (E),

¹ Marinaccio A, Binazzi A, Bonafede M, et al. Il Registro Nazionale dei Mesoteliomi. VIII Rapporto. Roma: INAIL; 2025. Disponibile da: https://www.cnasostenibile.it/files/viii-rapporto-renam_822.pdf

² WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Thoracic Tumours*, 5th ed. Lyon: IARC Press; 2021

sarcomatoide (S) e due varianti bifasiche (bifasico-E e bifasico-S) [7]. La successiva caratterizzazione isto-molecolare, basata sui punteggi E e S (E-score e S-score), ha ulteriormente evidenziato l'eterogeneità del tumore [8]. Nonostante questi profili molecolari non siano ancora entrati nella pratica diagnostica, La classificazione WHO del 2021 ha perfezionato la classificazione del MPM introducendo un sistema di grading per l'istotipo epitelioidale, fondato sui pattern di crescita (quali solido e micropapillare) e sul grado di atipia nucleare, due parametri che mostrano una forte associazione con la prognosi clinica. Per cui attualmente, il MPM viene classificato come segue:³

Sottotipo epitelioidale

È il più frequente e, tra i tre, quello associato a prognosi migliore. È caratterizzato da cellule rotonde ed epitelioidee, solitamente con struttura coesa, ma possono essere osservate anche singole cellule all'interno di uno stroma fibroso. Per via della loro rilevanza prognostica, i pattern architetturali, le caratteristiche stromali e citologiche sono stati incorporati nella versione più recente del WHO [9].

Tra i pattern architetturali con prognosi favorevole si riconoscono il pattern tubulopapillare, rappresentato da cellule organizzate in strutture tubulari e proiezioni papillari allungate, quello trabecolare, in cui le cellule si dispongono in cordoni o travate, e quello adenomatoide, caratterizzato da piccole strutture ghiandolari o cistiche. Sono invece considerate sfavorevoli il pattern micropapillare, in cui piccoli aggregati cellulari privi di un vero e proprio asse fibrovascolare appaiono distaccati dal contesto tumorale circostante, e il pattern solido, in cui le cellule formano lamine compatte e continue, quando quest'ultimo interessa almeno il 50% del tumore.

Dal punto di vista citologico se si ha presenza di cellule con globuli citoplasmatici e caratteristiche pleomorfe (nuclei atipici e/o cellule giganti multinucleate) si ha una prognosi sfavorevole.

Sottotipo bifasico

È definito dalla compresenza di una componente epitelioidale e sarcomatoide. La diagnosi richiede almeno il 10% di ciascuna componente, soglia non più richiesta nei campioni di piccole dimensioni come biopsie o citologici; la percentuale della

³ WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Thoracic Tumours*, 5th ed. Lyon: IARC Press; 2021

componente sarcomatoide va comunque sempre riportata, data la sua rilevanza prognostica.

Sottotipo sarcomatoide

Presenta la prognosi peggiore tra i tre. È costituito da cellule fusate o allungate, disposte in foglietti solidi o immerse in uno stroma fibroso. Rientra tra queste anche la forma desmoplastica, caratterizzata da uno stroma denso e ialinizzato. Una novità della classificazione WHO 2021 riguarda le caratteristiche citologiche transazionali, morfologicamente intermedie tra epitelioide e sarcomatoide, poiché associate a prognosi peggiore.

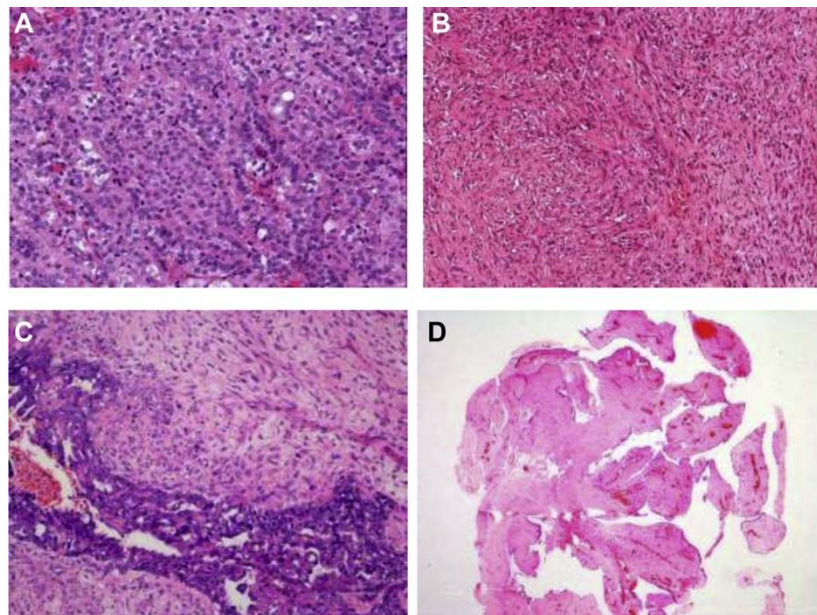


Figura 1 A) Il mesotelioma maligno epitelioide presenta cellule epitelioidi di forma rotondeggiante. B) Il mesotelioma maligno sarcomatoide presenta cellule fusiformi maligne immerse in uno stroma fibroso. C) Il mesotelioma maligno bifasico mostra una combinazione di aree epitelioidi e sarcomatoidi. D) Il mesotelioma papillare ben differenziato presenta una marcata architettura papillare, con la superficie rivestita da cellule mesoteliali dall'aspetto benigno[10].

Ruolo dell'asbesto

A causa del basso costo e delle sue qualità isolanti, l'amianto è stato ampiamente utilizzato dalla metà del XX secolo. Con la parola amianto si fa riferimento a sei minerali commercialmente sfruttati: un serpentino (crisotilo) e cinque anfiboli

(crocidolite, actinolite, tremolite, antofillite e amosite), i quali sono dotati di potenziale cancerogeno variabile in funzione delle dimensioni, della biopersistenza e delle caratteristiche fisico-chimiche delle singole fibre [11]. La patogenicità dell'amianto dipende dai meccanismi molecolari che le fibre innescano una volta depositate a livello pleurico.

Le fibre lunghe e sottili dell'amianto, infatti inducono nelle cellule mesoteliali un processo di morte prevalentemente necrotico, ulteriormente stimolato dal rilascio di ROS e RNS da parte dei fagociti attivati. I macrofagi, infatti, tentano di rimuovere le fibre, che però sono troppo grandi per poter essere internalizzate. Questo fenomeno, che prende il nome di "fagocitosi frustrata", porta all'attivazione dei macrofagi con conseguente produzione di ROS e RNS. In particolare studi recenti hanno dimostrato che i ROS rilasciati dai macrofagi attivati dall'amianto possono causare danni al DNA inducendo la formazione di addotti di 8-idrossi-2-desossiguanosina (8-OHdG) implicati in un meccanismo di morte cellulare ferro dipendente detto ferroptosi [12,13]. L'attivazione continua dei macrofagi dovuta alla biopersistenza di molte fibre minerali, unita alla morte delle cellule mesoteliali stabilisce uno stato di infiammazione cronica che è riconosciuto essere uno dei principali fattori che contribuiscono alla fisiopatologia dello sviluppo di cancro causato dall'amianto e da altre fibre minerali.

La necrosi delle cellule mesoteliali determina il rilascio passivo nello spazio extracellulare della proteina high mobility group box 1 (HMGB1), un tipico "damage-associated molecular pattern" (DAMPs) che legando RAGE ed altri recettori, favorisce il reclutamento e l'attivazione dei macrofagi [14]. Le fibre di asbesto, unitamente ad altri stimoli endogeni come i ROS, portano all'attivazione dell'inflammosoma NLRP3[15]. L'oligomerizzazione di NLRP3 inattivo, insieme alla proteina adattatrice ASC e alla procaspasi-1 porta all'attivazione di quest'ultima e al conseguente rilascio delle citochine pro-infiammatorie IL-1 β e IL-18. Queste insieme a IL-1 α e HMGB1, instaurano un circuito infiammatorio autocrino che si automantiene nel tempo portando a uno stato di infiammazione cronica. In questo contesto, il TNF- α prodotto attiva la via di segnalazione di NF- κ B, favorendo la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule mesoteliali danneggiate dall'amianto. Questa resistenza delle cellule mesoteliali alla morte cellulare programmata, favorisce l'accumulo progressivo di alterazioni genetiche

che nel tempo portano alla trasformazione neoplastica e allo sviluppo del mesotelioma. [16]

Base genetica della patologia

Non tutti i pazienti con MPM hanno una storia di esposizione all'amianto. Studi genetici hanno messo in luce che gli individui portatori di mutazioni germinali a carico di geni che codificano per proteine coinvolte nel processo di riparazione del DNA, come ad esempio “BRCA1-Associated Protein 1” (BAP1) hanno un rischio più alto di sviluppare l'MPM, perchè sono più vulnerabili ai cancerogeni ambientali, incluso l'amianto. Per tale motivo, ad oggi il metodo GxE, che combina indagini genetiche (G) e ambientali (E), rappresenta l'approccio metodologico più utilizzato per indagare la carcinogenesi da amianto. Questo modello mette in luce l'importanza delle mutazioni germinali e/o somatiche a carico di quei geni che, codificando per proteine coinvolte nei processi di riparazione del DNA, favoriscono l'accumulo progressivo di mutazioni genetiche nelle cellule mesoteliali sopravvissute all'esposizione alle fibre di amianto[17].

Un ulteriore meccanismo di instabilità genomica recentemente chiamato in causa nella carcinogenesi del mesotelioma è la cromotripsia, un processo che coinvolge la rottura di un singolo cromosoma segregato in modo anomalo durante la mitosi, con successivo riasssemblaggio casuale dei frammenti e formazione di riarrangiamenti errati, oppure con perdita di materiale genetico. Un singolo evento di cromotripsia può portare ad una vera e propria catastrofe cellulare: il numero di alterazioni genomiche è infatti così elevato da poter sfociare nell'attivazione simultanea di più oncogeni e nella perdita di funzione di più oncosoppressori [18]. Tra le alterazioni più frequentemente riscontrate nel mesotelioma umano vi è la delezione omozigote sul locus 9p21, che influisce sulla trascrizione di due oncosoppressori, p16^{INK4a} e p14^{ARF}. Nello specifico, p16^{INK4a}, essendo un inibitore delle chinasi ciclina dipendente CDK4 e CDK6, blocca il ciclo cellulare, mentre p14^{ARF}, inibendo MDM2, impedisce l'ubiquitinazione di p53 e favorisce l'apoptosi. Il mesotelioma presenta anche mutazioni significative negli intermedi della via di segnalazione Hippo. In quasi il 40% dei casi di mesotelioma maligno si osserva l'inattivazione di NF2 (Neurofibromina 2, o Merlin), l'attivatore a monte della cascata di Hippo. L'inattivazione di NF2 determina la trascrizione di diversi proto-oncogeni e sostiene la sopravvivenza delle cellule tumorali [19]

Il gene che però risulta essere più frequentemente mutato sia nelle forme sporadiche che familiari è il gene BAP1, che codifica per una deubiquitinasi nucleare. Dal punto di vista funzionale BAP1 agisce come oncosoppressore attraverso molteplici meccanismi: a livello nucleare BAP1 regola la riparazione dei danni al DNA, il ciclo, la sopravvivenza e il differenziamento cellulare, a livello citoplasmatico, il metabolismo e sensibilità allo stress ossidativo. La sua mutazione porta a instabilità genetica, resistenza alla morte cellulare, proliferazione incontrollata, resistenza allo stress ossidativo, perdita del differenziamento e adattamento metabolico, tutti processi biologici che favoriscono lo sviluppo e la crescita dei tumori.

Nel complesso, la scoperta di BAP1 e delle sue funzioni biologiche ha permesso di avanzare considerevolmente nella comprensione dei meccanismi molecolari che partecipano alla carcinogenesi associata all'amianto[20].

IL MICROAMBIENTE TUMORALE del MPM

Il microambiente tumorale (TME), costituito da cellule stromali, endoteliali e immunitarie immerse nella matrice extracellulare, rappresenta un ecosistema cellulare complesso e dinamico che interagisce costantemente con le cellule neoplastiche, influenzando profondamente la crescita tumorale, la capacità invasiva e metastatica, e la risposta alle diverse strategie terapeutiche. Di conseguenza, negli ultimi anni la caratterizzazione delle componenti cellulari e molecolari del TME e la comprensione dei meccanismi che regolano il “cross-talk” tra cellule tumorali e microambiente sono diventate un campo di ricerca importante per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici e di biomarcatori con valore prognostico o predittivo di risposta alle terapie [21].

Sebbene il sistema immunitario sia potenzialmente in grado di riconoscere ed eliminare le cellule neoplastiche, queste ultime sviluppano molteplici strategie per evadere la sorveglianza immunologica. Tra i principali meccanismi coinvolti si annoverano:

- Ridotta immunogenicità delle cellule tumorali, dovuta alla diminuzione dell'espressione degli antigeni tumorali e delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I), che limita il riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici

- Resistenza all'apoptosi, acquisita attraverso alterazioni delle vie di morte cellulare, che consente alle cellule neoplastiche di sopravvivere nonostante l'attacco del sistema immunitario.
- Attivazione di circuiti immunosoppressivi, mediata dalla produzione di citochine quali IL-10 e TGF- β e dall'espressione di checkpoint immunitari inibitori, tra cui PD-L1, VISTA, TIM-3 e LAG-3, da parte delle cellule tumorali e delle cellule immunitarie infiltranti, con conseguente inibizione della risposta immunitaria antitumorale(21).
- Riprogrammazione funzionale delle cellule immunitarie infiltranti, che acquisiscono un fenotipo pro-tumorale capace di promuovere la crescita del tumore, l'angiogenesi, il rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) e la resistenza ai trattamenti[22].

Nel loro insieme, questi meccanismi compromettono l'efficacia della risposta immunitaria antitumorale: da un lato determinano la disfunzione o l'esaurimento delle cellule effettrici, in particolare dei linfociti T citotossici e delle cellule NK; dall'altro favoriscono l'accumulo e l'attivazione di popolazioni mieloidi immunosoppressive, come i macrofagi associati al tumore (TAM) e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC), che, oltre a inibire le cellule immunitarie citotossiche, sostengono la creazione di un microambiente infiammatorio cronico favorevole alla progressione maligna e alla resistenza alle terapie [21].

Composizione del TME

Il TME dell'MPM è composto da diverse popolazioni cellulari:

- Cellule dell'immunità innata: i TAM, le cellule dendritiche (DC), le NK, le MDSC e i neutrofili.
- Cellule dell'immunità adattiva: linfociti T infiltranti il tumore (TIL) CD4+ e CD8+, linfociti T regolatori (Treg), linfociti B
- Componente stromale e vascolare: fibroblasti, cellule endoteliali e matrice connettivale.

Studi recenti suggeriscono che, nel MPM, la composizione del TME oltre a essere soggetta a variabilità interindividuale sia influenzata anche dal sottotipo istologico[23]. Nello specifico, l'infiltrato del sottotipo epitelioide risulta più ricco di DC plasmacitoidi

(pDC), linfociti B, linfociti T helper CD4⁺ e linfociti T CD8⁺ funzionalmente esausti, mentre le cellule immunosoppressive mieloidi (TAM, neutrofili) e linfoidi (linfociti T regolatori) sono più abbondanti nel sottotipo non-epitelioide (15).

I macrofagi associati al tumore (TAM)

I TAM derivano prevalentemente dai monociti circolanti e rappresentano la popolazione immunitaria principale del TME del MPM. Come tutti i macrofagi, anche i TAM, sono fagociti specializzati, tuttavia le cellule neoplastiche evadono la sorveglianza immunitaria attraverso molteplici meccanismi. Tra questi vi è l'espressione di molecole "don't eat me" quali CD47, che legando il recettore inibitorio SIRP-1 α , bloccano la fagocitosi delle cellule tumorali da parte dei macrofagi[24].

Inoltre, i macrofagi sono cellule plastiche che in risposta a segnali ambientali distinti possono acquisire fenotipi funzionali diversi associati ad attività pro- e anti-tumorale. Nello specifico, i macrofagi M1, pro-infiammatori e promotori di una risposta immunitaria citotossica, sono anti-tumorali; mentre quelli polarizzati M2, essendo caratterizzati da attività pro-angiogenica, pro-fibrotica, immunomodulante e immunosoppressiva, sono pro-tumorali. Nell'MPM, così come in altri tumori solidi, i TAM tendono ad acquisire fenotipi pro-tumorali M2-simili. Coerentemente, molte evidenze dimostrano una correlazione tra la presenza di un numero consistente di TAM e un esito clinico sfavorevole o una ridotta sensibilità alla chemioterapia e alla radioterapia [25]. Ad esempio, uno studio ha mostrato che, in una coorte di pazienti con MPM non epitelioide trattati con radioterapia, quelli che avevano un rapporto M2/TAM totale più alto e un numero di cellule CD8⁺ più basso andavano più precocemente incontro a progressione. Lo studio di Marcq e collaboratori, invece ha messo in luce una correlazione diretta tra il numero di macrofagi CD68⁺ presenti nei campioni di MPM e il numero di linfociti T regolatori (Treg), suggerendo un'azione diretta dei macrofagi nello stimolare e reclutare cellule immunosoppressive CD4⁺[21,26].

Le cellule tumorali contribuiscono attivamente al reclutamento dei monociti circolanti e alla loro differenziazione in TAM M2-simili. Il versamento pleurico dei pazienti con MPM è infatti ricco di fattori chemiotattici, come CCL2 e di citochine immunomodulanti, quali TGF- β e l'interleuchina-10 (IL-10) [27]. Inoltre, diverse evidenze sperimentali dimostrano l'importanza dell'asse rappresentato dal recettore per

il fattore stimolante le colonie dei macrofagi (CSF-1R) e dai suoi ligandi CSF-1/M-CSF o IL-34 [28]. Alcuni studi mostrano che livelli elevati di M-CSF e IL-34 nel versamento pleurico correlano con una sopravvivenza ridotta. Altre evidenze pre-cliniche dimostrano che il blocco del CSF-1R riduce significativamente l'infiltrazione dei TAM, portando a un recupero dell'attività delle cellule T CD8⁺ e a un aumento dell'efficacia degli inibitori dei checkpoint immunitari, in particolare l'anti-PD-L1[29].

Nel complesso in molti tumori solidi umani la presenza di un infiltrato ricco di TAM emerge essere un marcatore prognostico sfavorevole e un determinante di resistenza ai farmaci sia convenzionali che all'immunoterapia. Per questo la modulazione del reclutamento e della polarizzazione dei TAM è considerata un approccio terapeutico promettente, sia come monoterapia che in combinazione con altri trattamenti.

I linfociti T

Il riconoscimento dell'importanza dei linfociti T per la risposta immunitaria anti-tumorale e la comprensione dei meccanismi che ne regolano l'attività rappresentano il razionale biologico che ha portato allo sviluppo dell'immunoterapia basata sugli inibitori dei checkpoint immunitari [25].

L'attivazione della risposta T dipende dalla presentazione dell'antigene da parte delle DC ai linfociti T naive e questo processo permette l'attivazione e la differenziazione in cellule T effettrici. In base all'espressione dei co-recettori di membrana CD4 o CD8 si distinguono due principali sottopopolazioni funzionali:

- i linfociti T CD4 helper che hanno la capacità di potenziare l'attività citotossica dei CD8⁺ mediante la secrezione di IL-2 e IFN- γ ;
- i linfociti T CD8 citotossici (CTL) che inducono direttamente l'apoptosi delle cellule tumorali tramite rilascio di citochine e di molecole citotossiche quali perforina e granzima.

Come in altri tumori solidi, anche nel MPM la presenza di TIL CD8⁺ è un marcatore di prognosi favorevole [30]. Nel complesso i TIL possono rappresentare fino al 20-42% dell'infiltrato immunitario del MPM, tuttavia nella maggior parte dei casi si trovano in uno stato di esaurimento funzionale ('*T-cell exhaustion*') caratterizzato da una ridotta attività citotossica e proliferativa, e da un'elevata espressione di checkpoint immunitari inibitori come PD-1, CTLA-4, TIM-3 e LAG-3 [31]. Inoltre, le caratteristiche

immunosoppressive del TME riducono significativamente l'attività anti-tumorale dei TIL. Oltre alla presenza di cellule mieloidi, le Treg (cellule CD4+CD25+FOXP3+), si localizzano tipicamente ai margini della massa tumorale, esercitano un'azione immunosoppressoria sia inibendo i linfociti T helper e citotossici, che riducendo la capacità di presentazione antigenica da parte delle DC. Un infiltrato ricco di Treg correla con una prognosi sfavorevole, motivo per cui è importante non solo valutare la quantità complessiva di TIL, ma anche le diverse sottopopolazioni di T e in particolare il rapporto tra cellule T effettrici e Treg[26].

Le altre componenti del TME

Sebbene meno abbondanti, il TME del MPM comprende anche altre popolazioni cellulari immunitarie tra cui le MDSC, le cellule NK e le DC.

- **le MDSC** sono una popolazione eterogenea di cellule monocitiche e granulocitiche immature caratterizzate da una spiccata attività immunosoppressiva. Pur costituendo una quota inferiore del 10%, svolgono un ruolo fondamentale nella soppressione di linfociti T tramite diversi meccanismi che vanno dalla deplezione di amminoacidi essenziali come l'arginina e il triptofano, alla produzione di molecole immunosoppressive come la chinurenina. Le MDSC contribuiscono anche al rimodellamento del TME, alla promozione dell'angiogenesi e della transizione epitelio-mesenchima (EMT). [25]
- **le cellule natural killer (NK)**, appartengono al sistema immunitario innato, per cui, sono in grado di riconoscere direttamente segnali attivatori espressi dalle cellule tumorali e di ucciderle attraverso il rilascio di perforina, granzimi e IFN- γ . Sebbene presenti, soprattutto nei tumori di istotipo epitelioide, l'ambiente immunosoppressivo contrasta la loro attivazione e di conseguenza il loro potenziale citotossico risulta bloccato[21].
- **Le DC** sono le più importanti APC. Essendo responsabili dell'attivazione delle cellule T naive negli organi linfoidi secondari, le DC sono fondamentali per l'avvio della risposta immunitaria adattativa, ma svolgono un ruolo centrale anche nella riattivazione delle cellule T di memoria. Si distinguono in DC convenzionali (cDC), localizzate nel tessuto polmonare e specializzate nella presentazione degli antigeni, e DC plasmacitoidi (pDC) specializzate nella

produzione di IFN- α e nell'attivazione dei Treg. Nel MPM, le pDC mostrano una ridotta capacità di attivazione, e una produzione diminuita o assente di IFN- α . Per cui la presenza di pDC nel MPM contribuisce alla formazione di un microambiente immunosoppressivo[31,32].

La crescita del tumore è sostenuta anche dal continuo cross-talk tra cellule neoplastiche, immunitarie e stromali. I fattori solubili rilasciati nell'ambiente extracellulare da questi diversi elementi cellulari insieme alle proteine della matrice extracellulare (ECM) governano l'interazione tra cellule neoplastiche e cellule del microambiente e influenzano la progressione della malattia. Le cellule tumorali, infatti, non si limitano a ricevere segnali dall'ambiente circostante, ma lo modificano attivamente rilasciando fattori solubili (ad es. IL-6, TGF- β , VEGF) che attivano le cellule stromali residenti favorendo la genesi di un microambiente permissivo all'evasione delle cellule tumorali dalla sorveglianza immunitaria e favorevole alla loro disseminazione nell'organismo. Un primo effetto di questa riprogrammazione riguarda le proteine della ECM che risultano iper-esprese, in particolare nei sottotipi istologici più aggressivi di MPM. L'aumentata produzione di integrine, collagene, fibronectina e metalloproteinasi da parte delle cellule tumorali rendono l'ECM favorevole alla migrazione delle cellule tumorali e all'invasione dei tessuti circostanti. Coerentemente con questo quadro è stato dimostrato il coinvolgimento della via TGF- β , la quale guida l'induzione dei fattori di crescita del tessuto connettivo (CTGF) sia nelle cellule tumorali, sia nelle cellule stromali circostanti.

I fibroblasti associati al cancro (CAF), sono la principale componente dello stroma tumorale. I CAF interagiscono direttamente con le cellule tumorali e favoriscono il reclutamento di cellule immunitarie e vascolari tramite il rilascio di citochine e chemochine. Inoltre, I CAF sono in grado di rimodellare l'ECM producendo componenti strutturali come le integrine che fungono da ponte comunicativo tra ECM e cellule tumorali, facilitando l'invasione locale e la successiva disseminazione a distanza. Infine, i CAF instaurano con le cellule tumorali un circuito bidirezionale basato sulla produzione di fattori solubili che si autosostiene nel tempo. Le cellule tumorali rilasciano, infatti, fattori di crescita, quali FGF-2 e PDGF-AA, che stimolano la proliferazione e l'attivazione funzionale dei CAF che, in risposta, secernono molecole come l'HGF che potenzia le capacità migratorie e invasive delle cellule tumorali[33].

Il MPM rientra anche tra i tumori con una spiccata angiogenesi. Localmente, a livello del versamento pleurico, e sistemicamente, nel siero dei pazienti con MPM è possibile misurare concentrazioni elevate di pro-angiogenici come VEGF e FGF-2, che sono prodotti sia dalle cellule tumorali che da quelle stromali (CAF e macrofagi M2). Le cellule di MPM, oltre ad esprimere i ligandi (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D), esprimono i recettori tirosin-chinasici VEGFR-1 e VEGFR-2. Ciò crea una stimolazione autocrina che promuove la sopravvivenza delle cellule tumorali stesse, e una stimolazione paracrina sui recettori delle cellule endoteliali locali, promuovendone la proliferazione e la migrazione. In sinergia con il VEGF e l'FGF-2 aumenta la permeabilità vascolare e stimola la formazione di nuovi vasi per gemmazione (sprouting) dei vasi pre-esistenti. Il risultato finale è la formazione di una rete vascolare strutturalmente e funzionalmente imperfetta: i capillari neoformati mostrano una parete sprovvista di una regolare copertura di periciti e una lamina basale sconnessa. L'iper-permeabilità indotta dal VEGF porta al continuo accumulo di fluido ricco di proteine nello spazio pleurico, contribuendo direttamente alla formazione del versamento pleurico. Infine, la perdita di fluidi dai vasi unita alla risposta desmoplastica aumenta la pressione tissutale interna al tumore. Questo fenotipo riduce drasticamente l'extra-vasazione dei farmaci chemioterapici e ostacola il reclutamento dei linfociti T. Nel contempo, il VEGF inibisce la maturazione delle DC mentre favorisce il reclutamento delle MDSC e dei precursori dei macrofagi M2, perpetuando il circuito che sostiene la tolleranza immunologica[34].

In conclusione, l'insieme di questi studi mettono in evidenza come l'interazione tra cellule stromali e immunitarie creino un microambiente favorevole alla progressione del mesotelioma e rappresentino, quindi, bersagli importanti bersagli per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

OPZIONI TERAPEUTICHE

Nel MPM resecabile, il trattamento di scelta è un approccio multimodale basato su chirurgia, chemioterapia e radioterapia. Il problema principale è che solo una quota limitata di pazienti viene accettata per svolgere l'intervento chirurgico, perché la maggior parte dei candidati, al momento della diagnosi presentano età avanzata, comorbidità significative o malattia in fase già avanzata. Inoltre la resezione

macroscopicamente completa non si attesta come soluzione definitiva, data l'elevata diffusione locale che caratterizza l'MPM, ma si mira a migliorare la funzionalità respiratoria e alleviare il dolore. I migliori risultati si osservano negli istotipi epitelioidi, mentre le varianti sarcomatoide e bifasica sono meno idonee al trattamento chirurgico dato il loro carattere più aggressivo e la prognosi peggiore. Le principali procedure impiegate sono la pleurectomia/decorticazione (P/D) che consiste nella rimozione della pleura parietale e viscerale e della massa tumorale visibile senza asportazione del polmone; e la pneumonectomia extrapleurica (EPP) che prevede l'asportazione in blocco del polmone, pleura, diaframma e pericardio [35].

Per molto tempo lo standard terapeutico di riferimento è stato rappresentato dalla doppia combinata di cisplatino e pemetrexed, sulla base dei risultati ottenuti dallo studio EMPHACIS, che ne aveva dimostrato la superiorità in termini di risposta clinica rispetto alla ionoterapia con cisplatino. Successivamente, tramite lo studio MAPS (fase III) si è valutata l'aggiunta di bevacizumab a questa combinazione, osservando un incremento della sopravvivenza globale a circa 19 mesi. Per quanto riguarda invece i pazienti che non rispondono in maniera positiva alla combinazione di cisplatino-pemetrexed sono state proposte alternative terapeutiche quali pemetrexed in associazione con carboplatino o gemcitabina in associazione con cisplatino.

La svolta più importante nella storia terapeutica del MPM avvenne nel 2020 con l'approvazione dell'immunoterapia basata sulla combinazione di ipilimumab (anticorpo monoclonale anti-CTLA-4) e nivolumab (anticorpo monoclonale anti-PD-1) come prima linea di trattamento. L'introduzione in clinica di questa nuova opzione terapeutica fu sostenuta dai risultati ottenuti dallo studio CheckMate-743, un trial clinico di fase III, randomizzato e open label, che comparò la chemioterapia base rispetto alla combinazione ipilimumab + nivolumab in una popolazione di pazienti affetti da MPM non resecabile. In questo studio furono arruolati 605 pazienti che, randomizzati 1:1, ricevettero nivolumab (dose di 3 mg/kg ogni 2 settimane) e ipilimumab (dose di 1 mg/kg ogni 6 settimane) per un massimo di 2 anni, oppure la chemioterapia standard basata sulla combinazione cisplatino e pemetrexed. I risultati ottenuti non evidenziarono un beneficio clinico immediato, ma un aumento significativo della sopravvivenza globale di 4 mesi per i pazienti trattati con l'immunoterapia (18,1 mesi) rispetto a quelli del braccio di controllo (14,1 mesi). Il tasso di sopravvivenza a 3 anni fu del 23,2% per l'immunoterapia, mentre del 15,4 % per il gruppo trattato con la

chemioterapia. Questi risultati portarono l'FDA e l'EMA ad approvare la combinazione nivolumab-ipilimumab come prima linea per i pazienti con MPM non resecabile, mentre l'AIFA sostiene tuttora il suo utilizzo in prima linea solo per i sottotipi non-epitelioidi (sarcomatoide o bifasico), che storicamente sono più aggressivi e resistenti dalla chemioterapia. Nel complesso l'immunoterapia basata sul doppio blocco dei checkpoint immunitari (ICB) ha rappresentato un avanzamento importante nella cura del mesotelioma, anche se la risposta dei pazienti rimane molto eterogenea e transitoria. In particolare, per il sottotipo epitelioidi, la superiorità dell'immunoterapia rispetto alla chemioterapia resta oggetto di dibattito [36]. Infatti circa il 20% dei pazienti con MPM non trae alcun beneficio dal trattamento, mentre una quota considerevole di pazienti presenta risposte solo transitorie [37]. Questa variabilità di efficacia clinica indica la necessità di identificare biomarcatori predittivi di risposta per selezionare i pazienti che possano effettivamente beneficiare dell'immunoterapia e il bisogno attuale e urgente di definire nuove opzioni terapeutiche.

EPIGENETICA COME BERSAGLIO TERAPEUTICO

L'epigenetica è l'insieme dei processi molecolari che regolano l'espressione genica attraverso modificazioni ereditabili e potenzialmente reversibili della cromatina e del DNA, senza alterarne la sequenza nucleotidica.

Le principali modificazioni epigenetiche descritte nella letteratura attuale comprendono: 1) le modificazioni post-traduzionali degli istoni attraverso l'acetilazione, la metilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione degli amminoacidi presenti a livello della coda ammino-terminale delle proteine istoniche, 2) le modificazioni covalenti delle basi del DNA attraverso l'aggiunta di gruppi metile, 3) il rimodellamento della cromatina attraverso la riorganizzazione dei nucleosomi, 4) la regolazione mediata da RNA non codificanti [38]. A livello molecolare, i primi tre meccanismi epigenetici sono orchestrati da un sistema di enzimi diviso in 4 categorie funzionali:

- **I “Writers”** sono enzimi che introducono modificazioni epigenetiche su specifiche componenti della cromatina. Tra questi rientrano, ad esempio, l'istone lisina metiltransferasi (KMTs) e l'istone acetiltransferasi (HATs), responsabili rispettivamente della metilazione e dell'acetilazione delle lisine istoniche, e le DNA metiltransferasi (DNMTs), che catalizzano la metilazione del DNA. Queste modificazioni possono alterare la struttura e l'organizzazione della

cromatina, modulando l'accessibilità del DNA e, di conseguenza, l'espressione genica.

- **Gli “Erasers”** sono enzimi responsabili della rimozione di modificazioni epigenetiche precedentemente introdotte dai *writers*. Tra questi rientrano l'istone lisina demetilasi (KDMs) e l'istone deacetilasi (HDACs), che rimuovono rispettivamente gruppi metilici e acetilici dalle proteine istoniche. La rimozione di tali modificazioni contribuisce a rimodulare lo stato della cromatina e l'attività trascrizionale.
- **I “Readers”** sono proteine dotate di domini specializzati, quali bromodomini, cromodomini e altri domini di riconoscimento delle modificazioni epigenetiche, in grado di riconoscere specifici “marcatori” presenti sugli istoni o sul DNA. Il loro legame può favorire il reclutamento di ulteriori fattori e complessi proteici coinvolti nella regolazione della struttura della cromatina, della trascrizione, della riparazione del DNA e di altri processi cellulari.
- **I “Movers”**, o più propriamente **rimodellatori della cromatina**, sono complessi ATP-dipendenti che modificano l'organizzazione della cromatina attraverso il riposizionamento, l'espulsione o il rimodellamento dei nucleosomi lungo il DNA. In questo modo regolano l'accessibilità di specifiche regioni genomiche ai fattori di trascrizione e ad altri componenti della macchina cellulare [39].

A differenza delle alterazioni genetiche, che comportano modifiche permanenti della sequenza del DNA, le alterazioni epigenetiche possono essere dinamiche e potenzialmente reversibili, queste caratteristiche rappresentano la base razionale per lo sviluppo dei farmaci epigenetici, o “*epidrugs*”, che modulano l'espressione genica regolando l'attività degli enzimi e dei complessi proteici responsabili della deposizione, rimozione o interpretazione dei marcatori epigenetici. La riprogrammazione dell'epigenoma assume particolare rilevanza in ambito oncologico, dove le alterazioni epigenetiche rappresentano una componente fondamentale della trasformazione neoplastica e possono contribuire al silenziamento di geni oncosoppressori, all'attivazione aberrante di programmi oncogenici e alla riprogrammazione dei processi cellulari coinvolti nella proliferazione, nella differenziazione e nella risposta ai trattamenti [40]. Non sorprende, pertanto, che la deregolazione dei meccanismi epigenetici sia stata

riconosciuta una degli “*hallmarks*” del tumore e rappresenti, pertanto, un importante bersaglio per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

EZH2

La metiltransferasi EZH2, ovvero la subunità catalitica del complesso Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), è uno dei modulatori epigenetici con attività pro-oncogenica più caratterizzata. La PRC2 ha un core/nucleo costituito da 3 subunità: la subunità catalitica EZH2 (o il suo paralogo EZH1), la subunità strutturale SUZ12 (Suppressor of Zeste 12) e EED (Embryonic Ectoderm Development) che attiva allostericamente EZH2 quando si lega a H3K27me3. (Figura 2)

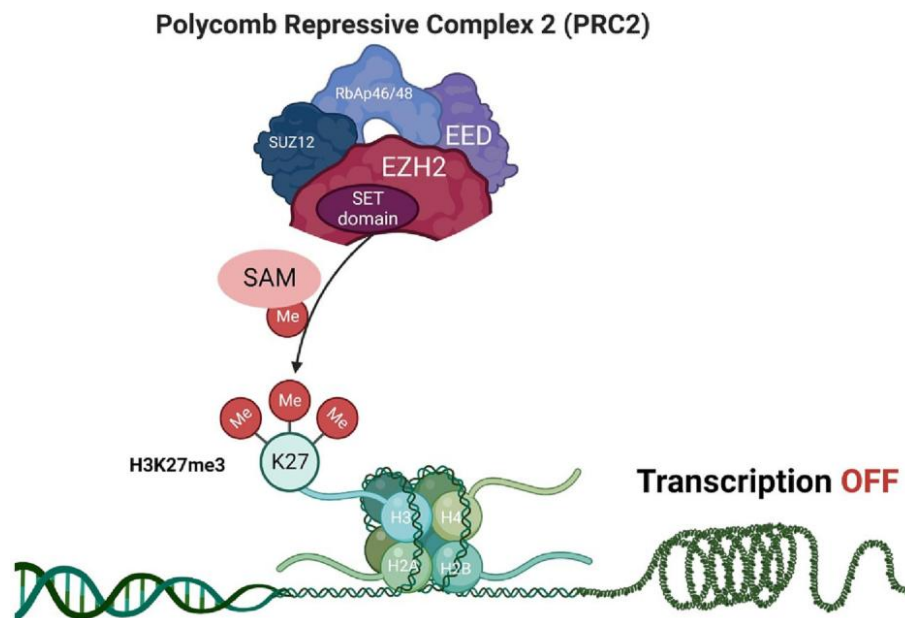


Figura 2 Rappresentazione schematica del complesso PRC2 con le componenti principali (EZH2, EED, SUZ12, RBBP7) e il loro ruolo nel silenziamento genico mediato da H3K27me3

Meccanismo d'azione canonico. Dal punto di vista funzionale, EZH2 catalizza la trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me3), una modificazione epigenetica associata al silenziamento genico. L'H3K27me3 funge infatti da sito di legame per altri regolatori della cromatina che, promuovendone la compattazione, ostacolano il legame dei fattori di trascrizione e del macchinario trascrizionale. Attraverso questo meccanismo EZH2 può, ad esempio, reprimere l'espressione di geni oncosoppressori come p21 e p16[41].

Funzioni non canoniche. indipendentemente dall'attività di istone-metiltransferasi, EZH2 è in grado di metilare direttamente fattori di trascrizione o di formare complessi con essi, regolandone la funzione, come nel caso di STAT3, della proteina p53 mutata e c-Myc[42].

L'espressione di EZH2 viene indotta da diversi oncogeni, tra cui c-Myc, che ne attiva la trascrizione sia direttamente, legandosi al promotore del gene EZH2, che indirettamente, reprimendo alcuni microRNA che normalmente ne limitano la trascrizione. Anche il fattore E2F, attraverso l'asse pRB-E2F, contribuisce alla trascrizione di EZH2, così come altri regolatori contesto specifici, ad esempio STAT3 nel carcinoma del colon-retto, ETS nel carcinoma prostata, HIF e Elk-1 nelle forme di carcinoma mammario più aggressive[43].

Numerose evidenze in letteratura dimostrano che l'iperattivazione di EZH2 nelle cellule neoplastiche, oltre a favorirne, sopravvivenza, proliferazione e de-differenziazione, ne promuove l'evasione dalla sorveglianza immunitaria, contribuendo quindi attivamente al processo di immunoediting. EZH2 può infatti creare un microambiente immunosoppressivo attraverso la riduzione della processazione e presentazione degli antigeni sui complessi di MHC di classe I, la repressione di geni che codificano per chemochine specifiche per linfociti T citotossici, e l'aumento dell'espressione dei checkpoint immunitari come PD-L1, PD-1 e CTLA4 [44]. Attraverso le sue vie non canoniche, EZH2 attiva anche la via di JAK-STAT3, che porta al rilascio di citochine come IL-10 e altri fattori immunosoppressivi. Inoltre, EZH2 modula il TME, sostiene la produzione di fattori pro-angiogenici e immunosoppressivi da parte dei CAFs, promuove il differenziamento dei T CD4⁺ in Treg e l'aumento della produzione di acido lattico tramite l'effetto Warburg[41,45].

Queste evidenze indicano l'inibizione di EZH2 come una strategia promettente per potenziare l'efficacia dell'immunoterapia, quindi la sopravvivenza libera da malattia. È proprio in questo quadro che il ruolo di EZH2 assume un rilievo particolare nell'MPM.

EZH2 nell'MPM

L'iper-espressione di EZH2 è stata recentemente introdotta dall'OMS come un potenziale marcatore immunoistochimico di supporto utile per la diagnosi differenziale tra mesotelioma maligno e proliferazioni mesoteliali reattive. L'EZH2 è infatti generalmente iper-espresso nel MPM, in più del 50% delle lesioni neoplastiche, e la sua

iper-espressione è stata associata a una maggiore aggressività tumorale, a uno stadio più avanzato della malattia, nonché a una ridotta sopravvivenza dei pazienti. In molti casi l'iper-espressione di EZH2 è associata alla perdita funzionale di BAP1 (BRCA1 Associated Protein 1). In condizioni fisiologiche BAP-1 interagisce con il promotore di EZH2 insieme a L3MBTL2, proteina che mantiene H4K20me1. Quando BAP1 viene perso, si ha una ridotta stabilità di L3MBTL2 e un conseguente aumento della trascrizione di EZH2. Questo meccanismo porta ad un significativo incremento di PRC2 e di H3K27me3 nelle cellule BAP1 deficienti, con maggiore sensibilità di queste cellule all'inibizione farmacologica dell'enzima rispetto alle controparti BAP1 wild-type. Esistono però anche diversi casi di iper-espressione di EZH2 attraverso meccanismi indipendenti da BAP-1, ma associati a perdita del locus CDKN2A o di altri modulatori epigenetici come i miR-101 e miR-26a. Oltre al suo ruolo di driver oncogenico diretto, EZH2 potrebbe modulare anche il microambiente immunitario del MPM, influenzando la composizione dell'infiltrato linfocitario e la polarizzazione dei TAM. Sebbene questa attività di EZH2 nell'MPM sia ancora poco studiata, esistono evidenze sperimentali in altri tipi di tumore che sostengono l'inibizione di EZH2 come una potenziale strategia terapeutica utile per terapie di combinazione con l'immunoterapia [46].

Tazemetostat

La crescente comprensione dell'importanza di EZH2 nella patogenesi di diversi tipi di tumore ha stimolato lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate a inibirne l'attività. Tra queste, tazemetostat (EPZ-6438) è il primo inibitore selettivo di EZH2 ad aver raggiunto la pratica clinica. In particolare, l'efficacia clinica di tazemetostat è stata dimostrata nel linfoma follicolare recidivato e refrattario e nel sarcoma epitelioido avanzato, condizioni per le quali dove è attualmente approvato come monoterapia.

Dal punto di vista farmacodinamico, tazemetostat agisce come inibitore competitivo nei confronti del cofattore S-adenosilmetionina (SAM), il donatore di gruppi metile necessario per l'attività catalitica di EZH2. Il farmaco impedisce il trasferimento del gruppo metilico sull'istone H3 riducendo i livelli di H3K27me3 nelle cellule trattate. Inoltre, l'inibizione di EZH2 de-reprime il gene CDKN1A che codifica per l'inibitore del ciclo cellulare p21CIP1/WAF1 (p21 in breve) e induce apoptosi nel linfoma. Allo stesso modo, il gene CDKN2A che codifica per p16INK4A è un bersaglio di

EZH2/PRC2 nei fibroblasti, nelle cellule staminali mesenchimali (MSC), nelle cellule beta pancreatiche e in alcuni tipi di cancro [47].

Dal punto di vista farmacocinetico, tazemetostat è un farmaco a somministrazione orale, caratterizzato da rapido assorbimento (tempo alla concentrazione massima, T_{max} di circa 1-2 ore) e da una biodisponibilità orale assoluta limitata, pari a circa il 33%, coerente con la sua classificazione come sostanza a bassa solubilità e alta permeabilità (classe 2 del Biopharmaceutics Classification System). Dal punto di vista metabolico tazemetostat viene metabolizzato quasi completamente a livello epatico dall'isoforma CYP3A, principalmente attraverso un processo di N-dealchilazione che genera metaboliti tutti farmacologicamente inattivi o marginalmente attivi rispetto al composto originario. Il farmaco ha un'emivita breve di circa 3-4 ore, ed è escreto prevalentemente per via fecale [48].

Nell'MPM, studi preclinici hanno dimostrato che i tumori BAP-1 deficienti, iper-esprimendo EZH2, sono sensibili al tazemetostat che ne riduce significativamente la crescita [49]. Su questa base, Zauderer e colleghi hanno condotto il primo studio clinico di fase II per valutare l'azione di tazemetostat nel MPM. Lo studio multicentrico è stato eseguito su una popolazione di pazienti con BAP-1 inattivato e MPM recidivato o primariamente refrattario al trattamento chemioterapico standard. L'endpoint primario, il tasso di controllo di malattia a 12 settimane, è stato raggiunto nel 51% dei pazienti, mentre dal 28% a 24 settimane, con due risposte parziali e una durata mediana di risposta di 30 settimane. Il farmaco ha dimostrato di stabilizzare la malattia e di avere un profilo di sicurezza favorevole, dato che gli eventi avversi osservati sono pochi e prevalentemente di grado 1-2 (astenia, nausea e anoressia) [50].

Nel complesso, questi risultati indicano che tazemetostat rappresenta una potenziale strategia terapeutica nei pazienti con MPM caratterizzato da inattivazione di BAP1. Tuttavia, la limitata percentuale di risposte osservata in monoterapia evidenzia la necessità di comprendere meglio i meccanismi che, oltre a BAP-1, sensibilizzano le cellule tumorali a tazemetostat al fine di sviluppare approcci terapeutici combinati che ne migliorino l'efficacia clinica.

La prostaglandina E2 (PGE2)

La PGE2 è un eicosanoide bioattivo derivato dall'acido arachidonico (AA), un acido grasso polinsaturo esterificato nei fosfolipidi di membrana delle cellule dei mammiferi. La cascata enzimatica inizia con il rilascio dell'AA dalle membrane cellulari da parte di enzimi fosfolipasi A2. Tra questi enzimi abbiamo: fosfolipasi A2 citosolica dipendente dal calcio (cPLA2) e indipendente dal calcio (iPLA2) e la fosfolipasi A2 secreta (sPLA2). Successivamente, l'AA viene convertito in Prostaglandine H2 (PGH2), dalle ciclossigenasi (COX). Esistono due isoforme di questo enzima: la COX-1 è espressa costitutivamente e permette la produzione di prostaglandine necessaria al mantenimento dell'omeostasi tissutale, in particolare modula il bilancio idro-elettrolitico renale, è citoprotettiva per la mucosa gastrica, regola l'aggregazione piastrinica e la vasocostrizione. La COX-2, invece, viene prodotta in seguito a stimoli come fattori di crescita e citochine infiammatorie [51].

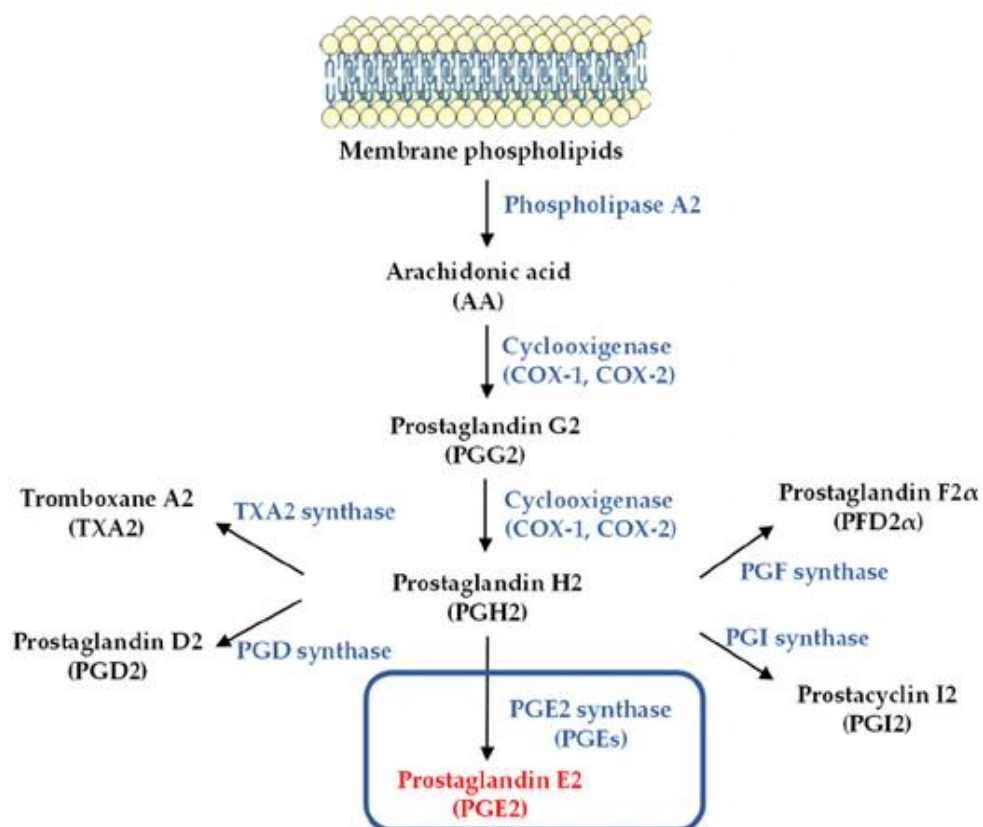


Figura 3 L'AA, rilasciato dai fosfolipidi di membrana, viene convertito attraverso la via della COX in PGE2 e altri eicosanoidi.

Un'elevata espressione di COX-2 e di PGE2 sono stati riscontrati in numerosi tumori, e la loro presenza è associata a crescita e progressione tumorale [52]. La PGH2 viene rapidamente convertita in PGE2 da una delle tre PGE2 sintasi: cPGES, mPGES-1 or mPGES-2. La PGE2, una volta convertita viene degradata trasformandosi in n 15-cheto-PGE2 dall'enzima 15-PGDH. Una volta secreta, la PGE2 agisce localmente a livello autocrino sulla cellula che l'ha prodotta e paracrino sulle cellule circostanti, legandosi ai recettori EP presenti sulla loro superficie.

La PGE2 svolge le sue funzioni tramite 4 recettori accoppiati a proteine G (GPCR): EP1, EP2, EP3 ed EP4 ciascuno dei quali va ad attivare vie di trasduzione del segnale differenti. Il legame di PGE2 a **EP1** attiva la proteina Gq e attiva la via PLC/IP3/DAG, mentre EP2 ed EP4 sono prevalentemente accoppiati a Gs e promuovono l'attivazione dell'adenilato ciclasi e l'aumento dei livelli intracellulari di cAMP. EP3 è invece prevalentemente accoppiato a Gi, determinando una riduzione dell'attività dell'adenilato ciclasi, sebbene le sue numerose isoforme possano presentare differenti modalità di accoppiamento. Rappresentano i principali recettori della PGE2 coinvolti nella regolazione del differenziamento dei linfociti T CD4+, ma sono anche i recettori con più ampia espressione tissutale. Entrambi i recettori sono accoppiati a proteine G attivatorie e sono responsabili dell'attivazione della via GSK3 β / β -catenina, la quale, a sua volta, incrementa la trascrizione di numerosi oncogeni, quali c-myc, la ciclina D1 e VEGF. Infine, i recettori **EP1** e **EP2** sono presenti solo in alcuni organi e legano la PGE2 con bassa affinità. Questo significa che questi recettori sono attivati solo quando la PGE2 è presente ad altissimi livelli [52].

Nel complesso i recettori EPR sono raggruppati nella stessa famiglia semplicemente perché condividono una preferenza di legame per la PGE2 rispetto agli altri prostanoidi. Dal punto di vista della sequenza amminoacidica, questi recettori mostrano un'omologia bassa, di circa il 30% [51]. Questa eterogeneità strutturale si traduce poi anche in una eterogeneità funzionale, motivo per cui la PGE2 si presenta con effetti pleiotropici nell'organismo.

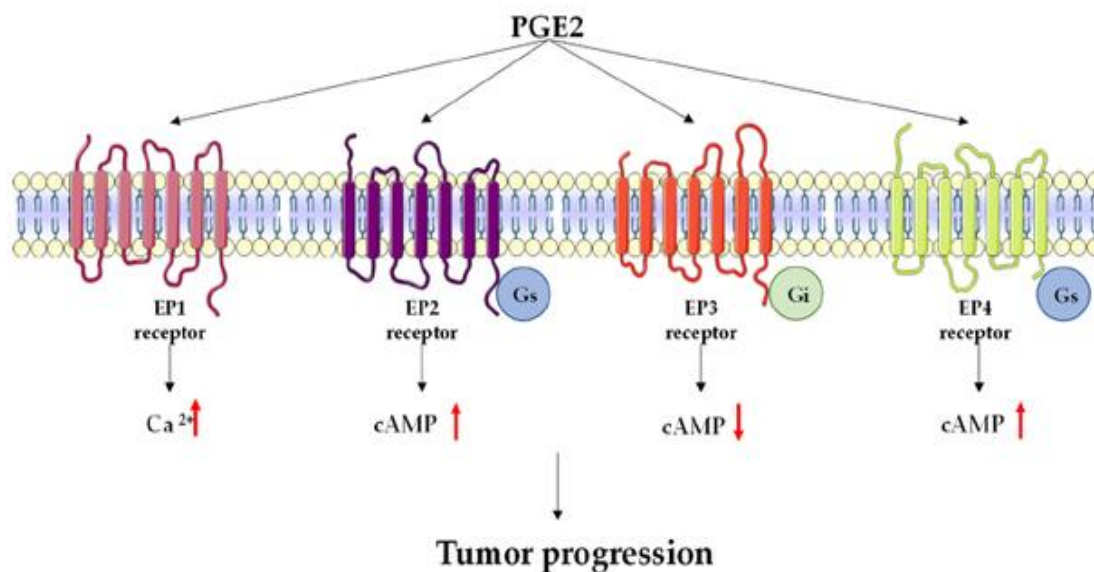


Figura 4 La PGE2 esercita le funzioni biologiche attraverso l'interazione con 4 recettori specifici accoppiati a proteine G (EP1-EP4), attivando differenti vie di segnalazione coinvolte nella progressione tumorale [53]

EP1. Tra i quattro sottotipi di recettore, EP1 mostra l'affinità di legame più bassa per la PGE2 e la sua presenza è stata trovata solo in specifici organi. Nei topi ad esempio è stato identificato principalmente a livello renale, polmonare, gastrointestinale, splenico, muscolare, cerebrale e testicolare, mentre nell'uomo la sua presenza è stata documentata nel miometrio, nelle vene polmonari, nei mastociti, nella muscolatura colica, nei linfociti B e nei cheratinociti. Sul piano della sua trasduzione, EP1 si accoppia alla proteina Gq, la cui attivazione stimola la fosfolipasi C, mentre per la sua funzionalità gli effetti spaziano dalla modulazione neurologia, alla percezione del dolore, a implicazioni cardiovascolari e immunitarie.

In ambito oncologico è stata associata a un aumento della capacità migratoria e invasiva delle cellule tumorali, oltre che a un miglior adattamento delle stesse a condizioni di ipossia; la sua espressione è stata riportata in diverse neoplasie, tra cui mammella, fegato e colon, e il suo blocco farmacologico si è dimostrato capace di limitare la crescita tumorale in modelli murini di carcinoma mammario e melanoma [54].

EP2. Il recettore EP2 mostra un'espressione più elevata nell'uomo a livello intestinale, e in polmone, rene, timo, utero, cervello. E' accoppiato a proteine Gs stimolatorie, la cui attivazione innesca l'adenilato ciclasi, con conseguente aumento del cAMP

intracellulare e conseguente attivazione della PKA. Una caratteristica che tende a differenziarlo dagli altri recettori è la sua capacità di resistenza alla desensibilizzazione omologa: mentre gli altri recettori tendono ad esaurire facilmente la propria risposta dopo esposizione prolungata al ligando, EP2 riesce a mantenere la propria attività per periodi più estesi favorendo la durata della risposta.

L'attivazione di EP2 sul piano immunologico e infiammatorio, porta all'attivazione di citochine pro-infiammatorie come L-1 β , IL-6, IL-23, chemochina CXCL1, mentre sopprime la produzione di IL-12, IL-27, interferone- γ , TNF- α e IL-2. Questo quadro nel complesso favorisce un ambiente immunosoppressivo. Nel contesto tumorale invece, EP2 attiva la via GSK3 β / β -catenina, con induzione di geni pro-tumoralmente come il VEGF. Inoltre, il recettore è coinvolto nella regolazione a feedback positivo dell'espressione di COX2: per cui l'attivazione di EP2 porta a livello del TME a livelli ancora più alti di PGE2, che sopprime direttamente l'attività di diverse cellule immunitarie, tra cui NK, DC e linfociti T.

EP3. Insieme a EP4, EP3 è tra i recettori più diffusi nell'organismo. Nel topo, è espresso praticamente in tutti i tessuti, nell'uomo è particolarmente abbondante a livello renale, pancreatico e uterino. Presenta una forte eterogeneità molecolare, tanto che nell'uomo sono state descritte 8 isoforme diverse. Nonostante ciò si può affermare che la via di trasduzione principale resta comunque l'inibizione dell'adenilato ciclasi mediata da G α_i , con conseguente attivazione delle cascate Ras/Raf e MAPK, sebbene alcune isoforme possano coinvolgere anche la via G α_q , con effetti su vasocostrizione, aggregazione piastrinica e modulazione dell'infiammazione. In ambito oncologico, EP3 è coinvolto nell'angiogenesi associata a sviluppo tumorale e infiammazione cronica. In uno studio su linee cellulari di carcinoma polmonare umano (A549), la segnalazione attraverso Src mediata da EP3 ha dimostrato di stimolare crescita cellulare, mentre il suo blocco riduce vitalità, migrazione di cellule tumorali, aumentando i tassi di apoptosi [54].

EP4 ha un'ampia distribuzione tissutale sia nell'uomo sia nel topo. Regola l'ipertrofia dei cardiomiociti, la vasodilatazione e l'angiogenesi. La via di trasduzione del segnale dipende da proteine Gs, ma rispetto ad EP2 va incontro a rapida desensibilizzazione indotta dal ligando, verosimilmente legata a un processo di rapida internalizzazione recettoriale. Di conseguenza l'attività di EP4 è meno duratura rispetto a quella di EP2. EP4 è in grado di attivare la via PI3K/AKT, meccanismo visto come determinante nella

regolazione della migrazione e della capacità metastatica delle cellule di carcinoma del colon. EP4 risulta iper-espresso in diverse neoplasie, tra cui quelle del colon, del polmone e della mammella. Dal punto di vista oncologico, l'inibizione della via di segnalazione PGE2/EP4 è stata considerata come strategia promettente per ripristinare la risposta immunitaria anti-tumorale [54].

PGE2 nel microambiente tumorale soppressivo

L'espressione degli EPR nelle cellule tumorali varia in base alla loro origine cellulare, e gli effetti della PGE2 sui componenti cellulari del TME dipendono, principalmente, dai sottotipi di recettori EP espressi. È importante però affermare che le cellule tumorali non sono l'unica fonte di produzione della PGE2, ma contribuiscono alla produzione locale anche macrofagi, cellule dendritiche, fibroblasti, neutrofili e cellule endoteliali vascolari la cui attività è stimolata da IL-1. In questo contesto, i recettori EP2 ed EP4 rivestono un'importanza particolare.

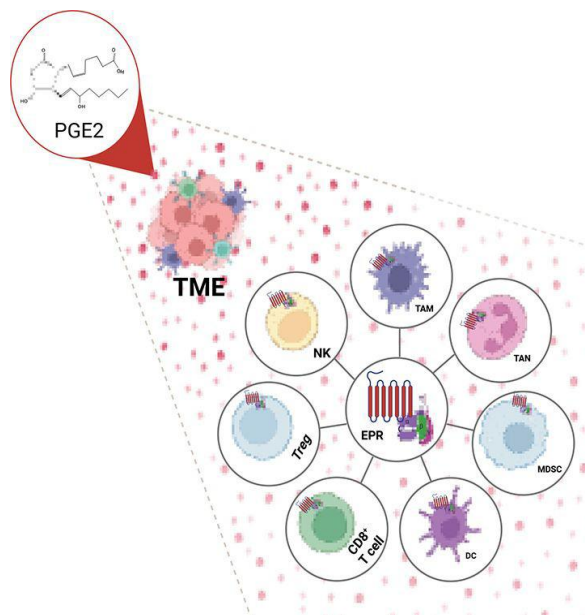


Figura 5 L'azione immunomodulante di PGE2 su diverse popolazioni immunitarie infiltranti: cellule NK, linfociti T, TAM, cellule dendritiche e MDSC

Diversi studi hanno dimostrato che la PGE2 modula diverse popolazioni immunitarie presenti nel TME attraverso meccanismi diretti e indiretti. Sui linfociti T CD8 la PGE2 può indurre l'espressione del checkpoint immunitario PD-1. Nelle cellule T CD8+ isolate da carcinoma polmonare umano è stata osservata una correlazione positiva tra espressione di PD-1 e l'attivazione dei recettori EP2-EP4, suggerendo che la PGE2 sia in grado di indurre l'espressione di PD-1 su linfociti T CD8+, indebolendone l'azione e

contribuendo alla risposta immunitaria immunosoppressiva. La PGE2 aumenta anche l'espressione di recettori inibitori come l'eterodimero CD94/NKG2A che limita ulteriormente la funzione citotossica dei linfociti T. Parallelamente l'attivazione di EP2 può interferire con la segnalazione del TCR, riducendo proliferazione, produzione di IL-2, e rilascio di IFN- γ [55].

Oltre ai CD8+, gli effetti della PGE2 sono rilevabili anche a livello dei linfociti CD4+ umani, che esprimono a livello di mRNA i recettori EP2, EP3 ed EP4. Nel carcinoma polmonare a piccole cellule, la PGE2 induce l'espressione del fattore di trascrizione Foxp3 aumentando l'attività delle Treg. Questo effetto è ridotto in assenza del recettore EP4 e completamente abolito in assenza di EP2. Coerentemente, l'inibizione dell'espressione di COX-2, riduce l'attività dei linfociti Treg CD4+CD25+ infiltranti il tumore, attenuando l'espressione di FoxP3. Tramite i recettori EP2 e EP4, la PGE2 sopprime anche l'attività citotossica dei linfociti T CD8+ effettori [56].

In modelli murini è stato osservato che la PGE2 ha un'azione inibitoria sullo sviluppo dei linfociti B che, in seguito all'attivazione del recettore EP4 vanno incontro ad apoptosi. Analogamente, esperimenti condotti su cellule umane hanno mostrato che la PGE2 sopprime la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B isolati dal sangue periferico. Questo effetto è conservato anche nel linfoma a cellule B ed è dipendente dal recettore EP4. La PGE2 è inoltre in grado di ridurre l'espressione di MHC e di alterare il profilo anticorpale, variando la risposta in base anche allo stadio maturativo della cellula.

I principali recettori della PGE2 espressi dai macrofagi sono EP2 ed EP4, la cui attivazione influenza la polarizzazione macrofagica, favorendo il fenotipo M2. Coerentemente uno studio condotto su linea cellulare murina di carcinoma del colon ha mostrato che la iper-espressione dell'enzima 15-PGDH, che degrada la PGE2, produce l'effetto opposto. Il recettore EP4 modula inoltre l'espressione di diverse chemochine e fattori di crescita tra cui il VEGF che, oltre all'angiogenesi, è un fattore chemiotattico per gli stessi macrofagi.

La PGE2, agendo via EP2/EP4 sui precursori midollari, inibisce il differenziamento delle DC modula la migrazione verso i linfonodi drenanti e promuove un fenotipo tollerogenico, caratterizzato da una ridotta espressione di MHC-II unito a un aumento di quella di IL-10, .

L'asse PGE2/COX-2 induce il differenziamento, il reclutamento e l'attività delle MDSC, mentre il blocco farmacologico di EP2/EP4 ne reverte il fenotipo soppressivo.

Infine, la PGE2 (soprattutto via EP2/EP4) inibisce migrazione, citotossicità, proliferazione e secrezione di IFN- γ da parte delle NK, compromettendo quindi anche il crosstalk NK-DC.

PGE2 nel mesotelioma pleurico maligno

Numerose evidenze in letteratura confermano il ruolo pro-tumorale della COX-2 e della PGE2, suggerendo il potenziale terapeutico della sua inibizione. Le prime evidenze risalgono al 2002, quando Edwards e collaboratori dimostrarono che COX-2 e PGE2 erano iper-espressi nei tre sottotipi istologici di MPM (epitelioidi, bifasico e sarcomatoide) e che i livelli di espressione erano direttamente correlati a una prognosi peggiore.

Studi successivi hanno confermato la correlazione tra elevata espressione di COX-2 e una maggiore aggressività tumorale. In particolare, in uno di questi studi, i livelli di COX-2 misurati attraverso l'analisi immunohistochimica di campioni di mesotelioma pleurico sono risultati essere l'unico parametro che, all'analisi multivariata, era significativamente associato alla sopravvivenza dei pazienti, confermando quindi, il suo potenziale valore come biomarcatore prognostico [57].

Nel complesso, queste evidenze indicano che la via COX-2/PGE-2 sia un regolatore chiave dei processi infiammatori associati alla progressione del mesotelioma e alla formazione di un TME immunosoppressivo e resistente all'immunoterapia [58]. Pertanto, ipotizziamo che una migliore caratterizzazione dei meccanismi molecolari dipendenti da EZH2 e PGE2, insieme alla valutazione di approcci combinati di inibizione dei due bersagli molecolari possano rappresentare degli aspetti importanti per la una migliore comprensione della patogenesi del mesotelioma e per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative [59].

SCOPO DEL LAVORO

Il MPM è una neoplasia aggressiva caratterizzata da prognosi sfavorevole e da una marcata eterogeneità nella risposta ai trattamenti. Tale variabilità è strettamente associata all'istotipo tumorale e alle caratteristiche del TME, che svolge un ruolo fondamentale nella progressione della malattia e nello sviluppo di meccanismi di resistenza terapeutica. Tra i nuovi bersagli di potenziale interesse terapeutico, EZH2, subunità catalitica del complesso PRC2, è particolarmente promettente.

EZH2, frequentemente iper-espresso nell'MPM, esercita attività oncogenica attraverso la repressione di geni che regolano la proliferazione, la sopravvivenza e l'immunogenicità delle cellule tumorali. Essendo un modulatore epigenetico, gli effetti di EZH2 sono reversibili, la sua l'inibizione mediante tazemetostat (EPZ-6438) ripristina l'espressione di inibitori del ciclo cellulare portando a effetti anti-proliferativi. Quest'attività è però controbilanciata dagli effetti immunomodulanti che portano a un maggior reclutamento e differenziazione M2 dei monociti infiltranti con conseguente neutralizzazione dell'attività anti-tumorale del farmaco.

Sulla base di queste evidenze, il presente progetto di tesi è focalizzato su una più approfondita caratterizzazione degli effetti immunomodulanti di tazemetostat in modelli di MPM di diverso istotipo e sulla valutazione di strategie capaci di neutralizzare i circuiti di resistenza guidati dalle cellule mieloidi così da ripristinare l'attività anti-tumorale del farmaco.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Per cogliere l'eterogeneità istologica del MPM, lo studio si avvale di linee cellulari rappresentative delle diverse varianti tumorali:

- **Istotipo bifasico:** rappresentato dalla linea **MSTO-211H**, caratterizzata da morfologia fibroblastica. Tale linea è stata fornita dall'Istituto Scientifico Tumori (IST) di Genova.
- **Istotipo epitelioide:** rappresentato dalle linee **REN**. La linea tumorale è stata gentilmente fornita dal Laboratorio di Biologia Cellulare diretto dalla Prof.ssa Laura Moro (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università del Piemonte Orientale) e certificate dall'unità di "Genomics & Transcriptomics" del Centro di Ricerca Traslationale sulle Malattie Autoimmuni e Allergiche (CAAD), Università del Piemonte Orientale (UPO).
- **Istotipo sarcomatoide:** rappresentato dalla linea H2052, acquisita presso l'American Type Culture Collection (ATCC).

Le cellule vengono coltivate in terreno RPMI 1640 (Euroclone), integrato con:

- 1% di L-Glutammina (2mM, Euroclone),
- 1% di Penicillina/Streptomycin (100U/ml, Euroclone)
- 10% di siero fetale bovino inattivato con il calore (FBS, ThermoFisher),

Le diverse linee cellulari sono state coltivate in incubatore termostato a 37 °C, in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Al raggiungimento di una confluenza pari all'80-90% della superficie disponibile, il monostrato cellulare è stato sottoposto a distacco enzimatico tramite tripsinizzazione con una soluzione di Tripsina-EDTA 1x (Euroclone). Successivamente, la densità cellulare è stata determinata mediante conteggio in camera di Bürker. Per garantire la stabilità sperimentale ed escludere l'insorgenza di contaminazioni da ceppi di Mycoplasma, le colture vengono sottoposte a screening periodici mediante test colorimetrico dedicato (Vazyme™). La conservazione a lungo termine delle linee è garantita dal criocongelamento in azoto liquido all'interno di una miscela crioprotettiva composta dal 95% di terreno RPMI completo e 5% dimetilsolfossido (DMSO).

Generazione di sferoidi tumorali multicellulari (MCS)

Per superare i limiti delle colture bidimensionali e avvicinarsi alle caratteristiche architetture e microambientali tipiche del tumore in vivo, è stato implementato un modello tridimensionale basato sulla formazione di sferoidi tumorali multicellulari (MCS).

Questo approccio consente di riprodurre in vitro alcune caratteristiche tipiche del tumore in vivo, tra cui una distribuzione cellulare stratificata caratterizzata da una zona periferica costituita da cellule attivamente proliferanti, analoghe a quelle adiacenti ai vasi sanguigni e il core centrale, costituito da cellule quiescenti o necrotiche, conseguenza diretta dei gradienti di ipossia e privazione di nutrienti.

Per promuovere l'auto-aggregazione cellulare prevenendo l'adesione al supporto, le cellule vengono piastrate su supporti Ultra-Low Attachment (ULA) da 96 pozzetti (Costar®, Euroclone®) alla densità di 10^4 cellule/pozzetto in 100 μ L di terreno completo.

Inoltre, dopo la semina, per la linea cellulare epitelioidale REN, la formazione dell'aggregato primario viene accelerata mediante una centrifuga iniziale a 500 rcf per 7 minuti, a temperatura ambiente. Nelle successive 96 ore, gli MCS sono stati mantenuti in incubatore a 37°C e al 5% di CO₂.

Allestimento modelli di co-cultura e isolamento di monociti e linfociti umani da sangue periferico (PBMC)

Trascorse 24 o 48 ore dalla formazione degli MCS, sono stati aggiunti i monociti o linfociti T precedentemente attivati. L'isolamento della componente monocitaria e linfocitaria è avvenuto a partire da sangue periferico prelevato da donatori sani e raccolti in provette contenenti l'anticoagulante EDTA. L'intero procedimento è stato eseguito operando in condizioni di sterilità sotto cappa biologica.

Il sangue è stato trasferito in una Falcon da 50 ml e le provette di raccolta sono state lavate con 1 mL di PBS sterile per recuperare eventuali residui cellulari. Il volume ematico finale è stato diluito in rapporto 1:1 con PBS sterile; la provetta è stata quindi chiusa e miscelata delicatamente mediante movimenti d'inversione verticale per omogeneizzare la sospensione.

In un tubo separato, sono stati disposti circa 10-12 ml Ficoll® (Euroclone). Utilizzando una siringa sterile, sono stati prelevati 10 ml di Ficoll®, prestando la massima attenzione a non generare bolle d'aria, stratificati molto lentamente sul fondo della provetta contenente il sangue diluito. Il Ficoll®, è un copolimero sintetico ramificato ad alto peso molecolare altamente idrosolubile, sintetizzato a partire da saccarosio ed epicloridrina. Tale reagente consente la creazione di un gradiente discontinuo utile a separare con precisione le diverse componenti ematiche.

La centrifuga è stata eseguita impostando una velocità di 1700 rpm e selezionando valori di accelerazione e decelerazione pari a 1, in modo da prevenire il rimescolamento delle fasi. Al termine della centrifugazione, si è osservata la stratificazione delle componenti cellulari disposte, dal basso verso l'alto come segue:

- Globuli rossi (pellet di fondo);
- Granulociti;
- Strato di Ficoll®;
- Anello intermedio di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC);
- Piastrine e plasma (frazione superiore).

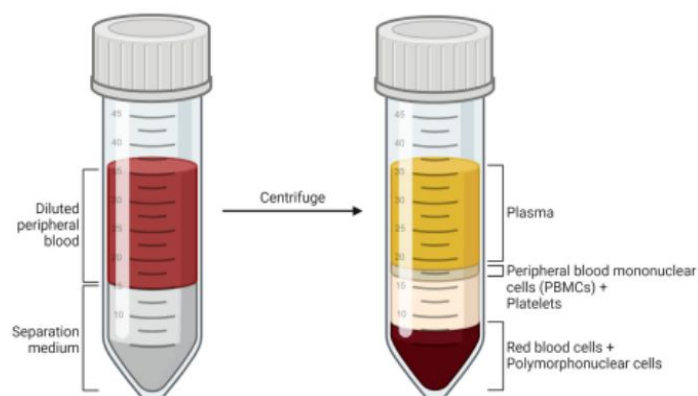


Figura 6 Isolamento di PBMC mediante centrifugazione su gradiente di densità.

Rappresentazione schematica della separazione dei componenti ematici prima e dopo la separazione. In seguito a centrifugazione, la miscela si separa in quattro frazioni distinte dall'alto verso il basso plasma, anello intermedio con PBMC e piastrine, Ficoll, sedimento inferiore composto da eritrociti e granulociti polimorfonucleati. Creato con *BioRender.com*

Terminata la centrifugazione, utilizzando l'ago da biopsia, sono state delicatamente aspirate le cellule dell'anello intermedio, ovvero le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). Successivamente, i PBMC sono stati sottoposti a due lavaggi con

soluzione fisiologica: il primo mediante centrifugazione a 1400 rpm per 10 minuti e il secondo a 1200 rpm per 10 minuti. Questi passaggi di lavaggio sequenziali sono stati fondamentali per eliminare i residui di Ficoll® e allontanare i contaminanti piastrinici. Il pellet cellulare finale è stato risospeso in PBS sterile e i PBMC totali sono stati conteggiati previa diluizione 1:10 con il colorante di Türk (Carlo Erba).

Isolamento dei monociti

Per assicurare una selezione specifica dei monociti dai PBMC totali, è stato impiegato il kit di separazione CD14 Micro-Beads (Miltyenyl Biotec). Le micro-biglie magnetiche utilizzate sono state coniugate ad un anticorpo anti- CD14 che si lega in modo altamente specifico al recettore di membrana CD14, marcatore espresso da monociti e macrofagi. L'intero procedimento è stato condotto rigorosamente in ghiaccio a 4 °C al fine di prevenire l'internalizzazione delle biglie e ridurre al minimo i legami aspecifici degli anticorpi. Dopo aver determinato la conta cellulare, la sospensione di PBMC è stata centrifugata a 300 rcf per 10 minuti a 4 °C e il surnatante è stato eliminato. Il pellet cellulare è stato risospeso in in MACS buffer freddo (PBS, pH 7.2; 0,5% di BSA o FBS e 2 mM di EDTA). Il volume di reagenti è stato scalato proporzionalmente alla conta cellulare: per ogni 10×10^6 cellule, sono stati addizionati 80 µl di MACS buffer e 20µl di CD14 Micro-Beads. La miscela è stata incubata per 20 minuti a una temperatura di 4°C al riparo dalla luce. Al termine dell'incubazione, le cellule sono lavate con 4 ml di MACS buffer, per eliminare eventuali legami aspecifici e centrifugate a 300 rcf per 10 minuti. Il pellet è stato infine risospeso in 500 µl di MACS buffer freddo.

La fase di separazione magnetica si è avvalsa dell'impiego di colonne MS MACS inserite nel separatore magnetico MiniMACS, montato su supporto MACS MultiStand. La colonna è stata prima equilibrata tramite flussaggio con 500 µL di MACS buffer. Successivamente, i 500 µL di sospensione cellulare marcata sono stati caricati all'interno della colonna.

Durante il passaggio all'interno della colonna posizionata nel campo magnetico, le cellule CD14⁺ legate alle microsfere magnetiche sono state trattenute all'interno della matrice della colonna. Al contrario, le cellule non marcate (CD14⁻) sono defluite liberamente nell'eluato, costituendo la frazione negativa della separazione. Per rimuovere eventuali ritenzioni aspecifiche, la colonna è stata sottoposta a tre lavaggi sequenziali con 500 µL di MACS buffer.

Infine, la colonna è stata rimossa dal separatore magnetico e posizionata sopra una provetta di raccolta pulita. L'elusione della frazione arricchita in monociti CD14⁺ è stata ottenuta aggiungendo 1 mL di MACS buffer ed esercitando una pressione decisa mediante lo stantuffo fornito in dotazione. Le cellule così ottenute sono state diluite in RPMI completo, quindi centrifugate a 1300 rpm per 7 minuti a 4°C al fine di ottenere un pellet cellulare e procedere alla conta cellulare per i successivi esperimenti.

Isolamento dei linfociti T

I linfociti T sono stati isolati mediante il kit pan t cell isolation kit (Miltenyi Biotec) a partire da PBMC di donatori sani. Il Pan T Cell Isolation Kit permette l'isolamento di cellule T umane mediante selezione negativa. Dopo aver determinato la conta cellulare, i PBMC sono stati in un volume di scalato proporzionalmente alla conta cellulare: per ogni 10×10^6 cellule, sono stati addizionati 40 µl di MACS buffer e 10µl di Biotin-Antibody Cocktail. La miscela è stata incubata per 5 minuti a una temperatura di 4°C al riparo dalla luce, quindi sono stati posti 30 µl di MACS buffer e 20 µL di Pan T Cell MicroBead Cocktail per ogni 10×10^6 cellule, quindi la soluzione è stata incubata per 10 minuti a 4°C.

Durante l'incubazione, la colonna LS MACS è stata equilibrata con 3 ml di MACS buffer. Al termine dell'incubazione, ai PBMC è stato posto MACS buffer fino a raggiungere 500 µL di soluzione, quindi la sospensione cellulare è stata caricata nella colonna LS MACS inserita nel QuadroMACS Separator (Miltenyi Biotec). Al termine del caricamento, quando la soluzione cellulare ha terminato di gocciolare dalla colonna LS, è stato eseguito un lavaggio con 5 ml di MACS buffer e la frazione negativa ottenuta, contenente i linfociti T, è stata recuperata. La soluzione cellulare è stata diluita in terreno TexMACS (Miltenyi Biotec) e centrifugata a 300 rcf a 4°C. Al termine della centrifuga, la sospensione cellulare è stata risospesa in TexMACS e si è proceduto con la conta cellulare.

Attivazione dei linfociti T purificati

L'attivazione in vitro dei linfociti T purificati è stata condotta impiegando il reagente T Cell TransAct Human (Miltenyi Biotec), una matrice polimerica nanostrutturata e solubile funzionalizzata con agonisti anti-CD3 e anti-CD288.

Questo sistema permette di mimare efficacemente i segnali primari e co-stimolatori necessari per l'attivazione policlonale dei linfociti T. I linfociti T isolati sono stati risospesi in terreno TexMACS supplementato con Human IL-2 a una concentrazione finale di 20 IU/ml e seminati alla densità ottimale prevista dal protocollo, pari a 4×10^6 cellule/well. Il reagente T Cell TransAct è stato aggiunto alla coltura a una diluizione finale di 1:100. Le cellule sono state incubate a 37 °C in atmosfera umidificata con 5% di CO₂ per un totale di 48h.

Trascorsi 2 giorni dall'inizio della stimolazione, il reagente è stato rimosso mediante centrifugazione dei linfociti T a 1300 rpm per 7 minuti. La popolazione T è stata caratterizzata mediante l'impiego del dye di vitalità BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780 (FVS780) (BD) e con i marcatori di superficie CD3 (BD Horizon™ BV786 Mouse Anti-Human CD3), CD4 (BD Horizon™ BUV563 Mouse Anti-Human CD4) e CD8 (RB780 Mouse Anti-Human CD8), al fine di discriminare le sottopopolazioni di linfociti T helper e T citotossici. Per la preparazione del campione citofluorimetrico, le cellule vitali sono state selezionate escludendo gli eventi corrispondenti a detriti e cellule morte.

Marcatura con sonda CFSE

Per l'identificazione e il monitoraggio delle cellule immunitarie all'interno degli esperimenti di co-cultura con gli sferoidi è stata utilizzata la sonda fluorescente CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Thermo Fisher Scientific) o carbossifluoresceina diacetato succinimidil estere è una molecola fluorescente di colore verde, in grado di attraversare la membrana plasmatica delle cellule. Una volta internalizzata, la molecola viene convertita nella sua forma attiva e si lega in maniera covalente a proteine intracellulari, consentendo di mantenere il segnale all'interno delle cellule e di seguirne la distribuzione nel tempo.

La sonda è stata utilizzata per la marcatura di monociti e linfociti T attivati ottenuti mediante separazione magnetica da PBMCs ottenuti da sangue periferico. L'utilizzo della sonda ha permesso di distinguere la componente immunitaria dalle cellule tumorali durante gli esperimenti di co-cultura.

Per procedere alla marcatura, le cellule immunitarie sono state raccolte mediante centrifugazione e il pellet cellulare è stato risospeso in 2 mL di PBS 1X preriscaldato, successivamente sono stati aggiunti 2 µL di soluzione di CFSE alla concentrazione di

10 mM al buio. La sospensione cellulare è stata incubata a 37 °C per 15 minuti in incubatore con il tappo della falcon leggermente svitato. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state sottoposte diluite con un volume di terreno completo (RPMI) caldo in rapporto di 5:1 rispetto al PBS presente, quindi la soluzione è stata lasciata nella falcon leggermente aperta per 30 minuti in incubatore. Al termine dei 30 minuti, la soluzione è stata centrifugata e le cellule risospese in terreno completo, quindi contate per procedere con gli esperimenti successivi.

Le cellule marcate con CFSE sono state aggiunte agli MCS in quantità differenti in funzione dell'analisi prevista. Per gli esperimenti di time-lapse condotti mediante microscopia a fluorescenza con sistema THUNDER, sono state utilizzate 30.000 cellule per ciascuno sferoide. Per gli esperimenti di co-cultura successivamente analizzati mediante microscopia confocale, sono state invece utilizzate 50.000 cellule per sferoide.

Trattamento farmacologico con l'inibitore di EZH2 (Tazemetostat)

Per valutare l'effetto dell'inibizione epigenetica target-specifica abbiamo utilizzato l'inibitore selettivo di EZH2 tazemetostat (EPZ-6438, Aurogene).

Il trattamento farmacologico è stato condotto parallelamente su due diversi modelli sperimentali: le monoculture di MCS, formate esclusivamente dagli sferoidi tumorali di mesotelioma e sistemi di co-cultura costituiti dagli sferoidi tumorali MCS integrati con le popolazioni immunitarie isolate (monociti o linfociti T).

Operativamente, sia le monoculture di MCS sia le co-culture con monociti o linfociti sono state trattate con tazemetostat alla concentrazione finale di 10 μ M. Per garantire una costante pressione farmacologica sul target molecolare per tutta la durata del saggio, la somministrazione del composto è stata ripetuta quotidianamente (ogni giorno). La durata complessiva dell'esposizione al farmaco è stata mantenuta per un intervallo temporale compreso tra 72 e 96 ore, calibrando la finestra di trattamento in funzione dello specifico endpoint e della tipologia di esperimento condotto.

Trattamento con Prostaglandina E2 (PGE2)

Per valutare il ruolo funzionale della prostaglandina E2 nel mediare la comunicazione molecolare tra le cellule tumorali e la componente mieloide del microambiente, abbiamo introdotto l'utilizzo della PGE2 esogena (Merck). Il trattamento è stato condotto sia su monoculture di MCS sia su sistemi di co-cultura costituiti da sferoidi

tumoriali integrati con monociti umani primari. La prostaglandina E2 esogena è stata somministrata alla concentrazione finale di 20 μ M nei pozzetti, analizzandone gli effetti sia in assenza sia in presenza di tazemetostat (10 μ M).

La somministrazione di PGE2 è stata mantenuta per la durata della co-coltura (48–72 ore), con un re-challenge di 24 ore, al fine di valutare le variazioni volumetriche degli sferoidi e quantificare l'impatto della segnalazione della prostaglandina sulla crescita tumorale e sul fenotipo protettivo indotto dai monociti.

Trattamento con antagonisti dei recettori EP2 ed EP4

Per caratterizzare lo specifico coinvolgimento dei recettori della PGE2 nella risposta al trattamento e verificare se l'interruzione della via di segnalazione PGE2/EP2-EP4 potesse ripristinare la sensibilità al tazemetostat, abbiamo impiegato antagonisti selettivi dei recettori EP2 (AH6809, Cayman chemicals) alla concentrazione di 40 μ M ed EP4 (L161-982, Cayman chemicals) alla concentrazione di 3 μ M. Gli antagonisti dei recettori EP2 ed EP4 sono stati somministrati in combinazione al momento del trattamento con la PGE2.

Nei saggi di co-coltura, gli MCS di MPM sono stati sottoposti a pre-trattamento con tazemetostat per 48 h. Parallelamente, i monociti sono stati pre-trattati per 2 h con PGE2, con gli specifici inibitori recettoriali oppure con il relativo veicolo (DMSO). Al termine del pre-trattamento, i monociti sono stati centrifugati per rimuovere il trattamento e successivamente seminati in co-coltura con gli MCS, a una densità di 50.000 monociti per sferoide. Dopo la semina, il trattamento con PGE2 e con gli inibitori recettoriali è stato nuovamente somministrato e mantenuto fino al giorno successivo, in combinazione con tazemetostat, PGE2 oppure somministrato singolarmente, a seconda della condizione sperimentale. La durata complessiva del trattamento è stata mantenuta a 48 h.

Analisi dell'espressione genica in modelli 3D

Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA dalle colture cellulari 3D è stata eseguita utilizzando il KIT RNA isolation (MACHEREY-NAGELTM).

Al termine dei trattamenti sperimentali, gli MCS sono stati raccolti in microtubi da 1,5 mL e sottoposti a centrifugazione a 1200 rpm per 7 minuti, al fine di favorire la sedimentazione e la formazione di un pellet compatto. Al termine della centrifugazione, il surnatante è stato accuratamente rimosso, prestando attenzione a non interferire con il pellet contenente gli MCS. Successivamente sono stati aggiunti 350 μ L di Lysis Buffer direttamente sul pellet. Gli MCS sono stati quindi sottoposti a vigorosa risospensione mediante pipettaggio ripetuto, in modo da favorire la disgregazione della struttura e la lisi degli MCS.

Il lisato ottenuto è stato trasferito interamente all'interno delle colonnine di purificazione per la rimozione del DNA genomico (g DNA), precedentemente siglate e posizionate nei rispettivi microtubi di raccolta. Le colonnine sono state chiuse e centrifugate a 11.000 x g per 30 s. Al termine della centrifugazione l'eluato ottenuto è stato recuperato e conservato per i passaggi successivi, mentre la colonnina utilizzata per la rimozione del gDNA è stata eliminata in apposito contenitore per rifiuti biologici. A ciascun campione sono stati successivamente aggiunti 100 μ L di Binding solution e l'intero volume del lisato è stato trasferito in una nuova colonnina fornita dal kit, posizionata all'interno di un microtubo di raccolta. Dopo aver chiuso le colonnine, i campioni sono stati centrifugati a 11.000 x g per 15 secondi, consentendo il passaggio della frazione contenente l'RNA attraverso la membrana della colonnina. La fase di purificazione è stata completata mediante una serie di lavaggi volti a rimuovere residui di Sali, reagenti e altre eventuali sostanze interferenti. In particolare, ogni colonnina è stata sottoposta a tre lavaggi consecutivi, di cui il primo utilizzando 200 μ L wash buffer 1 (WB1), seguito da centrifuga di 15 secondi, e i successivi due utilizzando 600 μ L e 250 μ L di wash buffer 2 (WB2) per un totale di 3 lavaggi. Gli ultimi due lavaggi sono stati seguiti da una centrifugazione di 15 secondi e l'ultimo da una centrifugazione di 2 minuti. Terminata la fase di purificazione, le colonnine sono state posizionate all'interno di microtubi da 1,5 ml siglati e sono stati aggiunti 10-15 μ L di acqua RNasi-free direttamente sulla membrana della colonnina. Dopo una centrifugazione finale di 1 minuto a 11.000 x g, l'eluato contenente l'RNA totale è stato raccolto nei microtubi.

I campioni di RNA sono stati conservati a -20°C fino alla successiva fase di quantificazione e analisi delle qualità dell'RNA estratto.

Quantificazione dell'RNA

La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state valutate mediante spettrofotometro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). La concentrazione dell'RNA è stata determinata sulla base dell'assorbanza misurata a 260 nm. La qualità e la purezza dell'RNA sono state valutate considerando principalmente i rapporti di assorbanza A260/280 che rappresenta un indicatore di possibile contaminazione da parte di proteine o altre molecole che assorbono nello stesso intervallo di lunghezze d'onda e il rapporto A260/230 che invece fornisce informazioni sulla presenza di eventuali contaminazioni derivati dai reagenti utilizzati durante l'estrazione come sali, fenoli ecc...

Nel seguente lavoro, i campioni sono stati considerati idonei per le successive analisi molecolari quando i rapporti di purezza risultavano pari o superiori a 1,5.

Retrotrascrizione dell'RNA

Per la sintesi del DNA complementare (cDNA), l'RNA totale estratto e quantificato è stato retrotrascritto tramite l'utilizzo del kit commerciale High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisherTM), contenente tutti i componenti necessari per la conversione in cDNA.

Per ciascun campione è stata utilizzata una quantità di RNA pari a 1 µg, portata al volume con acqua RNAsi-free. La reazione di retrotrascrizione è stata preparata in un volume finale di 20 µL, composta da 10 µL di reaction mix e 10 µL di campione precedentemente diluito. La reaction mix è stata preparata aggiungendo Reverse Transcription Buffer, dNTPs, Random primers, Reverse Transcriptase e acqua priva di nucleasi. La mix è stata mantenuta in ghiaccio durante la preparazione e fino al momento di utilizzo, al fine di limitare l'attività enzimatica. La miscela è stata poi aliquotata in ciascuna provetta contenente RNA. Le provette sono state incubate in termoblocco a 37 °C per 2 ore per consentire la sintesi del cDNA. Al termine dell'incubazione, l'enzima Reverse Transcriptase è stata inattivata mediante un riscaldamento a 95 °C per 5 minuti.

Il cDNA ottenuto è stato quindi utilizzato direttamente per le successive reazioni di Real Time PCR oppure conservato a -20 °C per usi futuri.

Real-time PCR

La quantificazione dell'espressione genica è stata effettuata mediante PCR quantitativa in tempo reale (qPCR) utilizzando il sistema di rilevazione SYBR® Green (Bio-Rad). Tale metodologia consente di monitorare l'amplificazione dei prodotti di PCR attraverso l'incremento della fluorescenza emessa dal fluoroforo SYBR® Green, che si lega al DNA a doppio filamento generato durante l'amplificazione.

Per ciascun campione è stata preparata una miscela di reazione costituita da 10 µL di Advanced Universal SYBR® Green Supermix, 1,2 µL di primer forward e reverse (5 µM ciascuno) e 4,8 µL di acqua priva di nucleasi. Per ogni condizione sono stati allestiti triplicati tecnici, in cui sono stati distribuiti 16 µL della relativa mix di reazione e 4 µL di cDNA precedentemente diluito 1:5 in acqua RNasi free. L'impiego di triplicati permette di valutare la riproducibilità e la riduzione delle variazioni associate alla preparazione. In parallelo sono stati inclusi anche controlli negativi (bianchi) privi di cDNA per monitorare eventuali contaminazioni.

Le reazioni sono state allestite in piastre PCR (Bio-Rad), queste sono state sigillate con pellicola trasparente e centrifugate a 300 x g per 5 minuti. Questo passaggio ha consentito la precipitazione dei campioni all'interno della mix e la rimozione di eventuali bolle d'aria. La qPCR è stata eseguita utilizzando il sistema CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad), utilizzando il programma di amplificazione SYBR Fast. Il protocollo prevede, una fase di attivazione della polimerasi a 98 °C per 30 secondi, seguita da cicli costituiti da una fase di denaturazione del DNA a 98 °C per 10 secondi e da una fase combinata di annealing/estensione a 60 °C per 30 secondi. I livelli di espressione dei geni d'interesse sono stati normalizzati rispetto all'espressione della β -actina, utilizzata come gene di riferimento. La quantificazione relativa all'espressione genica è stata effettuata utilizzando il metodo comparativo $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, permettendo di determinare le variazioni dell'espressione genica rispetto a una condizione di riferimento, tenendo conto della normalizzazione rispetto al gene housekeeping.

Le sequenze nucleotidiche dei primer utilizzati per l'amplificazione dei geni analizzati sono riportate in Tabella 1.

Gene	Forward	Reverse
IL-8	atgacttccaagctggccgtggct	tctcagccctcttcaaaaacttctc
CCL2	aagatctcagtgagaggctcg	cacagatctccttgccacaa
CCL5	gtctttgtcacccgaaag	gacaagagcaagcagaaac
M-CSF (CSF1)	ttaagaaggcatttcctg	ccttgatcatgcttccataatc
VEGF	tacctccaccatgccaagtg	atgattctgccctcctcttc
CXCL12	acactccaaactgtgcccttc	ccacgtctttgcccttcac
COX2	cccttgggtgtcaaaggtaa	gccctcgcttatgatctgtc
CXCL10	ggaagcactgcatcgatttg	cagaattcgaaggccatcaaga
CXCL11	gccttggctgtgatattgtgt	cactttcactgctttacccca
ACTB (β -actina)	caccattggcaatgagcgggtc	aggtctttgaggatgtccacgt

Tabella 1: sequenze primers utilizzare per qPCR

Acquisizione e analisi al microscopio confocale

Gli MCS derivati da linee cellulari REN, MSTO-211H, H2052 mCherry⁺ sono stati analizzati attraverso microscopia confocale al termine dei trattamenti sperimentali, sia in assenza che in presenza di monociti/linfociti T attivati marcati con CellTrace™ CSFE Cell Proliferation Kit.

Al termine delle 96 ore complessive di trattamento, gli MCS sono stati fissati con paraformaldeide (PFA) al 4% per 1 ora e montati su vetrini. Il terreno in eccesso è stato completamente asciugato aiutandosi con una pipetta, quindi è stata posta una goccia di Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich), un mezzo di montaggio compatibile con l'analisi della fluorescenza, su ogni sferoide. Infine, un vetrino copri-oggetto è stato posto con molta delicatezza sopra il vetrino con gli sferoide e, una volta che il montante era completamente asciutto, è stato posto dello smalto trasparente sui

bordi del vetrino per impedire la formazione di bolle d'aria. I campioni sono stati quindi analizzati mediante microscopio confocale Leica TCS SP8 Laser Scanning.

Per ciascun MCS è stata effettuata l'acquisizione di una serie di immagini ottiche consecutive lungo l'asse z, ottenendo uno z-stack corrispondente alla struttura intera dello sferoide. Questo ha consentito di ottenere informazioni sulla distribuzione spaziale delle cellule all'interno del modello tridimensionale.

Le immagini acquisite sono state studiate utilizzando l'impiego del software ImageJ (ImageJ-win64). L'analisi ha permesso di valutare la struttura degli MCS, e identificare la componente monocitaria/linfocitaria precedentemente marcata in relazione alla componente tumorale.

Live imaging al microscopio Thunder

Al fine di valutare in tempo reale il potenziale chemoattrattivo esercitato dalle cellule tumorali degli MCS sui monociti è stata eseguita un'analisi di live imaging mediante microscopia a fluorescenza. In particolare, l'esperimento è stato utilizzato per monitorare nel tempo il comportamento e la distribuzione delle cellule immunitarie studiate nel tempo.

Dopo un pre-trattamento di 72 con tazemetostat, e un periodo di acclimatazione pari a 30 minuti nella cameretta del microscopio, a ciascuno sferoide sono stati aggiunti 30.000 monociti o linfociti marcati con CFSE e le colture sono state inserite nel sistema di acquisizione Leica THUNDER Image 3D Live Cell, dotato al suo interno di una camera ambientale termostata che ha consentito di mantenere le cellule in condizioni controllate, a una temperatura di 37°C, con 5% di CO₂, al fine di preservare la vitalità e mantenere condizioni compatibili con la coltura cellulare.

L'acquisizione delle immagini è stata effettuata a intervalli regolari di 10 minuti per una durata complessiva di 2 ore ottenendo una sequenza temporale di immagini che mostrano l'interazione dinamica tra MCS e cellule immunitarie.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Questo progetto mira a analizzare gli effetti sia pro-oncogenici che immunomodulanti di EZH2 in modelli preclinici di mesotelioma pleurico maligno (MPM) rappresentativi dei tre istotipi: epitelioide, bifasico e sarcomatoide. I modelli 2D tradizionali, pur essendo ampiamente utilizzati per la loro elevata riproducibilità, mostrano evidenti limiti nella simulazione dei tumori solidi: la rigidità del supporto piatto modifica l'espressione genica, la morfologia e le dinamiche con l'ECM, riducendo l'affidabilità dei saggi di efficacia terapeutica. Per superare questa mancanza di complessità fisiologica, mantenendo al contempo un modello idoneo per screening ad alta resa e test meccanicistici, la presente ricerca si focalizza sull'uso di sferoidi multicellulari (MCS). L'adozione di questa tecnologia 3D consente infatti di ricapitolare i gradienti nutrizionali e la fitta rete di interazioni cellula-cellula del microambiente tumorale, fornendo un contesto sperimentale più robusto per validare l'efficacia delle strategie terapeutiche testate. A tal proposito, indagini precedenti condotte dal nostro gruppo su un modello 3D composto da cellule di MPM bifasico (MSTO-211H) e monociti umani [60] hanno rivelato che EZH2 non si limita a regolare la proliferazione delle cellule neoplastiche, ma condiziona direttamente il reclutamento e il profilo funzionale dei monociti infiltranti (Mo-TAM) [60]. Per stabilire se tale dinamica costituisse un tratto conservato del MPM o se dipendesse da specifiche proprietà cellulari, la casistica è stata ampliata includendo linee ottenute da tumori di istotipo epitelioide e sarcomatoide. Questo approccio strategico consente di superare i limiti dello studio su un singolo modello e di valutare come i vari sottotipi istologici, profondamente diversi per profilo clinico e risposta alle terapie, rispondano al targeting molecolare di EZH2. A tale scopo, utilizzando linee cellulari umane di origine epitelioide (cellule REN) e sarcomatoide (cellule H2052), il nostro gruppo di ricerca ha generato cellule esprimenti in modo stabile il gene reporter mCherry, settato le condizioni sperimentali per favorire la loro aggregazione a formare strutture 3D, confermato che il passaggio da 2D a 3D portasse a un aumento dell'espressione di EZH2 e di H3K27me3, quindi analizzato la sensibilità dei 3 modelli al tazemetostat. L'analisi del volume degli MCS tramite microscopia confocale ha dimostrato una riduzione di circa il 50% nel gruppo trattato con tazemetostat rispetto al controllo, trattato con il veicolo (Figura 7). Questi risultati confermano che l'inibizione di EZH2 è efficace nel sopprimere la crescita degli MCS di origine epitelioide e sarcomatoide, in modo analogo a quanto precedentemente

osservato per il modello bifasico. Nel complesso queste evidenze preliminari hanno posto le basi per approfondire il ruolo immunomodulante di EZH2 nei tre istotipi e per valutare l'impatto della presenza delle cellule immunitarie sulla sensibilità delle cellule tumorali al tazemetostat.

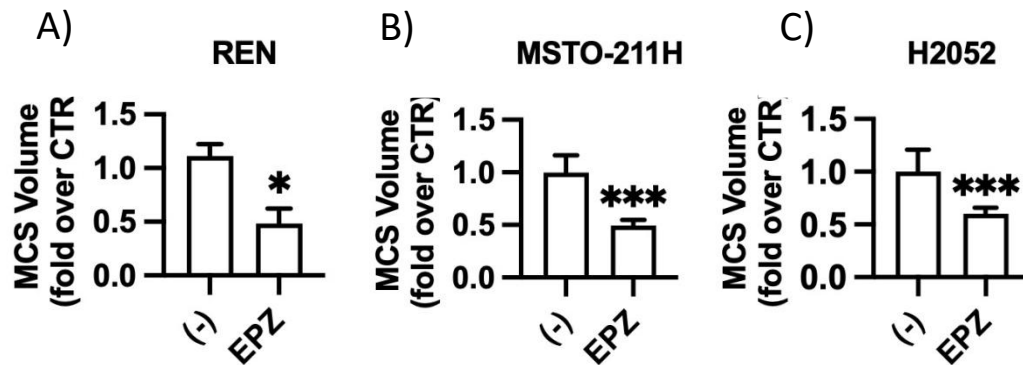


Figura 7 Effetto dell'inibizione di EZH2 tramite tazemetostat sulla crescita di MCS di MPM. MCS rappresentativi dei principali istotipi di MPM — linea bifasica MSTO-211H (A), linea epitelioide REN (B) e linea sarcomatoide H2052 (C) — sono stati trattati con Tazemetostat (EPZ) o veicolo (-) per 72 ore. (A-C) Grafici rappresentativi della variazione del volume degli MCS misurato tramite analisi di microscopia confocale. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (two-tailed t-test).

Il tazemetostat modula il profilo trascrizionale infiammatorio nei diversi istotipi di MPM

Per valutare gli effetti immunomodulanti di tazemetostat nei tre modelli di MPM, abbiamo analizzato il profilo di espressione genica degli MCS trattati con il farmaco. Abbiamo selezionato un pannello di geni codificanti per citochine, chemochine ed enzimi chiave per il reclutamento e l'attivazione di cellule immunitarie mieloidi e linfoide. In particolare, abbiamo scelto *IL-8*, *CCL2* e *CCL5*, in quanto sono le principali chemochine coinvolte nel reclutamento di neutrofili e monociti; *VEGF* e *CXCL12*, fattori pro-angiogenici nelle zone ipossiche dei tumori, *M-CSF* e *COX-2*, perché contribuiscono alla polarizzazione M2 dei macrofagi, *CXCL10* e *CXCL11*, perché insieme a *CCL5* richiamano linfociti T helper 1 (T_H1) e citotossici (CTL).

I risultati ottenuti hanno mostrato come in tutti gli istotipi esaminati, il trattamento inducesse un aumento significativo dell'espressione dei geni infiammatori considerati, a conferma della capacità di EZH2 di influenzare la composizione dell'infiltrato

immunitario nel MPM (Figura 8). L'analisi ha rilevato un pattern di modulazione genica istotipo-dipendente: gli MCS sarcomatoidi (H2052) hanno mostrato un incremento importante nell'espressione di chemochine deputate al richiamo di linfociti, quelli bifasici (MSTO-211H) hanno un'attivazione trascrizionale più ampia, che comprende geni per il reclutamento di monociti e linfociti, al contrario la linea epiteloide ha mostrato una risposta trascrizionale più contenuta e caratterizzata da un'induzione selettiva di geni per il richiamo di cellule mieloidi (*IL-8*, *CCL2* e *CCL5*).

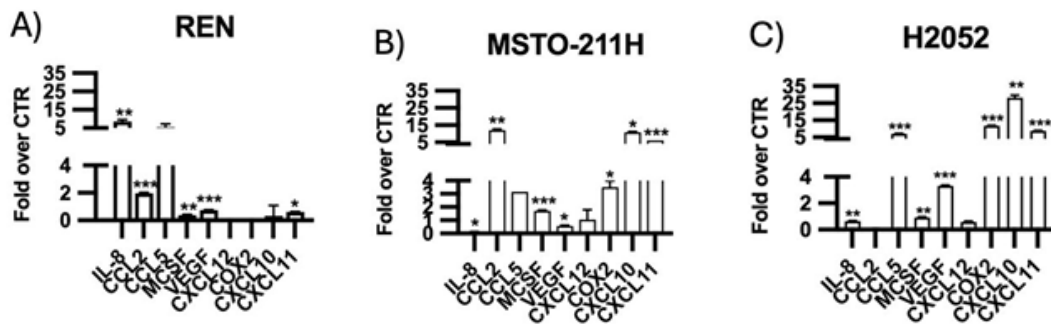


Figura 8 Il tazemetostat modula l'espressione di mediatori dell'infiammazione in modo istotipo-dipendente. Le linee cellulari REN (A), MSTO-211H (B) e H2052 (C), coltivate come MCS, sono state trattate con tazemetostat 10 μ M o con veicolo (DMSO 0,1%) per 72h. I livelli di mRNA di mediatori dell'infiammazione sono stati analizzati mediante qPCR; β -actina è stata utilizzata come gene di riferimento. I dati normalizzati sono espressi come variazione relativa di espressione rispetto alle cellule controllo (fold over CTR) e presentati come media $\pm$ SEM, rappresentativi di tre esperimenti indipendenti ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ rispetto alle cellule non trattate; two tailed t-test).

Complessivamente questi dati suggeriscono che l'inibizione di EZH2 sia in grado di riprogrammare il profilo infiammatorio delle cellule di MPM in maniera dipendente dall'istotipo, con potenziali ripercussioni sul reclutamento e sull'attivazione delle cellule immunitarie infiltranti il tumore.

Il tazemetostat promuove il richiamo dei monociti negli MCS epitelioidi e bifasici

Poiché il profilo trascrizionale ha evidenziato la presenza di un ampio spettro di chemochine potenzialmente coinvolte nel reclutamento leucocitario, abbiamo valutato se il cambiamento di espressione genica indotto da EZH2 nelle cellule tumorali si traducesse in un effettivo aumento del reclutamento di cellule immunitarie negli MCS. A tal fine, gli MCS generati dalle linee MPM REN, MSTO-211H e H2052, marcate con mCherry per consentirne l'identificazione al microscopio confocale, sono stati pre-trattati per 48 h con tazemetostat o veicolo. Successivamente, sono stati aggiunti monociti isolati da donatori sani e marcati con CFSE, e la loro migrazione verso gli MCS è stata monitorata in tempo reale, mediante acquisizioni multiple, a intervalli di tempo successivi (Figura 9). Il totale dei monociti infiltranti l'MCS è stato quantificato mediante analisi di microscopia confocale degli MCS fissati dopo 48 h di co-cultura.

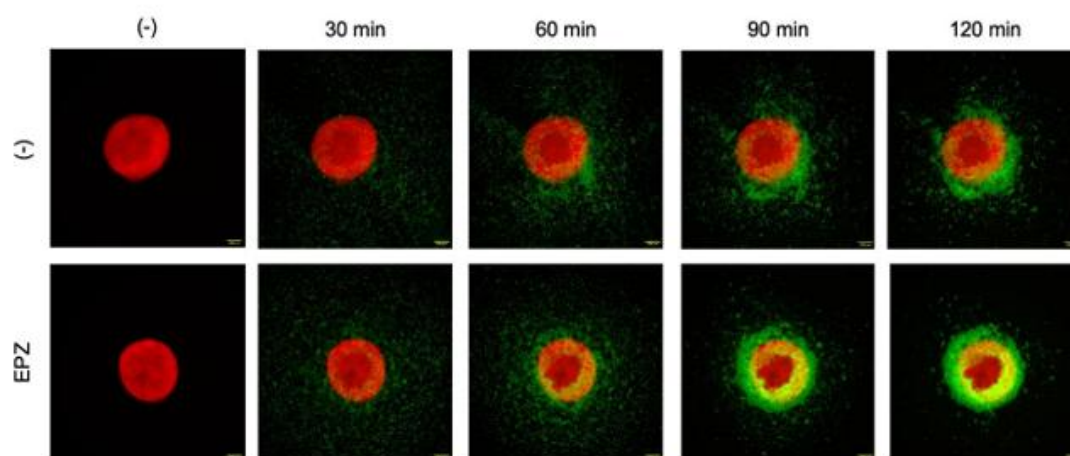


Figura 9 Il trattamento con tazemetostat incrementa il reclutamento dei monociti negli MCS MSTO-211H. Immagini rappresentative estratte da acquisizioni time-lapse della migrazione di monociti CFSE⁺ verso MCS di MPM, ottenute mediante microscopio Leica THUNDER Imager 3D Live Cell. Le acquisizioni sono state condotte mantenendo le cellule a 37°C, 5% CO₂ in atmosfera umidificata. I singoli fotogrammi sono rappresentativi dei tempi indicati. Barra di scala = 200 μ m.

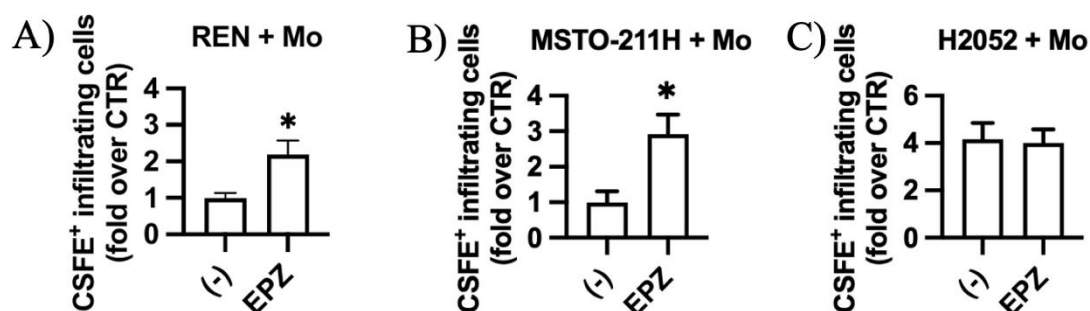


Figura 10 Il trattamento con tazemetostat incrementa il reclutamento dei monociti all'interno degli MCS di MPM. Gli MCS REN (A), MSTO-211H (B) e H2052 (C) sono stati coltivati e trattati con tazemetostat 10 μ M o con veicolo (DMSO 0,1%) a partire dalla semina. Dopo 48h di trattamento, i monociti marcati con CFSE (50.000 per MCS) sono stati aggiunti a ciascuno MCS e il trattamento è stato protratto per ulteriori 48h, per una durata complessiva di 96h. Al termine dell'esperimento, le immagini confocali sono state acquisite e i monociti CFSE⁺ infiltrati all'interno degli MCS sono stati quantificati mediante il software Fiji-ImageJ (NIH). I risultati sono espressi come fold over CTR e presentati come media $\pm$ SEM ($p < 0,05$; two-tailed t-test).

I risultati hanno mostrato un aumento significativo dei monociti infiltrati gli MCS delle linee REN e MSTO-211H dopo trattamento con tazemetostat, mentre gli sferoidi H2052 hanno mostrato un'entità di infiltrato paragonabile ai controlli trattati con il solo veicolo (Figura 10). Questo comportamento è coerente con quanto osservato a livello trascrizionale e conferma che l'inibizione di EZH2 nelle cellule tumorali modifica la loro capacità di richiamare monociti in modo variabile a seconda dell'istotipo di origine.

I monociti infiltranti antagonizzano l'efficacia del tazemetostat

Dato che i risultati degli esperimenti di co-cultura hanno evidenziato un incremento del reclutamento monocitario in risposta a tazemetostat, abbiamo deciso di valutare le conseguenze funzionali dell'infiltrato sulla crescita tumorale. Poiché monociti, e i macrofagi da essi derivati, sono noti per il loro ruolo attivo nel sostenere la proliferazione tumorale e rimodellare in maniera immunosoppressiva il microambiente tumorale, abbiamo voluto verificare se la loro presenza fosse in grado di interferire con la risposta degli MCS all'inibizione di EZH2. Per tale ragione si è deciso di studiare il volume degli MCS in tre condizioni sperimentali differenti:

- Sferoidi di controllo, trattati esclusivamente con il veicolo (DMSO 0,1 %)

- Sferoidi trattati con tazemetostat
- Sferoidi trattati con tazemetostat in co-cultura con monociti, (questa condizione è necessaria per valutare l'effetto del farmaco in un modello integrato, che include l'infiltrato monocitario).

La quantificazione del volume degli MCS, effettuata tramite ricostruzione tridimensionale delle z-stacks ottenute mediante microscopia confocale, ha rilevato che la riduzione del volume degli MCS, precedentemente osservata in seguito al trattamento con tazemetostat, non è più presente in condizioni di co-cultura (Figura 11). Questi risultati indicano che la presenza di monociti contrasta l'effetto del farmaco neutralizzandone gli effetti anti-proliferativi. In altre parole, la presenza dei monociti emerge come un possibile meccanismo di resistenza al tazemetostat.

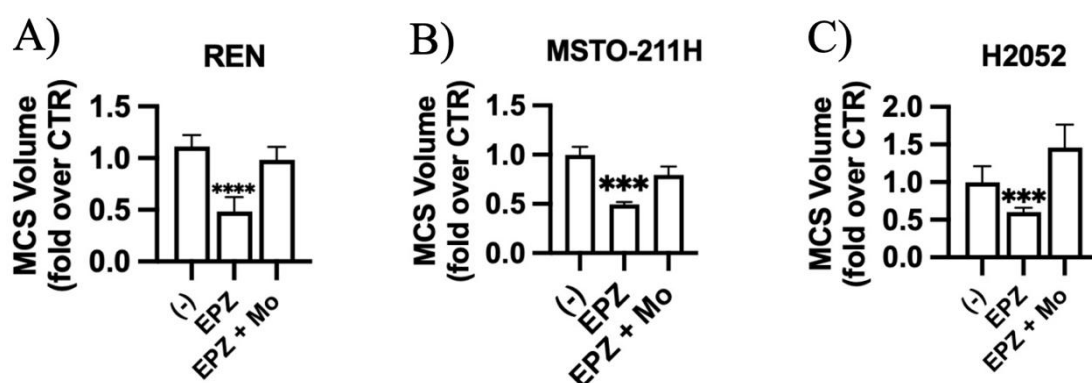


Figura 11 La presenza di monociti infiltranti gli MCS annulla gli effetti anti-tumorali indotti dal trattamento con tazemetostat. Gli MCS REN (A), MSTO-211H (B) e H2052 (C) sono stati trattati con tazemetostat 10 μ M o veicolo (DMSO 0,1%), Dopo 48h, gli MCS sono stati co-cultivati con monociti CFSE+ e il trattamento è stato protratto per ulteriore 48h. Il volume degli MCS è stato misurato mediante analisi confocale e quantificato con il software Fiji-ImageJ (NIH): i dati sono stati normalizzati rispetto agli MSC trattati con il veicolo (DMSO) e senza monociti. I dati sono espressi come fold over CTR e presentati come media $\pm$ SEM (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; two-tailed t-test).

Questi risultati, inoltre, evidenziano l'importanza di studiare la risposta delle cellule tumorali in un sistema più complesso, che possa almeno in parte riprodurre il TME. Le interazioni tra le diverse popolazioni di cellule immunitarie, stromali e tumorali possono infatti influenzare in modo significativo l'efficacia complessiva di un farmaco, per cui la disponibilità di modelli *in vitro* integrati è cruciale per una selezione più accurata degli approcci di potenziale valore terapeutico.

Il trattamento con tazemetostat promuove il reclutamento dei linfociti attivati negli MCS di mesotelioma

In modo analogo ai monociti, i dati trascrizionali ottenuti a seguito del trattamento degli MCS con tazemetostat hanno suggerito una possibile riattivazione dell'asse chemochinico coinvolto nella migrazione di linfociti anti-tumorali. Per verificare tale ipotesi abbiamo analizzato il reclutamento di linfociti T attivati negli MCS ottenuti con cellule delle tre linee di MPM (REN, MSTO-211H, H2052). A tal fine i linfociti isolati dal sangue di donatori sani sono stati sottoposti ad una fase preliminare di attivazione della durata di 48 ore mediante T Cell TransAct™ (Miltenyi Biotec),

Successivamente, i linfociti attivati sono stati marcati con il tracciante fluorescente CFSE, così da poterne seguire la migrazione e, successivamente aggiunti agli sferoidi già sottoposti a 48 ore di pre-trattamento con tazemetostat. La co-cultura è proseguita per altre 48 ore, arrivando ad un totale di 96 ore dall'avvio del trattamento con tazemetostat.

A questo punto gli MCS sono stati analizzati per valutare sia il numero di linfociti infiltranti che il loro volume. L'analisi tramite microscopia confocale ha mostrato un incremento significativo dei linfociti T infiltranti gli MCS trattati con tazemetostat. Coerentemente con i dati di espressione genica, l'effetto è più marcato per gli MCS non-epiteliodi, ma comunque significativo anche per quelli formati dalle cellule REN (Figura 12). Questo suggerisce che, nonostante la scarsa modulazione dell'espressione di *CXCL10* e *CXCL11*, la riprogrammazione epigenetica conseguente a tazemetostat induca l'espressione di altri fattori chemiotattici per linfociti T attivati.

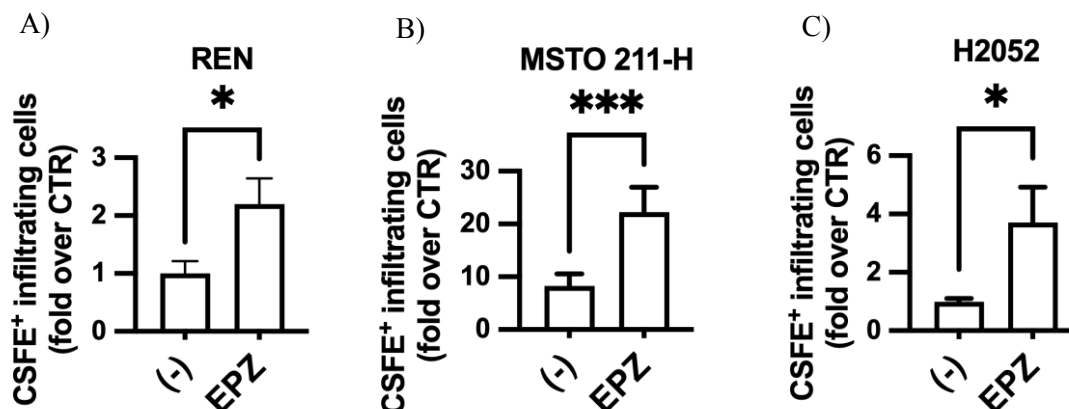


Figura 12 Il trattamento con tazemetostat incrementa il reclutamento linfocitario negli sferoidi di mesotelioma. Gli MCS REN (A), MSTO.211H (B) e H2052 (C) sono stati coltivati e trattati con Tazemetostat (10 μ M) o con veicolo (DMSO 0,1%) a partire dalla semina. Dopo 48h di trattamento, i linfociti attivati e marcati con CFSE (50.000 per sferoide) sono stati aggiunti a ciascuno sferoide, protraendo il trattamento per ulteriori 48h fino al raggiungimento delle 96h complessive. Le immagini confocali acquisite al termine dell'esperimento hanno permesso di quantificare, mediante il software Fiji-ImageJ (NIH), i linfociti CFSE⁺ infiltrati all'interno di ciascuno sferoide. I dati sono espressi come fold rispetto al controllo e riportati come media $\pm$ SEM (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ two-tailed t-test).

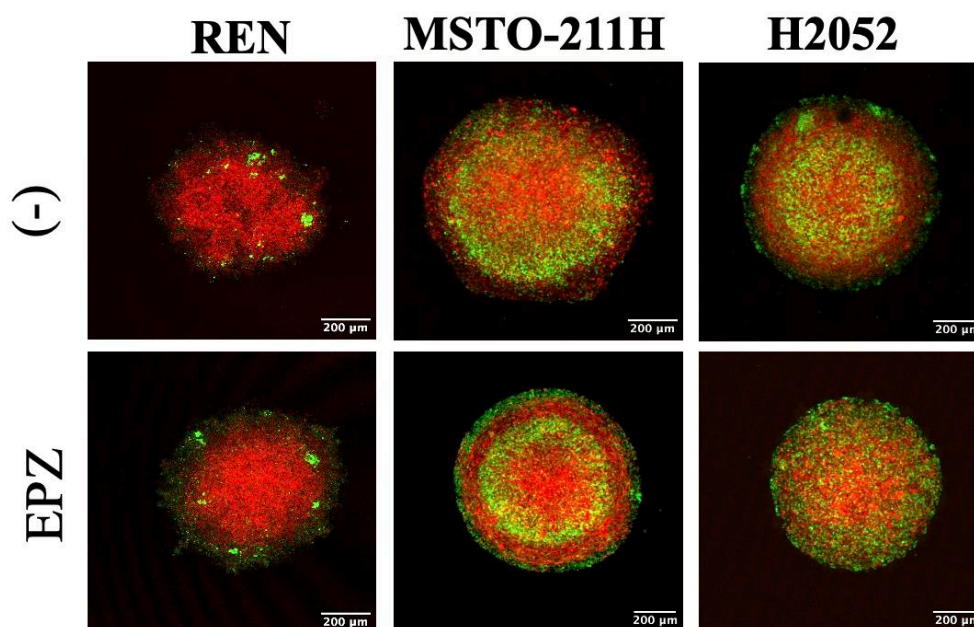


Figura 13 Sezione di sferoidi in co-cultura con tazemetostat, analisi in microscopia confocale. Il volume degli MCS è stato calcolato mediante analisi delle proiezioni z-stack con il software ImageJ e rappresentato come fold over degli MCS trattati con tazemetostat rispetto agli

MCS di controllo (-) trattati con il solo veicolo. Le immagini confocali rappresentative sono ottenute come proiezioni di z-stack ; (ΔZ stack= 0.70 μm). Scala = 200 μm .

Inoltre, valutando il volume degli MCS trattati con tazemetostat, si può osservare che, contrariamente ai monociti, il farmaco riduce significativamente la dimensione degli MCS sia in presenza che in assenza di linfociti T (Figura 14).

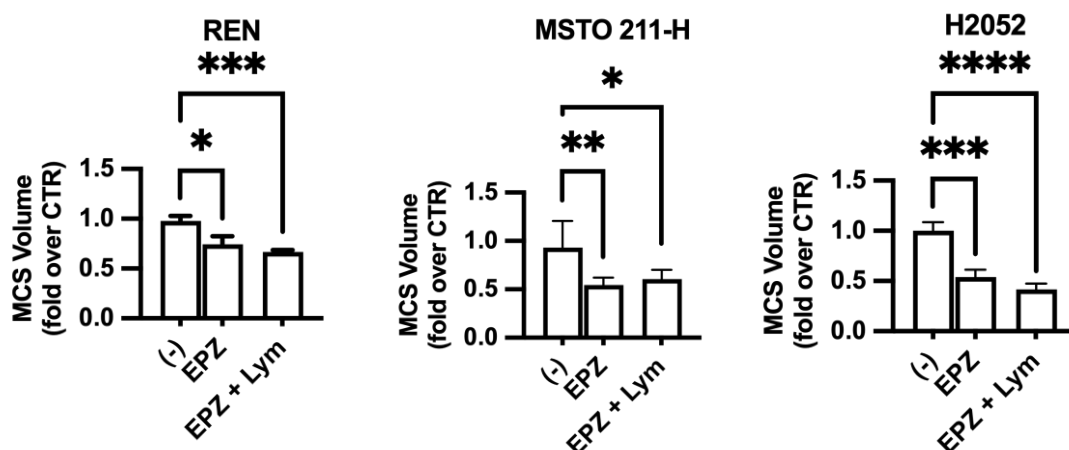


Figura 14 La presenza di linfociti T non compromette l'attività antitumorale di tazemetostat. Gli MCS MSTO-211H (A), (B) e REN (C) sono stati coltivati e trattati con Tazemetostat (10 μM) o con veicolo (DMSO 0,1%) a partire dalla semina. Dopo 48h di trattamento, i linfociti attivati e marcati con CFSE (50.000 per sferoide) sono stati aggiunti a ciascuno sferoide, protraendo il trattamento per ulteriori 48h fino al raggiungimento delle 96h complessive. Le immagini confocali acquisite al termine dell'esperimento hanno permesso di quantificare, mediante il software Fiji-ImageJ (NIH), i linfociti CFSE⁺ infiltrati all'interno di ciascuno sferoide. I dati sono espressi come fold rispetto al controllo e riportati come media $\pm$ SEM ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; one-way ANOVA).

Nel complesso, quindi, questi risultati dimostrano che l'inibizione di EZH2 favorisca attivamente il reclutamento dei linfociti T attivati all'interno degli MCS, suggerendo un potenziale ruolo di questo modulatore epigenetico nel trasformare un microambiente tumorale "freddo" in uno immunologicamente attivo. Queste evidenze gettano le basi per studi futuri mirati alla valutazione di potenziali sinergie terapeutiche tra tazemetostat e ICIs.

Tazemetostat induce l'espressione della COX-2 negli MCS

Considerando che l'infiltrato monocitario non è solo promosso da tazemetostat, ma è anche causa della resistenza delle cellule tumorali al farmaco, abbiamo deciso di identificare dei bersagli molecolari per interrompere questo circuito di resistenza. Tra i possibili candidati abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'asse COX-2/PGE2, il primo è un enzima coinvolto nella sintesi di prostanoidi a partire dall'acido arachidonico, mentre il secondo un mediatore chimico importante sia per la genesi della risposta infiammatoria acuta, che per la regolazione delle risposte immunitarie. Nello specifico, numerose evidenze sperimentali indicano che la PGE2 è una molecola con effetti immunomodulanti ad ampio spettro e con un effetto globale immunosoppressivo [61]. I livelli di PGE2 sono particolarmente elevati nel versamento pleurico dei pazienti con MPM [62] indicando l'importanza di questo mediatore nel TME del MPM. Per questa ragione abbiamo analizzato l'espressione basale della *COX-2* da parte degli MCS di MPM. I risultati mostrano un'espressione istotipo-dipendente, ovvero gli istotipi non-epiteliodi esprimono livelli più alti di quello epitelioide (Figura 15A). Abbiamo quindi valutato se EZH2 controllasse l'espressione della *COX-2* nei diversi istotipi. L'analisi degli MCS trattati con tazemetostat (10 μ M) o con il relativo veicolo per 72 ore ha dimostrato che l'inibizione di EZH2 porta a un aumento significativo dei livelli di mRNA della *COX-2* (Figura 15B). Rispetto ai rispettivi controlli, i livelli di induzione sono più marcati per gli MCS sarcomatoidi (cellule H2052), intermedi per quelli bifasici (cellule MSTO-211H), e più modesti per quelli epiteliodi (cellule REN).

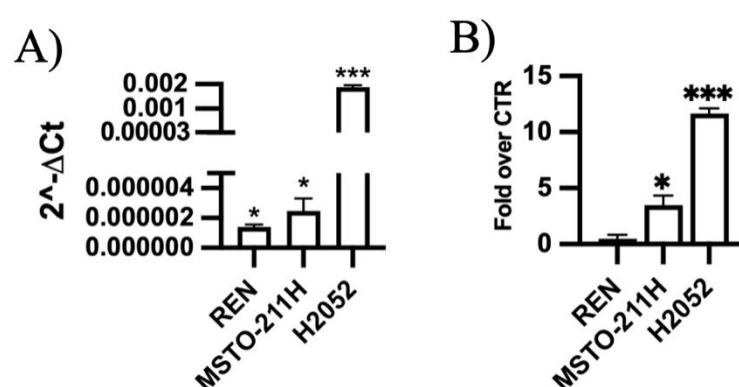


Figura 15 Il trattamento con tazemetostat incrementa l'espressione di COX2 in modo istotipo-dipendente. Le linee cellulari REN, MSTO-211H e H2052 sono state coltivate come MCS per 72 h e l'espressione di *COX-2* è stata valutata a livello basale mediante qPCR. La β -actina è stata utilizzata come gene di riferimento. I dati normalizzati sono espressi come $2^{-\Delta C_t}$; B) L'espressione di *COX-2*, dopo 72 h di

trattamento con tazemetostat 10 μ M o veicolo (DMSO 0,1%), è stata valutata nelle linee REN, MSTO-211H e H2052. La β -actina è stata utilizzata come gene di riferimento. I dati normalizzati sono espressi come variazione relativa di espressione rispetto alle cellule di controllo (fold over CTR) e presentati come media $\pm$ SEM di tre esperimenti indipendenti (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ rispetto alle cellule di controllo; t-test a due code).

Nel complesso questi risultati indicano che la *COX-2* è espressa costitutivamente nei modelli MPM, sebbene con livelli distinti nei diversi istotipi. Inoltre, l'aumento di espressione indotto da tazemetostat, con intensità differente, ma comunque significativo nei tre diversi istotipi, risulta di particolare interesse perché numerose evidenze sostengono che la PGE2 possa favorire la polarizzazione di monociti/macrofagi verso fenotipi pro-tumoral e immunosoppressivi. Per cui il profilo di espressione della COX2 emerso nei diversi modelli di MPM analizzati rafforzano l'ipotesi dell'asse COX2/PGE2 come un possibile circuito alla base della resistenza monocita-dipendente al tazemetostat.

La PGE2 promuove la crescita degli MCS in modo dipendente dai monociti

Per valutare se la PGE2 avesse effettivamente un'attività pro-tumorale nell'MPM abbiamo valutato l'effetto dell'aggiunta di PGE2 esogena sulla crescita degli MCS. Poiché la PGE2 potrebbe avere un effetto diretto sulle cellule tumorali che esprimono i recettori per la PGE2 di tipo 2 (EP2) e 4 (EP4), abbiamo inizialmente analizzato l'effetto dell'aggiunta di PGE2 esogena su MCS formati da sole cellule tumorali. Dopo 48 ore di trattamento con la PGE2 (20 μ M) da sola o in combinazione con gli antagonisti dei recettori EP2/EP4 (aEP2/EP4), abbiamo misurato il volume degli sferoidi tramite analisi di microscopia confocale. In modo consistente per i tre istotipi la crescita degli MCS trattati con la PGE2 da sola o in co-presenza di aEP2/EP4 è simile a quello degli MCS di controllo (Figura 16) escludendo, quindi un effetto pro-tumorale diretto della PGE2 sulle cellule di MPM.

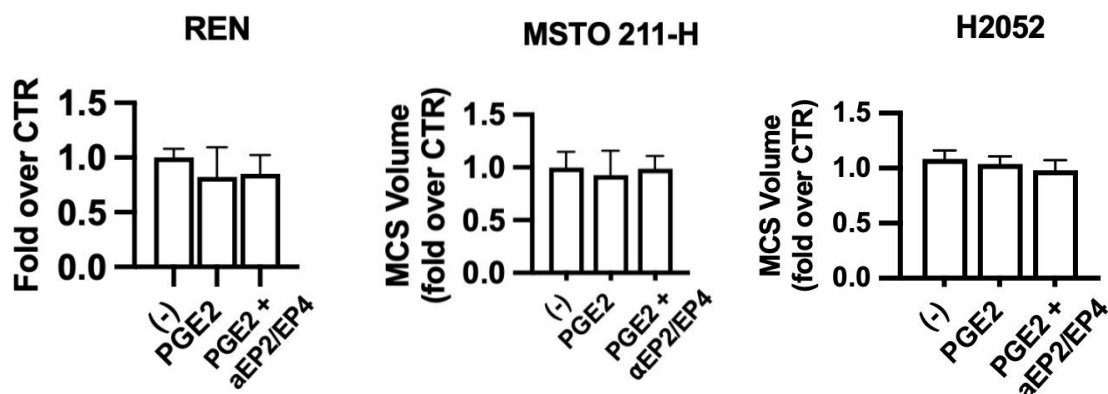


Figura 15 La presenza di PGE2 esogena non altera il volume degli sferoidi. Gli MCS formati dalle cellule di MPM delle linee REN, MSTO 211-H e H2052 sono stati trattati con PGE2 alla concentrazione di 20 μ M o con veicolo (EtOH 0,1). Il volume degli MCS è stato valutato mediante analisi confocale e quantificato utilizzando il software Fiji-ImageJ (NIH). I dati sono espressi come fold over CTR e presentati come media $\pm$ SEM (two-tailed t-test).

Abbiamo quindi valutato se la PGE2 stimolasse nei monociti infiltranti gli MCS un fenotipo pro-tumorale capace di sostenerne la crescita. Gli MCS sono stati co-coltivati con i monociti in presenza di PGE2 per 48 ore. Come controllo, alcuni monociti sono stati pre-trattati per 2 ore con gli aEP2/EP4 prima di procedere alla co-coltura con gli MCS. I risultati ottenuti mostrano che, in presenza di monociti, l'aggiunta della PGE2 aumenta la crescita degli MCS mentre il blocco dei recettori EP2/EP4 neutralizza l'effetto della PGE2, ristabilendo il volume degli MCS a valori simili ai controlli (Figura 17). In assenza di PGE2 esogena, l'aggiunta di monociti pretrattati con aEP2/EP4 riduce la crescita degli MCS, suggerendo un effetto neutralizzante sulla PGE2 prodotta dalle cellule tumorali e/o dai monociti infiltranti (Figura 17). Nel complesso questi risultati consistenti nei tre modelli di MCS dimostrano che la PGE2 ha un effetto pro-tumorale che necessita la presenza dei monociti.

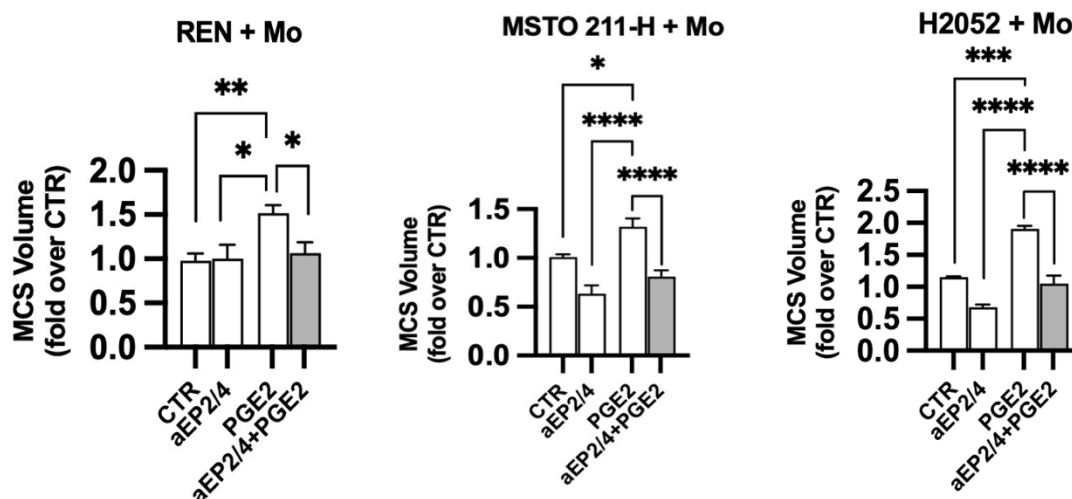


Figura 16. La PGE2 esogena aumenta il volume degli MCS in presenza di monociti. Gli MCS delle linee REN, MSTO 211-H e H2052, in presenza di monociti, sono stati trattati con antagonisti dei recettori EP2 ed EP4, singolarmente o in combinazione con PGE2 esogena, al fine di valutare il coinvolgimento della segnalazione PGE2/EP2-EP4 nella modulazione della crescita degli sferoidi. Il volume degli MCS è stato valutato mediante analisi confocale e quantificato utilizzando il software Fiji-ImageJ (NIH): i dati sono stati normalizzati rispetto agli MSC trattati con il veicolo (DMSO, 0,1%) e senza monociti. I dati sono espressi come fold over CTR e presentati come media $\pm$ SEM (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; two-tailed t-test).

Avendo escluso che la PGE2 avesse un effetto autocrino/paracrino diretto sulle cellule di MPM ed avendo dimostrato che la sua attività pro-tumorale necessita l'intervento dei monociti, questi studi supportano l'ipotesi che la PGE2 prodotta dalle cellule tumorali possa rappresentare uno dei mediatori molecolari prodotti dalle cellule di MPM per condizionare il fenotipo funzionale dei monociti a proprio vantaggio. Inoltre, poiché l'inibizione di EZH2 potenzia l'espressione della COX2, è verosimile che l'asse COX2/PGE2-monociti sia un circuito che promuova la resistenza delle cellule di MPM al tazemetostat.

L'inibizione della segnalazione PGE2/EP2-EP4 potenzia l'attività di tazemetostat in presenza di monociti

Per valutare il ruolo della via COX2/PGE2 nella resistenza monocita-dipendente degli MCS al tazemetostat, abbiamo valutato se la sua neutralizzazione tramite gli aEP2/EP4 fosse in grado di ristabilire l'effetto citostatico di tazemetostat in un sistema di co-

cultura MCS-monociti. Come controlli, abbiamo valutato la crescita di MCS non trattati e trattati con tazemetostat in assenza di monociti. Come atteso, la riduzione di volume degli MCS osservata in seguito al trattamento con tazemetostat è annullata dalla presenza dei monociti (Figura 18). La neutralizzazione della PGE2 attraverso gli aEP2/EP4 annulla l'effetto pro-tumorale dei monociti, come dimostrato dalla riduzione della crescita degli MCS a valori comparabili a quelli dei MCS formati dalle sole cellule tumorali (Figura 18). Questi risultati consistenti nei tre modelli di MPM identificano l'asse COX2-PGE2 come un meccanismo di resistenza al tazemetostat in un sistema inclusivo di monociti, quindi in un sistema che meglio riproduce l'ambiente del MPM.

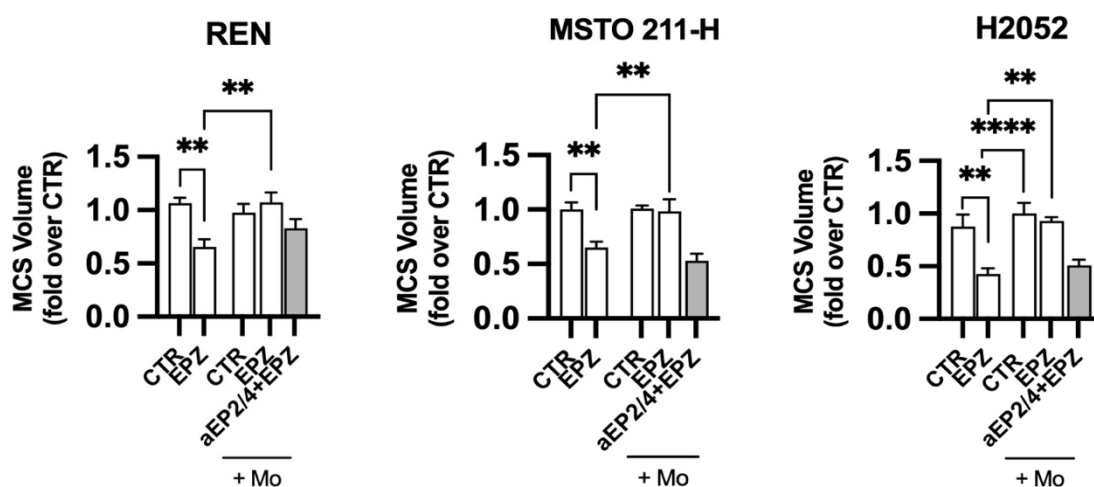


Figura 17 Effetto dell'inibizione dei recettori EP2 ed EP4 sulla risposta a tazemetostat in presenza di monociti. Rappresentazione grafica degli MCS delle linee REN, MSTO-211H e H2052 sottoposti a diversi trattamenti, in presenza o in assenza di monociti. Gli MCS sono stati trattati con tazemetostat (EPZ-6438), antagonisti dei recettori EP2 ed EP4, singolarmente o in combinazione con tazemetostat, al fine di valutare la combinazione di tazemetostat e degli antagonisti EP2-EP4 e ripristinare l'azione del tazemetostat. I volumi degli MCS sono espressi come fold change rispetto al relativo controllo. I dati rappresentano la media $\pm$ SEM degli esperimenti effettuati. La significatività statistica è indicata dagli asterischi (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;))

Nel complesso i risultati ottenuti completano le osservazioni precedenti, sostenendo un quadro per cui l'espressione della COX-2, che è rilevabile a livello basale nelle cellule tumorali di MPM, viene incrementata dal trattamento con tazemetostat portando, verosimilmente, a una maggior produzione di PGE2. Quest'ultima, stimolando l'attività pro-tumorale dei monociti infiltranti, promuove la crescita degli MCS. L'inibizione dei recettori EP2 ed EP4 neutralizza l'effetto pro-tumorale della PGE2 ripristinando

l'effetto citostatico di tazemetostat. Questi dati supportano pertanto l'ipotesi che la segnalazione PGE2/EP2-EP4 contribuisca alla modulazione della crescita tumorale e alla resistenza al tazemetostat, indicando la sua neutralizzazione come una possibile strategia complementare per potenziare l'efficacia dell'inibizione farmacologica di EZH2 nell'MPM.

CONCLUSIONE

I risultati ottenuti evidenziano come l'inibizione epigenetica di EZH2 mediata da tazemetostat eserciti un'azione complessa e duale nel contesto del MPM. L'efficacia del farmaco, infatti, non si limita a colpire alcuni tratti distintivi delle cellule tumorali, ma si estende a una marcata modulazione del TME. Dal punto di vista metodologico, gli sferoidi hanno permesso di ricreare in vitro l'architettura tridimensionale e le reali e dinamiche interazioni cellulari tra cellule neoplastiche e popolazione immunitarie infiltranti.

Sulla base di questi presupposti, i dati raccolti portano a tre conclusioni chiave:

1. **L'inibizione di EZH2 rimodella il TME del MPM:** tazemetostat induce una differente modulazione istotipo dipendente del profilo trascrizionale, caratterizzato da elevata espressione di molecole che attraggono monociti negli istotipi epitelioide e bifasico, e molecole che attraggono linfociti negli istotipi non-epitelioidi. La presenza della componente mieloide inficia l'attività citostatica di tazemetostat, mentre la componente linfocitaria supporta l'azione anti-tumorale del farmaco esercitando un'azione citotossica diretta contro le cellule tumorali.
2. **Ruolo chiave di COX-2/PGE2:** Sebbene tazemetostat richiami i monociti, la loro infiltrazione annulla l'efficacia terapeutica del farmaco, agendo come un vero e proprio "scudo" protettivo mieloide. Uno dei protagonisti di questa resistenza mediata dai monociti risiede nell'attivazione dell'asse COX-2/PGE2, che è ulteriormente potenziato dal trattamento epigenetico. In linea, la PGE2 esogena induce un incremento del volume degli sferoidi solo in condizione di co-cultura con i monociti,
3. **Un approccio terapeutico combinato (tazemetostat + antagonisti EP2/EP4):** Il trattamento con inibitori selettivi dei recettori EP2 ed EP4, in combinazione con l'inibizione di EZH2, consente di recuperare la sensibilità di tazemetostat. Questi dati indicano che l'interruzione farmacologica dell'asse COX-2/PGE2 rappresenta una promettente strategia di combinazione per potenziare l'efficacia clinica dei trattamenti epigenetici nel MPM.

In conclusione, i risultati ottenuti supportano solidamente il razionale scientifica alla base dell'associazione tra l'inibizione di EZH2 mediante tazemetostat e il blocco dell'asse COX-2/PGE2 tramite antagonisti EP2/EP4 quale nuova opzione terapeutica per il MPM.

Per trasferire queste evidenze *in vitro* nella pratica clinica, le prospettive future di ricerca si articoleranno su diversi livelli:

- 1) Validazione in vivo e studi farmacocinetici: Sarà prioritario condurre studi di validazione in vivo utilizzando modelli ortotopici di MPM in topi immunocompetenti. Tali studi permetteranno di valutare l'efficacia della combinazione in presenza di una rete vascolare e immunitaria sistemica complessa, definendo al contempo il profilo di tollerabilità, la tossicità e la farmacocinetica/farmacodinamica dei farmaci somministrati in associazione.
- 2) Caratterizzazione meccanicistica ad alta risoluzione: Sarà opportuno approfondire l'effetto della terapia combinata sulle sottopopolazioni immunitarie del TME mediante tecniche di come la citometria a flusso multiparametrica. Ciò consentirà di delineare con precisione la riprogrammazione fenotipica dei monociti/macrofagi (es. polarizzazione M1 vs M2) e lo stato funzionale dei linfociti T (attivazione vs esaurimento).
- 3) Stratificazione dei pazienti: Date le differenze istotipo-dipendente osservate, le ricerche future dovranno focalizzarsi sulla conferma di tali differenze in un pannello più ampio di linee e campioni istologici umani, insieme all'identificazione di biomarker predittivi di risposta (es. livelli espressivi di EZH2, COX-2, recettori EP2/EP4 o specifiche signature trascrizionali mieloidi vs linfocitarie) indispensabili per una futura personalizzazione terapeutica dei pazienti con MPM.
- 4) Valutazione di combinazioni triple con immunoterapia: considerato che il tazemetostat favorisce il reclutamento linfocitario negli istotipi non-epitelioidei e che il blocco di EP2/EP4 abbatte lo scudo immunosoppressivo mieloidi, sarà di grande interesse scientifico testare la sinergia di questa combinazione con gli inibitori dei checkpoint immunitari (quali anti-PD-1/PD-L1 o anti-CTLA-4).

In sintesi, questo studio dimostra come la riprogrammazione epigenetica del microambiente tumorale, integrata con il blocco mirato dei pathway di immunoevasione mieloide-mediati, rappresenti un innovativo cambio di paradigma razionale per superare le resistenze terapeutiche e guidare il futuro sviluppo di strategie combinate e personalizzate per il MPM.

BIBLIOGRAFIA

1. Lettieri, S.; Bortolotto, C.; Agustoni, F.; Lococo, F.; Lancia, A.; Comoli, P.; Corsico, A.G.; Stella, G.M. The Evolving Landscape of the Molecular Epidemiology of Malignant Pleural Mesothelioma. *J Clin Med* **2021**, *10*, 1034, doi:10.3390/jcm10051034.
2. Schumann, S.O.; Kocher, G.; Minervini, F. Epidemiology, Diagnosis and Treatment of the Malignant Pleural Mesothelioma, a Narrative Review of Literature. *J Thorac Dis* **2021**, *13*, 2510–2523, doi:10.21037/jtd-20-2761.
3. Kuroda, A. Recent Progress and Perspectives on the Mechanisms Underlying Asbestos Toxicity. *Genes Environ* **2021**, *43*, 46, doi:10.1186/s41021-021-00215-0.
4. Gariazzo, C.; Gasparrini, A.; Marinaccio, A. Asbestos Consumption and Malignant Mesothelioma Mortality Trends in the Major User Countries. *Ann Glob Health* **2023**, *89*, 11, doi:10.5334/aogh.4012.
5. Malignant Mesothelioma - StatPearls - NCBI Bookshelf Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519530/> (accessed on 30 July 2026).
6. Mesotelioma: Sintomi, prevenzione, cause, diagnosi | AIRC Available online: <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/mesotelioma> (accessed on 30 July 2026).
7. Bueno, R.; Stawiski, E.W.; Goldstein, L.D.; Durinck, S.; De Rienzo, A.; Modrusan, Z.; Gnad, F.; Nguyen, T.T.; Jaiswal, B.S.; Chirieac, L.R.; et al. Comprehensive Genomic Analysis of Malignant Pleural Mesothelioma Identifies Recurrent Mutations, Gene Fusions and Splicing Alterations. *Nat Genet* **2016**, *48*, 407–416, doi:10.1038/ng.3520.
8. Blum, Y.; Meiller, C.; Quetel, L.; Elarouci, N.; Ayadi, M.; Tashtanbaeva, D.; Armenoult, L.; Montagne, F.; Tranchant, R.; Renier, A.; et al. Dissecting Heterogeneity in Malignant Pleural Mesothelioma through Histo-Molecular Gradients for Clinical Applications. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1333, doi:10.1038/s41467-019-09307-6.
9. Bertuccio, F.R.; Agustoni, F.; Galli, G.; Bortolotto, C.; Saddi, J.; Baietto, G.; Baio, N.; Montini, S.; Putignano, P.; D'Ambrosio, G.; et al. Pleural Mesothelioma: Treatable Traits of a Heterogeneous Disease. *Cancers (Basel)* **2023**, *15*, 5731, doi:10.3390/cancers15245731.
10. EURACAN/IASLC Proposals for Updating the Histologic Classification of Pleural Mesothelioma: Towards a More Multidisciplinary Approach - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31546041/> (accessed on 30 July 2026).
11. Gaudino, G.; Xue, J.; Yang, H. How Asbestos and Other Fibers Cause Mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res* **2020**, *9*, S39–S46, doi:10.21037/tlcr.2020.02.01.
12. Wang, Z.; Huang, J.; MinYang, null; Fu, L.; Liu, S.; Huang, J.; Han, J.; Zhao, X. Identification of the Ferroptosis-Related Prognostic Gene Signature in Mesothelioma. *Gene* **2024**, *919*, 148498, doi:10.1016/j.gene.2024.148498.

13. Felley-Bosco, E.; Gray, S.G. Mesothelioma Driver Genes, Ferroptosis, and Therapy. *Front Oncol* **2019**, *9*, 1318, doi:10.3389/fonc.2019.01318.
14. Sekido, Y.; Sato, T. NF2 Alteration in Mesothelioma. *Front Toxicol* **2023**, *5*, 1161995, doi:10.3389/ftox.2023.1161995.
15. Hillegass, J.M.; Miller, J.M.; MacPherson, M.B.; Westbom, C.M.; Sayan, M.; Thompson, J.K.; Macura, S.L.; Perkins, T.N.; Beuschel, S.L.; Alexeeva, V.; et al. Asbestos and Erionite Prime and Activate the NLRP3 Inflammasome That Stimulates Autocrine Cytokine Release in Human Mesothelial Cells. *Part Fibre Toxicol* **2013**, *10*, 39, doi:10.1186/1743-8977-10-39.
16. Yang, H.; Bocchetta, M.; Kroczyńska, B.; Elmishad, A.G.; Chen, Y.; Liu, Z.; Bubici, C.; Mossman, B.T.; Pass, H.I.; Testa, J.R.; et al. TNF-Alpha Inhibits Asbestos-Induced Cytotoxicity via a NF-kappaB-Dependent Pathway, a Possible Mechanism for Asbestos-Induced Oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 10397–10402, doi:10.1073/pnas.0604008103.
17. Singh, A.; Busacca, S.; Gaba, A.; Sheaff, M.; Poile, C.; Nakas, A.; Dzialo, J.; Bzura, A.; Dawson, A.G.; Fennell, D.A.; et al. BAP1 Loss Induces Mitotic Defects in Mesothelioma Cells through BRCA1-Dependent and Independent Mechanisms. *Oncogene* **2023**, *42*, 572–585, doi:10.1038/s41388-022-02577-3.
18. Ly, P.; Cleveland, D.W. Rebuilding Chromosomes After Catastrophe: Emerging Mechanisms of Chromothripsis. *Trends Cell Biol* **2017**, *27*, 917–930, doi:10.1016/j.tcb.2017.08.005.
19. Sato, T.; Sekido, Y. NF2/Merlin Inactivation and Potential Therapeutic Targets in Mesothelioma. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, 988, doi:10.3390/ijms19040988.
20. Osmanbeyoglu, H.U.; Palmer, D.; Sagan, A.; Sementino, E.; Becich, M.J.; Testa, J.R. Isolated BAP1 Genomic Alteration in Malignant Pleural Mesothelioma Predicts Distinct Immunogenicity with Implications for Immunotherapeutic Response. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, 5626, doi:10.3390/cancers14225626.
21. Napoli, F.; Listì, A.; Zambelli, V.; Witel, G.; Bironzo, P.; Papotti, M.; Volante, M.; Scagliotti, G.; Righi, L. Pathological Characterization of Tumor Immune Microenvironment (TIME) in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 2564, doi:10.3390/cancers13112564.
22. Labani-Motlagh, A.; Ashja-Mahdavi, M.; Loskog, A. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front Immunol* **2020**, *11*, 940, doi:10.3389/fimmu.2020.00940.
23. Qualiotto, A.N.; Baldavira, C.M.; Balancin, M.; Ab'Saber, A.; Takagaki, T.; Capelozzi, V.L. Mesothelin Expression Remodeled the Immune-Matrix Tumor Microenvironment Predicting the Risk of Death in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1268927, doi:10.3389/fimmu.2023.1268927.
24. Schürch, C.M.; Forster, S.; Brühl, F.; Yang, S.H.; Felley-Bosco, E.; Hewer, E. The “Don’t Eat Me” Signal CD47 Is a Novel Diagnostic Biomarker and Potential Therapeutic Target for Diffuse Malignant Mesothelioma. *OncoImmunology* **2018**, *7*, e1373235, doi:10.1080/2162402X.2017.1373235.

25. Hiltbrunner, S.; Mannarino, L.; Kirschner, M.B.; Opitz, I.; Rigutto, A.; Laure, A.; Lia, M.; Nozza, P.; Maconi, A.; Marchini, S.; et al. Tumor Immune Microenvironment and Genetic Alterations in Mesothelioma. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 660039, doi:10.3389/fonc.2021.660039.
26. Marcq, E.; Siozopoulou, V.; Waele, J.D.; Audenaerde, J. van; Zwaenepoel, K.; Santermans, E.; Hens, N.; Pauwels, P.; Meerbeeck, J.P. van; Smits, E.L.J. Prognostic and Predictive Aspects of the Tumor Immune Microenvironment and Immune Checkpoints in Malignant Pleural Mesothelioma. *Oncoimmunology* **2016**, *6*, e1261241, doi:10.1080/2162402X.2016.1261241.
27. Cersosimo, F.; Barbarino, M.; Lonardi, S.; Vermi, W.; Giordano, A.; Bellan, C.; Giurisato, E. Mesothelioma Malignancy and the Microenvironment: Molecular Mechanisms. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 5664, doi:10.3390/cancers13225664.
28. Blondy, T.; d'Almeida, S.M.; Briolay, T.; Tabiasco, J.; Meiller, C.; Chéné, A.-L.; Cellierin, L.; Deshayes, S.; Delneste, Y.; Fonteneau, J.-F.; et al. Involvement of the M-CSF/IL-34/CSF-1R Pathway in Malignant Pleural Mesothelioma. *J Immunother Cancer* **2020**, *8*, e000182, doi:10.1136/jitc-2019-000182.
29. Cornelissen, R.; Lievense, L.A.; Robertus, J.-L.; Hendriks, R.W.; Hoogsteden, H.C.; Hegmans, J.P.J.J.; Aerts, J.G.J.V. Intratumoral Macrophage Phenotype and CD8⁺ T Lymphocytes as Potential Tools to Predict Local Tumor Outgrowth at the Intervention Site in Malignant Pleural Mesothelioma. *Lung Cancer* **2015**, *88*, 332–337, doi:10.1016/j.lungcan.2015.03.013.
30. Yamada, N.; Oizumi, S.; Kikuchi, E.; Shinagawa, N.; Konishi-Sakakibara, J.; Ishimine, A.; Aoe, K.; Gemba, K.; Kishimoto, T.; Torigoe, T.; et al. CD8⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predict Favorable Prognosis in Malignant Pleural Mesothelioma after Resection. *Cancer Immunol Immunother* **2010**, *59*, 1543–1549, doi:10.1007/s00262-010-0881-6.
31. Désage, A.-L.; Karpathiou, G.; Peoc'h, M.; Froudarakis, M.E. The Immune Microenvironment of Malignant Pleural Mesothelioma: A Literature Review. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 3205, doi:10.3390/cancers13133205.
32. Cornwall, S.M.J.; Wikstrom, M.; Musk, A.W.; Alvarez, J.; Nowak, A.K.; Nelson, D.J. Human Mesothelioma Induces Defects in Dendritic Cell Numbers and Antigen-Processing Function Which Predict Survival Outcomes. *Oncoimmunology* **2015**, *5*, e1082028, doi:10.1080/2162402X.2015.1082028.
33. Li, Q.; Wang, W.; Yamada, T.; Matsumoto, K.; Sakai, K.; Bando, Y.; Uehara, H.; Nishioka, Y.; Sone, S.; Iwakiri, S.; et al. Pleural Mesothelioma Instigates Tumor-Associated Fibroblasts To Promote Progression via a Malignant Cytokine Network. *Am J Pathol* **2011**, *179*, 1483–1493, doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.060.
34. Nowak, A.K.; Brosseau, S.; Cook, A.; Zalcmann, G. Antiangiogenic Strategies in Mesothelioma. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.00126.
35. Sayan, M.; Eren, M.F.; Gupta, A.; Ohri, N.; Kotek, A.; Babalioglu, I.; Kaplan, S.O.; Duran, O.; Or, O.D.; Cukurcayir, F.; et al. Current Treatment Strategies in Malignant Pleural Mesothelioma with a Treatment Algorithm. *Adv Respir Med* **2019**, *87*, 289–297, doi:10.5603/ARM.2019.0051.

36. Sofianidi, A.A.; Syrigos, N.K.; Blyth, K.G.; Charpidou, A.; Vathiotis, I.A. Breaking Through: Immunotherapy Innovations in Pleural Mesothelioma. *Clinical Lung Cancer* **2025**, *26*, 458–469, doi:10.1016/j.clcc.2025.04.008.
37. Baas, P.; Scherpereel, A.; Nowak, A.K.; Fujimoto, N.; Peters, S.; Tsao, A.S.; Mansfield, A.S.; Popat, S.; Jahan, T.; Antonia, S.; et al. First-Line Nivolumab plus Ipilimumab in Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma (CheckMate 743): A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet* **2021**, *397*, 375–386, doi:10.1016/S0140-6736(20)32714-8.
38. Tao, L.; Zhou, Y.; Luo, Y.; Qiu, J.; Xiao, Y.; Zou, J.; Zhang, Y.; Liu, X.; Yang, X.; Gou, K.; et al. Epigenetic Regulation in Cancer Therapy: From Mechanisms to Clinical Advances. *MedComm – Oncology* **2024**, *3*, e59, doi:10.1002/mog2.59.
39. Gold, S.; Shilatifard, A. Epigenetic Therapies Targeting Histone Lysine Methylation: Complex Mechanisms and Clinical Challenges. *J Clin Invest* **134**, e183391, doi:10.1172/JCI183391.
40. Bennett, R.L.; Licht, J.D. Targeting Epigenetics in Cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2018**, *58*, 187–207, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010716-105106.
41. Gan, L.; Yang, Y.; Li, Q.; Feng, Y.; Liu, T.; Guo, W. Epigenetic Regulation of Cancer Progression by EZH2: From Biological Insights to Therapeutic Potential. *Biomark Res* **2018**, *6*, 10, doi:10.1186/s40364-018-0122-2.
42. Zimmerman, S.M.; Lin, P.N.; Souroullas, G.P. Non-Canonical Functions of EZH2 in Cancer. *Front Oncol* **2023**, *13*, 1233953, doi:10.3389/fonc.2023.1233953.
43. Yamaguchi, H.; Hung, M.-C. Regulation and Role of EZH2 in Cancer. *Cancer Res Treat* **2014**, *46*, 209–222, doi:10.4143/crt.2014.46.3.209.
44. Kim, K.H.; Roberts, C.W.M. Targeting EZH2 in Cancer. *Nat Med* **2016**, *22*, 128–134, doi:10.1038/nm.4036.
45. Wang, D.; Quiros, J.; Mahuron, K.; Pai, C.-C.; Ranzani, V.; Young, A.; Silveria, S.; Harwin, T.; Abnousian, A.; Pagani, M.; et al. Targeting EZH2 Reprograms Intratumoral Regulatory T Cells to Enhance Cancer Immunity. *Cell Rep* **2018**, *23*, 3262–3274, doi:10.1016/j.celrep.2018.05.050.
46. Al Khatib, M.O.; Pinton, G.; Moro, L.; Porta, C. Benefits and Challenges of Inhibiting EZH2 in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancers* **2023**, *15*, 1537, doi:10.3390/cancers15051537.
47. Gilardini Montani, M.S.; Benedetti, R.; Cirone, M. Targeting EZH2 in Cancer: Mechanisms, Pathways, and Therapeutic Potential. *Molecules* **2024**, *29*, 5817, doi:10.3390/molecules29245817.
48. Orleni, M.; Beumer, J.H. Pharmacology and Pharmacokinetics of Tazemetostat. *Cancer Chemother Pharmacol* **2024**, *93*, 509–517, doi:10.1007/s00280-024-04658-4.
49. LaFave, L.M.; Béguelin, W.; Koche, R.; Teater, M.; Spitzer, B.; Chramiec, A.; Papalexi, E.; Keller, M.D.; Hricik, T.; Konstantinoff, K.; et al. Loss of BAP1 Function Leads to EZH2-Dependent Transformation. *Nat Med* **2015**, *21*, 1344–1349, doi:10.1038/nm.3947.

50. Zauderer, M.G.; Szlosarek, P.W.; Le Moulec, S.; Popat, S.; Taylor, P.; Planchard, D.; Scherpereel, A.; Koczywas, M.; Forster, M.; Cameron, R.B.; et al. EZH2 Inhibitor Tazemetostat in Patients with Relapsed or Refractory, BAP1-Inactivated Malignant Pleural Mesothelioma: A Multicentre, Open-Label, Phase 2 Study. *Lancet Oncol* **2022**, *23*, 758–767, doi:10.1016/S1470-2045(22)00277-7.
51. Santiso, A.; Heinemann, A.; Kargl, J. Prostaglandin E2 in the Tumor Microenvironment, a Convolved Affair Mediated by EP Receptors 2 and 4. *Pharmacological Reviews* **2024**, *76*, 388–413, doi:10.1124/pharmrev.123.000901.
52. O’Callaghan, G.; Houston, A. Prostaglandin E2 and the EP Receptors in Malignancy: Possible Therapeutic Targets? *Br J Pharmacol* **2015**, *172*, 5239–5250, doi:10.1111/bph.13331.
53. Finetti, F.; Paradisi, L.; Bernardi, C.; Pannini, M.; Trabalzini, L. Cooperation between Prostaglandin E2 and Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer Progression: A Dual Target for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* **2023**, *15*, 2374, doi:10.3390/cancers15082374.
54. Wang, Q.; Morris, R.J.; Bode, A.M.; Zhang, T. Prostaglandin Pathways: Opportunities for Cancer Prevention and Therapy. *Cancer Res* **2022**, *82*, 949–965, doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-2297.
55. Wang, J.; Zhang, L.; Kang, D.; Yang, D.; Tang, Y. Activation of PGE2/EP2 and PGE2/EP4 Signaling Pathways Positively Regulate the Level of PD-1 in Infiltrating CD8+ T Cells in Patients with Lung Cancer. *Oncol Lett* **2018**, *15*, 552–558, doi:10.3892/ol.2017.7279.
56. Lacher, S.B.; Dörr, J.; de Almeida, G.P.; Hönninger, J.; Bayerl, F.; Hirschberger, A.; Pedde, A.-M.; Meiser, P.; Ramsauer, L.; Rudolph, T.J.; et al. PGE2 Limits Effector Expansion of Tumour-Infiltrating Stem-like CD8+ T Cells. *Nature* **2024**, *629*, 417–425, doi:10.1038/s41586-024-07254-x.
57. Baldi, A.; Santini, D.; Vasaturo, F.; Santini, M.; Vicidomini, G.; Di, M.; Esposito, V.; Groeger, A.; Liuzzi, G.; Vincenzi, B.; et al. Prognostic Significance of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Expression of Cell Cycle Inhibitors P21 and P27 in Human Pleural Malignant Mesothelioma. *Thorax* **2004**, *59*, 428–433, doi:10.1136/thx.2003.008912.
58. Mineo, T.C.; Ambrogi, V.; Cufari, M.E.; Pompeo, E. May Cyclooxygenase-2 (COX-2), P21 and P27 Expression Affect Prognosis and Therapeutic Strategy of Patients with Malignant Pleural Mesothelioma? *Eur J Cardiothorac Surg* **2010**, *38*, 245–252, doi:10.1016/j.ejcts.2010.02.012.
59. Vogl, M.; Rosenmayr, A.; Bohanes, T.; Scheed, A.; Brndiar, M.; Stubenberger, E.; Ghanim, B. Biomarkers for Malignant Pleural Mesothelioma—A Novel View on Inflammation. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 658, doi:10.3390/cancers13040658.
60. Mola, S.; Pinton, G.; Erreni, M.; Corazzari, M.; De Andrea, M.; Grolla, A.A.; Martini, V.; Moro, L.; Porta, C. Inhibition of the Histone Methyltransferase EZH2 Enhances Protumor Monocyte Recruitment in Human Mesothelioma Spheroids. *IJMS* **2021**, *22*, 4391, doi:10.3390/ijms22094391.

61. Santiso, A.; Heinemann, A.; Kargl, J. Prostaglandin E2 in the Tumor Microenvironment, a Convolved Affair Mediated by EP Receptors 2 and 4. *Pharmacol Rev* **2024**, *76*, 388–413, doi:10.1124/pharmrev.123.000901.
62. Lieverse, L.A.; Cornelissen, R.; Bezemer, K.; Kaijen-Lambers, M.E.H.; Hegmans, J.P.J.J.; Aerts, J.G.J.V. Pleural Effusion of Patients with Malignant Mesothelioma Induces Macrophage-Mediated T Cell Suppression. *J Thorac Oncol* **2016**, *11*, 1755–1764, doi:10.1016/j.jtho.2016.06.021.