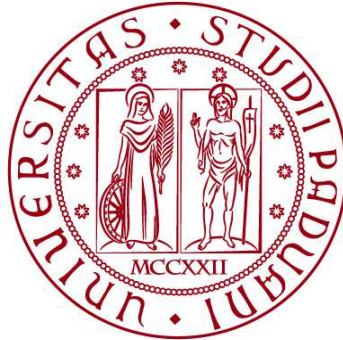


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

Dipendenza oncogenica dalla fosforilazione della serina di STAT3 nel tumore polmonare KRAS mutato

**Tutor: Prof.ssa Maddalena Mognato
Dipartimento di Biologia**

Laureando: Matteo Scavezzon

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

Abstract	1
1. Introduzione	3
1.1. La famiglia delle proteine STAT	3
1.2. STAT3	3
1.2.1. Fosforilazione della serina 727 di STAT3	5
1.2.2. Funzione mitocondriale di STAT3	5
1.2.3. STAT3 e l'infiammazione durante la carcinogenesi.....	6
2. Materiali e metodi	7
2.1. Linee cellulari e modelli murini	7
2.2. Immunoistochimica	7
2.3. Western-blot.....	8
2.4. Real-time PCR	8
2.5. Saggio crescita colonie su agar	8
2.6. Saggio TUNEL	9
2.7. Seahorse assay.....	9
2.8. Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)	9
3. Risultati	10
3.1. Espressione costitutiva di pSTAT3	10
3.2. Inibizione del fenotipo LAC come conseguenza dell'assenza della fosforilazione della serina di STAT3.....	11
3.3. pS ₇₂₇ -STAT3 induce proliferazione delle cellule polmonari in LAC KRAS mutato	12
3.4. pS ₇₂₇ -STAT3 contribuisce alla riprogrammazione del metabolismo in LAC KRAS mutato.....	14
3.5. pS ₇₂₇ -STAT3 aumenta la trascrizione di geni nucleari regolatori delle funzioni mitocondriali e del metabolismo energetico in LAC indotto dall'oncogene KRAS	15
3.6. Eterozigosi per l'espressione di STAT3 in topi <i>Kras</i> ^{G12D} mostra un fenotipo sovrapponibile a quello del genotipo <i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>Stat</i> ^{SA/SA}	16
4. Discussione e conclusioni	17
5. Esperienza di stage	20
Bibliografia	22
Appendice	22

Abstract

Il Signal Transducer And Activator Of Transcription 3 (STAT3) è un fattore di trascrizione che si è dimostrato avere un potenziale oncogeno in diversi tipi tumorali agendo come fattore di trascrizione nucleare dopo aver subito fosforilazione della Tirosina 705 (Y705). In parallelo, studi recenti hanno evidenziato un ruolo della fosforilazione del residuo Serina 727 (S727) di STAT3 nel processo di cancerogenesi. Il lavoro qui analizzato prende in esame il caso dell'adenocarcinoma polmonare con mutazione di KRAS. Utilizzando linee cellulari umane e modelli murini mutanti per KRAS, è emerso come l'assenza di pS₇₂₇-STAT3 vada in qualche modo a sopprimere la manifestazione di un fenotipo tumorale. Attraverso vari saggi si è poi evidenziato come pS₇₂₇-STAT3 agisca come fattore di trascrizione sia a livello nucleare che mitocondriale andando a riprogrammare la proliferazione e il metabolismo di queste cellule. È inoltre emerso come STAT3 sia in grado di dirigere l'espressione genica interagendo direttamente con l'RNA polimerasi II. Tutte queste evidenze spingono dunque verso una nuova direzione che non vede più la fosforilazione della serina come un elemento di supporto dell'attività di pY₇₀₅-STAT3 ma come protagonista negli eventi di tumorigenesi.

1. Introduzione

1.1. La famiglia delle proteine STAT

Le proteine Trasduttori del Segnale ed Attivatori della Trascrizione (STAT) sono una famiglia di proteine che nei mammiferi è composta da sette membri (STAT-1, -2, -3, -4, -5a, -5b, -6); il loro ruolo è stato tradizionalmente identificato in quello di fattori di trascrizione nucleari attivati dalla fosforilazione di un residuo di tirosina in risposta a determinati stimoli extracellulari, tra cui citochine, fattori di crescita e ligandi peptidici [1].

Le proteine della famiglia STAT presentano sei domini conservati: dominio N-terminale (che media la dimerizzazione delle proteine STAT anche in assenza di fosforilazione), dominio *coiled-coil* (che permette il legame ad altri fattori di trascrizione o co-attivatori e co-repressori ed è inoltre coinvolto nella traslocazione nel nucleo grazie alla presenza di una sequenza di importazione nucleare che viene riconosciuta dalle importine), dominio di legame al DNA (che riconosce specificamente il motivo palindromo TTCN₃₋₄GAA nella regione promotoriale dei geni target e qui vi si lega), dominio linker (con funzione strutturale per il legame al DNA e per la formazione del complesso di trascrizione), dominio SH2 (che permette l'interazione con altre proteine fosforilate a livello di residui di tirosina ed è indispensabile per la dimerizzazione) e il dominio C-terminale (detto anche dominio transattivatore, importante per la capacità di interazione con co-attivatori) [1, 2].

Oltre alla funzione canonica delle proteine STAT, ossia quella di attivare la trascrizione a seguito della loro attivazione, recenti studi hanno portato alla luce come queste proteine possano influenzare la trascrizione anche reprimendola e non solo nella forma fosforilata ma anche nella forma non fosforilata. Inoltre, le proteine STAT si è visto essere coinvolte anche in funzioni non nucleari e possono svolgere diverse funzioni anche a livello mitocondriale, nel reticolo endoplasmatico, nell'apparato di Golgi e nel citoplasma, sia nella forma fosforilata che nella forma non fosforilata [1].

Le proteine STAT sono infine implicate in numerose patologie umane quali l'immunodeficienza, malattie infiammatorie, alcune forme di cancro e disordini della proliferazione cellulare. Ad esempio, in molti tipi di cancro è possibile riscontrare una fosforilazione costitutiva della tirosina nelle proteine STAT come risultato di mutazioni in elementi a monte della cascata di attivazione o a causa di un rilascio eccessivo di regolatori extracellulari e questo determina una sovra-espressione di quei geni normalmente attivati dal pathway canonico [1].

1.2. STAT3

STAT3 è una proteina di circa 800 residui amminoacidici e massa molecolare di circa 92 kDa. Presenta un dominio transattivatore C-terminale contenente un residuo di tirosina (Y705) e un residuo di serina (S727) fosforilabili. La fosforilazione della tirosina da parte di chinasi a monte della via di segnale ne determina l'attivazione, la dimerizzazione e traslocazione nel nucleo dove espleta

il suo ruolo canonico. Esistono tre diverse isoforme di STAT3: quella a lunghezza completa α e due isoforme più corte β e γ che sono il risultato rispettivamente di uno splicing alternativo e di un taglio proteolitico. STAT3 α è principalmente coinvolta nei processi di proliferazione cellulare e trasformazione, STAT3 β regola invece il differenziamento cellulare (e manca del sito di fosforilazione a livello della serina) mentre STAT3 γ è stata riscontrata nei neutrofili e non presenta il dominio transattivatore.

Il principale pathway di attivazione di STAT3 è quello che vede coinvolte le proteine JAKs e la fosforilazione del residuo di tirosina 705. STAT3 nella forma non fosforilata risiede nel citoplasma in uno stato inattivo. Una volta che regolatori extracellulari come citochine o fattori di crescita vengono legati da loro specifici recettori di membrana di cellule competenti, viene attivata la cascata di segnale che vede coinvolti i domini tirosin-chinasici intrinseci dei recettori per fattori di crescita e tirosin-chinasi non recettoriali associate ai recettori per le citochine come le proteine JAKs. L'attivazione delle chinasi si traduce in modifiche conformazionali dei recettori stessi che possono quindi legare le proteine STAT3 nella loro forma non fosforilata grazie ai domini SH2. A questo punto le chinasi possono fosforilare un residuo di tirosina del dominio transattivatore e questa fosforilazione permette la dimerizzazione delle proteine STAT3 e la loro traslocazione nel nucleo dove possono promuovere la trascrizione di geni target. Questi geni sono generalmente coinvolti in importanti processi cellulari quali la proliferazione, la sopravvivenza, il differenziamento e una loro mal regolazione può determinare carcinogenesi. La defosforilazione ad opera di tirosin-fosfatasi nucleari ne determina poi l'inattivazione e l'esportazione nel citoplasma [1, 2]. L'attivazione di STAT3 risulta essere finemente regolata a monte e una sua attivazione costante è emerso contribuire alla proliferazione cellulare, differenziamento e sopravvivenza cellulare e, di conseguenza, sono in corso studi circa inibitori di questo pathway di segnalazione come terapie antitumorali. Infatti un'attivazione non regolata e continuativa di STAT3 determina l'espressione anomala di geni come ciclina *D1* e *C-MYC* la cui sovra-espressione determina disfunzione del ciclo cellulare e proliferazione incontrollata. Oltre a questo, l'attivazione di STAT3 favorisce angiogenesi tumorale [2].

La sovra-espressione o la fosforilazione costitutiva della tirosina 705 di STAT3 sono state osservate in diversi tipi di cancro umano e supportano la trasformazione in diverse linee cellulari e modelli animali. Insieme a STAT5, STAT3 tra le proteine STAT è quella che è maggiormente associata alla progressione tumorale.

Tuttavia la fosforilazione della tirosina 705 non è l'unica modifica post-traduzionale (*post-translational modification*, PTM) a cui è soggetta questa proteina. Altri residui amminoacidici possono infatti essere soggetti a fosforilazione come la serina 727 e non solo. Per quanto riguarda il residuo di serina 727, in passato si pensava che la funzione fosse limitata ad un aumento dell'attività nucleare di STAT3 ma recenti evidenze hanno dimostrato come questa PTM sia alla base di ulteriori meccanismi d'azione di STAT3. La spettrometria di

massa ha inoltre rilevato fosforilazioni anche in altri residui tirosinici o serinici del dominio transattivatore ma non è ancora chiaro se queste vadano ad influenzare l'attività di STAT3. Alcuni residui amminoacidici di STAT3 del dominio N-terminale, del dominio SH2 e del dominio transattivatore possono invece andare incontro ad acetilazione ed alcuni studi hanno messo alla luce come queste modifiche concorrano a determinare la traslocazione a livello nucleare ma anche mitocondriale (in questo caso sembra che l'aggiunta di questa modificazione contribuisca a mascherare la carica positiva di un residuo di lisina e questo possa aiutare ad attraversare la membrana del mitocondrio carica negativamente) [3].

1.2.1. Fosforilazione della serina 727 di STAT3

L'importanza della via di segnalazione IL6/JAK/STAT3 è stata dimostrata utilizzando modelli murini e linee cellulari mutanti per i recettori e chinasi di questa via o per STAT3 stessa. Tuttavia, la funzione canonica di STAT3 descritta finora non è ben rappresentativa del complesso comportamento di questa proteina. STAT3 può infatti essere importata nel mitocondrio dove interagisce con il DNA mitocondriale, con i complessi della catena di trasporto degli elettroni e con il poro di transizione della permeabilità mitocondriale [4].

Il potenziale oncogenico di STAT3 è stato tradizionalmente associato alla sua natura di fattore di trascrizione nucleare ma un pool di STAT3 in modo dipendente dalla fosforilazione della serina 727 è stato dimostrato essere un requisito nei tumori RAS mutati per la sua capacità di riprogrammare il metabolismo cellulare. Le proteine RAS sono GTPasi trasduttori del segnale e comprendono tre proto-oncogeni, *KRAN*, *HRAS* e *NRAS*, che se mutati diventano oncogeni capaci di portare all'insorgenza di tumori. Le proteine RAS sono coinvolte nella modulazione di diversi pathways di segnalazione intracellulari che controllano diverse funzioni cellulari. Quando non regolate, inducono un'anormale proliferazione cellulare, crescita, sopravvivenza, riarrangiamenti citoscheletrici, adesione, motilità e differenziamento e ciò determina l'insorgenza di forme maligne di tumore [5]. Mutazioni ai codoni 12, 13 e 61 bloccano RAS in uno stato attivo legante il GTP e questo può quindi attivare diversi pathway come Raf-MEK-ERK, PI3K e Ral che portano alla proliferazione, sopravvivenza cellulare ed angiogenesi.

Il pathway di fosforilazione del residuo di serina 727 non è stato tuttavia del tutto chiarito. Sono infatti diverse le chinasi capaci di operare questa fosforilazione e l'attivazione di una piuttosto che di un'altra dipende dallo stimolo extracellulare. Il pathway MEK-ERK sembra essere quello più comunemente coinvolto nelle trasformazioni con RAS mutato ma la possibilità di riscontrare questa PTM anche quando questo pathway non è attivo suggerisce la possibilità del coinvolgimento di altre chinasi [6].

1.2.2. Funzioni mitocondriali di STAT3

STAT3 quindi può essere riscontrata in diversi compartimenti cellulari tra cui i mitocondri e proprio sulla funzione del pool mitocondriale si stanno focalizzando molti progetti di ricerca. La presenza di STAT3 nel mitocondrio è stata in particolar

modo evidenziata a livello della membrana interna e della matrice mitocondriale. L'importazione attraverso la membrana esterna sembra avvenire grazie all'interazione con i recettori TOM70 piuttosto che TOM20 in quanto, nonostante STAT3 sia in grado di interagire con quest'ultimo recettore, la delezione dei 134 amminoacidi dell'N-terminale non va ad influenzare l'efficienza di importazione. Il fatto che STAT3 sia riscontrabile a livello di membrana interna e di matrice mitocondriale suggerisce anche l'interazione con il complesso TIM ma non è ancora stato chiarito il meccanismo con cui questo avvenga. L'importazione al mitocondrio è emersa essere dipendente dalla fosforilazione del residuo di serina 727 *in vitro* anche se esperimenti su modelli murini deficitari per questa PTM non mostravano deficit per l'importazione al mitocondrio. Questa apparente contraddizione è stata spiegata assumendo che la fosforilazione vada ad influire sulla cinetica del trasporto *in vitro* e una mancanza di questa PTM non andrebbe invece a modificare il pool di STAT3 residente nel mitocondrio *in vivo* [4].

Le funzioni mitocondriali di STAT3 sono tutt'ora oggetto di studio ma sono ascrivibili alla sua capacità di regolare l'espressione di geni mitocondriali agendo in particolar modo sul *D-loop*, di interagire con i complessi della catena di trasporto degli elettroni (*electron transport chain*, ETC) e con il poro di transizione della permeabilità mitocondriale (*mitochondrial permeability transition pore*, mPTP) [4].

Per quanto riguarda l'interazione con il mPTP è emerso come STAT3 agisca da repressore per l'apertura del poro e questo può essere correlato con la morte cellulare ritardata in diversi tipi di cancro [4].

Per quanto riguarda l'interazione con i complessi della ETC, STAT3 influenza l'attività dei complessi I, II, III, IV e V potenziandone l'attività. STAT3 è inoltre responsabile di un cambiamento del metabolismo cellulare descritto effetto Warburg. Si è dimostrato come le cellule tumorali prediligano la produzione di ATP attraverso la glicolisi che risulta essere meno efficiente ma che prevede la sintesi di molecole necessarie per una rapida proliferazione. Questa riprogrammazione del metabolismo cellulare è però da attribuire all'attività nucleare di STAT3 grazie alla promozione dell'espressione del fattore di trascrizione HIF α . Al contrario invece nei tumori RAS-mutati pS727-STAT3 agisce a livello mitocondriale aumentando l'attività della ETC. Questo aumento di attività della ETC sembra essere poi correlato con l'aumento della concentrazione di ROS. Ciò d'altro canto spiega come la forma mitocondriale di STAT3 vada a influenzare il macchinario di sintesi del glutatione la cui sintesi in questi casi viene appunto aumentata per bilanciare l'aumento di ROS [4].

1.2.3. STAT3 e l'infiammazione durante la carcinogenesi

La maggior parte dei tumori, se non tutti, sono caratterizzati dalla presenza di cellule del sistema immunitario e cellule coinvolte nei processi infiammatori. L'infiammazione è coinvolta in diversi stadi della carcinogenesi ed è considerabile il settimo marcatore del cancro. L'infiammazione, in alcuni casi, sembra andare ad

ostacolare la crescita del tumore ma nella maggior parte dei casi sembra invece promuoverla. Durante le prime fasi di carcinogenesi, un microambiente infiammatorio sembra promuovere la proliferazione cellulare. Le cellule tumorali agiscono andando a modificare il proprio repertorio di antigeni con il fine di una minore immunogenicità ed inoltre modificano il microambiente tumorale affinché diventi immunosoppressivo. Topi knock-out hanno mostrato come NF- κ B e STAT3 siano regolatori chiave dell'infiammazione associata al cancro. L'attivazione costitutiva di NF- κ B è infatti riscontrabile in diversi tipi di cancro e controlla geni coinvolti nella proliferazione, invasione, angiogenesi e nel processo di metastatizzazione. Recenti studi hanno inoltre evidenziato come STAT3 sia coinvolta nel mantenimento di un ambiente pro-tumorale durante la carcinogenesi andando a sopprimere la risposta immunitaria antitumorale e promuovendo l'espansione di linfociti T regolatori [7].

2. Materiali e metodi

2.1. Modelli murini e linee cellulari

Gli esperimenti del lavoro trattato sono stati condotti sia su modelli murini sia su linee cellulari umane. Topi *Stat^{SA/SA}* (portatori di una mutazione in omozigosi tale per cui risultano deficitari per la fosforilazione della serina 727 di STAT3 in quanto questo allele presenta la sostituzione della serina con un'alanina non fosforilabile) e *Stat3^{-/+}* (eterozigoti per il knock out di STAT3 funzionante) sono stati opportunamente incrociati con topi *Kras^{G12D}* per ottenere doppi mutanti i quali sono stati soggetti di studio attraverso il confronto con i parentali *Kras^{G12D}* e con topi *wild type*. L'attivazione dell'oncogene *KRAS* nei topi *Kras^{G12D}*, *Kras^{G12D}:Stat^{SA/SA}* e *Kras^{G12D}:Stat3^{-/+}* è stata eseguita a sei settimane di vita tramite somministrazione intranasale di Cre-ricombinasi adenovirale. I topi sono stati cresciuti in condizioni prive di patogeni e sono stati abbattuti a sei o dodici settimane dall'attivazione di *KRAS*.

Per quanto riguarda le linee cellulari, sono state impiegate la linea A549 e la linea NCI-H1299, due linee cellulari di adenocarcinoma polmonare (*lung adenocarcinoma*, LAC) umano rese knock-out per l'esone 3 del gene *STAT3* tramite editing genomico mirato operato con il sistema CRISPR/Cas9. Oltre alle linee di controllo (CTL) esprimenti *STAT3* endogeno e le linee cellulari knock-out per *STAT3* (*STAT3-KO*), attraverso trasduzione con lentivirus si sono ottenute le linee *STAT3-SA* (esprimenti una forma di *STAT3* difettiva per la fosforilazione del residuo di serina 727 in quanto sostituita con un'alanina non fosforilabile), *STAT3-YF* (difettiva per la fosforilazione del residuo di tirosina 705), *STAT3-SA/YF* (difettiva per la fosforilazione sia del residuo di tirosina 705 sia del residuo di serina 727), *STAT3-WT* (esprimenti la forma *wild type* di *STAT3*) e *STAT3-MTS* (esprimenti una forma di *STAT3* con sequenza di importazione al mitocondrio).

2.2. Immunoistochimica

L'immunoistochimica permette di andare a visualizzare in un preparato istologico la presenza di una proteina di interesse grazie all'impiego di un anticorpo. La

marcatura può essere diretta o indiretta a seconda se l'anticorpo ad essere marcato sia quello primario o quello secondario. Tali anticorpi possono essere coniugati ad un fluoroforo, ed in questo caso si parla di immunofluorescenza, oppure ad un enzima che, se incubato con apposito substrato, fa precipitare in situ un prodotto cromogeno.

2.3. Western Blot

Il Western-Blot è una tecnica che permette di riconoscere una banda corrispondente ad una proteina di interesse su una membrana, all'interno di un pattern di bande ottenuto mediante separazione elettroforetica, grazie ad un anticorpo marcato rivolto verso la proteina di interesse. È utile per verificare la presenza in un lisato proteico della proteina target oppure, grazie all'utilizzo di software informatici che confrontino l'intensità delle bande, per confrontare livelli di espressione della proteina in condizioni diverse. Oltre al Western-Blot gli autori utilizzano anche un'altra metodica, l'Oxyblot, che prevede l'utilizzo di un anticorpo che non vada a riconoscere specificamente una proteina ma che riconosca le proteine ossidate dai ROS dopo una reazione di derivatizzazione che prevede la sostituzione dei gruppi carbonile introdotti dai ROS con 2,4-dinitrofenilidrazina che viene riconosciuta dall'anticorpo marcato.

2.4. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

La qRT-PCR permette di andare a determinare i valori di espressione assoluta o relativa dei trascritti (precedentemente retrotrascritti a cDNA) grazie alla rilevazione della fluorescenza ad ogni ciclo di amplificazione. Per ogni reazione viene registrato il ciclo soglia ovvero quel ciclo a cui la fluorescenza diventa rilevabile. Trascritti più abbondanti raggiungeranno questo valore in meno cicli. Il confronto dei cicli soglia permette di stabilire i rapporti di espressione relativi tra geni diversi o tra lo stesso gene in condizioni diverse e grazie ad un modello matematico è possibile determinare questo rapporto di espressione normalizzato per un gene reference ovvero un gene la cui espressione si assume essere costante [8].

2.5. Saggio di crescita di colonie su agar

Questo saggio è finalizzato a valutare la capacità di cellule tumorali di crescere e formare colonie. Le cellule tumorali possono crescere non adese alla matrice e questo saggio permette di valutare il tasso di proliferazione relativo andando a confrontare il numero di colonie formatesi su una piastra di agar+medium di crescita cellulare a parità di cellule seminate. Nel lavoro in esame sono stati utilizzati anche altri test per valutare la capacità proliferativa. Il saggio del cristal-violetto va a stimare il tasso proliferativo confrontando le diverse quantità di colorante trattenute dalle cellule dei vari campioni e che si assumono essere vitali. Il saggio dell'ATP invece stima questo tasso andando a confrontare le diverse quantità di ATP dei diversi campioni; in questo caso la concentrazione di ATP viene

determinata attraverso una reazione chemio-luminescente catalizzata dalla luciferasi.

2.6. Saggio TUNEL

TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) è un saggio che permette di identificare e quantificare le cellule apoptotiche tramite l'etichettatura fluorescente delle estremità 3' generate durante la frammentazione del DNA ad opera delle DNasi attivate da caspasi (*caspase-activated DNase, CAD*) come risultato dell'attivazione del pathway di morte cellulare programmata. Il tessuto in analisi deve essere fissato, ad esempio in formaldeide, e permeabilizzato. Quindi vengono aggiunti l'enzima deossinucleotidil-transferasi terminale, o TdT, e la deossiuridina trifosfato, o dUTP, etichettata con un fluoroforo. Una volta aggiunti i reagenti, i dUTP fluorescenti vengono attaccati alle estremità 3' del DNA frammentato nelle cellule apoptotiche grazie all'enzima catalizzatore TdT. Quindi attraverso un'analisi della fluorescenza è possibile identificare e quantificare le cellule apoptotiche.

2.7. Seahorse assay

Il Seahorse è un saggio che permette di valutare l'attività metabolica di cellule vive. La respirazione viene monitorata tramite l'indice OCR (*oxygen consumption rate*) mentre la glicolisi tramite l'acidificazione extracellulare (*extracellular acidification rate, ECAR*). In entrambi i casi quello che si fa è misurare questi indici nelle condizioni basali e poi come cambiano quando sono aggiunti specifici inibitori dei protagonisti di queste due vie metaboliche. Nel caso della respirazione, per prima si aggiunge l'oligomicina (che inibisce il complesso V della catena respiratoria), poi FCCP (*carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxy-yphenyl-hydrazon*, un disaccoppiante del flusso protonico che quindi fa aumentare l'attività dei complessi della catena respiratoria e quindi anche il consumo di ossigeno) ed infine rotenone e antimicina (che inibiscono i complessi III e I e di fatto si blocca completamente la respirazione per ottenere il valore di consumo di ossigeno non derivato dalla respirazione mitocondriale). Nel caso della glicolisi, come prima cosa si fornisce solo glucosio nel medium per misurare il consumo basale, poi si aggiunge oligomicina (che inibendo il complesso V della catena respiratoria dovrebbe aumentare di molto il consumo di glucosio) ed infine 2-deossi-D-glucosio (che blocca completamente la glicolisi).

Per andare a valutare ulteriormente cambiamenti nel metabolismo cellulare, gli autori hanno anche eseguito il saggio del lattato che ha permesso loro di andare a determinare la quantità di lattato attraverso una reazione colorimetrica ed una lettura allo spettrofotometro.

2.8. Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

Si tratta di una tecnica in vivo utilizzata per saggiare l'interazione tra proteine e DNA. Prevede un primo step di cross-linking con formaldeide per stabilizzare le interazioni DNA-proteina. Quindi si estrae e si frammenta la cromatina. A questo

punto si esegue una immunoprecipitazione: si aggiunge l'anticorpo specifico per la proteina di interesse e, attraverso delle *beads* rivestite di proteine che leghino la porzione costante di questo anticorpo, si recuperano i frammenti di cromatina legati dalla proteina di cui si sta saggiando l'interazione. Quindi, vengono rotti i legami DNA-proteina e si degradano le proteine o si separa il DNA dalle proteine attraverso un'estrazione fenolo-cloroformio. A questo punto si è ottenuto un arricchimento di frammenti di DNA legati dalla proteina. Se l'obiettivo è verificare se la proteina interagisce con una regione di DNA d'interesse si può verificare la presenza di questa sequenza nell'arricchimento con tecniche quali qRT-PCR o microarray, altrimenti è possibile eseguire un sequenziamento per identificare tutte le sequenze che sono state immunoprecipitate e dal loro confronto è possibile ottenere la sequenza consenso legata dalla proteina.

3. Risultati

3.1. Espressione costitutiva di pSTAT3

Dall'analisi istochimica di sezioni polmonari di un gruppo di soggetti affetti da LAC, diviso in due sottogruppi a seconda che presentassero o meno mutazione di *KRAS*, sono emersi risultati contrastanti per quanto riguarda il numero di cellule positive per la presenza di pS₇₂₇-STAT3 e di pY₇₀₅-STAT3 rispetto ad individui di controllo ovvero soggetti non affetti da LAC. Infatti, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa nel numero di cellule positive per pS₇₂₇-STAT3 tra i soggetti di controllo ed i soggetti affetti da LAC, sia che presentassero *KRAS* mutato che *KRAS* nella forma *wild type* (Fig.1). Queste sono risultate essere distribuite sia nelle cellule epiteliali sia in quelle immunitarie con intensità maggiore in quelle epiteliali (Fig.1). Per quanto riguarda invece pY₇₀₅-STAT3, il numero di cellule positive in questo caso è emerso essere maggiore nei soggetti affetti da LAC con *KRAS* mutato (Fig.1). Inoltre, è emerso come nelle cellule epiteliali la localizzazione, sia per quanto riguarda pS₇₂₇-STAT3 sia pY₇₀₅-STAT3, risulti principalmente nucleare mentre nelle cellule immunitarie questa sia anche citosolica.

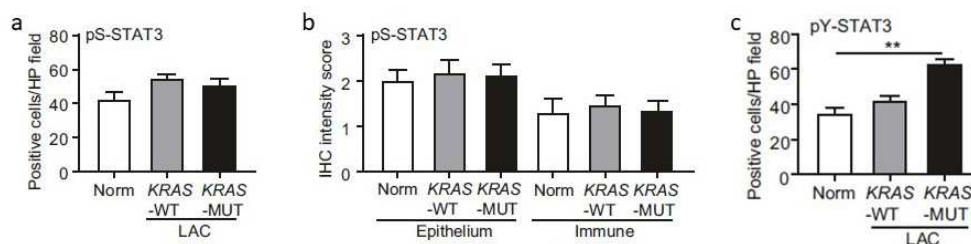


Figura 1. (a) Quantificazione delle cellule positive per pS₇₂₇-STAT3 nei soggetti di controllo e soggetti affetti da LAC. (b) Intensità della colorazione delle cellule positive per pS₇₂₇-STAT3. (c) Quantificazione delle cellule positive per pY₇₀₅-STAT3 nello stesso gruppo di individui.

Analogamente è stata quindi eseguita un'analisi istochimica delle sezioni polmonari di modelli murini in cui si è indotto il fenotipo 'sviluppo di LAC' attraverso l'attivazione dell'allele *Kras*^{G12D} grazie alla somministrazione intranasale di Cre-ricombinasi virale. Dal confronto tra parenchima non

presentanti LAC, siano essi di topi aventi genotipo $Kras^{WT}$ che $Kras^{G12D}$, non sono emerse differenze statisticamente significative nel numero di cellule positive per pS727-STAT3 e la colorazione è risultata essere sia nucleare sia citoplasmatica con intensità maggiore nei topi $Kras^{G12D}$ rispetto ai topi $Kras^{WT}$. Dal confronto tra gli stessi campioni, l'analisi per le cellule positive per pY705-STAT3 ha invece fatto emergere un numero maggiore di cellule positive nel parenchima dei topi $Kras^{G12D}$. In più, confrontando il numero di cellule tumorali positive per l'espressione di pY705-STAT3 e pS727-STAT3, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa nei topi $Kras^{G12D}$ (Fig. 2).

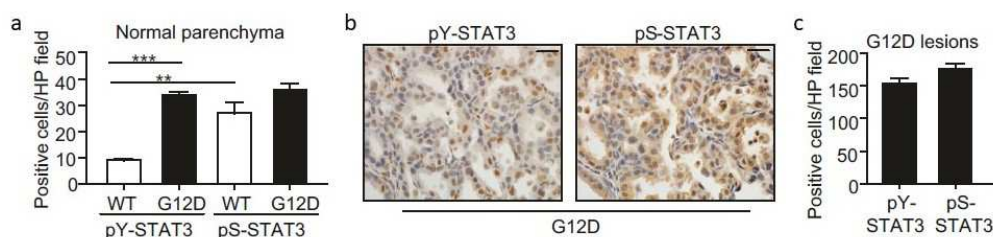


Figura 2. (a) Quantificazione delle cellule positive per pS727-STAT3 e per pY705-STAT3 nel parenchima polmonare dei topi $Kras^{WT}$ e $Kras^{G12D}$. (b) Fotomicrografia delle lesioni nelle sezioni polmonari di topi $Kras^{G12D}$ colorate con anticorpi contro per pS727-STAT3 e pY705-STAT3. (c) Quantificazione delle cellule positive per pS727-STAT3 e per pY705-STAT3 nelle lesioni dei topi $Kras^{G12D}$.

L'espressione di pS727-STAT3 quindi risulta essere principalmente nucleare sia nelle cellule degli epiteli non affetti sia delle lesioni mentre pY705-STAT3, espresso anche questo principalmente a livello nucleare, risulta essere sovra-espresso solo nelle lesioni con mutazione di $Kras$.

3.2. Inibizione del fenotipo LAC come conseguenza dell'assenza della fosforilazione della serina di STAT3

Per verificare se pS727-STAT3 fosse in qualche modo coinvolta nello sviluppo di LAC in seguito all'attivazione dell'oncogene $KRAS$, è stato confrontato il fenotipo 'sviluppo di LAC' nei topi $Kras^{G12D}$ rispetto ai topi $Kras^{G12D}; Stat^{SA/SA}$. L'assenza di pS727-STAT3 è stata verificata utilizzando un immunoblot e sono stati verificati livelli inalterati di pY705-STAT3 nei polmoni dei topi $Kras^{G12D}; Stat^{SA/SA}$ rispetto ai parentali $Kras^{G12D}$ (Fig.3). In entrambi i casi l'attivazione dell'oncogene $Kras$ è avvenuta previa somministrazione intranasale di Cre-ricombinasi adenovirale e quello che si è fatto è stato valutare il fenotipo sviluppato a sei e dodici settimane da questa attivazione. Ciò che è emerso dalle valutazioni istopatologiche dalle sezioni dei polmoni dei due modelli a sei settimane è stata una riduzione di circa 2.5 volte del tessuto tumorale nei topi $Kras^{G12D}; Stat^{SA/SA}$ rispetto ai topi $Kras^{G12D}$, con un numero inferiore di lesioni tra cui piccole e diffuse AAH (iperplasia adenomatosa atipica) e rari adenocarcinomi. In accordo con la soppressione del fenotipo LAC nei topi $Kras^{G12D}; Stat^{SA/SA}$, si è osservata inoltre una significativa riduzione del numero di cellule epiteliali alveolari di tipo II positive alla colorazione per TTF-1, un indicatore di LAC, rispetto ai parentali $Kras^{G12D}$ (Fig.3). I risultati raccolti a 12 settimane dall'attivazione di $KRAS$ sono risultati essere in linea con i precedenti: nei topi $Kras^{G12D}; Stat^{SA/SA}$ si sono riscontrate lesioni principalmente

limitate agli stadi iniziali di AAH; al contrario, il 100% delle lesioni nei topi *Kras*^{G12D} erano invece evolute in LAC. Nonostante studi precedenti avessero riscontrato differenze significative nello sviluppo di questo fenotipo tra i due sessi in condizioni simili, i dati raccolti in questo caso non hanno evidenziato discrepanze tra maschi e femmine. Quindi si può concludere che i livelli di pY₇₀₅-STAT3 risultano inalterati nonostante l'assenza della fosforilazione della serina e che la fosforilazione della serina 727 è un elemento chiave nel ruolo pro-oncogeno di STAT3 nell'induzione della carcinogenesi tumorale con KRAS-mutato.

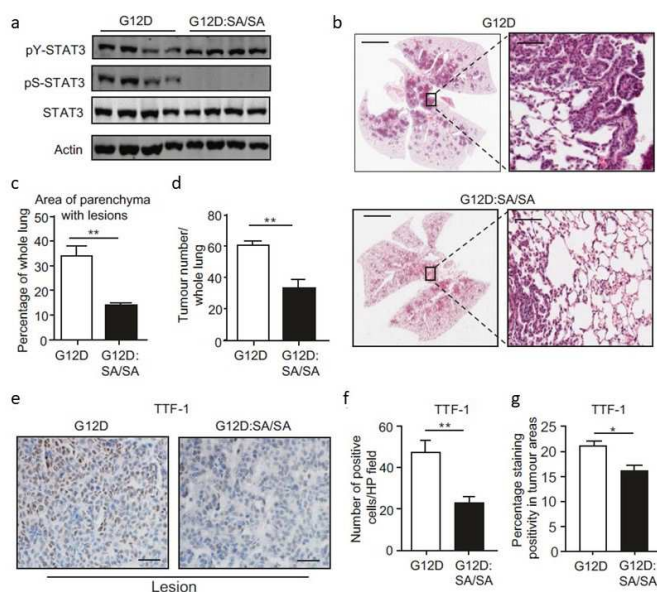


Figura 3. (a) Immunoblot dei lisati proteici da tessuto polmonare di topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA} e *Kras*^{G12D}. (b) Fotomicrografia di sezioni polmonari di topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA} e *Kras*^{G12D} colorate con ematosilina ed eosina. (c) Quantificazione della percentuale di parenchima polmonare presentante AAH e lesioni adenocarcinose e (d) numero di lesioni presenti nell'intero polmone dei topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA} e *Kras*^{G12D}. (e) Fotomicrografia delle sezioni polmonari dei topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA} e *Kras*^{G12D} colorate per TTF-1. (f) Quantificazione delle cellule positive per TTF-1 nelle lesioni polmonari e (g) percentuale di colorazione nelle aree tumorali.

3.3. pS₇₂₇-STAT3 induce proliferazione delle cellule polmonari in LAC KRAS mutato

Riscontrata quindi questa soppressione del fenotipo LAC negli organismi mutati per non esprimere pS₇₂₇-STAT3 e poiché precedenti studi avevano associato pS₇₂₇-STAT3 ad un aumento della proliferazione cellulare, è stata eseguita un'analisi immunoistochimica sui tessuti polmonari dei topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA} e *Kras*^{G12D} per valutare il numero di cellule positive per la presenza di PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), una proteina ausiliaria della DNA polimerasi δ in grado di aumentarne la processività e che viene considerata un marker proliferativo. Quello che è emerso è stata una riduzione di circa 2.5 volte del numero di cellule positive per PCNA nel parenchima polmonare sia con lesioni sia privo di lesioni dei topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA}. Questa osservazione, in linea con i risultati precedentemente ottenuti, è rafforzata dalla diminuita espressione nei polmoni di topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA} di regolatori della proliferazione cellulare, ad esempio il fattore di trascrizione *Myc*, evidenziata da altri studi.

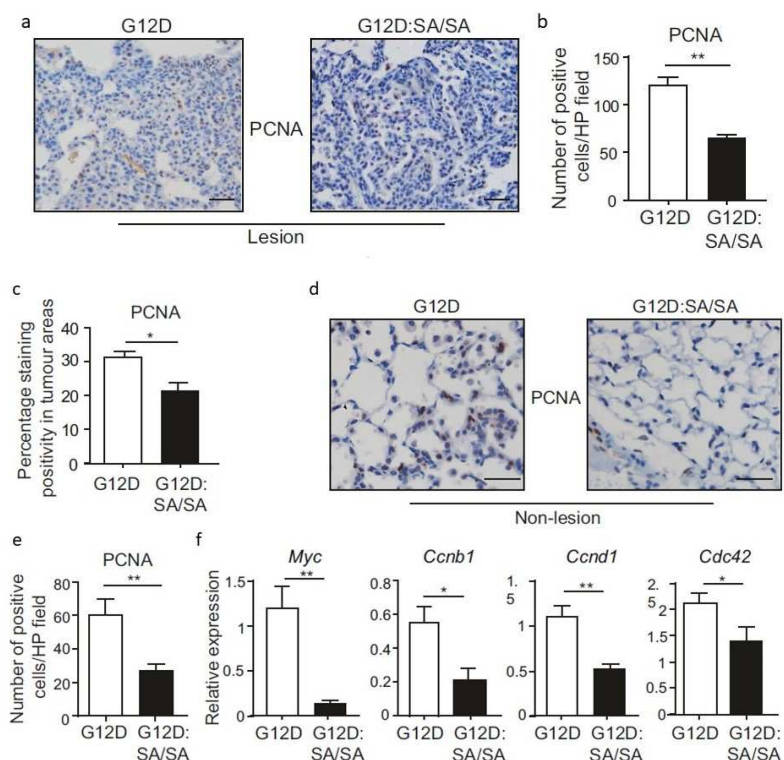


Figura 4. (a) Fotomicrografia delle sezioni polmonari dei topi $Kras^{G12D}; Stat^{SA/SA}$ e $Kras^{G12D}$ colorate con anticorpi contro PCNA. (b) Quantificazione delle cellule positive per PCNA per campo visivo e (c) percentuale di colorazione nelle aree tumorali. (d) Fotomicrografia del parenchima polmonare privo di lesioni di topi $Kras^{G12D}; Stat^{SA/SA}$ e $Kras^{G12D}$ colorato con anticorpi contro PCNA. (e) Quantificazione delle cellule positive per PCNA nel parenchima polmonare privo di lesioni dei topi $Kras^{G12D}; Stat^{SA/SA}$ e $Kras^{G12D}$. (f) Analisi di qRT-PCR per l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare.

Raccolti questi dati per quanto riguarda il modello topo, rimaneva la questione se lo stesso avvenisse anche in uomo. Per rispondere a questa domanda sono state utilizzate due linee cellulari di LAC umane, A549 e NCI-H1299, ingegnerizzate come precedentemente descritto. Il potenziale di crescita è quindi stato saggiato attraverso il saggio di formazione di colonie su soft agar, saggio del cristal-violetto e saggio dell'ATP. Quello che è emerso è stato che le cellule STAT-KO mostravano un numero significativamente ridotto di colonie formate, una ridotta proliferazione ed una ridotta vitalità rispetto al controllo esprimente STAT3 endogeno (CTL) o cellule trasdotte con STAT3-WT o STAT3-YP. Un fenotipo del tutto simile a quello delle cellule STAT3-KO caratterizza le cellule esprimenti STAT3-SA e STAT3-SA/YF. Al contrario invece la crescita delle cellule trasdotte con STAT3-MTS è risultata essere paragonabile a quella delle cellule esprimenti STAT3-WT o STAT3-YP. Questi dati, dunque, confermano il coinvolgimento di pS727-STAT3 nel determinare il potenziale proliferativo della cellula e il ripristino di un'attività proliferativa comparabile al CTL o alle cellule esprimenti STAT3-WT nelle cellule esprimenti STAT3-MTS suggerisce come la forma mitocondriale di STAT3 sia sufficiente per determinare il potenziale proliferativo in questo tipo di cellule.

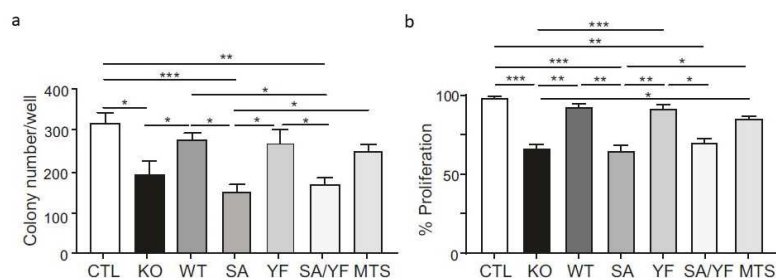


Figura 5. Grafici raffiguranti i dati ottenuti con il saggio di crescita di colonie su soft agar (a) e con il saggio del cristal-violetto per la proliferazione cellulare (b) eseguiti sulle linee cellulari A549.

È stato poi eseguito il saggio TUNEL sui modelli murini per vedere se fosse riscontrabile una differenza nel numero di apoptosi tra i topi *Kras*^{G12D}: *Stat*^{SA/SA} e i topi *Kras*^{G12D}. Sorprendentemente la quantità di apoptosi è risultata minima e comparabile tra i due genotipi. Inoltre, nonostante sia noto che KRAS scateni una risposta infiammatoria nei polmoni, il numero di cellule del sistema immunitario nei polmoni è comparabile tra i due genotipi. Perdi più, la soppressione della tumorigenesi polmonare nei topi *Kras*^{G12D}: *Stat*^{SA/SA} risulta essere indipendente dall'espressione di numerosi geni infiammatori.

3.4. pS₇₂₇-STAT3 contribuisce alla riprogrammazione del metabolismo in LAC KRAS mutato

La carcinogenesi indotta da KRAS è associata con una mal regolazione delle funzioni mitocondriali. La colorazione istochimica con il marcatore della funzione mitocondriale TOM20, indica elevati livelli di intensità di colorazione nei polmoni di pazienti con mutazione in *KRAS* rispetto ai pazienti con *KRAS WT*. Dal momento in cui un metabolismo mitocondriale non regolato e lo stress ossidativo conferiscono un vantaggio alle cellule tumorali e poiché pS₇₂₇-STAT3 è coinvolta nella regolazione della fosforilazione ossidativa mitocondriale e quindi nella produzione di ROS, si è andati a studiare se pS₇₂₇-STAT3 modulasse lo stress ossidativo in LAC indotto da mutazione in *KRAS*. L'analisi tramite Oxyblot ha mostrato maggiori livelli di ROS nei lisati polmonari da topi portatori di tumore con *Kras* mutato rispetto a controlli sani con *Kras wild type* e che questi alti valori diminuivano significativamente nei topi *Kras*^{G12D}: *Stat*^{SA/SA}. In accordo con il fatto che l'aumento della glicolisi aerobica e l'associato metabolismo del glucosio in lattato sono una caratteristica delle cellule tumorali nota con l'effetto Warburg, elevati livelli di produzione di lattato vengono significativamente ridotti nei tumori polmonari dei topi *Kras*^{G12D}: *Stat*^{SA/SA} e questi ultimi sono comparabili a quelli misurati in individui non affetti da tumore e con *Kras wild type*.

Si è poi andati a vedere se un comportamento simile fosse anche riscontrabile in linee cellulari umane (A549). Ciò che è emerso è che i livelli di lattato nel surnatante delle cellule STAT3-SA è significativamente minore rispetto a quello dei controlli o delle cellule STAT3-WT e simile a quello delle cellule STAT3-KO. In più i livelli di lattato riscontrabili nelle cellule STAT3-MTS sono significativamente

maggiori rispetto a quelli sia STAT3-SA sia STAT3-KO e raggiungono quasi quelli registrati in CTL e STAT3-WT.

È stato poi eseguito il saggio Seahorse sulle stesse cellule per misurare l'Oxygen consumption rate (OCR) e l'acidificazione extracellulare (ECAR) che sono indicatori rispettivamente della respirazione mitocondriale e della glicolisi. Ciò che è emerso è che nelle cellule che esprimono STAT3-SA, in modo simile alle cellule STAT3-KO, sia OCR sia ECAR risultano essere ridotti rispetto alle cellule di controllo, a quelle trasdotte con STAT3-MTS e, come ulteriore controllo, a quelle trasdotte con STAT3-YP. Questi dati suggeriscono quindi in LAC umano *KRAS* mutato pS727-STAT3 probabilmente sia coinvolta nella regolazione del metabolismo mitocondriale.

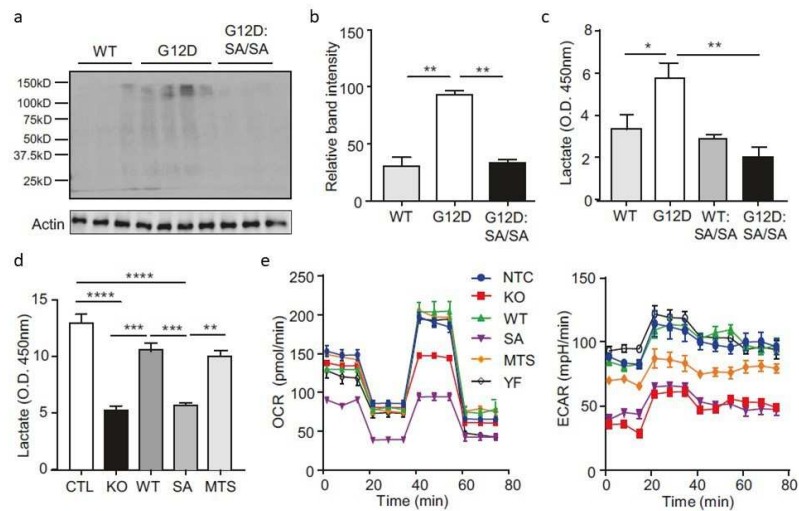


Figura 6. (a) Livelli di carbosilazione delle proteine determinati tramite Oxyblot dei lisati proteici polmonari di topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA}, *Kras*^{G12D} e *Kras*^{WT} e (b) quantificazione dell'intensità delle bande dell'Oxyblot normalizzati rispetto all'actina. Saggio del lattato eseguito sui lisati polmonari (c) e sulle linee cellulari A549 (d). (e) OCR e ECAR misurati con il kit Seahorse sulle linee cellulari A549.

3.5. pS727-STAT3 aumenta la trascrizione di geni nucleari regolatori delle funzioni mitocondriali e del metabolismo energetico in LAC indotto dall'oncogene KRAS

Si sono quindi analizzate le basi molecolari della disregolazione del metabolismo mitocondriale in LAC-KRAS mutato sia *in vitro* sia *in vivo*. L'espressione di geni mitocondriali per componenti chiave dei complessi enzimatici della fosforilazione ossidativa (MT-ND1 e MT-ATP6) risulta significativamente ridotta sia nei topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA} rispetto ai topi *Kras*^{G12D}, sia nelle cellule A549 STAT3-SA rispetto a CTL o STAT3-WT. Poiché è stato dimostrato che il target genetico di TFAM (*master mitochondrial transcriptional regular*) va a sopprimere la tumorigenesi polmonare indotta da *Kras*^{G12D}, si è considerata la possibilità che pS727-STAT3 possa in qualche modo influenzare la capacità trascrizionale a livello mitocondriale di TFAM. Attraverso qRT-PCR e Western-blot, si è vista un'importante riduzione del livello di mRNA e di proteina espressa di TFAM nei topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA} rispetto ai topi *Kras*^{G12D}. Anche nelle cellule A549 STAT3-SA si è vista una riduzione dei livelli

di mRNA di *TFAM* paragonabile a quella riscontrata nelle cellule STAT3-KO. La soppressione di *TFAM*, un gene nucleare, sia nei topi sia nelle cellule LAC umane è simile alla riduzione di geni nucleari regolati da STAT3, *SOCS3*, *HIF1A* e *MYC* (quest'ultimo un regolatore chiave del metabolismo e della glicolisi in cellule tumorali). La necessità della localizzazione nucleare di STAT3 per l'induzione di questi geni è confermata dal fatto che i livelli di espressione di *SOCS3*, *HIF1A*, *MYC* e *TFAM* sono significativamente ridotti nelle cellule A549 STAT3-MTS rispetto a CTL e STAT3-WT.

Per investigare se *TFAM* sia un target diretto dell'attività trascrizionale di STAT3 è stata eseguita una ChIP in vivo nei polmoni di topi *Kras*^{G12D}:*Stat*^{SA/SA} e *Kras*^{G12D}. Per controllare di eseguire una precipitazione di un equivalente pool di STAT3 attiva tra i due genotipi, sono stati impiegati anticorpi contro pY-STAT3 che hanno mostrato livelli simili di espressione nei polmoni di topi *Kras*^{G12D}:*Stat*^{SA/SA} e *Kras*^{G12D}. Quello che è emerso è che STAT3 veniva reclutata da una putativa sequenza consenso TTCCc/gGGAA nel promotore endogeno di *Tfam* con affinità comparabile tra *Kras*^{G12D}:*Stat*^{SA/SA} e *Kras*^{G12D}. Risultato analogo circa la sequenza di legame a livello promotoriale per STAT3 è emerso anche per i geni regolati da STAT3, *Hif1a*, *Myc* e *Socs3*. Questo suggerisce che il reclutamento di STAT3 in queste regioni promotoriali sia indipendente dalla fosforilazione della serina e quindi per spiegare la differenza di espressione tra i genotipi *Kras*^{G12D}:*Stat*^{SA/SA} e *Kras*^{G12D}, ci si è focalizzati sulla possibilità che la mancanza della fosforilazione della serina potesse impattare a livello di inizio della trascrizione o dell'elongazione da parte dell'RNA polimerasi II. È stata quindi eseguita una ChIP in vivo nei polmoni dei topi *Kras*^{G12D}:*Stat*^{SA/SA} e *Kras*^{G12D} con anticorpi contro la fosforilazione della serina 5 e 2 del dominio C-terminale dell'RNA pol. Il che sono associate rispettivamente all'inizio della trascrizione ed all'elongazione. È emerso un accumulo di pSer5 Pol II nei promotori attivi di *Tfam*, *Hif1a* e *Myc* significativamente minore nei tessuti polmonari di topi *Kras*^{G12D}:*Stat*^{SA/SA} rispetto ai topi *Kras*^{G12D}. Al contrario i livelli di pSer2 RNA Pol II legata a questi geni sono comparabili tra i due genotipi. Stessi risultati sono stati ottenuti per *TFAM* e *MYC* nelle cellule LAC A549 che esprimono STAT3-SA rispetto STAT3-WT. Questo suggerisce un'attività di pS727-STAT3 nella regolazione dell'espressione di geni nucleari importanti per le funzioni mitocondriali e per il metabolismo in LAC principalmente potenziando l'inizio della trascrizione da parte dell'RNA Pol. Il ma non l'elongazione.

3.6. Eterozigosi per l'espressione di STAT3 in topi *Kras*^{G12D} mostra un fenotipo sovrapponibile a quello del genotipo *Kras*^{G12D}:*Stat*^{SA/SA}.

Per verificare i risultati precedentemente descritti, si è proceduto con l'analizzare il fenotipo di topi *Kras*^{G12D} con un *background* eterozigote per la presenza di una forma di STAT3 funzionante (*Kras*^{G12D}:*Stat3*^{-/+}) in modo da ottenere informazioni anche circa le conseguenze di un pool di STAT3 ridotto del 50% rispetto alla condizione selvatica. Come i topi *Kras*^{G12D}:*Stat*^{SA/SA}, anche i topi *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{-/+}

mostrano una soppressione del fenotipo LAC con riduzione del numero di cellule positive per TTF-1 e PCNA nei polmoni e riduzione dell'espressione dei geni *Tfam*, *Hif1a* e *Myc*. Dunque, la mancanza della fosforilazione della serina porta ad un miglioramento del fenotipo LAC, sia nei topi i topi *Kras*^{G12D}: *Stat*^{SA/SA} sia nei topi *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{-/+}; considerando che un deficit nel livello di pY-STAT3 è presente solo nel genotipo *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{-/+}, è ragionevole supporre che la fosforilazione della serina 727 di STAT3 espleti la sua azione oncogena potenziando l'induzione di LAC in un background KRAS mutato.

4. Discussione e conclusione finale

Obiettivo del lavoro di *Alhayani et al. [2021]* era quello di valutare il diverso sviluppo dell'adenocarcinoma polmonare in modelli murini in funzione del diverso *background* genetico. Quello che è emerso è che la fosforilazione della serina 727 di STAT3 risulta essere condizione necessaria per lo sviluppo di un fenotipo tumorale indotto dall'oncogene *KRAS*. Il fatto che nelle linee cellulari di LAC umano la forma mitocondriale sia in grado di ripristinare lo stesso potenziale proliferativo delle cellule rispetto a quelle esprimenti STAT3-WT o le cellule di controllo suggerisce la possibilità che sia il pool mitocondriale di STAT3 a supportare la trasformazione indotta da *KRAS*. Per chiarire questo aspetto e per poter verificare queste deduzioni in un sistema *in vivo*, potrebbe essere utile verificare quest'ipotesi utilizzando un modello murino *Kras*^{G12D}: *Stat*^{SA/SA} opportunamente ingegnerizzato per esprimere anche un costrutto esogeno codificante per una forma mitocondriale di STAT3, posto possibilmente sotto il controllo di un promotore tessuto specifico in modo che questo costrutto esogeno venga espresso solo a livello polmonare, andando quindi ad evitare possibili alterazioni al di fuori dei polmoni. L'integrazione nel genoma di topo può essere fatta avvenire in modo efficiente attraverso l'iniezione di DNA esogeno nei pronuclei allo stadio di zigote; questa tecnica permette l'integrazione casuale e stabile del materiale genetico iniettato nel genoma del topo [9]. Se infatti, a seguito dell'attivazione del gene *Kras* tramite somministrazione intranasale di Cre-ricombinasi, questi topi dovessero sviluppare il fenotipo sviluppo tumorale in modo analogo ad un controllo *Kras*^{G12D}, allora si potrebbe affermare che il pool mitocondriale fosforilabile a livello della serina 727 sia sufficiente a supportare la trasformazione indotta dall'oncogene *KRAS*. Al contrario, se si dovesse riscontrare la stessa soppressione del fenotipo tumorale riscontrata nei topi *Kras*^{G12D}: *Stat*^{SA/SA} allora la funzione di supporto alla trasformazione indotta da *KRAS* non sarebbe attribuibile al pool mitocondriale ma solo alla presenza di una forma di STAT3 fosforilabile a livello della serina 727 che quindi agirebbe anche al di fuori del mitocondrio, probabilmente a livello nucleare dove potrebbe andare ad influenzare la trascrizione di alcuni geni. Se questa seconda ipotesi dovesse risultare vera, si potrebbero valutare le differenze di espressione di putativi geni target attraverso analisi quali qRT-PCR, microarray e RNA seq. Tuttavia, i risultati presentati in questo lavoro ottenuti dalle linee cellulari di LAC umano farebbero protendere più

per la prima opzione anche se non è possibile escludere la seconda opzione a priori perché non è detto che *in vitro* si ottengano gli stessi risultati ottenibili *in vivo*; inoltre non è detto che si ottengano gli stessi risultati in organismi che, seppur molto simili, presentano comunque differenze.

Gli autori nel loro lavoro hanno utilizzato più volte l'immunoistochimica per determinare il numero di cellule positive a diversi marcatori/proteine in un HPF (*high power field*). Per confermare tali risultati si sarebbero potute eseguire anche delle qRT-PCR o dei Western Blot per valutare i diversi livelli di espressione di queste proteine tra i diversi genotipi in modo da avere anche una differenza in termini quantitativi a parità di massa di tessuto di partenza. Inoltre, per una più precisa stima del numero di cellule positive per un dato marcatore o comunque per validare i dati dell'immunoistochimica, si sarebbero potute eseguire delle analisi al citofluorimetro.

Altro possibile punto critico è l'esiguo numero di modelli murini presi in esame (solo 6). Nonostante i valori di *p-value* dimostrino che le statistiche riportate nel lavoro siano robuste, l'esiguo numero di modelli analizzati può, in qualche modo, aver influenzato il risultato che quindi potrebbe essere ancora più convincente con un campione più vasto. Sicuramente la scelta di analizzare solo sei modelli murini è stata dettata dai costi associati a questo modello che non permette di fatto studi su larga scala. Per ovviare a questo inconveniente sarebbe necessario valutare l'impiego di altri modelli polmonati dai costi ed esigenze più ridotte. Allo stesso tempo si dovrebbe però rinunciare alla vicinanza del modello murino con il modello umano.

La dipendenza da pS727-STAT3 dei tumori indotti da KRAS suggerisce la possibilità che questo possa diventare un target terapeutico. Diminuendo infatti la quantità di pS727-STAT3 si potrebbero ottenere risultati simili alla repressione del fenotipo LAC dei topi *Kras*^{G12D}: *Stat*^{SA/SA}. In questo caso target terapeutico potrebbe essere il pathway MEK-ERK ma questa possibilità è ostacolata dal fatto che la fosforilazione della serina può essere operata da diverse chinasi anche quando il pathway principale viene inibito. Primo passo in questa direzione potrebbe essere un'analisi *in vitro* utilizzando linee cellulari umane di LAC con forma WT di STAT3. Si potrebbe eseguire un saggio di crescita di colonie su agar confrontando la crescita di cellule non trattate rispetto a cellule trattate con un inibitore del pathway MEK-ERK. Se l'inibizione del pathway *in vitro* dovesse risultare in una minor capacità proliferativa delle cellule tumorali, allora si potrebbe identificare negli elementi di questa via di segnalazione dei possibili target terapeutici. Se questo dovesse avere successo, la difficoltà sarebbe individuare un modo per veicolare il farmaco affinché agisca specificamente sulle cellule tumorali e allo stesso tempo con effetti collaterali minimi.

Il lavoro di *Alhayyani et al. [2021]* si inserisce comunque in un contesto più ampio per cui si sta ormai abbandonando l'idea che la fosforilazione della serina 727 abbia solo la funzione di potenziare l'attività canonica di STAT3. Risultati del tutto analoghi a quelli ottenuti in questo lavoro sono stati dimostrati anche da *Balic et*

al. [2019] che invece hanno analizzato la dipendenza oncogenica della fosforilazione della serina nel tumore allo stomaco umano. Quello che è emerso dal loro studio è stata una comparabile soppressione del fenotipo tumorale nei topi esprimenti una forma di STAT3 non fosforilabile a livello della serina 727. Anche in questo lavoro è stata poi dimostrata la capacità di STAT3 di influenzare la trascrizione agendo sull'RNA pol. Il ma in questo caso gli autori sono giunti alla conclusione opposta. La forma fosforilata a livello della serina 727, secondo i dati da loro raccolti, non andrebbe ad influenzare il reclutamento e l'inizio della trascrizione quanto l'elongazione [10]. Risultano quindi necessarie ulteriori evidenze per stabilire quale sia la natura dell'influenza di pS₇₂₇-STAT3 sull'attività dell'RNA pol. Il oppure se l'influenza sull'attività dell'RNA pol. Il sia tessuto-specifica.

Rimane poi da chiarire la questione di come STAT3 possa andare a riprogrammare il metabolismo cellulare in direzioni opposte. Abbiamo detto come l'attività nucleare porti la cellula ad esprimere un set di geni responsabili dell'effetto Warburg mentre il pool mitocondriale pS₇₂₇-STAT3 spinga nella direzione opposta andando infatti a potenziare l'attività della ETC. Futuri progetti di ricerca potrebbero quindi focalizzarsi su cosa sia determinante nel prevalere di una funzione piuttosto che dell'altra. Lo studio analizzato ha inoltre evidenziato come anche l'attività nucleare di STAT3 che porta all'espressione di geni coinvolti nell'effetto Warburg sia in realtà dipendente dalla fosforilazione della serina ed è quindi presumibile che entrambe le funzioni di STAT3, nucleare e mitocondriale, vadano a conferire vantaggio metabolico alle cellule tumorali. Potrebbe quindi risultare interessante verificare se l'attivazione di uno solo dei due pathway sia sufficiente a garantire tale vantaggio o se al contrario debbano necessariamente essere compresenti. Per andare a contrastare l'induzione dell'effetto Warburg si potrebbe utilizzare l'RNA interference andando a bersagliare *HIF α* , mentre per andare a bloccare il potenziamento della ETC di STAT3 si potrebbero utilizzare degli inibitori dei complessi della ETC. Quindi grazie ai saggi sopra citati si potrebbe andare a valutare il potenziale proliferativo delle cellule di LAC umano trattate in questi due modi rispetto a cellule di controllo esprimenti STAT3-WT.

Nella discussione finale, l'attenzione di *Alhassani et al. [2021]* si sposta sul coinvolgimento di STAT3 nella determinazione del microambiente tumorale. Vengono infatti citati altri studi nei quali il targeting mirato di STAT3 tramite Cre-ricombinasi nell'epitelio polmonare *Kras*^{G12D} vada a determinare un ambiente tumorale pro-infiammatorio e pro-angiogenico suggerendo quindi anche un ruolo alternativo per STAT3 di soppressore del tumore. Inoltre questi effetti opposti sembrano essere genere-specifici in quanto alcuni studi hanno dimostrato come la delezione di STAT3 risulti nelle femmine in una riduzione mentre nei maschi in un aumento della massa tumorale. L'effetto pro o anti-tumorale provocato dalla delezione condizionale di STAT3 nell'epitelio polmonare dipenderebbe dall'aumento o dalla riduzione dell'espressione di citochine e chemochine indotte da NF- κ B che sono le principali attrici del rimodellamento di un microambiente

tumorale pro-tumorale ed immunosoppressivo piuttosto che antitumorale. Tuttavia lo studio analizzato non ha riscontrato differenze nei livelli di espressione di citochine o chemochine come IL6, IL17, CXCL1 nei topi *Kras*^{G12D}; *Stat*^{SA/SA}, *Kras*^{G12D} e *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{-/+}.

L'effetto antitumorale dovuto alla delezione di STAT3 è stato supposto essere dovuto ad una alterazione della specificità delle citochine. In particolare, IL6 in questo contesto non andrebbe ad attivare il pathway di STAT3 determinando quindi una risposta pro-infiammatoria e pro-tumorale ma andrebbe ad attivare una risposta di tipo interferonica guidata da STAT1. La delezione di STAT3 è infatti emersa essere associata ad un aumento dell'espressione del gene *Infg* che è responsabile di una risposta antitumorale guidata da STAT1.

Il lavoro analizzato e molti altri hanno evidenziato come STAT3 possa localizzarsi in diversi compartimenti cellulari e come questo possa interagire con diverse altre proteine. Prospettive future di ricerca potrebbero quindi focalizzarsi sull'interattoma di STAT3 anche in dipendenza da modifiche post-trascrizionali (fosforilazione della tirosina o della serina e non solo) combinando ad esempio la centrifugazione frazionata con l'immunoprecipitazione seguita da spettroscopia. L'identificazione dell'interattoma, completo delle dipendenze delle interazioni da eventuali modifiche post-traduzionali, compresi eventuali co-interattori, permetterebbe di approfondire le conoscenze circa i meccanismi molecolari con cui STAT3 espleta le sue diverse funzioni.

5. Esperienza di Stage

Real-Time PCR

Attraverso un'analisi di qRT-PCR si è andati a vedere come cambiava l'espressione di alcuni geni nei campioni non irradiati ed irradiati con raggi gamma (2 Gy) o con raggi UVC (5 J). Fibroblasti embrionali di topo della linea NIH-3T3, sono stati seminati su piastre da 10 mL e a 24 h dall'irradiazione sono stati raccolti e centrifugati a 156g per 10 min. Quindi ho proceduto con l'estrazione dell'RNA totale. L'RNA estratto è stato quantificato al Nanodrop e con lo stesso strumento si è valutata la contaminazione proteica (rapporto assorbanza A260/A280) e la contaminazione da carboidrati (A260/A230). Quindi ho proceduto alla retrotrascrizione dell'RNA in cDNA utilizzando il kit Promega; i campioni così ottenuti sono stati utilizzati per gli esperimenti di qRT-PCR. I geni analizzati sono stati *Gapdh* (utilizzato come gene reference), *P21*, *TP53*, *Gadd45a*, *Ddb2* e *C-Myc*. In particolare, si è visto come variava la risposta a 24h dall'irradiazione nelle cellule NIH-3T3, in cellule NIH-3T3 trasdotte con una forma *wild type* di STAT3, NIH-3T3 trasdotte con STAT3 in cui la serina 727 è stata mutata in alanina non fosforilabile (mut. A) e NIH-3T3 trasdotte con STAT3 in cui la serina 727 è stata mutata in acido aspartico per mimare una fosforilazione costitutiva (mut. D). I risultati che ho ottenuto mostrano un comportamento diverso delle 4 linee cellulari circa l'espressione dei geni in analisi.

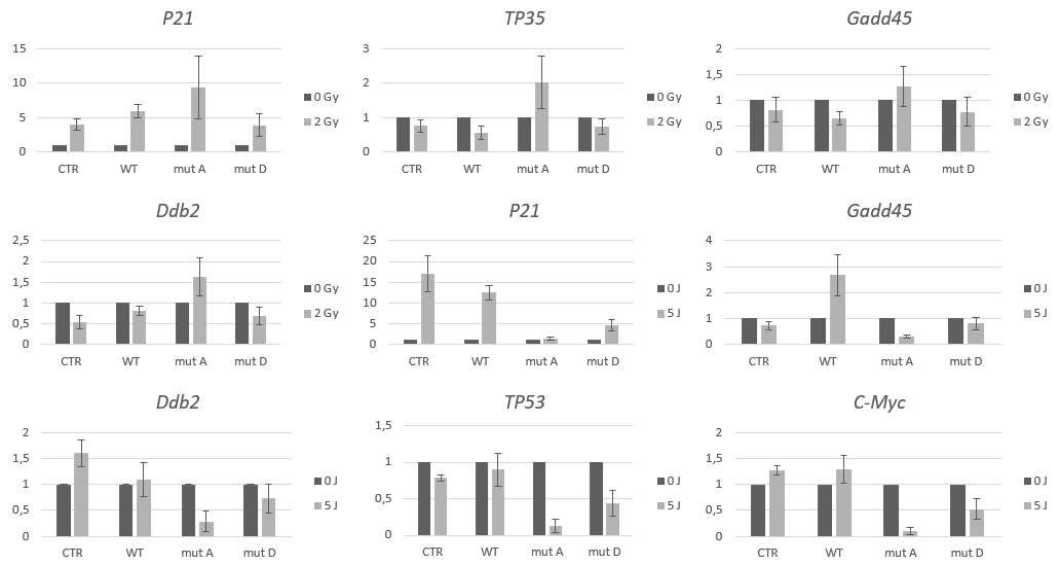


Figura 7. Analisi dell'espressione genica in cellule NIH-3T3. L'espressione relativa di ogni trascritto è stata determinata tramite qRT-PCR a 24h dall'irradiazione con raggi gamma o raggi UVC.

Sia a 24h dall'irradiazione con i raggi gamma sia a 24h dall'irradiazione con i raggi UVC, si osserva l'induzione di *P21* che codifica per un inibitore delle chinasi ciclina-dipendente che va a bloccare la progressione del ciclo cellulare. L'aumento dell'espressione di questo gene in risposta al danno al DNA da radiazioni risulta essere in linea con i risultati in letteratura. I geni *Ddb2*, *Gadd45*, *TP53* e *C-Myc* codificano anch'essi proteine coinvolte nella risposta al danno al DNA o nella regolazione del ciclo cellulare ma, a differenza di quanto detto per *P21*, non è emersa un'induzione in tutte le linee in esame in quanto i profili di espressione risultano essere diversi. Questo suggerisce che il diverso corredo genetico delle 4 linee cellulari sia responsabile di una diversa risposta da parte di queste cellule al danno. Tuttavia questi non possono essere definibili come risultati veri e propri quanto delle osservazioni perciò si rendono necessarie delle repliche per poterli validare.

Bibliografia

1. Awasthi N, Liongue C, Ward AC. STAT proteins: a kaleidoscope of canonical and non-canonical functions in immunity and cancer. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):198. doi:10.1186/s13045-021-01214-y.
2. Gu Y, Mohammad I, Liu Z. Overview of the STAT-3 signaling pathway in cancer and the development of specific inhibitors (Review). *Oncol Lett*. Published online February 13, 2020. doi:10.3892/ol.2020.11394.
3. Tesoriere A, Dinarello A, Argenton F. The Roles of Post-Translational Modifications in STAT3 Biological Activities and Functions. *Biomedicines*. 2021;9(8):956. doi:10.3390/biomedicines9080956.
4. Garama DJ, White CL, Balic JJ, Gough DJ. Mitochondrial STAT3: Powering up a potent factor. *Cytokine*. 2016;87:20-25. doi:10.1016/j.cyto.2016.05.019.
5. Murugan AK, Grieco M, Tsuchida N. RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine. *Seminars in Cancer Biology*. 2019;59:23-35. doi:10.1016/j.semcancer.2019.06.007.
6. Gough DJ, Koetz L, Levy DE. The MEK-ERK Pathway Is Necessary for Serine Phosphorylation of Mitochondrial STAT3 and Ras-Mediated Transformation. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e83395. doi:10.1371/journal.pone.0083395.
7. Fan Y, Mao R, Yang J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*. 2013;4(3):176-185. doi:10.1007/s13238-013-2084-3.
8. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
9. Hickman-Davis JM, Davis IC. Transgenic mice. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2006;7(1):49-53. doi:10.1016/j.prrv.2005.09.005.
10. Balic JJ, Garama DJ, Saad MI, et al. Serine-Phosphorylated STAT3 Promotes Tumorigenesis via Modulation of RNA Polymerase Transcriptional Activity. *Cancer Research*. 2019;79(20):5272-5287. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0974.

Appendice

Alhayyani S, McLeod L, West AC, et al. Oncogenic dependency on STAT3 serine phosphorylation in KRAS mutant lung cancer. *Oncogene*. 2022;41(6):809-823. doi:10.1038/s41388-021-02134-4

ARTICLE



Oncogenic dependency on STAT3 serine phosphorylation in KRAS mutant lung cancer

Sultan Alhayyani^{1,2,3,9}, Louise McLeod^{1,2,9}, Alison C. West^{1,2}, Jesse J. Balic^{1,2}, Christopher Hodges^{1,2}, Liang Yu^{1,2}, Julian A. Smith^{4,5}, Zdenka Prodanovic⁶, Steven Bozinovski⁷, Beena Kumar⁸, Saleela M. Ruwanpura^{1,2}, Mohamed I. Saad^{1,2} and Brendan J. Jenkins^{1,2}✉

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2021

The oncogenic potential of the latent transcription factor signal transducer and activator of transcription (STAT3) in many human cancers, including lung cancer, has been largely attributed to its nuclear activity as a tyrosine-phosphorylated (pY₇₀₅ site) transcription factor. By contrast, an alternate mitochondrial pool of serine phosphorylated (pS₇₂₇ site) STAT3 has been shown to promote tumorigenesis by regulating metabolic processes, although this has been reported in only a restricted number of mutant RAS-addicted neoplasms. Therefore, the involvement of STAT3 serine phosphorylation in the pathogenesis of most cancer types, including mutant *KRAS* lung adenocarcinoma (LAC), is unknown. Here, we demonstrate that LAC is suppressed in oncogenic *Kras*^{G12D}-driven mouse models engineered for pS₇₂₇-STAT3 deficiency. The proliferative potential of the transformed *Kras*^{G12D} lung epithelium, and mutant *KRAS* human LAC cells, was significantly reduced upon pS₇₂₇-STAT3 deficiency. Notably, we uncover the multifaceted capacity of constitutive pS₇₂₇-STAT3 to metabolically reprogramme LAC cells towards a hyper-proliferative state by regulating nuclear and mitochondrial (mt) gene transcription, the latter via the mtDNA transcription factor, TFAM. Collectively, our findings reveal an obligate requirement for the transcriptional activity of pS₇₂₇-STAT3 in mutant *KRAS*-driven LAC with potential to guide future therapeutic targeting approaches.

Oncogene (2022) 41:809–823; <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02134-4>

INTRODUCTION

Lung adenocarcinoma (LAC) is the most common subtype (~40%) of lung cancer, the most lethal worldwide, and is associated with a poor overall 5-year relative survival rate of 15–20% [1]. The majority of LAC patients are diagnosed at an advanced stage when current standard-of-care (i.e. surgery, chemotherapy and/or radiation therapy) or targeted (e.g. tyrosine kinase inhibitors for epidermal growth factor receptor activating mutations) therapy options provide minimal clinical benefit and are associated with a high risk of tumour re-occurrence and/or drug resistance [2–4].

A strong link exists between chronic lung inflammation triggered by cigarette smoking and LAC, and one of the most established disease-associated consequences of the genotoxic effects of cigarette-derived carcinogens is activating mutations in the *KRAS* proto-oncogene [5, 6]. Activating mutations in *KRAS* are found in 25–40% of human LAC cases, with the highest incidence of point mutations found in codon 12 (leading to substitutions of the glycine (G) residue) that is associated with poor survival outcomes cases [6–8]. A definitive role for *KRAS* in the initiation and progression of lung carcinogenesis is evidenced by the spontaneous development of LAC in mouse models genetically engineered to express the oncogenic *Kras*^{G12D} allele in the airway epithelium [9, 10]. Despite the recent advent of small molecule

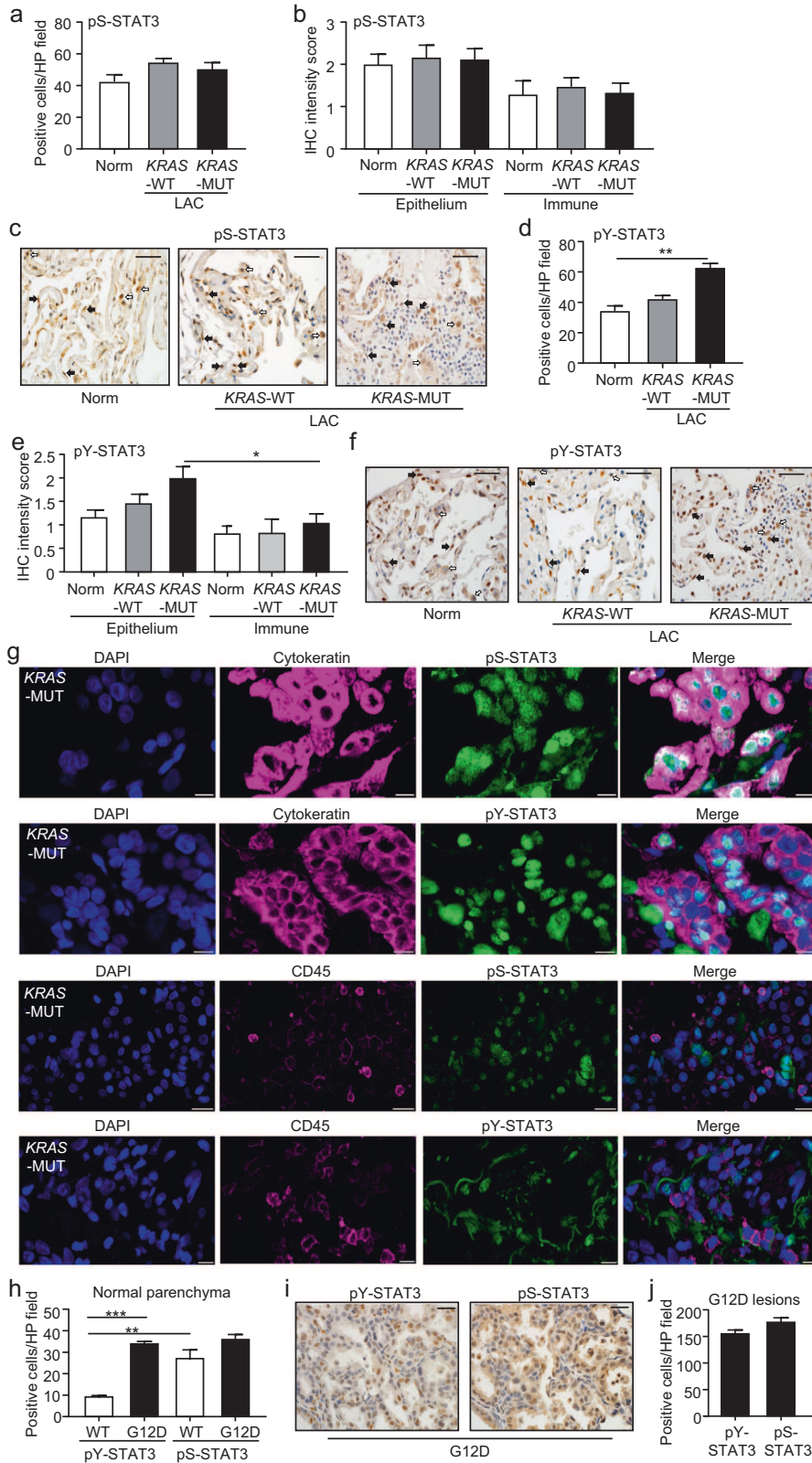
inhibitors against mutant *KRAS* with promising in vivo anti-cancer activity, the long-held uncertainty regarding the translation of such pharmacological approaches directly targeting oncogenic *KRAS* to the clinic remains [11, 12]. Accordingly, the identification of essential downstream mediators of mutant *KRAS* in LAC (and for that matter, other cancers such as pancreatic and colorectal) provides an alternative rationale to indirectly target the oncogenic activity of *KRAS*.

Oncogenic *KRAS* activates multiple downstream cytokine signalling cascades to promote LAC, namely ERK MAPK, PI3K/Akt and STAT3 [8, 13–15]. Regarding the latter, elevated tyrosine phosphorylation (pY) of STAT3 (Y₇₀₅ site), which is required for its dimerisation and subsequent nuclear translocation, is observed in over 50% of human LAC cases, and is associated with poor overall survival outcomes for patients [16–18]. Indeed, a critical driver role for STAT3 in LAC is suggested by studies reporting that reduced pY₇₀₅-STAT3 levels in the *Kras*^{G12D}-driven LAC model are linked to tumour regression [14, 19]. Furthermore, overexpression of an artificially engineered hyperactive form of STAT3 (STAT3-C) in the pulmonary epithelium of mice drives spontaneous lung inflammation and adenocarcinoma [20]. In these settings, the oncogenic activity of STAT3 has been largely assumed to be the result of its canonical nuclear role as a

¹Centre for Innate Immunity and Infectious Diseases, Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Victoria 3168, Australia. ²Department of Molecular and Translational Science, School of Clinical Sciences, Monash University, Clayton, Victoria 3168, Australia. ³Department of Chemistry, College of Sciences and Arts, King Abdulaziz University, Rabigh, Saudi Arabia. ⁴Department of Surgery, School of Clinical Sciences at Monash Health, Monash University, Clayton, Victoria 3168, Australia. ⁵Department of Cardiothoracic Surgery, Monash Health, Clayton, Victoria 3168, Australia. ⁶Monash Biobank, Monash Health, Clayton, Victoria 3168, Australia. ⁷School of Health and Biomedical Sciences, RMIT University, Bundoora, Victoria 3082, Australia. ⁸Department of Anatomical Pathology, Monash Health, Clayton, Victoria 3168, Australia. ⁹These authors contributed equally: Sultan Alhayyani, Louise McLeod. ✉email: brendan.jenkins@hudson.org.au

Received: 30 October 2020 Revised: 15 November 2021 Accepted: 23 November 2021

Published online: 3 December 2021



tyrosine-phosphorylated transcription factor that regulates a multitude of gene networks affecting cellular processes such as proliferation (e.g. *Ccnd1*, *Tlr2*), survival (e.g. *Bcl2l1*, *Birc5*), angiogenesis (e.g. *Mmp2*, *Vegf*), inflammation (e.g. *Il6*, *Il11*, *Il17a*) and metabolism (e.g. *Myc*, *Hif1a*) [21–23].

Notably, a mitochondrial pool of STAT3, dependent on its serine phosphorylation at residue 727 (pS₇₂₇), has been shown to be a requisite for mutant RAS tumours by regulating the electron transport chain, and thus mitochondrial function, resulting in the metabolic reprogramming of cancer cells towards aerobic

Fig. 1 Constitutive expression of serine phosphorylated STAT3 in human LAC patients and the *Kras*^{G12D} LAC model. **a** Quantification of pS₇₂₇-STAT3-positive cells per high-power (HP) field in lung cross-sections from normal (cancer-free) control individuals and LAC patients either *KRAS* wild-type (WT) or mutant (MUT). **b** Immunohistochemical (IHC) staining intensity of pS₇₂₇-STAT3-positive epithelial versus immune cells in lung cross-sections from the indicated patient groups. **c** Representative high-power photomicrographs of lung cross-sections from the above patient groups stained with an anti-pS₇₂₇-STAT3 antibody. Scale bars, 50 μ m. White arrows point to representative positively-stained immune cells, and black arrows point to representative positively-stained pneumocytes. **d** Quantification of pY₇₀₅-STAT3-positive cells per HP field in the indicated patient lung cross-sections. **e** IHC staining intensity of pY₇₀₅-STAT3-positive epithelial versus immune cells in lung cross-sections from the indicated patient groups. **f** Representative high-power photomicrographs of lung cross-sections from the above patient groups stained with an anti-pY₇₀₅-STAT3 antibody. Scale bars, 50 μ m. White arrows point to representative positively-stained immune cells, and black arrows point to representative positively-stained pneumocytes. **g** Representative images of pS₇₂₇-STAT3 (green) or pY₇₀₅-STAT3 (green) and either Cytokeratin (magenta) or CD45 (magenta) immunofluorescence on a *KRAS* mutant LAC patient tumour cross-section. 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear staining is blue. Merged images show co-localisation (white/turquoise). Scale bars: 10 μ m. **h** Quantification of the number of pS₇₂₇-STAT3 or pY₇₀₅-STAT3 positive cells per HP field in normal lung parenchyma of *Kras*^{WT} and *Kras*^{G12D} mice at 6 weeks post vehicle (*Kras*^{WT}) or Ad-Cre (*Kras*^{G12D}) inhalation. **i** Representative high-power photomicrographs of lesions in lung cross-sections from *Kras*^{G12D} mice at 6 weeks following Ad-Cre inhalation that were stained with antibodies against pS₇₂₇-STAT3 or pY₇₀₅-STAT3. Scale bars, 50 μ m. **j** Quantification of the number of pS₇₂₇-STAT3 or pY₇₀₅-STAT3 positive cells per HP field in lesions of *Kras*^{G12D} mice at 6 weeks post Ad-Cre inhalation. **n** = 6 mice/genotype. In **d**, **e** and **h**, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, One-way ANOVA.

glycolysis (“Warburg effect”) [22, 24–27]. However, in a mutant RAS-independent gastric cancer model, a pro-tumourigenic role for pS₇₂₇-STAT3 has recently been assigned to its nuclear localisation as a direct transcriptional regulator of STAT3-target genes that drive tumour cell proliferation, survival, angiogenesis and inflammation [28]. While this finding is supported by earlier studies indicating a transcriptional regulatory role for pS₇₂₇-STAT3 [29–31], it nonetheless raises the critical question as to whether S₇₂₇ is an integral regulator of STAT3’s oncogenic potential via dual nuclear (i.e. transcriptional) and mitochondrial (i.e. metabolic) activities.

Here, we have employed a genetic strategy by coupling pS₇₂₇-STAT3-deficient *Stat3*^{SA/SA} mice [29]—harbouring an S₇₂₇A knockin substitution in the endogenous *Stat3* locus (SA allele)—with the mutant *Kras*^{G12D} LAC model to demonstrate that constitutive pS₇₂₇-STAT3 expression is an essential downstream oncogenic effector of mutant KRAS-driven lung carcinogenesis. The driver role for STAT3 in mutant KRAS LAC was verified upon heterozygous ablation of endogenous *Stat3* in *Kras*^{G12D} mice, which phenocopied the suppressed LAC observed in *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice. Our data indicate that pS₇₂₇-STAT3, but not pY₇₀₅-STAT3, in the lungs of *Kras*^{G12D} mice promoted tumour cell proliferation, which was supported by our findings in STAT3-deficient human KRAS mutant LAC cells reconstituted with a pS₇₂₇-defective STAT3 mutant. Furthermore, our findings reveal that the oncogenicity of STAT3 was associated with the dual capacity of pS₇₂₇ to modulate the transcription of STAT3-regulated nuclear-encoded and mitochondrial-encoded genes, the latter via upregulation of mitochondrial transcription factor A (TFAM), leading to augmented mitochondrial respiration and glycolysis in hyper-proliferating tumour cells.

RESULTS

Constitutive expression of pS₇₂₇-STAT3 in LAC

Immunohistochemical analysis of pS₇₂₇-STAT3 expression in the lungs of a cohort of LAC patients, stratified into either *KRAS* wild-type or mutant, along with cancer-free individuals (Supplementary Table S1), indicated comparable numbers of pS₇₂₇-STAT3⁺ cells which were widely distributed throughout the epithelial and immune (inflammatory) cell compartments within the stroma, with stronger staining intensity observed in epithelial cells (Fig. 1a–c and Supplementary Fig. S1). By contrast, in lung sections from both LAC patient cohorts and cancer-free controls, numbers of pY₇₀₅-STAT3⁺ cells were significantly higher in *KRAS* mutant LAC sections (Fig. 1d–f and Supplementary Fig. S1). Interestingly, immunohistochemical and immunofluorescence staining of both pS₇₂₇-STAT3 and pY₇₀₅-STAT3 in the transformed (and normal)

cytokeratin-positive lung epithelium (i.e. pneumocytes) was predominantly nuclear, whereas pS₇₂₇-STAT3⁺ and pY₇₀₅-STAT3⁺ staining in immune (CD45-positive) cells were cytoplasmic and nuclear (Fig. 1g and Supplementary Fig. S2).

We next explored the expression of pS₇₂₇-STAT3 in the mutant *Kras*^{G12D}-driven LAC model, in which the lung-specific oncogenic activation of the *Kras*^{G12D} allele—initiated by intranasal administration of adenoviral Cre recombinase—leads to the formation of lesions comprising atypical adenomatous hyperplasia (AAH) that advance to adenocarcinoma within 6 weeks [10, 14, 32]. Immunohistochemical analysis of lung sections from tumour-bearing *Kras*^{G12D} mice and, as controls, tumour-free *Kras*^{WT} mice indicated similar numbers of pS₇₂₇-STAT3⁺ type I and II alveolar epithelial cells (pneumocytes) in unaffected lung parenchyma, with nuclear and, to a lesser extent, cytoplasmic staining of weak-moderate (*Kras*^{WT}) compared to moderate-strong (*Kras*^{G12D}) intensity (Fig. 1h and Supplementary Fig. S3a). By contrast, significantly lower numbers of pY₇₀₅-STAT3⁺ pneumocytes were observed in the lung parenchyma of *Kras*^{WT} mice (predominant nuclear staining of weak intensity) compared to unaffected lung parenchyma of *Kras*^{G12D} mice (moderate-strong nuclear staining), the latter of which were similar in number and staining intensity to pS₇₂₇-STAT3⁺ pneumocytes (nuclear and cytoplasmic) in unaffected *Kras*^{G12D} lung parenchyma (Fig. 1h and Supplementary Fig. S3a). Furthermore, in lung lesions of *Kras*^{G12D} mice, comparable numbers of pY₇₀₅-STAT3⁺ and pS₇₂₇-STAT3⁺ transformed epithelial cells of moderate-strong staining intensity (predominantly nuclear) were present (Fig. 1i, j and Supplementary Fig. S3b).

Taken together, these data demonstrate predominant nuclear expression of pS₇₂₇-STAT3 throughout the epithelium of both unaffected lung parenchyma and lesions, unlike pY₇₀₅-STAT3 whose predominant nuclear expression is upregulated only in lesions by the presence of oncogenic KRAS.

Genetic ablation of STAT3 serine phosphorylation suppresses the LAC phenotype of *Kras*^{G12D} mice

To evaluate whether pS₇₂₇-STAT3 contributes to the pathogenesis of oncogenic KRAS-driven LAC, male and female *Kras*^{G12D} mice were generated on a pS₇₂₇-STAT3 deficient background (*Stat3*^{SA/SA}). In the absence of pS₇₂₇-STAT3, immunoblotting and immunohistochemistry confirmed unchanged pY₇₀₅-STAT3 levels in the lungs of *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} (compared to parental *Kras*^{G12D}) mice (Fig. 2a and Supplementary Fig. S3b). At 6 weeks following activation of the oncogenic *Kras*^{G12D} allele, histopathological evaluation of H&E-stained lung sections revealed that the lung tumour burden of *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice was significantly reduced by ~2.5-fold compared to parental *Kras*^{G12D} mice, with fewer lesions comprising smaller sized diffuse AAH and sporadic

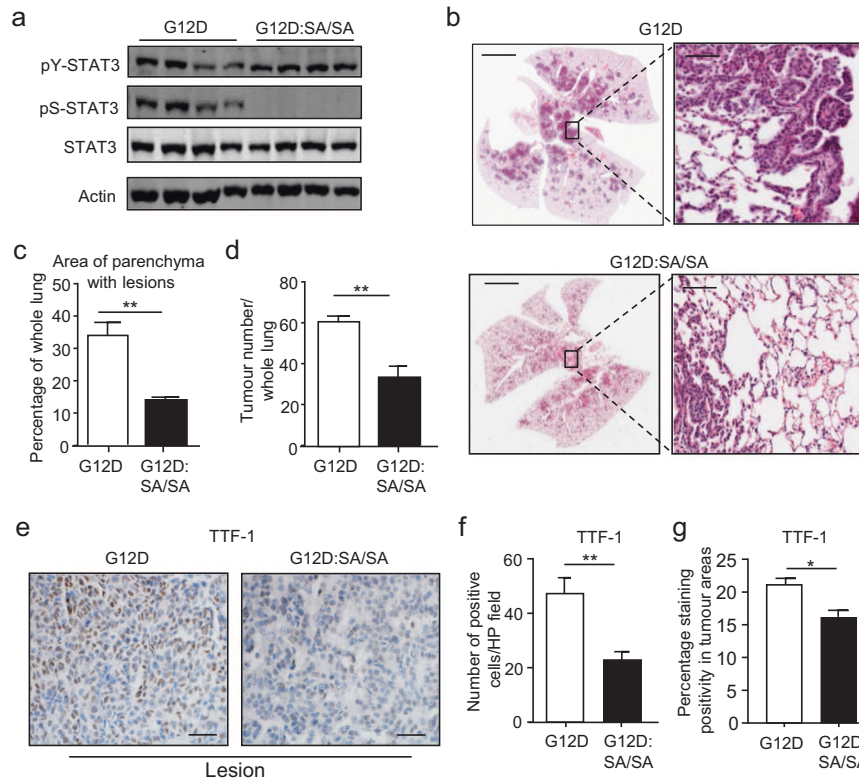


Fig. 2 Suppressed KRAS-induced LAC in pS₇₂₇-STAT3-deficient *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice. **a** Representative immunoblots of *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mouse tumour-bearing lung lysates at 6 weeks post oncogenic *Kras* induction with the indicated antibodies. Each lane represents an individual mouse sample. **b** Representative low power (left panels) and high power (right panels) photomicrographs showing H&E-stained lung cross-sections from *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice at 6 weeks post oncogenic *Kras* induction. Scale bars = 3 mm (left panels) and 300 μm (right panels). Graphs depicting **c** quantification of the percentage of lung parenchyma area containing hyperplastic AAH and adenocarcinoma lesions, and **d** number of lesions present in the whole lung, in the indicated mouse genotypes at 6 weeks post Ad-Cre inhalations (*n* = 6 mice/genotype). ***P* < 0.01, unpaired *t* test. **e** Representative high-power photomicrographs of TTF-1-stained lung cross-sections showing a lesion from *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice. Scale bar = 50 μm. Quantification of TTF-1-positive cells (**f**) per high-power (HP) field in lung lesions, and **g** as a percentage of staining in tumour areas, of the indicated mice (*n* = 6 mice/group). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, unpaired *t* test.

adenocarcinoma in situ (Fig. 2b–d). Consistent with the suppressed LAC phenotype in *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice, we observed a significant (up to ~2.5-fold) reduction in the numbers of alveolar epithelial type II cells staining positive for TTF-1, a clinical indicator of LAC [33], in *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} compared to *Kras*^{G12D} lung lesions and tumour areas (Fig. 2e–g). At 12 weeks post induction of oncogenic KRAS, a similar suppression of the LAC phenotype was observed in *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice, with lesions predominantly comprised of early-stage AAH which contrasts the 100% of lesions in *Kras*^{G12D} lungs that progressed to adenocarcinoma (Supplementary Fig. S4a–e). No gender bias was observed in these studies, with comparable suppressed lung carcinogenesis observed in male and female *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice. These findings indicate that pY₇₀₅-STAT3 is unaffected by the absence of S₇₂₇ phosphorylation in the lung, and support the notion that pS₇₂₇ is critical for the pro-tumourigenic role of STAT3 in *Kras*^{G12D}-induced lung carcinogenesis.

pS₇₂₇-STAT3 promotes lung cellular proliferation during *Kras*^{G12D}-induced LAC

We have previously reported that STAT3 contributes to the pathogenesis of oncogenic KRAS-induced LAC by promoting cellular proliferation [14]. Notably, immunohistochemical staining of *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} and *Kras*^{G12D} mouse lungs at 6 weeks post induction of the oncogenic *Kras*^{G12D} allele for the proliferative marker, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), indicated significantly reduced numbers (up to ~2.5-fold) of PCNA⁺ cells

in both lesions and lesion-free parenchyma of *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} lungs (Fig. 3a–e). These observations were also supported by the significantly lower gene expression in *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} lungs of numerous cell proliferation regulators, among which includes *Myc*, that have been previously implicated in oncogenic KRAS-driven LAC [15, 34–37] (Fig. 3f).

To evaluate the importance of pS₇₂₇-STAT3 as a proliferative driver of human mutant KRAS LAC cells, we employed CRISPR/Cas9-mediated gene editing to knockout (KO) endogenous STAT3 gene expression in A549 cells, and then reconstituted STAT3-KO cells with expression constructs for wild-type STAT3 (STAT3-WT) and the S₇₂₇A phosphorylation-defective STAT3 mutant (STAT3-SA) (Fig. 4a, b). As controls, STAT3-KO cells were reconstituted with a Y₇₀₅F phosphorylation-defective STAT3 mutant (STAT3-YF) previously shown to display impaired growth in A549 cells [38], along with a double STAT3-SA/YF mutant, and a STAT3 variant carrying a mitochondrial targeting sequence (MTS) to determine whether mitochondrial-localised STAT3 in mutant KRAS human LAC cells is linked to cellular proliferation (Fig. 4a, b). The growth potential of cells was assessed by a combination of assays for soft agar colony formation, crystal violet and ATP cell proliferation, and MTT cell viability. STAT3-KO A549 cells displayed significantly reduced colony formation, cell proliferation and viability compared to either control (CTL) non-targeted/empty vector cells expressing endogenous STAT3 or cells reconstituted with STAT3-WT, thus further supporting a growth-promoting role for STAT3 in human LAC (Fig. 4c, d and Supplementary Fig. S5a, b). Moreover,

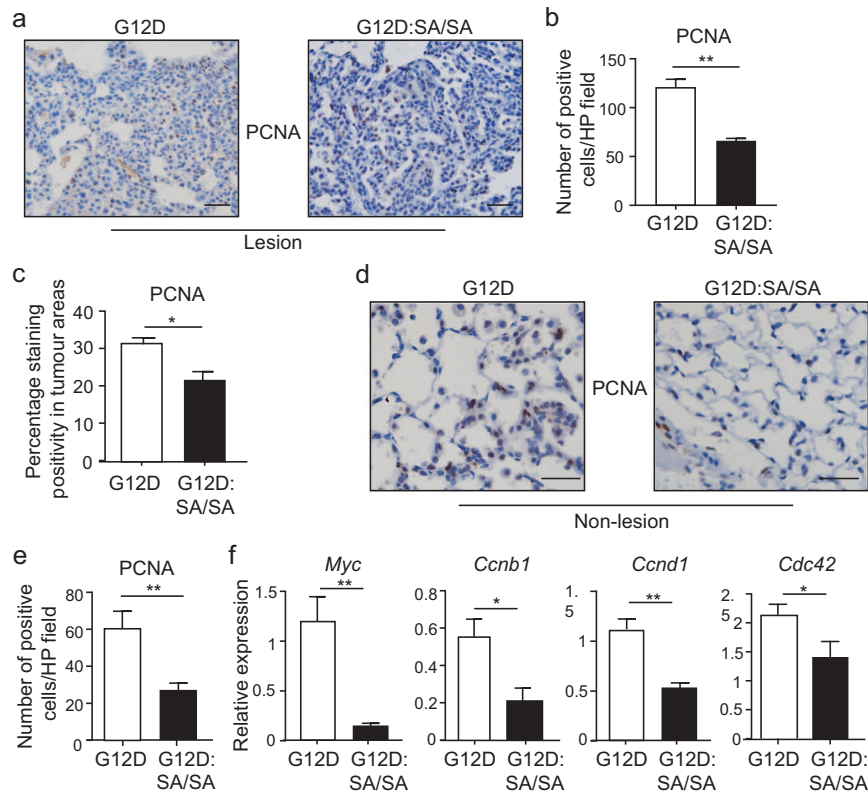


Fig. 3 pS₇₂₇-STAT3 deficiency in the *Kras*^{G12D} LAC mouse model and human LAC cells selectively suppresses cellular proliferation. **a** Representative photomicrographs of lung lesions in lung cross-sections from *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice, at 6 weeks post Ad-Cre inhalation, that were subjected to PCNA antibody staining. Positively stained cells are brown in colour. Scale bars = 100 μm. Quantification of PCNA-positive cells **b** per high-power (HP) field in lung lesions, and **c** as a percentage of staining in tumour areas, of the indicated mice (*n* = 6 mice/group). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, unpaired *t* test. **d** Representative photomicrographs of PCNA staining in lesion-free lung parenchyma from *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice, at 6 weeks post Ad-Cre inhalation. Positively stained cells are brown in colour. Scale bars = 100 μm. **e** Quantitative enumeration of PCNA-positive cells in lesion-free lung parenchyma, per HP field, in the indicated mouse groups. Data are presented from 6 mice/group. ***P* < 0.01, unpaired *t* test. **f** qPCR expression analyses of the indicated cell proliferation genes in lung cDNA from the indicated genotypes at 6 weeks post Ad-Cre inhalation. Expression data are normalised against 18s rRNA (*n* = 5 mice/genotype). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, unpaired *t* test.

the growth potential of A549 cells expressing STAT3-SA and STAT3-SA/YF was markedly reduced compared to CTL cells, as well as cells expressing STAT3-WT and/or STAT3-YF, and was similar to that of STAT3-KO cells (Fig. 4c, d and Supplementary Fig. S5a, b). By contrast, the growth of STAT3-MTS expressing cells was markedly greater than STAT3-KO, STAT3-SA and STAT3-SA/YF expressing cells, and was comparable to the growth of CTL and STAT3-WT cells (Fig. 4c, d, Supplementary Fig. S5a, b). To verify the observed preferential requirement of pS-STAT3 over pY-STAT3 for the proliferative potential of A549 cells, we used a second human LAC cell line, NCI-H1299, in which a mutant *KRAS*^{G12V} expression construct was transiently transfected. Indeed, as shown in Fig. 4e, f, the proliferation of mutant *KRAS* NCI-H1299 cells expressing STAT3-SA and STAT3-SA/YF was again comparable to STAT3-KO cells, and significantly reduced compared to either CTL cells, or cells expressing STAT3-WT, STAT3-YF or STAT3-MTS. Taken together, these data support our findings in the *Kras*^{G12D} LAC model, and suggest that the growth-potentiating activity of S₇₂₇-STAT3 on human LAC cells occurs in a cell intrinsic manner. Furthermore, the contrasting growth profile of STAT3-SA and STAT3-MTS expressing cells suggests that mitochondrial-localised (pS₇₂₇) STAT3 function is largely sufficient for the growth potentiating effects of STAT3 on A549 cells.

In contrast to these observations, the extent of apoptosis, as determined by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labelling (TUNEL) assay, was minimal and comparable between both genotypes (Supplementary Fig. S6a, b). Similarly,

although oncogenic *KRAS* has been reported to trigger an inflammatory response in the lung [14, 15, 39], the numbers of CD45⁺ total immune cells, and B220⁺ B and CD3⁺ T cell subsets, were unaltered in the lungs of *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} compared to *Kras*^{G12D} mice (Supplementary Fig. S6c–h). In addition, the suppressed lung tumourigenesis in *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice was independent of changes in the expression of numerous inflammatory genes, as well as an angiogenic gene signature comprising the glutamic acid-leucine-arginine (ELR) motif-containing chemokines CXCL-1 and CXCL-2, matrix metalloproteinase (MMP)2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) [40] (Supplementary Fig. S7a, b).

pS₇₂₇-STAT3 is required to maintain dysregulated mitochondrial metabolism in oncogenic *KRAS*-induced LAC

Consistent with previous reports showing that *KRAS*-induced tumourigenesis is associated with dysregulated mitochondrial function (i.e. metabolism and oxidative stress) [41, 42], immunohistochemical staining with the mitochondrial function marker, Tom20, indicated elevated staining intensity in the lungs of *KRAS* mutant compared to *KRAS* wild-type patients (Supplementary Fig. S8a, b). Since dysregulated mitochondrial metabolism and oxidative stress confer tumour cells with a proliferative advantage [41, 42], together with a key function of pS₇₂₇-STAT3 being the regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation and subsequent generation of reactive oxygen species (ROS) [22, 24], we investigated whether pS₇₂₇-STAT3 modulated oxidative stress in

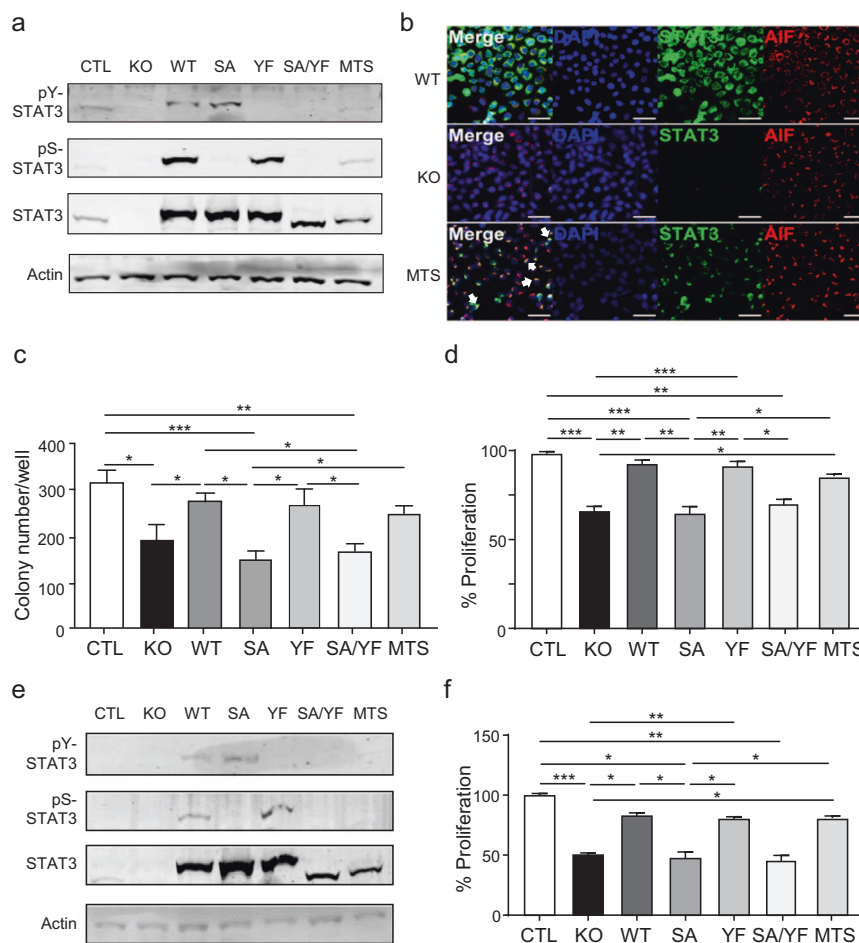


Fig. 4 pS₇₂₇-STAT3 deficiency in human *KRAS* mutant LAC cells selectively suppresses cellular proliferation. **a** Immunoblots with antibodies against pS₇₂₇, pY₇₀₅- and total-STAT3, as well as Actin, on lysates from the indicated A549 LAC cell lines during normal culture conditions. CTL, control non-targeted cells; KO, knockout; WT, wild-type; SA, S₇₂₇A; MTS, mitochondrial target sequence; YF, Y₇₀₅F. **b** Representative immunofluorescence images of STAT3-KO human A549 LAC cells, as well as those reconstituted with STAT3-WT and STAT3-MTS expression constructs, co-stained for STAT3 (green) and the mitochondrial marker apoptosis-inducing factor (AIF; red). 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear staining is blue. Scale bars, 50 μ m. Arrowheads in merged images indicate dual-positive STAT3/A IF-expressing cells. Graphs depicting **c** colony (>50 cells) formation per well in soft agar, and **d** crystal violet cell proliferation assays, of the indicated A549 cell lines. Data are from 3 independent experiments performed in triplicate. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, One-way ANOVA. **e** Immunoblots with antibodies against pS₇₂₇, pY₇₀₅- and total-STAT3, as well as Actin, on lysates from the indicated NCI-H1299 LAC cell line *KRAS* mutant transfectants during normal culture conditions. **f** Graph depicting crystal violet cell proliferation assays of the indicated NCI-H1299 cell line *KRAS* mutant transfectants. Data are from 3 independent experiments performed in triplicate. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, One-way ANOVA.

Kras^{G12D}-induced LAC. Indeed, oxyblot analyses indicated that increased levels of ROS observed in lung lysates from tumour-bearing *Kras*^{G12D} mice (versus tumour-free *Kras*^{WT} controls) were significantly reduced to wild-type levels in *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice (Fig. 5a, b). Furthermore, consistent with enhanced aerobic glycolysis and associated metabolism of glucose to lactate being a feature of cancer cells (the 'Warburg effect') [43], elevated lactate production in *Kras*^{G12D} mouse lung tumours was significantly lower in lung tumours of *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice, the latter comparable to that in control *Kras*^{WT} tumour-free lungs (Fig. 5c).

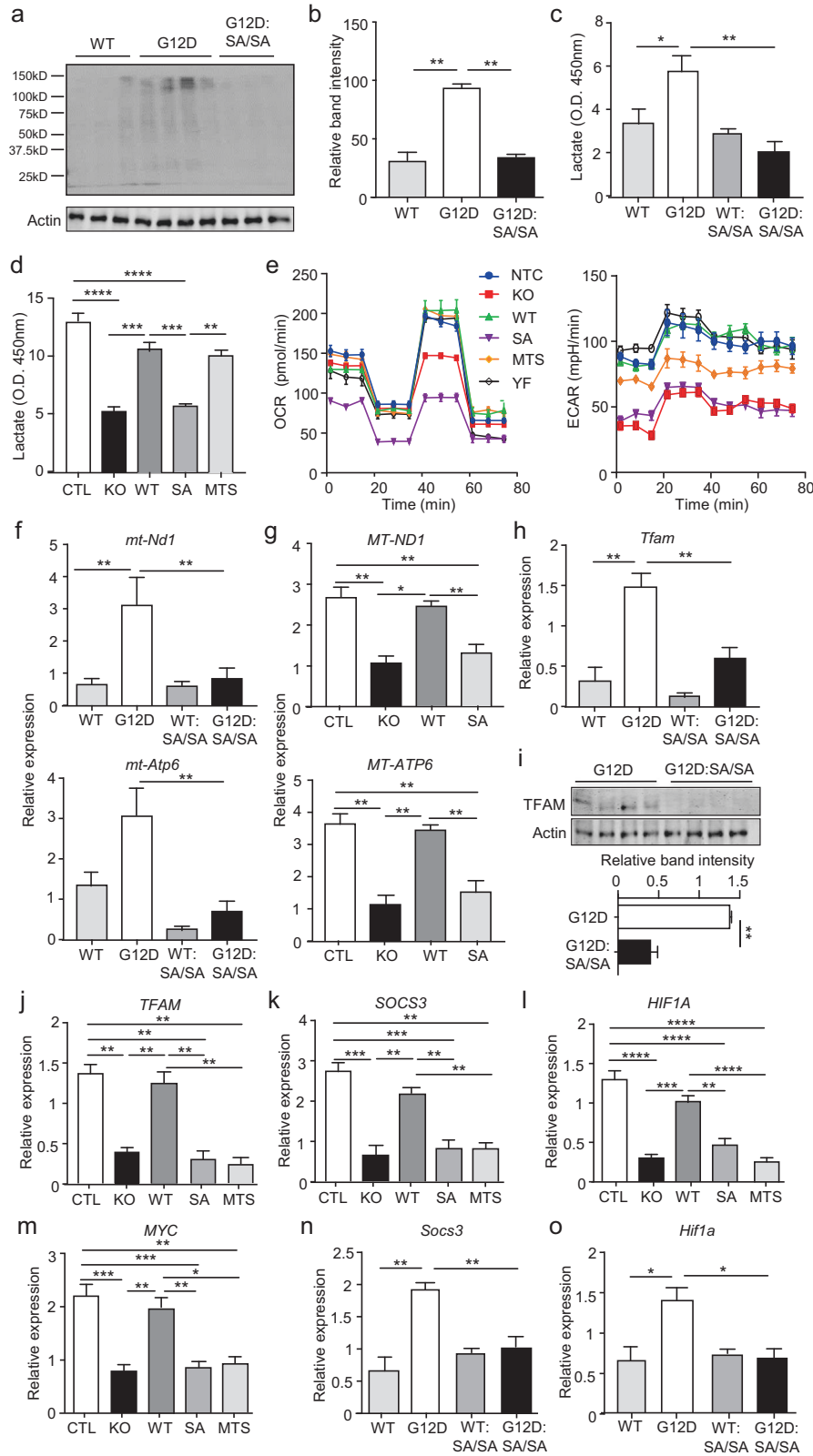
We next investigated whether the requirement of pS₇₂₇-STAT3 for the metabolic alterations in *Kras*^{G12D}-induced LAC extended to mutant *KRAS* human LAC cells. Consistent with our *in vivo* data, the production of lactate was significantly reduced in STAT3-SA expressing A549 cells compared to CTL and STAT3-WT expressing A549 cells, with low lactate levels in STAT3-SA expressing cells similar to those in STAT3-KO cells (Fig. 5d). In addition, lactate levels in supernatants from STAT3-MTS expressing cells were significantly increased compared to STAT3-KO and STAT3-SA expressing cells, almost reaching the

same levels as those observed in CTL and STAT3-WT expressing cells.

To further investigate the role of pS₇₂₇-STAT3 in regulating metabolic activities in human LAC A549 cells, Seahorse assays were performed to measure the oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR), which are indicators of mitochondrial respiration (oxidative phosphorylation) and glycolysis, respectively. In STAT3-SA expressing cells, both OCR and ECAR were significantly impaired (along with that of STAT3-KO cells) compared to CTL cells, as well as cells expressing STAT3-WT, STAT3-MTS and, as an additional control, STAT3-YF (Fig. 5e, Supplementary Table S2). These data, therefore, suggest that in *KRAS* mutant human LAC cells, pS₇₂₇-STAT3 likely contributes to mitochondrial metabolic activities.

pS₇₂₇-STAT3 augments the transcription of nuclear-encoded genes that are master regulators of mitochondrial function and energy metabolism in oncogenic *KRAS*-induced LAC

We next investigated the molecular basis for the pS₇₂₇-STAT3-dependent dysregulated mitochondrial metabolism in mutant



KRAS LAC both in vitro and in vivo upon pS₇₂₇-STAT3 deficiency. Interestingly, the expression of representative mitochondrial-encoded genes for key components of enzyme complexes of oxidative phosphorylation, MT-ND1 and MT-ATP6, was significantly reduced in both lungs of *Kras*^{G12D};*Stat3*^{SA/SA} versus *Kras*^{G12D}

mice, and STAT3-SA versus STAT3-WT (and CTL) expressing A549 cells (Fig. 5f, g). Since the genetic targeting of the master mitochondrial transcriptional regulator, TFAM, has previously been shown to suppress *Kras*^{G12D}-driven lung tumourigenesis [42], we explored the possibility that pS₇₂₇-STAT3 deficiency may impair

Fig. 5 pS₇₂₇-STAT3-mediated dysregulation of oxidative stress and mitochondrial respiration in *Kras* mutant LAC associates with transcriptional regulation of nuclear- and mitochondrial-encoded genes. **a** Protein carbonylation levels were determined by oxyblot of lung protein lysates from *Kras*^{WT}, *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mice at 6 weeks post Ad-Cre inhalations. Each lane represents an individual mouse sample. **b** Densitometric quantification of total protein carbonylation (from **a**) was performed and normalised against corresponding Actin protein levels. ***P* < 0.01, One-way ANOVA. **c** and **d** Lactate production was measured in the indicated (**c**) mouse lung lysates (*n* = 6/genotype) and **d** A549 cell line culture medium during passaging (*n* = 3 independent experiments). NTC, non-targeted control; KO, knockout; WT, wild-type; SA, S₇₂₇A; MTS, mitochondrial target sequence. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001, One-way ANOVA. **e** Oxygen consumption rate (OCR) and basal extracellular acidification rate (ECAR) were assayed using the Seahorse XFp Analyser in the indicated A549 cell lines for 24 h after sequential treatment with compounds oligomycin, FCCP and a mix of antimycin A and rotenone. Data are from 3 independent experiments. Exact *P* values for significant differences between cell lines are specified in Supplementary Table S2. Two-way ANOVA. qPCR expression analysis of the indicated genes in **f** lungs from the stated mouse genotypes (*n* = 5/genotype) and **g** passaged A549 cell lines (*n* = 3 independent experiments). Expression data are normalised against *18S rRNA*. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, One-way ANOVA. **h** qPCR expression analysis of *Tfam* in lungs from the stated mouse genotypes (*n* = 5/genotype). Expression data are normalised against *18S rRNA*. ***P* < 0.01, One-way ANOVA. **i** Immunoblots with antibodies against TFAM and Actin on lung lysates from the indicated mouse genotypes at 6 weeks post Ad-Cre inhalations. Each lane represents an individual mouse sample. Also shown is semi-quantitative densitometry of TFAM protein levels (relative to Actin) in lung lysates from **i**. ***P* < 0.01, unpaired *t* test. **j–m** qPCR expression analysis of the indicated human genes in passaged A549 cell lines (*n* = 3 independent experiments). Expression data are normalised against *18S rRNA*. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001, One-way ANOVA. **n** and **o** qPCR expression analysis of the indicated genes in lungs from the stated mouse genotypes (*n* = 5/genotype). Expression data are normalised against *18S rRNA*. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, One-way ANOVA.

the mitochondrial transcriptional capacity of TFAM. Indeed, qPCR and immunoblotting analyses revealed a striking reduction in mRNA and protein expression levels of TFAM in *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mouse lungs compared to the elevated levels observed in *Kras*^{G12D} lungs (Fig. 5h, i). In support of this finding, *TFAM* mRNA levels were also significantly reduced in A549 cells expressing STAT3-SA, comparable to the low levels observed in STAT3-KO expressing cells (Fig. 5j). Notably, the suppressed expression of TFAM, a nuclear-encoded gene, in both KRAS mutant mouse lung tumours and human LAC cells was akin to the reduced mRNA levels observed for the bonefide nuclear-encoded STAT3-regulated genes, *SOCS3*, *HIF1A* and *MYC* (Figs. 3e, 5k–o), the latter of which are also key transcriptional drivers of mitochondrial metabolism and glycolysis in cancer cells [44–48]. The requirement for nuclear-localised STAT3 for the transcriptional induction of these STAT3-target genes was also confirmed by the observation that gene expression of *SOCS3*, *HIF1A*, *MYC* and *TFAM* was significantly reduced in A549 cells expressing STAT3-MTS (i.e. exclusively mitochondrial STAT3 localisation) versus STAT3-WT and CTL expressing A549 cells (Fig. 5j–m).

To further explore the notion that TFAM is a direct transcriptional target of STAT3, we performed *in vivo* ChIP assays on the lungs of *Kras*^{G12D} and control *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mice. To control for immunoprecipitation of an equivalent cellular pool of activated STAT3 between genotypes, we employed an antibody against pY-STAT3 which displays similar expression levels in the lungs of *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mice (Fig. 2a). Notably, STAT3 was recruited to a putative consensus TTCCc/gGGAA binding site in the endogenous *Tfam* promoter with equal affinity in both *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} lungs (Fig. 6a, b). A similar finding for STAT3 binding to the promoters for STAT3-regulated *Hif1a*, *Myc* and *Socs3* genes was also observed in *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} lungs (Fig. 6a, c–e).

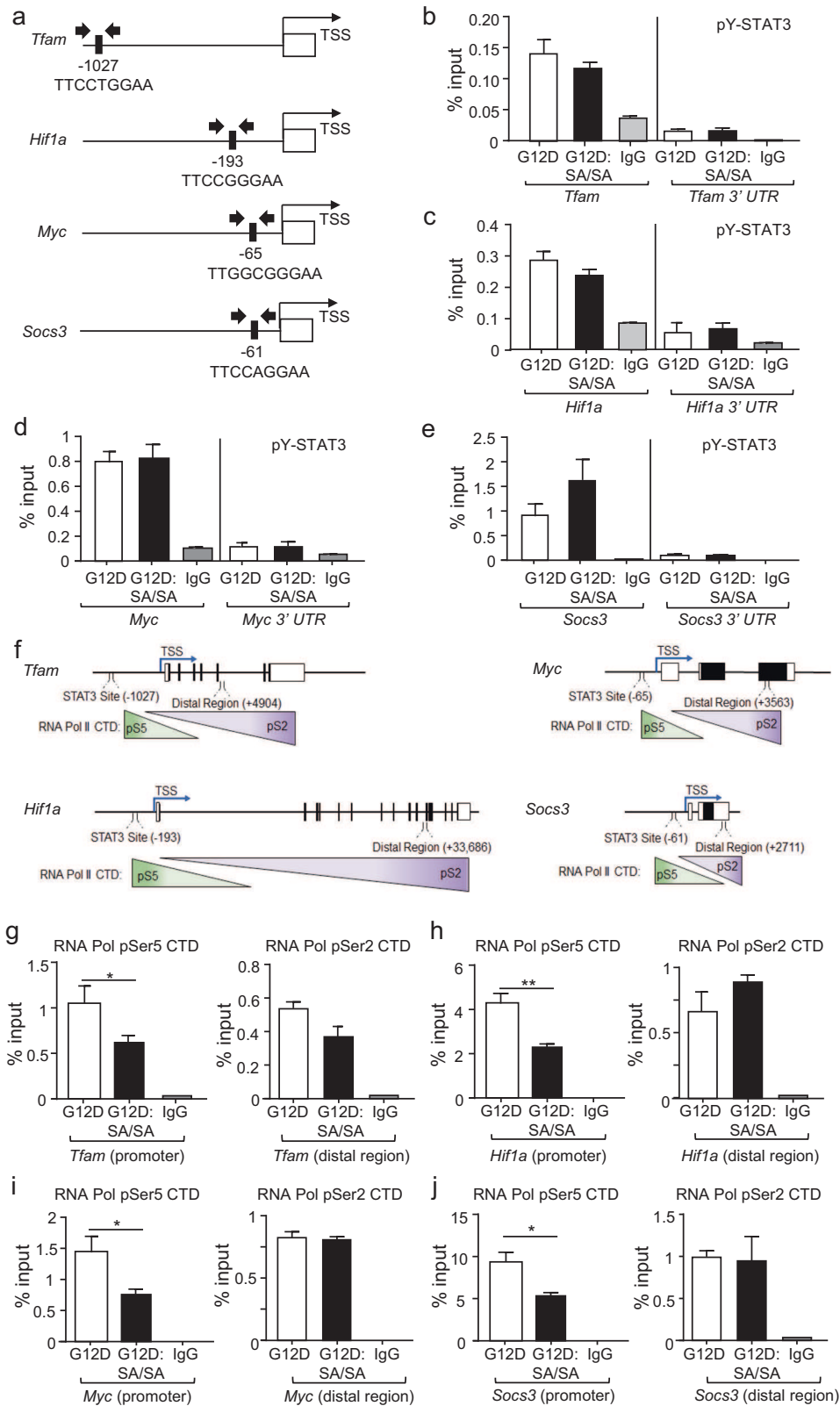
Since these data indicate that STAT3 recruitment to the promoter for *Tfam*, as well as for *Socs3*, *Myc* and *Hif1a*, is independent of its serine phosphorylation in the lung, we next investigated whether the reduced transcription of STAT3-target genes in pS₇₂₇-STAT3 deficient *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mouse lungs occurs via defective transcription initiation and/or elongation activity of RNA polymerase II (Pol II). For this purpose, we performed *in vivo* ChIP assays on *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mouse lungs with antibodies against distinct serine phosphorylation sites, pSer5 and pSer2, within the C-terminal domain of Pol II that are associated with transcription initiation and elongation, respectively (Fig. 6f). As shown in Fig. 6g–j, the accumulation of pSer5 RNA Pol II on the

active *Tfam*, *Hif1a*, *Myc* and *Socs3* promoters was significantly lower in lung tissues from *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mice compared to *Kras*^{G12D} mice. By contrast, pSer2 RNA Pol II levels bound to these genes were comparable in *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mouse lung tissues (Fig. 6g–j). We note that these observations for *TFAM* and *MYC* were confirmed in human A549 LAC cells expressing STAT3-WT and STAT3-SA (Supplementary Fig. 9a, b). Taken together, these data reveal a hitherto unknown capacity of pS₇₂₇-STAT3 to direct the expression of nuclear genes critical for mitochondrial function and metabolism in LAC primarily by augmenting RNA Pol II-driven transcription initiation, but not elongation.

Heterozygous deficiency for total STAT3 expression in *Kras*^{G12D} mice phenocopies the suppressed lung carcinogenesis of *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mice

To further verify our findings that STAT3 plays a pro-tumorigenic role in KRAS-induced LAC, we undertook an alternative yet complementary genetic strategy by generating *Kras*^{G12D} mice on a STAT3 heterozygous background (*Kras*^{G12D}.*Stat3*^{-/+}). Importantly, this approach facilitates interrogation of the phenotypic consequences of ~50% reduction in the total pool of STAT3 protein, as well as serine and tyrosine phosphorylated forms (Fig. 7a), whilst simultaneously preserving sufficient STAT3 protein expression without disruption of the transcriptional output of other STATs (i.e. STAT1) that is seen upon conditional cell type-specific ablation of *Stat3* (Supplementary Fig. S10a, b) [49, 50].

As shown in Fig. 7b–d, compared to parental *Kras*^{G12D} mice, male and female *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{-/+} mice displayed a significantly ameliorated LAC phenotype, similar to that observed in *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mice. The suppressed lung tumourigenesis in *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{-/+} mice, like that in *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mice, was also associated with significantly lower numbers of TTF-1⁺ and PCNA⁺ cells in the lung (Fig. 7e–h). In addition, similar to our findings in *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mice, in the lungs of *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{-/+} mice the expression of STAT3-regulated and disease-associated *Myc*, *Tfam* and *Hif1a* genes was reduced, whereas the expression of representative angiogenic or inflammatory genes was unchanged, compared to *Kras*^{G12D} mice (Fig. 7i–k, Supplementary Fig. S10c, d). Therefore, considering that compromised STAT3 S₇₂₇ phosphorylation is common to the ameliorated LAC phenotype in both *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{-/+} and *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mice, whereas pY₇₀₅-STAT3 is reduced only in *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{-/+} mice, these data lead us to propose that the S₇₂₇ site in STAT3 invokes its oncogenic actions to potentiate mutant KRAS-induced LAC.



DISCUSSION

In cancer, the oncogenic potential of STAT3 has traditionally been assigned to its status as a tyrosine-phosphorylated transcription factor that is activated via numerous upstream ligand-bound cytokine and growth factor receptors [21, 23]. However, the

multifaceted oncogenicity of STAT3 also extends to its non-transcriptional mitochondrial function as a serine phosphorylated metabolic regulator [22, 27]. This has specifically been the case for mutant RAS transformed cancer cells, which demonstrate an oncogenic reliance on mitochondrial pS₇₂₇, but not nuclear pY₇₀₅,

Fig. 6 pS₇₂₇-STAT3 binding to the promoter of *Tfam* and other STAT3-regulated genes modulates the transcription initiation activity of RNA Polymerase II. **a** Schematic diagram of the location (black rectangle) and sequence of STAT3 binding sites within the 5' promoter regions of the indicated mouse genes. Arrows indicate the relative positions of the transcription start sites (TSS), and arrowheads indicate the position of the primers used for PCR amplification in ChIP assays (see below). **b–e**, Nuclear enrichments from *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}.*Stat3*^{SA/SA} mouse lungs taken at 6 weeks post Ad-Cre inhalations were subjected to ChIP analysis with antibodies against either pY₇₀₅-STAT3 or IgG isotype control. qPCR (*n* = 4 mice/genotype) was performed with primers against the STAT3 binding region (depicted in **a**) of the **b** *Tfam*, **c** *Hif1a*, **d** *Myc*, or **e** *Socs3* gene promoters, or control primers against the respective 3' untranslated regions (UTR) for each gene. **f** Promoter and structure of the indicated mouse genes depicting the regions amplified by primer pairs to detect RNA Polymerase (Pol) II loaded on the promoters, and its progress through the gene body. pSer5 (pS5) and pSer2 (pS2) of the C-terminal domain (CTD) of RNA Pol II marks transcription initiation and elongation, respectively. Nuclear enrichments from panels (**b–e**) above were subjected to ChIP with antibodies against pSer5 RNA Pol II CTD, pSer2 Pol II CTD, or IgG isotype control, and proximal promoter (STAT3 binding site) or distal gene regions of **g** *Tfam*, **h** *Hif1a*, **i** *Myc* and **j** *Socs3* were qPCR amplified. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, unpaired *t* test.

STAT3 for optimal ETC activity and augmented metabolic functions, including oxidative phosphorylation and glycolysis [24, 25, 27, 51]. Notably, constitutive pS₇₂₇-STAT3 has also recently been shown to promote gastric tumourigenesis independent of both Ras and its non-canonical mitochondrial role, but rather via its capacity to augment RNA polymerase II-driven transcription of many nuclear-encoded STAT3-regulated genes implicated in oncogenic cellular processes, such as proliferation, survival, angiogenesis and inflammation [28]. This finding challenges the long-held dogma of a supportive role only for pS₇₂₇ to maximise pY₇₀₅-driven transcription of STAT3-target genes [29–31], and suggests that in certain cancer types, pS₇₂₇ is a critical post-translational modification within STAT3 that drives its oncogenic transcriptional activities. Indeed, in our current study, we reveal that in mutant KRAS-addicted LAC, constitutive pS₇₂₇-STAT3 exhibits a hitherto unknown capacity to metabolically reprogramme cancer cells towards a hyper-proliferative state by augmenting the transcription of both key nuclear- and mitochondrial-encoded genes. In this respect, we propose a cancer cell-autonomous function of pS₇₂₇-STAT3 in LAC, which is supported by our i) *in vitro* studies whereby ablation of STAT3 serine phosphorylation (STAT3-SA mutant) directly impairs the proliferative and growth (i.e. colony-forming) potential of, and disrupts metabolic activities in, human LAC cell lines, and ii) findings that ablation of pS₇₂₇-STAT3 (using *Stat3*^{SA/SA} mice) does not impact on immune/inflammatory cell infiltrates in the tumour microenvironment in the lung of *Kras*^{G12D} mice. It will therefore be of interest for future studies to further explore the tumour cell autonomous role of pS₇₂₇-STAT3 in KRAS-driven LAC by, for example, comparing oncogenic cellular responses in immunodeficient versus 'humanised' mouse models xenografted with human LAC cell lines engineered to express the STAT3-SA mutant.

A key aspect of our study was the inclusion of *Kras*^{G12D} mice heterozygous null for *Stat3* (displaying reduced pY₇₀₅- and pS₇₂₇-STAT3 levels), which phenocopied the suppressed tumourigenesis in the absence of pS₇₂₇-STAT3 (displaying unaltered pY₇₀₅-STAT3 levels), thus supporting pS₇₂₇ as a critical STAT3 post-translational modification driving KRAS-addicted LAC. These findings are consistent with other *in vivo* models and clinical studies implicating a driver role for STAT3 in lung cancer, although the involvement of pS₇₂₇-STAT3 was not reported [14, 16, 18–20, 52]. Conversely, the conditional targeting of *Stat3* (by Cre-recombinase) in the *Kras*^{G12D} transformed lung epithelium has been reported to cause a pro-inflammatory and pro-angiogenic tumour microenvironment that enhances LAC initiation, suggesting an alternate tumour suppressor role of STAT3 in the lung [53, 54]. Somewhat intriguingly, another study involving the conditional targeting of *Stat3* in the lung epithelium reported a gender-specific function of STAT3 during oncogenic KRAS-driven LAC, in which epithelial *Stat3* deletion in female and male mice resulted in reduced and increased lung tumour burden, respectively [55]. Mechanistically, the contrasting pro- or anti-tumourigenic effect of conditional ablation of *Stat3* in the airway epithelium was attributed to the increased or reduced NF-κB-induced expression

of inflammatory chemokines (e.g. CXCL1) and cytokines (e.g. IL-6, IL-17), respectively, in lung tissues that shapes either a pro-tumour immunosuppressive or anti-tumour immune response in the microenvironment [54, 55]. However, in our current study we did not observe any gender-specific effects on tumourigenesis, nor did we detect any changes in, for instance, CXCL1, IL-6 or IL-17 expression in the lungs of *Kras*^{G12D} mice either deficient for pS₇₂₇-STAT3 or heterozygous null for STAT3.

Notably, a caveat with conditional (i.e. cell- or tissue-specific) ablation of certain STAT family members, in particular STAT3 or STAT1, is the alteration to cytokine specificity [49]. For example, ablation of STAT3 in mouse embryonic fibroblasts induces a molecular switch of IL-6 from a typical STAT3-driven pro-inflammatory and pro-tumour response towards an 'interferon-type' STAT1-driven response, the latter of which is generally considered tumour suppressive in solid tumours [50, 56]. In this respect, the reported anti-tumour immune response in the lungs of female *Kras*^{G12D} mice harbouring epithelial-specific *Stat3* ablation was associated with highly upregulated *lfn* gene expression, which would be expected to drive a STAT1-mediated anti-tumour response [55]. Also, the conditional ablation of STAT3 in numerous cell types invariably provokes a marked *in vivo* inflammatory response in tissues caused by the biased disruption of STAT3-activating anti-inflammatory regulators (e.g. IL-10) at the expense of pro-inflammatory cytokines (e.g. IL-6) that also signal via STAT3 [57–59]. However, unlike STAT3-null (epithelial) cells, cells harbouring the pS₇₂₇A-STAT3 homozygous mutation (i.e. *Stat3*^{SA/SA}) maintain their capacity to elicit certain STAT3-driven cellular responses that are dependent on other post-translational modifications retained in STAT3-SA mutant-expressing cells (e.g. pY₇₀₅) which are important for its function (including homeostatic) downstream of activating cytokines (e.g. IL-6, IL-10). Therefore, the above compensatory mechanisms in STAT3-null cells that alter the biological response of STAT3-activating cytokines and lead to a tumour suppressor function are not predicted to feature in cells expressing the STAT3-SA mutant.

We speculate that the above compensatory mechanisms may also apply, at least in part, to a recent study reporting that the *ex vivo* CRISPR/Cas9-mediated ablation of *Stat3* (i.e. STAT3-KO) in primary lung epithelial cell cultures from *Kras*^{G12D}.*p53*^{-/-} mice reduces tumour latency, whereas oncogenic *Kras* mutant lung epithelial cell cultures engineered to over-express either STAT3-WT or a constitutively active STAT3-Y₆₄₀F mutant increases latency, upon subcutaneous implantation in a xenograft tumour model [60]. However, this engineered manipulation of STAT3 expression and activity in lung epithelial cultures also affected the differentiation status of subcutaneous tumours (STAT3-WT and STAT3-Y₆₄₀F, squamous cell carcinoma versus STAT3-KO, carcinosarcoma). Since previous studies targeting endogenous STAT3 in the native lung epithelium of *Kras*^{G12D} mice have not affected the LAC histological tumour type [14, 53, 54], it is possible that the artificial subcutaneous environment of transplanted tumour cells and/or *ex vivo* culturing conditions of tumour cells may also skew the functional outcomes of altered STAT3 signalling. Nonetheless,

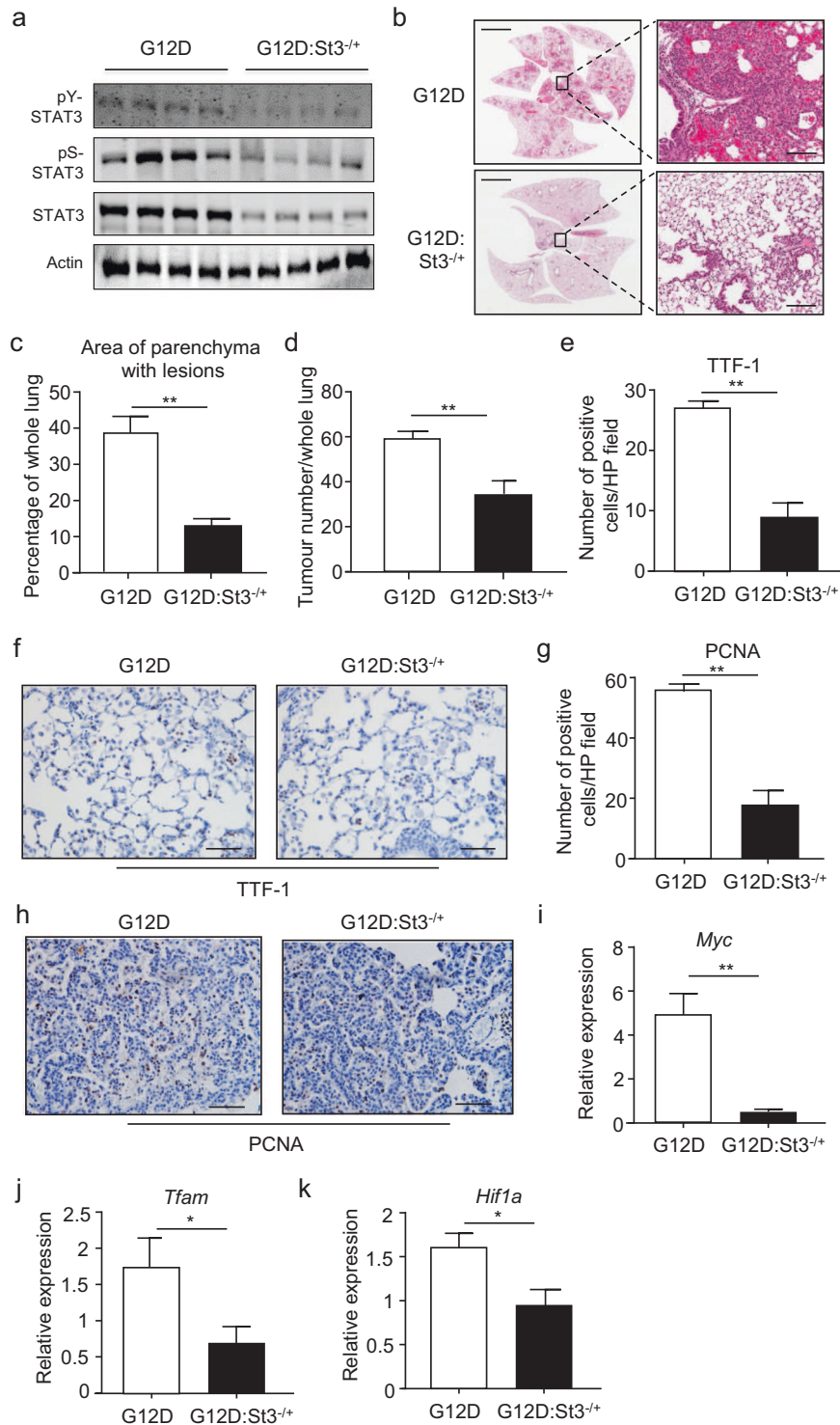


Fig. 7 Heterozygous ablation of *Stat3* suppresses *Kras*^{G12D}-induced LAC. **a** Representative immunoblots with the indicated antibodies of *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{-/+} mouse lung lysates at 6 weeks post induction of oncogenic *Kras* via Ad-Cre inhalation. Each lane represents an individual mouse sample. **b** Representative low-power (left panels) and high-power (right panels) photomicrographs showing H&E-stained lung cross-sections from *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{-/+} mice at 6 weeks post Ad-Cre inhalations. Scale bars = 3 mm (left panels) and 300 μ m (right panels). **c** and **d** Graphs depicting **c** quantification of the percentage of lung parenchyma area containing hyperplastic AAH and adenocarcinoma lesions, and **d** number of lesions present in the whole lung, in the indicated mouse genotypes at 6 weeks post Ad-Cre inhalations. Data from 6 mice/genotype. ** $P < 0.01$, unpaired *t* test. **e** Quantification of TTF-1-positive cells per high-power (HP) field in lung lesions of the indicated mice. $n = 6$ mice/group. ** $P < 0.01$, unpaired *t* test. **f** Representative high-power photomicrographs of TTF-1-stained lung cross-sections from *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice at 6 weeks post Ad-Cre inhalations. Scale bars = 60 μ m. **g** Quantification of PCNA-positive cells per HP field in lung lesions of the indicated mice. $n = 6$ mice/group. ** $P < 0.01$, unpaired *t* test. **h** Representative high-power photomicrographs of PCNA-stained lung cross-sections from *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12D}:*Stat3*^{SA/SA} mice at 6 weeks post Ad-Cre inhalations. Scale bars = 60 μ m. **i** qPCR gene expression analysis of **i** *Myc*, **j** *Tfam* and **k** *Hif1a* (normalised against *18 s rRNA*) in lungs of the indicated mice at 6 weeks post Ad-Cre inhalations ($n = 5$ mice/genotype). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, unpaired *t* test.

we propose that the tumour suppressor role assigned to STAT3—based on the endogenous ablation of *Stat3* in lung epithelial cells—may be more indicative of the altered compensatory transcriptional outputs of others STATs (e.g. STAT1) and/or selective impairment of anti-inflammatory STAT3-activating cytokines (e.g. IL-10) that also exhibit tumour suppressive functions [61]. Although these mechanisms were not investigated in *Kras*^{G12D} lung epithelial cells specifically lacking STAT3 [54, 60], our current study overcomes these limitations since there remains sufficient cytokine-driven homeostatic endogenous STAT3 activity (e.g. ~50% upon heterozygous loss) within the native lung environment to prevent disruption of the transcriptional output of STAT1 whilst reducing the threshold of STAT3 oncogenic signalling.

Another key finding of our current study was that the oncogenic role of pS₇₂₇-STAT3 associated with the transcriptional regulation of key nuclear-encoded genes involved in glycolysis and mitochondrial function, namely those encoding HIF1 α , MYC and TFAM. While *HIF1A* and *MYC* have previously been documented as STAT3-regulated genes [45, 47], to the best of our knowledge we present the novel finding that *TFAM* is also transcriptionally regulated by STAT3. Of note, our findings here also build upon the previous report that *TFAM* is transcriptionally regulated by MYC, thus highlighting the importance of the STAT3-MYC axis in regulating *TFAM* expression and activity [62]. Indeed, the suppressed expression of these three genes collectively in both pS₇₂₇-STAT3-deficient *Kras*^{G12D} tumour tissues and human KRAS mutant LAC cells provides a robust molecular explanation for the pronounced reduction observed in glycolysis and mitochondrial respiration upon pS₇₂₇-STAT3-deficiency, which in turn results in the reduced proliferative capacity of mutant KRAS transformed epithelial cells. This notion is supported by a previous report that blocking mitochondrial function with a mitochondrial electron transport inhibitor (antimycin A) suppresses the in vitro growth potential of human LAC cells [63]. Considering that MYC, in addition to its role as a key regulator of glycolysis, is also a potent stimulator of cell proliferation by transcriptionally inducing numerous target genes encoding cell cycle regulators (e.g. cyclins, cyclin-dependent kinases), the reduced expression of MYC alone in pS₇₂₇-STAT3-deficient LAC cells is likely to have a further suppressive effect on LAC cell growth [44, 64]. With respect to *TFAM*, in mouse keratinocytes mitochondrial-localised (pS₇₂₇) STAT3 can bind to the mitochondrial genome by complexing with *TFAM* and regulate the expression of mitochondrial genes, and thus mitochondrial respiration [65]. This finding, together with our current data, suggests the potential of pS₇₂₇-STAT3 to influence *TFAM*-dependent transcription of the mitochondrial genome by regulating both the expression and functional activation of *TFAM*.

Despite our in vivo demonstration that STAT3 was recruited to the *Tfam* gene promoter, this was independent of pS₇₂₇, since STAT3 occupancy of the *Tfam* promoter was comparable in both pS₇₂₇-STAT3-deficient and STAT3-WT-expressing *Kras*^{G12D} mouse lungs. Rather, we reveal that pS₇₂₇-STAT3 promotes oncogenic KRAS-induced lung carcinogenesis by augmenting RNA polymerase II-mediated transcriptional initiation, but not elongation, of STAT3-target genes, in particular *Tfam*, *Myc* and *Hif1a* (and *Socs3*). In this respect, we compare our findings here with those of a recent study that, in the context of gastric cancer, reported constitutive pS₇₂₇ can drive the transcriptional activation of STAT3-regulated genes by enhancing RNA polymerase II-mediated transcriptional elongation, but not initiation [28]. In the gastric compartment, while pS₇₂₇ was also not required for the recruitment of STAT3 to the promoter of STAT3-target genes (e.g. *SOCS3*), instead pS₇₂₇ facilitated the binding of STAT3 with RuvB-like AAA ATPase 1 (RUVBL1/Pontin) and enhancer of rudimentary homologue (ERH), both of which can directly modulate gene transcription among their complex repertoire of activities, to augment the transcription elongation phase by RNA polymerase II

[28, 66, 67]. While these divergent roles for pS₇₂₇-STAT3 in modulating the transcriptional elongation versus initiation of STAT3-regulated mRNA transcripts may be attributed to cell- and/or tissue-type differences (i.e. gastric versus lung epithelium), it will be of most interest to undertake similar proteomic studies in oncogenic KRAS-addicted LAC to identify interacting partners of pS₇₂₇-STAT3 that specifically facilitate maximal RNA polymerase II-mediated transcriptional initiation of STAT3-regulated genes in the transformed lung epithelium. Nonetheless, these observations further emphasise how pS₇₂₇-STAT3 can differentially modulate discrete phases of the RNA polymerase II-dependent transcription cycle, namely initiation and elongation, of target genes in certain cancer settings (i.e. pSer-STAT3 for initiation of gene transcription in mutant KRAS LAC).

Collectively, our demonstration here of an uncoupling of pS₇₂₇-STAT3 from pY₇₀₅-STAT3 in driving mutant KRAS LAC emphasises the growing need for new therapeutic approaches to selectively target pS₇₂₇ in STAT3 for evaluation in LAC and other KRAS-addicted cancers associated with STAT3 activation (e.g. colorectal, pancreatic).

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples

Snap-frozen and formalin-fixed resected lung tissues were collected from LAC patients and control LAC-free individuals (Supplementary Table S1) upon formal written informed consent from either Monash Medical Centre or the Victorian Cancer Biobank. Studies were conducted in accordance with the ethical principles for medical research involving human subjects, as stated in the World Medical Association Declaration of Helsinki and Department of Health and Human Services Belmont Report. Ethics approval was provided by the Monash Health Human Research Ethics Committee.

Mice and treatments

The mouse strains *Stat3*^{SA/SA} and *Stat3*^{-/+} (harbouring heterozygous knockout of *Stat3*) were individually backcrossed with *Kras*^{G12D/+} mice on the C57BL/6 \times 129 Sv background [9, 14, 29]. Randomly assigned equivalent numbers of male and female mice aged 6 weeks received adenoviral Cre (Ad-Cre) recombinase at 5×10^6 plaque-forming units (University of Iowa), or, as a control, equivalent volume (125 μ l) of Modified Eagle's Medium as vehicle, by intranasal inhalation [10, 14, 15], and were culled after 6 or 12 weeks. The reporting of these mouse studies conforms with the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments guidelines [68]. All mice were housed under specific pathogen-free conditions, and experiments were approved by the Monash University/Monash Medical Centre "B" Animal Ethics Committee. Where possible, the investigator was blinded to individual animals being experimented on.

Histopathology, immunohistochemistry and immunofluorescence

Dissected mouse and human lungs were fixed in formalin and then embedded in paraffin for sectioning as before [14, 15]. Haematoxylin and Eosin (H&E) stained lung sections were subjected to blinded histological evaluation. Immunohistochemistry was performed with Cell Signalling Technology antibodies against pS₇₂₇-STAT3 (Cat. No. 9134), pY₇₀₅-STAT3 (Cat. No. 9145) and PCNA (Cat. No. 2586), BD Biosciences antibodies against CD45 (Cat. No. 550539) and B220 (Cat. No. 550286), Santa Cruz Biotechnology antibodies against CD3e (Cat. No. sc-1127) and Tom20 (Cat. No. sc-11415), and a Novus Biologicals antibody against TTF-1 (Cat. No. NBP2-29434), as per the manufacturers recommended protocols. Apoptosis was assessed by the TUNEL assay (Chemicon/Merck Millipore), as described previously [14, 15, 28]. Staining for positive cells was quantified on digital images of lung photomicrographs (60 \times or 100 \times high-power fields) that were visualised using Image J software (National Institutes of Health). Positive-staining cells were counted manually ($n=10$ fields) within a grid that was placed over photomicrographs with a random offset. In addition, the percentage of staining positivity for PCNA and TTF-1 was measured in tumour areas of lung sections using Aperio ImageScope software (Leica Biosystems). The staining intensity of cells positive for either pS₇₂₇-STAT3 or pY₇₀₅-STAT3 in lung sections was evaluated using the following system: 0 (none), 1 (weak), 2 (moderate) and

3 (strong). Multilabel immunofluorescence was performed on FFPE human lung tissue sections using a DAKO Autostainer Plus (Agilent Technologies) with the following primary antibodies: anti-pS₇₂₇-STAT3 (Cell Signalling Technology, Cat. No. 9134), anti-pY₇₀₅-STAT3 (Cell Signalling Technology, Cat. No. 9145), anti-human CD45 (DAKO, Cat. No. M0701), and anti-human Cytokeratin (DAKO, Cat. No. M351501-2). Secondary antibodies were as follows: anti-mouse Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cat. No. 715-605-151) and anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cat. No. 711-545-152). Slide scanning was performed on an Olympus VS120 research slide scanner, and images were captured with an Olympus XM10 digital camera. The following filters were used for detection of fluorophores: 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue, nuclear counterstain), Alexa Fluor 488 (pseudo-colour green, pS₇₂₇-STAT3 or pY₇₀₅-STAT3), and Alexa Fluor 647 (pseudo-colour magenta, CD45 or Cytokeratin).

Cell lines and cell growth assays

The human A549 and NCI-H1299 LAC cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), 1% penicillin-streptomycin and 1% L-glutamine (Thermo Fisher Scientific). Human LAC cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and were characterised/authenticated via short tandem repeat profiling, and passaged for under 6 months after receipt. Cells were routinely tested for mycoplasma contamination (MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit, Lonza) throughout the duration of experiments. Cell viability (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; MTT (Sigma-Aldrich)) and proliferation (CellTiter-Glo Assay (Promega)), as well as soft agar colony formation, were assessed as described previously [15, 46]. For crystal violet proliferation assays, cells (5×10^3) were plated into each well of a 96-well plate in triplicate, and were cultured over 96 h. Cells were fixed in ice-cold methanol, then cell monolayers were covered with a 50% v/v solution of glycerol in phosphate-buffered saline (PBS), following which upon removal cells were stained in crystal violet solution (0.2% crystal violet, 2% ethanol, ddH₂O). Cells were washed extensively in tap water and allowed to dry, and crystal violet was solubilised in 70% ethanol and absorbance measured at 570 nm using a ClarioStar spectrophotometer (BMG LABTECH).

Engineered human LAC cell lines

Human A549 and NCI-H1299 STAT3 knockout (KO) LAC cells were generated by the genetic targeting of STAT3 (exon 3) using the CRISPR/Cas9 system with self-complementary oligonucleotides (Sigma) comprising single-guided RNA sequences, as described previously [46]. STAT3-KO cells were reconstituted with lentiviral expression constructs (pLVX-IRES-mCherry backbone; Clontech) for STAT3-WT, STAT3-SA, STAT3-SA/YF, STAT3-MTS and STAT3-YF, and reconstituted cells were sorted by flow cytometry (for mCherry) to select cell populations with equivalent STAT3 expression levels, as before [28]. Using a similar strategy as published previously [69], NCI-H1299 cells were transiently transfected with a KRAS^{G12V} mutant construct (Addgene, Cat. No. 46746; gift from D. Gough, Hudson Institute of Medical Research, Melbourne, Australia). Briefly, NCI-H1299 cells were plated in cell culture media for 24 h, following which cells were transfected with pBABE-Puro-Kras*G12V construct using Fugene[®] HD Transfection Reagent (Promega) according to manufacturer's instructions. The presence of the Kras*G12V construct in transfectants was confirmed by PCR amplification of a 668 bp band (observed by 1.5% agarose gel electrophoresis) using the following primers: pBABE-F, 5'-CTTTATC-CAGCCCTCAC-3', and pBABE-R, 5'-GGAATGTGTGTGAGTTAGGGT-3'. Immunoblotting and cell proliferation assays were performed at 24 and 72 h, respectively.

Immunoblotting

Total protein lysates were prepared from snap-frozen mouse lung tissue and human LAC cell lines, and subjected to immunoblotting as described previously with the following antibodies: pS₇₂₇-STAT3 (Cat. No. 9134), pY₇₀₅-STAT3 (Cat. No. 9145), total STAT3 (Cat. No. 9139), TFAM (Cat. No. 80765) (Cell Signalling Technology), and Actin (Cat. No. A4700) (Sigma-Aldrich) [15, 28]. Oxyblot assays were performed on lung lysates as described previously [70]. Protein bands were visualised using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR) and quantified using Image J software.

Lactate assay

Lactate was assessed in protein lysates from human LAC cells or mouse lung tumour issues using the L-lactate colorimetric assay kit (Abcam), as described previously [71].

Mitochondrial localisation assay

Cells were cultured overnight in an eight-well chamber (Ibidi, USA), following which cells were washed twice with ice-cold PBS and fixed with ice-cold methanol. After PBS washing, cells were permeabilised with 0.1% Triton-X in PBS, then blocked with CAS blocking reagent (Invitrogen, USA). Cells were incubated with primary antibodies against STAT3 (Cat. No. 9139) and AIF (Cat. No. 4642) (Cell Signalling Technology) overnight at 4°, then washed and incubated for 1 h at room temperature with Alexa Fluor secondary antibodies (Invitrogen, USA). Nuclear staining was achieved using DAPI.

Seahorse assay

The oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (EACR) of human LAC cells were measured using a Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 5×10^4 cells in DMEM plus 10% FCS were seeded in triplicate overnight in Seahorse XF Cell Culture Microplates. On the following day, each well containing sub-confluent cells at comparable cell density were washed and incubated in Seahorse assay medium supplemented with 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, and 10 mM glucose (pH 7.4) in a 37 °C non-CO₂ incubator for 1 h prior to assay. Oligomycin (1 μM), FCCP (0.2 μM), antimycin (0.5 μM) and rotenone (0.5 μM) compounds were then added to the Seahorse XFp Analyzer (Agilent) for calibration, following which warmed assay medium was added to the cell culture microplates for incubation (37 °C, non-CO₂) for 45 min. OCR and ECAR data were then recorded and analysed by Seahorse Wave Controller software.

Quantitative chromatin immunoprecipitation (ChIP)

In vivo ChIP on mouse lung tissues was performed with antibodies against pY₇₀₅-STAT3 (Cat. No. 9145) (Cell Signalling Technology), pSer2 RNA Polymerase II and pSer5 RNA Polymerase II (Cat. No. ab103968) (Abcam), as well as concentration matched Rabbit IgG antibody (Cat. No. 2729) (Cell Signalling Technology), using methodology as described previously [28]. The percentage input was calculated using the 2^{-ΔΔCT} method [28]. qPCR was performed with the following primers (Sigma-Aldrich): STAT3 binding site on mouse *Socs3* promoter, as well as RNA polymerase II proximal *Socs3* gene, forward 5'-CACAGCCTTTCAGTGCAGAGT-3', and reverse 5'-TATT TACCCGGCCAGTACGC-3'; *Socs3* 3' UTR, forward 5'-TCGGTCAGTAGTCC GAGAG-3', and reverse 5'-AGGTAATTGCATGGCTGCTG-3'; STAT3 binding site on mouse *Tfam* promoter, as well as RNA polymerase II proximal *Tfam* gene, forward 5'-agcctgactgactggaattt-3', and reverse 5'-cacatagagcagg catggtg-3'; *Tfam* 3' UTR, forward 5'-GCAGGCACTACAGCGATACA-3', and reverse 5'-TACCTTCCCATTCCTCC-3'; STAT3 binding site on mouse *Myc* promoter, as well as RNA polymerase II proximal *Myc* gene, forward 5'-gtccgactgcctcactcagct-3', and reverse 5'-caaccgtcgtcactccct-3'; *Myc* 3' UTR, forward 5'-tccttctgacagaactgatg-3', and reverse 5'-CATTCAAGGCC TATTACA-3'; STAT3 binding site on mouse *Hif1a* promoter, as well as RNA polymerase II proximal *Hif1a* gene, forward 5'-ccctagctgcacacagaca-3', and reverse 5'-GCGCGGAGAAAGACAAAGT-3'; *Hif1a* 3' UTR, forward 5'-TCAGCATTTCACCATTCAT-3', and reverse 5'-AAGGGACAACTCCCTACC-3'; RNA Polymerase II distal *Socs3* coding, forward 5'-GAGGCAGGAGGT GATGGAG-3', and reverse 5'-TTGTTTCTCCCAACACAGG-3'; RNA Polymerase II distal *Tfam* coding, forward 5'-CAAAGGATGATTCGGCTCAG-3', and reverse 5'-tccatttgcgatttccctc-3'; RNA Polymerase II distal *Myc* coding, forward 5'-TGCCACGTCTCCACTACCAG-3', and reverse 5'-GCGGTTGTTGCTGATCTGCT-3'; RNA Polymerase II distal *Hif1a* coding, forward 5'-tgaccaccatcaactaaa-3', and reverse 5'-GGCTGGGAAAAGT TAGGAGTG-3'; RNA polymerase II proximal *TFAM* gene, forward 5'-tggtctcaagaccaccgaca-3', and reverse 5'-TCGGAGTTCAGAAATGTAACG-3'; RNA Polymerase II distal *TFAM* coding, forward 5'-AAGATTCCAAGAAGC TAAGGGTGA-3', and reverse 5'-GAGTTACTGTCTGGATATCA-3'; RNA polymerase II proximal *MYC* gene, forward 5'-gcctcgagaagggcaggct-3', and reverse 5'-GGCCGCCCTCGCTCCCTCTG-3'; RNA Polymerase II distal *MYC* coding, forward 5'-gaatgtcaagaggcgaacac-3', and reverse 5'-TGGACG GACAGGATGTATGCT-3'.

RNA isolation and gene expression analyses

Total RNA was extracted from snap-frozen mouse lung tissues and human LAC cell lines using a RNeasy mini kit (Qiagen). Quantitative RT-PCR (qPCR) was performed on cDNA with SYBR Green (Life Technologies) using the 7900HT Fast RT-PCR System (Applied Biosystems) as described previously [15, 28]. Gene expression data acquisition and analyses were performed

using the Sequence Detection System Version 2.4 software (Applied Biosystems). Forward and reverse human and mouse primer sequences for specified genes have been previously published [15, 28].

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism for Windows version 7.0 software (San Diego). Significance between experimental groups was determined by two-tailed Student's *t* tests (unpaired or paired, as appropriate) or ANOVA (one-way or two-way) assuming normal distribution. $P < 0.05$ was considered statistically significant, as indicated in figure legends along with experimental sample sizes, where relevant. Experimental sample size estimates were based on power analyses assuming a significance level (alpha) of 0.05 and a power of 80% confidence of detecting a 25% difference between the means (standard deviation of 15%), as well as on our previous studies [14, 15]. Data in all figures are expressed as the mean \pm standard error of the mean.

REFERENCES

- Wong MCS, Lao XQ, Ho KF, Goggins WB, Tse SLA. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Sci Rep*. 2017;7:14300–9.
- Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ Jr, Wu YL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017;389:299–311.
- Wang X, Goldstein D, Crowe PJ, Yang JL. Next-generation EGFR/HER tyrosine kinase inhibitors for the treatment of patients with non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations: a review of the evidence. *Onco Targets Ther*. 2016;9:5461–73.
- Noonan KL, Ho C, Laskin J, Murray N. The influence of the evolution of first-line chemotherapy on steadily improving survival in advanced non-small-cell lung cancer clinical trials. *J Thorac Oncol*. 2015;10:1523–31.
- Walser T, Cui X, Yanagawa J, Lee JM, Heinrich E, Lee G, et al. Smoking and lung cancer: the role of inflammation. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5:811–5.
- Ahrendt S, Decker PA, Alawi EA, Zhu YR, Sanchez-Cespedes M, Yang SC, et al. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2001;92:1525–30.
- Westra WH, Slebos RJ, Offerhaus GJ, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, et al. K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers: evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 1993;72:432–8.
- Román M, Baraibar I, López I, Nadal E, Rolfó C, Vicent S, et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Mol Cancer*. 2018;17:33.
- Jackson E, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, et al. DA. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev*. 2001;15:3243–8.
- DuPage M, Dooley AL, Jacks T. Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. *Nat Protoc*. 2009;4:1064–72.
- Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:828–51.
- Janes MR, Zhang J, Li LS, Hansen R, Peters U, Guo X, et al. Targeting KRAS mutant cancers with a covalent G12C-specific inhibitor. *Cell*. 2018;172:578–89.
- Zhu Z, Aref A, Cohoon TJ, Barbie TU, Imamura Y, Yang S, et al. Inhibition of KRAS-driven tumorigenicity by interruption of an autocrine cytokine circuit. *Cancer Discov*. 2014;4:452–65.
- Brooks GD, McLeod L, Alhayyani S, Miller A, Russell PA, Ferlin W, et al. IL6 Trans signaling promotes KRAS-driven lung carcinogenesis. *Cancer Res*. 2016;76:866–76.
- Saad MI, Alhayyani S, McLeod L, Yu L, Alanazi M, Deswaerte V, et al. ADAM17 selectively activates the IL-6 trans-signaling/ERK MAPK axis in KRAS-addicted lung cancer. *EMBO Mol Med*. 2019;11:e9976.
- Kim HS, Park YH, Lee J, Ahn JS, Kim J, Shim YM, et al. Clinical impact of phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3, epidermal growth factor receptor, p53, and vascular endothelial growth factor receptor 1 expression in resected adenocarcinoma of lung by using tissue microarray. *Cancer*. 2010;116:676–85.
- Tong M, Wang J, Jiang N, Pan H, Li D. Correlation between p-STAT3 overexpression and prognosis in lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12:e0182282.
- Yang Q, Shen S, Zhou S, Ni J, Chen D, Wang G, et al. STAT3 activation and aberrant ligand-dependent sonic hedgehog signaling in human pulmonary adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2012;93:227–36.
- Tran P, Fan AC, Bendapudi PK, Koh S, Komatsubara K, Chen J, et al. Combined inactivation of MYC and K-Ras oncogenes reverses tumorigenesis in lung adenocarcinomas and lymphomas. *PLoS One*. 2008;3:e2125.
- Li Y, Du H, Qin Y, Roberts J, Cummings OW, Yan C. Activation of the signal transducers and activators of the transcription 3 pathway in alveolar epithelial cells induces inflammation and adenocarcinomas in mouse lung. *Cancer Res*. 2007;67:8494–503.
- Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:736–46.
- Poli V, Camporeale A. STAT3-mediated metabolic reprogramming in cellular transformation and implications for drug resistance. *Front Oncol*. 2015;5:121.
- Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018;18:773–89.
- Gough D, Corlett A, Schlessinger K, Wegrzyn J, Lamer AC, Levy DE. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science*. 2009;324:1713–6.
- Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, et al. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science*. 2009;323:793–7.
- Gough DJ, Marie I, Lobry C, Aifantis I, Levy DE. STAT3 supports experimental K-RasG12D-induced murine myeloproliferative neoplasms dependent on serine phosphorylation. *Blood*. 2014;124:2252–61.
- Garama DJ, White CL, Balic JJ, Gough DJ. Mitochondrial STAT3: powering up a potent factor. *Cytokine*. 2016;87:20–25.
- Balic JJ, Garama DJ, Saad M, Yu L, West A, West AJ, et al. Serine-phosphorylated STAT3 promotes tumorigenesis via modulation of RNA polymerase transcriptional activity. *Cancer Res*. 2019;79:5272–87.
- Shen Y, Schlessinger K, Zhu X, Meffre E, Quimby F, Levy DE, et al. Essential role of STAT3 in postnatal survival and growth revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2004;24:407–19.
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*. 1995;82:241–50.
- Zouein FA, Zgheib C, Hamza S, Fuseler JW, Hall JE, Soljancic A, et al. Role of STAT3 in angiotensin II-induced hypertension and cardiac remodeling revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation. *Hypertens Res*. 2013;36:496–503.
- Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature*. 2001;410:1111–6.
- Jerome-Marson V, Mazieres J, Groussard O, Garcia O, Berjard J, Dahan M, et al. Expression of TTF-1 and cytokeratins in primary and secondary epithelial lung tumours: correlation with histological type and grade. *Histopathology*. 2004;45:125–34.
- Kortlever RM, Sodir N, Wilson CH, Burkhart DL, Pellegrinet L, Brown Swigart L, et al. Myc cooperates with Ras by programming inflammation and immune suppression. *Cell*. 2017;171:1301–15.
- Dragoj M, Milosevic Z, Bankovic J, Dinic J, Pesic M, Tanic N, et al. Association of CCND1 overexpression with KRAS and PTEN alterations in specific subtypes of non-small cell lung carcinoma and its influence on patients' outcome. *Tumour Biol*. 2015;36:8773–80.
- Soucek L, Whitfield J, Martins CP, Finch AJ, Murphy DJ, Sodir NM, et al. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature*. 2008;455:679–83.
- Murphy DJ, Junttila MR, Pouyet L, Karnezis A, Shchors K, Bui DA, et al. Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer Cell*. 2008;14:447–57.
- Dutta P, Zhang L, Zhang H, Peng Q, Montgrain PR, Wang Y, et al. Unphosphorylated STAT3 in heterochromatin formation and tumor suppression in lung cancer. *BMC Cancer*. 2020;20:145.
- Ji H, Houghton A, Mariani TJ, Perera S, Kim CB, Padera R, et al. K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors. *Oncogene*. 2006;25:2105–12.
- McClelland MR, Carskadon SL, Zhao L, White ES, Beer DG, Orringer MB, et al. Diversity of the angiogenic phenotype in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36:343–50.
- Liou GY, Doppler H, DelGiorno KE, Zhang L, Leitges M, Crawford HC, et al. Mutant KRas-induced mitochondrial oxidative stress in acinar cells upregulates EGFR signaling to drive formation of pancreatic precancerous lesions. *Cell Rep*. 2016;14:2325–36.
- Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:8788–93.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324:1029–33.
- Stine ZE, Walton Z, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV. MYC, metabolism, and cancer. *Cancer Discov*. 2015;5:1024–39.
- Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Pledger WJ, Sedivy JM, et al. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:7319–24.
- Yu L, Wu D, Gao H, Balic J, Tsykin A, Han T-S, et al. Clinical utility of a STAT3-regulated microRNA-200 family signature with prognostic potential in early gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2018;24:1459–72.

47. Niu G, Briggs J, Deng J, Ma Y, Lee H, Kortylewski M, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 α RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1099–105.
48. Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, Chow CCT, Harada H. HIF-1-dependent reprogramming of glucose metabolic pathway of cancer cells and its therapeutic significance. *Int J Mol Sci.* 2019;20:E238.
49. Hirahara K, Onodera A, Villarino AV, Bonelli M, Sciumè G, Laurence A, et al. Asymmetric action of STAT transcription factors drives transcriptional outputs and cytokine specificity. *Immunity.* 2015;42:877–89.
50. Costa-Pereira AP, Tininini S, Strobl B, Alonzi T, Schlaak JF, Is'harc H, et al. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:8043–7.
51. Yu C, Huo X, Agoston AT, Zhang X, Theiss AL, Cheng E, et al. Mitochondrial STAT3 contributes to transformation of Barrett's epithelial cells that express oncogenic Ras in a p53-independent fashion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;309:G146–161.
52. Song L, Turkson J, Karras JG, Jove R, Haura EB. Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene.* 2003;22:4150–65.
53. Zhou J, Qu Z, Yan S, Sun F, Whitsett JA, Shapiro SD, et al. Differential roles of STAT3 in the initiation and growth of lung cancer. *Oncogene.* 2015;34:3804–14.
54. Grabner B, Schramek D, Mueller KM, Moll HP, Svinka J, Hoffmann T, et al. Disruption of STAT3 signalling promotes KRAS-induced lung tumorigenesis. *Nat Commun.* 2015;6:6285–98.
55. Caetano MS, Hassane M, Van HT, Bugarin E, Cumpian AM, McDowell CL, et al. Sex specific function of epithelial STAT3 signaling in pathogenesis of K-ras mutant lung cancer. *Nat Commun.* 2018;9:4589.
56. Meissl K, Macho-Maschler S, Müller M, Strobl B. The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. *Cytokine.* 2017;89:12–20.
57. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I, et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity.* 1999;10:39–49.
58. Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, et al. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J.* 1999;18:4657–68.
59. Zhu S, Phatarpekar P, Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Nguyen-Jackson HT, et al. Transcription of the activating receptor NKG2D in natural killer cells is regulated by STAT3 tyrosine phosphorylation. *Blood.* 2014;124:403–11.
60. D'Amico S, Shi J, Martin BL, Crawford HC, Petrenko O, Reich NC. STAT3 is a master regulator of epithelial identity and KRAS-driven tumorigenesis. *Genes Dev.* 2018;32:1175–87.
61. Oft M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunol Res.* 2014;2:194–9.
62. Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wensey DR, O'Donnell KA, et al. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol.* 2005;25:6225–34.
63. Han YH, Sim HK, Kim SZ, Park WH. Antimycin A as a mitochondrial electron transport inhibitor prevents the growth of human lung cancer A549 cells. *Oncol Rep.* 2008;20:689–93.
64. Bretones G, Delgado M, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1849:506–16.
65. Macias E, Rao D, Carbajal S, Kiguchi K, DiGiovanni J. Stat3 binds to mtDNA and regulates mitochondrial gene expression in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2014;134:1971–80.
66. Mao YQ, Houry WA. The role of pontin and reptin in cellular physiology and cancer etiology. *Front Mol Biosci.* 2017;4:58.
67. Weng MT, Luo J. The enigmatic ERH protein: its role in cell cycle, RNA splicing and cancer. *Protein Cell.* 2013;4:807–12.
68. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8:e1000412.
69. Garassino MC, Marabese M, Rusconi P, Rulli E, Martelli O, Farina G, et al. Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2011;22:235–7.
70. Ruwanpura SM, McLeod L, Miller A, Jones J, Bozinovski S, Vlahos R, et al. Interleukin-6 promotes pulmonary emphysema associated with apoptosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45:720–30.
71. Liu YD, Yu L, Ying L, Balic J, Gao H, Deng NT, et al. Toll-like receptor 2 regulates metabolic reprogramming in gastric cancer via superoxide dismutase 2. *Int J Cancer.* 2019;144:3056–69.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are deeply grateful to D. Gough and S. Fernando (Hudson Institute of Medical Research, Melbourne, Australia) for expert technical assistance and proofreading of the manuscript, as well as A. Vais (Monash Histology Platform, Melbourne, Australia) for immunofluorescence expertise. This work was supported by a research grant awarded by the National Health and Medical Research Council (NHMRC) of Australia to BJJ, as well as the Operational Infrastructure Support Programme by the Victorian Government of Australia. MIS is supported by a Cancer Council Victoria Postdoctoral Fellowship. SA was sponsored by the Department of Chemistry, College of Sciences and Arts, King Abdulaziz University, Rabigh, Saudi Arabia. BJJ is supported by a NHMRC Senior Medical Research Fellowship.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: BJJ. Development of methodology: BJJ. Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): LM, SA, ACW, JJB, LY, JAS, ZP, SR, MIS, BJJ. Analysis and interpretation of data (e.g. statistical analysis, biostatistics, computational analysis): LM, SA, BK, SR, MIS, BJJ. Writing, review, and/or revision of the manuscript: BJJ. Administrative, technical, or material support (i.e. reporting or organising data, constructing databases): BJJ. Study supervision: SR, BJJ.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02134-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Brendan J. Jenkins.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.