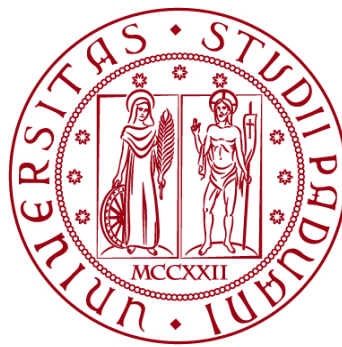


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

HMGA2 facilita la progressione del cancro coloretale tramite il reclutamento di macrofagi associati al tumore mediato da STAT3

Tutor: Prof.ssa Gaia Codolo
Dipartimento di Biologia

Laureando: Pellegrino Panagrosso

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

ABSTRACT	4
1 STATO DELL'ARTE	5
1.1 Il cancro colon-rettale	5
1.2 Gruppo ad alta mobilità AT-hook 2 (HMGA2)	5
1.3 Il microambiente tumorale del CRC (TME)	6
2 APPROCCIO SPERIMENTALE: descrizione delle metodologie	7
2.1 Collezione di dati clinici	7
2.2 Colture cellulari e trasfezione	7
2.3 Modello di allotrapianto tumorale in vivo	8
2.4 Saggio di co-coltura in vitro	8
2.5 Topi knock-in (KI) HMGA2 specifici per le cellule epiteliali intestinali	8
2.6 Modello murino di tumore indotto da AOM/DSS	9
2.7 Immunoistochimica (IHC)	9
2.8 Saggio della luciferasi	9
2.9 Saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)	10
2.10 Citometria a flusso	10
2.11 Western blotting	11
2.12 Estrazione dell'RNA e RT-qPCR	11
2.13 Test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA)	12
2.14 Analisi statistica	12
3 RISULTATI e Discussione: analisi critica e discussione dell'approccio sperimentale	13
3.1 L'eliminazione di HMGA2 nelle cellule del CRC sopprime l'infiltrazione di TAM, la polarizzazione in M2 e la secrezione di CCL2 nei modelli tumorali sottocutanei	13
3.2 Il KI delle cellule epiteliali intestinali di HMGA2 promuove l'infiltrazione TAM, la polarizzazione in M2 e la secrezione di CCL2 nei modelli AOM/DSS	14

3.3 HMGA2 attiva direttamente la trascrizione STAT3	15
3.4 L'aumento dell'espressione di CCL2 e della migrazione dei macrofagi indotta dalla sovraespressione di HMGA2 nelle cellule CRC dipendono da STAT3	16
3.5 L'aumento della migrazione dei macrofagi indotta dalla sovraespressione di HMGA2 dipende da CCL2	17
3.6 Significato clinico dell'espressione di HMGA2 e CD68 nei campioni CRC umani	18
3.7 Discussione	19
4 BIBLIOGRAFIA	20
5 APPENDICE	20

ABSTRACT

I macrofagi associati al tumore (TAMs) influenzano significativamente la progressione del cancro del colon-retto (CRC) attraverso le loro attività immunosoppressive. HMGA2 (High-Mobility Group A2) è una oncoproteina anormalmente sovraespressa nelle cellule del CRC. Questo studio ha utilizzato modelli murini e saggi di co-coltura in vitro per comprendere il suo ruolo nell'infiltrazione dei TAMs. I saggi di luciferasi e immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) sono stati impiegati per approfondire il meccanismo regolativo di HMGA2 tramite STAT3. È stata esaminata la correlazione tra l'espressione di CD68 e l'esito clinico in 167 campioni di tessuto tumorale CRC umano. Si è scoperto che HMGA2 nelle cellule tumorali favorisce il reclutamento e la differenziazione dei macrofagi nel fenotipo M2 pro-tumorale; lega direttamente il promotore di STAT3 e attiva la sua trascrizione, inducendo la secrezione di CCL2 che a sua volta promuove il reclutamento dei TAMs. Nei campioni umani di CRC è stata riscontrata una forte correlazione positiva tra l'espressione di HMGA2 nelle cellule tumorali e CD68 nello stroma. I pazienti con alta espressione di CD68 hanno mostrato una sopravvivenza globale sfavorevole, sia nel complesso che in assenza di metastasi. Questi risultati suggeriscono che l'asse HMGA2/STAT3/CCL2 potrebbe rappresentare un nuovo bersaglio terapeutico nel trattamento del CRC.

1. STATO DELL'ARTE

1.1 Il cancro colon-rettale

A livello globale, il cancro del colon-retto (CRC) è il terzo tumore maligno più comunemente diagnosticato e rappresenta la seconda causa principale di morte per cancro. La maggior parte dei CRC (>90%) sono adenocarcinomi, una neoplasia maligna che si origina dalle cellule epiteliali ghiandolari del colon-retto. L'adenocarcinoma convenzionale è caratterizzato dalla formazione di una massa ghiandolare, che costituisce il criterio di riferimento per la classificazione istologica del tumore; gli adenocarcinomi vengono di fatto classificati in base al grado di differenziamento cellulare. Gli adenocarcinomi scarsamente differenziati hanno una frazione ridotta di cellule tumorali formanti strutture ghiandolari; negli adenocarcinomi moderatamente differenziati più della metà delle cellule tumorali sono differenziate mentre, negli adenocarcinomi ben differenziati la quasi totalità della massa tumorale (>95%) forma ghiandole. La classificazione non si applica alle varianti istologiche che, pur avendo un alto grado morfologico, mostrano un comportamento meno aggressivo e una prognosi migliore. La classificazione dell'OMS identifica diverse varianti istologiche dei CRC, ciascuna con morfologia e composizione differente. I CRC vengono inizialmente diagnosticati tramite biopsia endoscopica o polipectomia, con l'esame microscopico che cerca segni di invasione. Tuttavia, queste prove possono rivelarsi difficili da identificare in campioni superficiali o mal orientati. Per poter diagnosticare un carcinoma invasivo, il tumore deve aver invaso la sottomucosa e la presenza di desmoplasia o reazioni desmoplastiche, insieme a detriti necrotici, possono aiutare nell'identificazione. Circa il 60-65% dei casi di CRC insorge in modo sporadico, senza precedenti familiari di CRC o sindromi tumorali ereditarie, mentre il 35-40% dei casi è associato a suscettibilità ereditaria. Nello specifico, il 25% dei casi ha una storia familiare con soggetti affetti da CRC senza sindromi genetiche ereditarie evidenti. Solo il 5% è dovuto a sindromi genetiche ereditarie note come, ad esempio, la sindrome di Lynch (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-HNPCC), malattia dovuta a mutazioni nei geni responsabili della riparazione del DNA che predispone i portatori al CRC, e la Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP), caratterizzata dalla formazione di polipi nel color e retto a causa di mutazioni nel gene APC che, se non rimossi, possono evolvere in carcinoma. Le variazioni genetiche comuni a bassa penetranza spiegano meno dell'1% dell'ereditarietà del CRC; il restante dei casi non è influenzato da fattori ereditari poiché si ha il contributo di fattori ambientali (obesità, fumo, alcool, ecc.) che aumentano il rischio di cancerogenesi.¹ Nonostante negli ultimi anni è migliorata l'aspettativa di sopravvivenza globale, i meccanismi molecolari alla base della patogenesi del CRC sono in gran parte sconosciuti; è quindi fondamentale approfondire i processi biologici coinvolti per lo sviluppo di approcci terapeutici innovativi e più efficaci.

1.2 Gruppo ad alta mobilità AT-hook 2 (HMGA2)

Il gruppo ad alta mobilità AT-hook 2 (HMGA2), denominato così per la sua rapida migrazione nei gel di poliacrilammide, è un fattore di trascrizione che lega il DNA inducendo alterazioni strutturali della cromatina. È una proteina non istonica coinvolta in molti processi quali regolazione genica, ciclo cellulare e

differenziazione. La sua relativa abbondanza nelle cellule embrionali, rispetto alle cellule differenziate ove non sono invece rilevabili, suggerisce che HMGA2 conferisca una maggior capacità proliferativa. Studi hanno mostrato che i fibroblasti embrionali di topo carenti di HMGA2 crescono più lentamente rispetto ai wild-type. HMGA2 è una proteina oncogenica sovraespressa in molti tumori principalmente di origine mesenchimale. Il gene HMGA2 è localizzato nel segmento q13-15 del cromosoma 12 ed è formato da 5 esoni. Gli esoni 1,2,3 codificano ciascuno un dominio AT-hook, che legano i solchi minori di tratti di DNA ricchi di AT, mentre gli esoni 4,5 codificano rispettivamente la regione di collegamento e la coda acida, quest'ultima ricca di residui amminoacidici acidi quali aspartato e glutammato. Il gene HMGA2 è soggetto a traslocazioni cromosomiche, con punti di rottura nella maggior parte dei casi a livello del terzo introne, dando origine a trascritti chimerici che fondono i primi tre esoni con altri geni. Inizialmente si pensava che queste proteine di fusione fossero responsabili della tumorigenicità, ma si è scoperto che una forma troncata di HMGA2, contenente solo i tre domini AT-hook, era sufficiente per indurre trasformazione in vitro. Le traslocazioni nel locus di HMGA2 sono tutt'ora oggetto di dibattito come evidenziato nello studio di 2 modelli murini transgenici, in cui HMGA2 era espresso o per intero o troncato sotto un promotore specifico per i tessuti mesenchimali differenziati; il risultato fu che entrambi i modelli hanno sviluppato vari tumori mesenchimali benigni, ma che gravità del fenotipo tumorale non è stata influenzata dalla presenza o assenza della coda acida C-terminale². Gli autori, in studi precedenti, hanno constatato che HMGA2 promuove la migrazione e invasione cellulare del carcinoma, legandosi direttamente ai promotori di FN1, IL-11³, e migliora l'ubiquitinazione e la degradazione di p53 mediata da MDM2, promuovendo il progresso del ciclo cellulare e inibendo l'apoptosi nelle cellule del CRC⁴. Nonostante ciò, viene sottolineato il ridotto numero di studi che approfondiscono l'influenza dell'HMGA2 nella regolazione del microambiente tumorale del CRC (TME).

1.3 Il microambiente tumorale del CRC (TME)

Negli ultimi anni il microambiente tumorale (TME) ha attirato un crescente interesse, rivelandosi un fattore chiave nella cancerogenesi e sviluppo tumorale. Il TME è un complesso eterogeneo, a contatto con i sistemi sanguigni e linfatici, composto, oltre che da cellule tumorali, da cellule immunitarie, tra cui macrofagi associati al tumore (TAMs), cellule di derivazione mieloide e linfociti T, fibroblasti, cellule endoteliali, matrice extracellulare e altre molecole secrete quali fattori di crescita e citochine. I macrofagi nel TME possono presentare 2 diversi fenotipi: il fenotipo pro-infiammatorio M1 e antinfiammatorio M2. I TAMs generalmente mostrano un fenotipo M2, creando un ambiente favorevole allo sviluppo del tumore ostacolano terapie citoriduttive quali chemioterapia e radioterapia. Il loro ruolo nella patogenesi del CRC però non è stato ancora chiarito; è quindi necessario approfondire ulteriormente il meccanismo alla base tra le cellule tumorali e i TAMs, in modo da poter sviluppare nuovi approcci terapeutici efficaci.

2. APPROCCIO SPERIMENTALE: descrizione delle metodologie

2.1 Collezione di dati clinici

Gli autori dell'articolo hanno analizzato 167 campioni tissutali di CRC umani provenienti dal Second Affiliated Hospital della Zhejiang University School of Medicine, raccolti tra l'ottobre del 2009 e il dicembre del 2012. Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti sono visibili nella *Tabella 1*. I campioni sono stati utilizzati per la realizzazione di microarray di tessuti (TMA): blocchi in paraffina contenenti numerosi prelievi di tessuto cilindrici (tissue cores) disposti in una matrice organizzata. Lo studio è stato approvato dal comitato etico della Zhejiang University School of Medicine.

Characteristic	Number (%)
Gender	
Male	94 (56.29%)
Female	73 (43.71%)
Age	
≤ 60 years	74 (44.31%)
> 60 years	93 (55.69%)
Tumor location	
Left-sided	46 (27.54%)
Right-sided	121 (72.46%)
Pathological type	
Tubular adenocarcinoma	123 (73.65%)
MC and SRCC	44 (26.35%)
T stage	
T1+T2	8 (4.79%)
T3+T4	159 (95.21%)
N stage	
Negative	89 (53.29%)
Positive	78 (46.71%)
M stage	
Negative	144 (86.23%)
Positive	23 (13.77%)
Clinical stage	
I+II	86 (51.50%)
III+IV	81 (48.50%)

MC, mucinous carcinoma
SRCC, signet-ring cell carcinoma

Tabella 1: Caratteristiche clinico-patologiche di 167 pazienti affetti da CRC

2.2 Colture cellulari e trasfezione

Per i successivi esperimenti, sono state utilizzate diverse linee cellulari provenienti dall'American Type Culture Collection (ATCC) di Manassas, negli USA. In particolare, sono state utilizzate linee cellulari di CRC umane (LoVo, HT29) e murine (MC38, CT26), una linea di cellule renali embrionali umane (HEK293T), monociti umani (THP1) e murini (RAW264.7). Topi femmine C57BL/6 e BALB/c, di età compresa tra 4 e 6 settimane, sono stati acquistati dalla Shanghai SLAC Laboratory Animal Co. (Cina) e mantenuti in un ambiente SPF (Specific Pathogen-Free) presso il Zhejiang University Laboratory Animal Center. Gli autori dichiarano che tutti gli esperimenti successivamente effettuati sui topi sono stati svolti rispettando la guida per il mantenimento e uso degli animali da laboratorio del NIH; con l'approvazione dalla commissione etica della Zhejiang University School of Medicine. Le linee LoVo, HT29, CT29, CT26, THP1 e RAW264.6 sono state coltivate utilizzando come medium di coltura RPMI-1640 arricchito con il 10% (v/v) di siero fetale di bovino, mentre per le linee HEK293T e MC38 è stato utilizzato il Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). I monociti THP1 sono stati differenziati in macrofagi trattandoli con 100 nM di forbitolo 12-mistrato 13-acetato per 48 ore. Per il knockdown di STAT3 è stata effettuata una trasfezione con siRNA (5'-CCACTTTGGTGTTCATAATT-3') con il reagente di trasfezione GenMute della SignaGen, seguendo il protocollo del produttore; il processo è stato accompagnato da un controllo negativo con una sequenza scramble

(5'-TTCTCCGAACGTGTCACGTTT-3'). Per aumentare il livello di espressione del gene HMGA2 nelle cellule di CRC sono stati utilizzati supernatanti lentivirali, ossia soluzioni contenenti lentivirus geneticamente modificati, che includono il gene HMGA2 e un gene di resistenza alla puromicina. Come controllo, è stato impiegato un costrutto virale casuale. Le cellule trasformate contenenti il gene HMGA2 d'interesse, sono state poi selezionate dalle restanti impiegando 2 mg/ml di puromicina. Per ridurre l'espressione di HMGA2 è stato impiegato un sistema di shRNA in cui le cellule tumorali sono state trasformate con uno shRNA contenente la sequenza target (5'-GCAGTGACCAGTTATTCTT-3') o un shRNA casuale (5'-ACTACCGTTGTTATAGG TGT-3') come controllo negativo. Infine, è stato effettuato un knockout per HMGA2 nelle cellule cancerogene murine (MC38-sgA2 e CT26-sgA2), tramite il sistema CRISPR/Cas9 con l'utilizzo di un vettore lentivirale contenente Cas9 e sgRNA specifico per HMGA2 (5'-CACCTTCTGGGCTGCTTAG-3').

2.3 Modello di allotrapianto tumorale in vivo

Nella generazione di modelli di allotrapianto tumorale in vivo, negli esemplari C57BL/6 sono state iniettate $1 \cdot 10^6$ cellule MC38-sgA2 o MC38-NC in 100 μ l di PBS per via sottocutanea, mentre negli esemplari BALB/C è stata iniettata la stessa quantità di cellule tumorali CT26-sgA2 o CT26-NC. I topi sono stati poi tenuti sotto osservazione ogni 3/5 giorni, misurando la crescita delle masse tumorali iniettate nel sito sottocutaneo secondo la seguente formula:

$$Volume_{CRC} = \frac{(lunghezza\ maggiore\ misurabile) * (larghezza\ maggiore\ misurabile)^2}{2}$$

I topi, 6 giorni dopo l'allotrapianto, hanno ricevuto due diverse tipologie di trattamento antitumorale con iniezioni intraperitoneali ogni 3 giorni. Nel primo caso, è stato somministrato Stattic a 5 mg/kg, un inibitore di STAT3, mentre il gruppo di controllo ha ricevuto DMSO. Nel secondo caso, i topi sono stati trattati con un anticorpo neutralizzante anti-CCL2 a 2 mg/kg, con un gruppo di controllo che ha ricevuto un anticorpo di controllo IgG. Alla fine delle analisi i topi sono stati sacrificati e campioni di CRC sono stati raccolti per esperimenti successivi.

2.4 Saggio di co-coltura in vitro

In primo luogo, è stato impiegato un sistema di coltura cellulare Transwell, composto da due camere separate da una membrana porosa con pori da 0,4 μ m; i macrofagi (monociti trattati con PMA) sono stati seminati nella camera superiore, mentre le cellule di CRC sono state posizionate nella camera inferiore. Le cellule sono state lasciate incubare per 24 ore, dopodiché sono state raccolte per effettuare una qPCR; il medium di coltura, invece, è stato raccolto e utilizzato per un test di migrazione dei macrofagi in un sistema Transwell con pori da 8 μ m. Sempre dopo 24 ore di incubazione, la camera superiore è stata rimossa e le cellule migrate nel secondo ambiente sono state colorate con Crystal Violet 0,1%. Infine, le cellule migrate sono state contate al microscopio ottico, considerando tre diverse aree casuali.

2.5 Topi knock-in (KI) HMGA2 specifici per le cellule epiteliali intestinali

In primo luogo, i ricercatori hanno inserito in alcuni topi un costrutto contenente un promotore CAG, una cassetta loxP-neomicina-sequenza STOP-loxP e un cDNA di HMGA2. Successivamente, questi topi sono stati incrociati con topi transgenici PVillin-Cre, che esprimono l'enzima Cre esclusivamente nelle cellule epiteliali intestinali. L'enzima Cre riconosce i siti loxP e genera una ricombinazione che

rimuove la cassetta contenente la sequenza STOP. Di conseguenza, la prole risultante esprimerà HMGA2 solo nelle cellule epiteliali intestinali.

2.6 Modello murino di tumore indotto da AOM/DSS

Nei topi C57BL/6, wild type e knock-in (KI) per HMGA2 nelle cellule epiteliali intestinali, è stata iniettata per via intraperitoneale una singola dose (10 mg/kg) di azossimetano (AOM) all'8^a/10^a settimana di vita. Successivamente, i topi sono stati sottoposti a 3 cicli di 3 settimane: nella prima settimana è stato somministrato DSS al 2,5% nell'acqua da bere, mentre le due settimane successive sono state di recupero. Alla decima settimana, gli intestini sono stati prelevati per ulteriori analisi.

2.7 Immunoistochimica (IHC)

L'immunoistochimica è una tecnica usata per individuare la presenza di proteine specifiche in sezioni tissutali. Sono stati impiegati i TMA di CRC con uno spessore di 4 µm; dopo procedure di deparaffinizzazione, disidratazione e smascheramento dell'antigene, le sezioni sono state bloccate per 30 minuti a temperatura ambiente con una soluzione contenente il 10% di siero fetale bovino. In seguito, hanno lasciato prima incubare le sezioni overnight a 4°C con anticorpi primari, quali: Anti-HMGA2 (1:50), Anti-CD68 (1:200), Anti-F4/80 (1:200) e CD206 (1:200). Dopodiché le sezioni sono state trattate con anticorpi secondari coniugati con perossidasi e, infine, colorate con diaminobenzidina (DAB), un cromogeno. La perossidasi reagisce con la DAB, producendo un precipitato marrone insolubile che indica la presenza dell'antigene. Le sezioni colorate sono state poi fotografate tramite un microscopio ottico dotato di fotocamera digitale. Il software Image-Pro Plus ha successivamente interpretato le immagini per determinare l'intensità dell'immunocolorazione di HMGA2 e CD68; considerando 3 campi visivi differenti, si calcola la media dei valori della densità ottica integrata (IOD), cioè la misura dell'intensità della colorazione, rispetto all'area (AREA) della superficie analizzata. Il rapporto IOD/AREA riflette il livello di espressione di una proteina. Se la media di HMGA2 è <0,215 si ha una bassa espressione, viceversa se è ≥0,215 si parla di alta espressione; per CD68 se la media IOD/AREA è <0,270 si ha una bassa espressione mentre se è ≥0,270 si ha un'alta espressione.

2.8 Saggio della luciferasi

Il saggio della luciferasi è una tecnica biochimica utilizzata per studiare l'attività dei promotori genici all'interno delle cellule. Il primo step prevede la clonazione delle regioni di delezione seriale dei promotori umani di STAT3 (-139/+133, -1555/-140, -850/-140, -1555/-851, -1555/+133) e HMGA2 (-1365/+140) nel vettore plasmidico pGL3. Successivamente, in alcuni di questi plasmidi sono state generate delle mutazioni nei siti di legame per HMGA2 nel promotore di STAT3 (Mut 1, Mut 2, Mut 3). Sono state effettuate delle co-trasfezioni nelle cellule HEK293T con i seguenti vettori: pGL3 contenente la versione wild-type o una mutata del promotore di STAT3; pcDNA3.1 con HMGA2 o un controllo negativo, e infine pRL-TK che presenta il gene della luciferasi Renilla. Dopo 48 ore di incubazione, le cellule vengono lisate e si aggiunge luciferina. La reazione tra la luciferina e l'enzima luciferasi emette luce, la cui intensità è proporzionale alla quantità di luciferasi presente, che riflette l'attività del promotore di STAT3. Per la

rilevazione è stato impiegato il Dual-Luciferase Reporter Assay System. Il saggio della luciferasi è stato ripetuto 3 volte.

Gene	Amplification Site	Sequences (5'-3')
STAT3	-1555/+133	F 5'-GCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGTGCCCTGTAGATGCCTCTGTC-3'
		R 5'-CAGTACCGGAATGCCAAGCTTGGCCCCACCCTGCACCCC-3'
	-1555/-851	F 5'-GCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGTGCCCTGTAGATGCCTCTGTC-3'
		R 5'-CAGTACCGGAATGCCAAGCTTGAAGACGGTGTATACGAAAGCTGA-3'
	-850 to -140	F 5'-GCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGTGCAATTCGCCTGTACGGG-3'
		R 5'-CAGTACCGGAATGCCAAGCTTCCCAGCCCCAGCCTGGCC-3'
	-1555/-140	F 5'-GCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGTGCCCTGTAGATGCCTCTGTC-3'
		R 5'-CAGTACCGGAATGCCAAGCTTCCCAGCCCCAGCCTGGCC-3'
	-139 to +133	F 5'-GCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGCGAGGATTGGCTGAAGGGG-3'
		R 5'-CAGTACCGGAATGCCAAGCTTGGCCCCACCCTGCACCCC-3'
	Mut 1	F 5'-AGTAGCCACTCTACGTCCACGTCATGTTTCCGGG-3'
		R 5'-GACGTAGAGTGGCTACTAGAGTGCGTGGGGAGAGG-3'
Mut 2	F 5'-ATGTCCTCGGTGTCGTCGCCAAGCAACCAATTCAGG-3'	
	R 5'-GGACGACACCGAGGACATGGGTGACTCCGCTG-3'	
Mut 3	F 5'-ACTCTCGCGCTAGCTGATTCCCGGTGGTAAGA-3'	
	R 5'-ATCAGCTAGCGCGAGAGTCCCAGGTATCTCCAGATCC-3'	
HMGA2	-1365/+140	F 5'-GCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGGACATTTACACGCGCTCTCT-3'
		R 5'-CAGTACCGGAATGCCAAGCTTGAACACAGGCAGAGGACAGAGT-3'

Tabella 2: primer utilizzati per la clonazione delle diverse regioni del promotore di STAT3

2.9 Saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

Il saggio ChIP è una tecnica ampiamente utilizzata per investigare sulle interazioni DNA-proteine, permettendo di identificare le regioni genomiche a cui si legano in maniera specifica proteine come i fattori di trascrizione; è una tecnica molto versatile e avviene in vitro su cellule vive, riflettendo il più possibile le condizioni fisiologiche. Innanzitutto, le cellule sono state trattate con formaldeide all'1% in PBS per 10 minuti, in modo da cross-linkare le proteine con il DNA; successivamente sono state lisate e sonicate per estrarre la cromatina cross-linkata. I frammenti di cromatina sono stati in seguito trattati con anticorpi specifici per HMGA2, utilizzando IgG come controllo negativo. Dopo l'immunoprecipitazione, viene eseguita una PCR per identificare la presenza di frammenti del promotore di STAT3; i primer utilizzati sono visibili nella tabella sottostante (Tabella 3). Come controllo positivo è stata utilizzata la cromatina di partenza, non sottoposta a immunoprecipitazione.

Gene	Amplification Site	Sequences (5'-3')
STAT3	-1555/-1316	F 5'-TGCCCTGTAGATGCCTCTGTC-3'
		R 5'-CCTTCTCCCAAGGATAGCTG-3'
	-1315/-1049	F 5'-AATGATGGGGTAGGGAAAGA-3'
		R 5'-GAGTGATTTCTGTGTATGTGCTGATACT-3'
	-1048/-816	F 5'-CATTATGCAAAGTTTCATCCTCTATTATG-3'
		R 5'-ACCAGCTAGCCCATGGCC-3'
	-815 to -546	F 5'-CGGCGTTTGATGCTTGAAG-3'
		R 5'-TTGAGAGCCTCTTACCACGCG-3'
	-551 to -350	F 5'-TCTCAACCTCGCCACCACG-3'
		R 5'-GCCACAGCGAGGGAAGAGC-3'
	-349 to -159	F 5'-GGAGGGAGGAGCACCGAA-3'
		R 5'-AGGCACGCCGTCATGCAT-3'

Tabella 3: Primer usati per l'amplificazione dei siti promotoriali di STAT3

2.10 Citometria a flusso

La citometria a flusso è una tecnica basata sulla focalizzazione idrodinamica, utilizzata per isolare determinate popolazioni cellulari da una miscela, misurare quantitativamente l'espressione di marcatori di superficie e intracellulari, effettuare analisi multiparametriche sulle cellule. È una tecnica molto rapida e caratterizzata da una elevata sensibilità. Le cellule, precedentemente trattate con anticorpi coniugati con un fluorocromo, vengono immerse in un sistema fluidico che utilizza un fluido di Sheath per generare un flusso laminare, permettendo il passaggio ordinato delle cellule attraverso un sistema ottico. Una sorgente laser illumina le cellule, eccitando i fluorocromi che emettono luce; questa luce viene

poi filtrata per selezionare specifiche lunghezze d'onda, indirizzate poi a un sistema di rilevazione attraverso specchi diecrici. La rilevazione utilizza fotomoltiplicatori, ognuno dei quali cattura una specifica lunghezza d'onda convertendola in un segnale elettrico, e diodi fotometrici che misurano la luce dispersa. Questi segnali sono poi convertiti in dati digitali dai convertitori analogico-digitali (ADC) e in seguito elaborati da un software di analisi che li restituisce graficamente. L'intero processo è monitorato da un software di controllo e da un sistema di raffreddamento che mantiene i vari componenti alle temperature operative ottimali. In base ai parametri misurati, quali dimensione cellulare, complessità interna, fluorescenza, le cellule possono essere isolate in sottopopolazioni tramite i processi di gating e sorting. In questo esperimento i leucociti sono stati risospesi in PBS preraffreddato, selezionati tramite un anticorpo contro il marcatore CD45, coniugato con il fluorocromo eFluor 450. Dopo la selezione iniziale, i leucociti vengono nuovamente incubati al buio, a 4°C, per 30 minuti con altri anticorpi ciascuno coniugato a un fluorocromo specifico: CD11b-APC (1:160), F4/80-PE (1:80) e CD206-PerCP/Cy5.5 (1:40). Le cellule sono state poi centrifugate per 5 minuti a 800 rpm, il supernatante è stato scartato e, dopo 3 lavaggi con PBS, le cellule sono state sospese in FACS buffer e sottoposte a citometria a flusso.

2.11 Western Blotting

Il Western blotting è una tecnica di laboratorio utilizzata per rilevare e quantificare proteine da un campione biologico, che in questo caso è un lisato di cellule CRC dal quale si estraggono le proteine. Quest'ultime vengono denaturate per poi essere separate, in base al peso molecolare, attraverso una corsa elettroforetica su un gel di poliacrilammide contenente SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Nel passaggio successivo, chiamato blotting, le proteine vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Dopo il bloccaggio con latte scremato in polvere al 5% per 1 ora a temperatura ambiente, le membrane sono state incubate con anticorpi primari specifici per HMGA2 (1:1000), STAT3 (1:1000), pSTAT3^{Tyr705} (1:2000) e β -actina (1:1000) per 24 ore a 4°C; in seguito sono state incubate con anticorpi secondari coniugati con fluorocromi, la cui fluorescenza è stata analizzata utilizzando l'Odyssey Infrared Imaging System. La β -actina è stata usata come controllo di carico.

2.12 Estrazione dell'RNA e RT-qPCR

I ricercatori hanno estratto l'RNA totale dai campioni utilizzando TRIZOL, per poi retrotrascriverlo in cDNA con il kit PrimerScript RT. Successivamente, è stata eseguita una PCR quantitativa (qPCR) utilizzando il SYBR Green PCR Master Mix, seguendo il protocollo fornito dal produttore. Il gene GAPDH è stato utilizzato come controllo interno per normalizzare i dati. Per ogni campione utilizzato, la reazione di qPCR è stata ripetuta 3 volte. Le sequenze dei primer utilizzati sono riportate nella tabella sottostante (Tabella 4).

Gene	Species	Sequences (5'-3')
CCL2	Human	F 5'-CAGCCAGATGCAATCAATGCC-3'
		R 5'-TGGAATCCTGAACCCACTTCT-3'
CCL2	Murine	F 5'-TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA-3'
		R 5'-GCATTAGCTTCAGATTACGGGT-3'
TNF- α	Human	F 5'-CCTCTCTAATCAGCCCTCTG-3'
		R 5'-GAGGACCTGGGAGTAGATGAG-3'
TNF- α	Murine	F 5'-CCTGTAGCCACGTCGTAG-3'
		R 5'-GGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
TGF- β	Human	F 5'-CTAATGGTGGAAACCCACAACG-3'
		R 5'-TATCGCCAGGAATTGTTGCTG-3'
TGF- β	Murine	F 5'-CTCCCGTGGCTTCTAGTGC-3'
		R 5'-GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG-3'
IL-12b	Murine	F 5'-GTCCTCAGAAGCTAACCATCTCC-3'
		R 5'-CCAGAGCCTATGACTCCATGTC-3'
Stat3	Murine	F 5'-AGCTGGACACACGCTACCT-3'
		R 5'-AGGAATCGGCTATATTGCTGGT-3'
Hmga2	Murine	F 5'-GAGCCCTCTCCTAAGAGACCC-3'
		R 5'-TTGGCCGTTTTTCTCCAATGG-3'
GAPDH	Human/Murine	F 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
		R 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Tabella 4: primer utilizzati per la RT- qPCR

2.13 Test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA)

L'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) è un saggio utilizzato per rilevare e quantificare proteine in campioni biologici. Si basa sull'interazione tra la proteina target, un anticorpo primario e un anticorpo secondario coniugato a un enzima. Si distinguono due tipologie: Sandwich ELISA ed ELISA indiretto. Nel sandwich ELISA l'anticorpo primario (di cattura) è immobilizzato sulla superficie della piastra ELISA, si aggiunge il campione e in seguito l'anticorpo secondario formando, appunto, un "sandwich" attorno al campione. Nell'ELISA indiretto è il campione immobilizzato sulla piastra, alla quale si aggiunge prima l'anticorpo primario e in seguito il secondario. In entrambi i casi, l'enzima coniugato all'anticorpo secondario catalizza la conversione di un substrato incolore in un prodotto cromogenico, con il cambiamento di colore proporzionale alla quantità di proteina target presente. In questo caso, le concentrazioni di CCL2, TNF- α e TGF- β nei surnatanti di colture cellulari e tissutali sono state quantificate utilizzando il kit ELISA (R&D), seguendo le istruzioni del produttore.

2.14 Analisi statistica

I risultati di ogni esperimento sono stati rappresentati come media \pm deviazione standard (SD) e successivamente confrontati utilizzando il test t di Student. L'analisi di Kaplan-Meier è stata utilizzata per valutare la sopravvivenza complessiva. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando i software SPSS 17.0 e GraphPad Prism, con un valore di $P < 0,05$ considerato statisticamente significativo.

3. Risultati e Discussione: analisi critica e discussione dell'approccio sperimentale

3.1 L'eliminazione di HMGA2 nelle cellule del CRC sopprime l'infiltrazione di TAM, la polarizzazione in M2 e la secrezione di CCL2 nei modelli tumorali sottocutanei

Gli autori hanno dapprima generato delle linee cellulari murine (MC38 e CT26) KO per HMGA2 mediante CRISPR/Cas9, come dimostrato in Figura 1A; cellule WT e KO sono state poi iniettate sottocute in topi C57Bl6 e BALB/c rispettivamente, e la crescita tumorale è stata monitorata per circa due settimane (Figura 1B). Nei topi inoculati con cellule KO, la crescita tumorale è risultata significativamente ridotta (Figura 1B-C-D). Poiché i macrofagi con fenotipo M2 favoriscono lo sviluppo tumorale, è stata impiegata la citometria a flusso per analizzare come HMGA2 influenzi il reclutamento e la polarizzazione dei macrofagi. È stata quantificata la proporzione di macrofagi (CD11b+F4/80+) e di macrofagi M2 (CD11b+F4/80+CD206+). I risultati hanno mostrato che nei topi con allotrapianto di MC38-sgA2 c'è una riduzione complessiva dei macrofagi (Figura 1E), suggerendo che la perdita di HMGA2 può avere effetti antitumorali riducendo il reclutamento e la polarizzazione dei TAM nel carcinoma coloretale. Sono stati ottenuti risultati simili nei topi trattati con CT26-sgA2 (Figura 1F). CCL2 è una chemochina prodotta dall'interazione tra le cellule stromali e tumorali; tale fattore chemiotattico interagisce con i recettori CCR2 dei monociti, promuovendo la loro migrazione e infiltrazione nel microambiente tumorale⁵. Di conseguenza, per verificare se HMGA2 regolasse CCL2, gli autori hanno svolto una qPCR (Figura 1G) per misurare il livello di espressione, e un test ELISA (Figura 1I) per quantificare la quantità di CCL2 secreta. Rispetto ai gruppi di controllo, nelle cellule MC38-sgA2 e CT26-sgA2 è stata notata una riduzione sia dell'espressione che della secrezione di CCL2. Anche questo caso simili risultati sono stati ottenuti dall'analisi, tramite qPCR (Figura 1H) ed ELISA (Figura 1J), dei topi trattati con CT26-sgA2. In seguito, per chiarire l'associazione tra la deplezione di HMGA2 nelle cellule di CRC e la polarizzazione dei macrofagi nel microambiente tumorale, sono stati valutati i livelli di espressione delle citochine specifiche per i fenotipi M1 (TNF- α , IL-12b) e M2 (TGF- β). L'analisi qPCR è stata utilizzata per determinare questi livelli di espressione e i risultati ottenuti sono stati confermati tramite ELISA. Nei tumori con cellule HMGA2-KO, è stato osservato un aumento dell'espressione di TNF- α e IL-12b, mentre l'espressione di TGF- β è risultata significativamente ridotta.

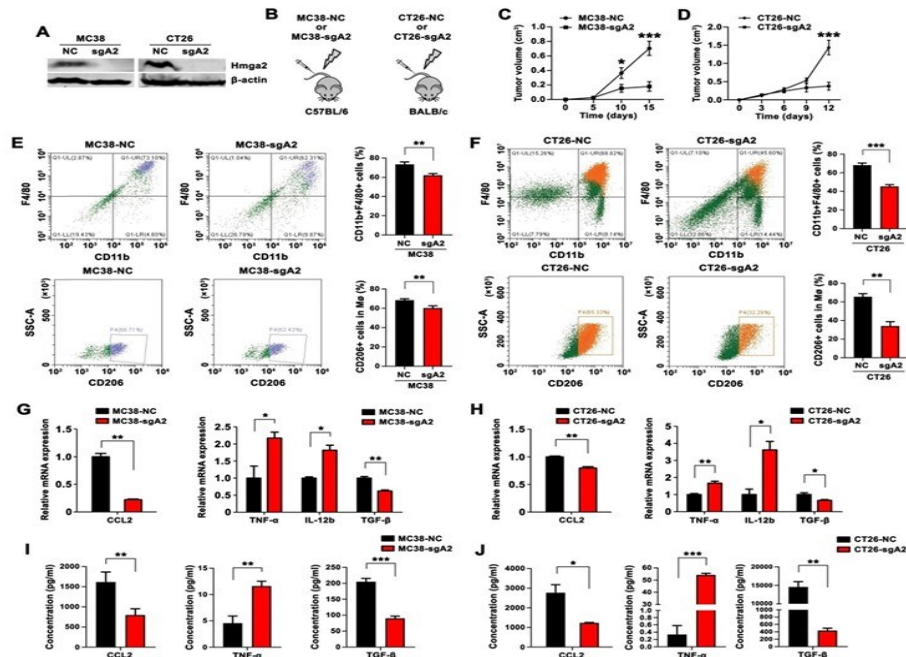


Figura 1: Il knockout di HMGA2 nelle cellule di CRC ha soppresso l'infiltrazione dei TAM, la polarizzazione M2 e la secrezione di CCL2 nei modelli tumorali sottocutanei. (A) Analisi Western blot dei livelli di HMGA2 in cellule MC38-sgA2 e CT26-sgA2. (B) Panoramica schematica dei modelli di allotrapianti tumorali sottocutanei. (C-D) Curve di crescita dei tumori allotrapiantati MC38-NC/MC38-sgA2 in topi C57BL/6 (C), e dei tumori allotrapiantati CT26-NC/CT26-sgA2 in topi BALB/c (D). (E-F) Traccianti rappresentativi della citometria a flusso (sx) e percentuali (dx) di macrofagi CD11b+F4/80+ (sopra) e macrofagi M2 CD11b+F4/80+CD206+ (sotto) nei tessuti dei tumori allotrapiantati MC38-NC/MC38-sgA2 (E), e dei tumori allotrapiantati CT26-NC/CT26-sgA2 (F). (G-H) qPCR di CCL2, TNF- α , IL-12b, e TGF- β nei tessuti dei tumori allotrapiantati MC38-NC/MC38-sgA2 (G), e nei tumori allotrapiantati CT26-NC/CT26-sgA2 (H). (I-J) Analisi ELISA della concentrazione di CCL2, TNF- α e TGF- β nei surnatanti coltivati dai tumori allotrapiantati MC38-NC/MC38-sgA2 (I), e nei tumori allotrapiantati CT26-NC/CT26-sgA2 (J). Le barre di errore indicano SD. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

3.2 Il KI delle cellule epiteliali intestinali di HMGA2 promuove l'infiltrazione TAM, la polarizzazione in M2 e la secrezione di CCL2 nei modelli AOM/DSS

Dall'osservazione e confronto dei topi trattati con AOM e DSS per indurre tumori coloretali (Figura 2A), i topi HMGA2-KI hanno sviluppato più tumori a livello intestinale rispetto ai topi WT (Figura 2B). Sono stati raccolti campioni di tessuti intestinali per analizzare le popolazioni di macrofagi (CD11b+F4/80+) e macrofagi M2 (CD11b+F4/80+CD206+) tramite citometria a flusso: rispetto ai campioni provenienti da topi WT, i tessuti dei topi HMGA2-KI presentano una concentrazione maggiore di macrofagi CD11b+F4/80+ e macrofagi M2 CD11b+F4/80+CD206+ (Figura 2C). I livelli della chemochina CCL2 sono stati misurati tramite qPCR ed ELISA (Figura 2D-E); i risultati hanno mostrato che il KI di HMGA2 ha causato una significativa sovraespressione di CCL2 nei tessuti intestinali. Sempre tramite qPCR ed ELISA l'analisi del livello di espressione delle citochine ha rivelato che, nei tessuti intestinali dei topi HMGA2-KI, il livello di espressione di TNF- α è notevolmente diminuito al contrario della citochina TGF- β che è aumentata.

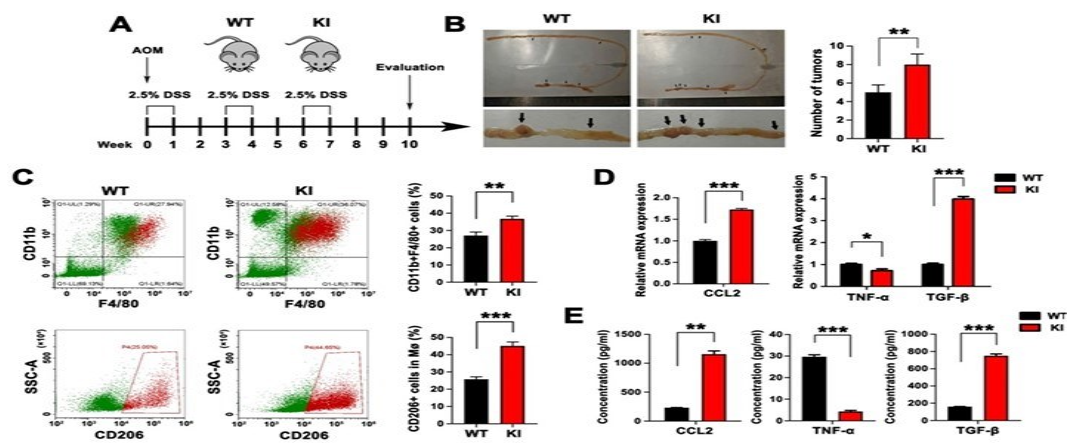


Figura 2: L'introduzione specifica di HMGA2 nei tessuti epiteliali intestinali ha promosso l'infiltrazione di TAM, la polarizzazione M2 e la secrezione di CCL2 nel modello AOM/DSS. (A) Panoramica schematica del modello murino AOM/DSS in topi WT e HMGA2-KI. (B) Immagini rappresentative (sx) e numero totale (dx) di tumori intestinali indotti da AOM/DSS. (C) Tracciati rappresentativi della citometria a flusso (sx) e percentuali (dx) di macrofagi CD11b+F4/80+ (sopra) e macrofagi M2 CD11b+F4/80+CD206+ (sotto) nei tessuti intestinali. (D) qPCR di CCL2, TNF- α e TGF- β nei tessuti intestinali. (E) Analisi ELISA delle concentrazioni di CCL2, TNF- α e TGF- β nei surnatanti coltivati dai tessuti intestinali. Le barre di errore indicano SD. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

3.3 HMGA2 attiva direttamente la trascrizione STAT3

STAT3 è una proteina della famiglia delle STAT che funge sia da trasduttore di segnale sia da attivatore trascrizionale. Viene attivata attraverso fosforilazione e successiva dimerizzazione in risposta a citochine (IL-6, IL-10 e IL-11) o fattori di crescita (FGF e VEGF). Studi precedenti hanno dimostrato che STAT3 è un fattore trascrizionale oncogenico, coinvolto nell'immunosoppressione tumorale tramite modifiche epigenetiche, alterando la topologia della cromatina, inibendo l'espressione di geni soppressori tumorali e alterando il ciclo cellulare⁶. Gli autori hanno quindi verificato se HMGA2 regolasse l'immunosoppressione dei TAMs nel TME attraverso un meccanismo STAT3-dipendente nel tumore coloretale. Il Western blotting ha mostrato che il knockdown di HMGA2 mediato da shRNA e il knockout mediato da sgRNA hanno rispettivamente ridotto e soppresso l'espressione di STAT3 totale e fosforilato (pSTAT3^{Tyr705}) (Figura 3A-B). Al contrario, nelle cellule LoVo e HT29 con sovraespressione di HMGA2 è aumentata l'espressione di STAT3 e pSTAT3^{Tyr705} (Figura 3C) e, inoltre, introducendo dei costrutti di controllo di sovraespressione di HMGA2 in cellule CT26-WT e CT26-sgA2, nelle cellule HMGA2-KO l'espressione di STAT3 è stata ripristinata (Figura 3D). Per approfondire la relazione tra HMGA2 e STAT3 in vivo, i campioni intestinali dei topi WT e HMGA2-KI sono stati analizzati tramite Western blotting; è stato riscontrato che nei topi modificati i livelli di STAT3 e di pSTAT3^{Tyr705} sono più alti rispetto ai topi WT (Figura 3E). Di conseguenza si è verificato se HMGA2 potesse attivare STAT3 a livello trascrizionale. Il saggio di luciferasi (Figura 3F) ha identificato la regione promotoriale di STAT3 compresa tra -1555 e -140 come rilevante per la regolazione di STAT3 da parte di HMGA2 e, tramite ChIP è stato scoperto che i siti di legame di HMGA2 sono presenti nella regione promotoriale -815/-546 (Figura 3G). Successivamente, sono stati mutati singolarmente tre siti di legame in questa regione e, ripetendo il saggio di luciferasi (Figura 3H), è stato osservato che le mutazioni nei siti 1 (-743/-730) e 3 (-585/-576) hanno attenuato l'attività trascrizionale di STAT3, mentre la mutazione nel sito 2 (-657/-644) non

ha provocato differenze significative. D'altro canto, è stata presa in considerazione la possibilità che STAT3 potesse eventualmente regolare l'espressione di HMGA2, ipotesi smentita dai saggi di Western blotting e qPCR sulle cellule, MC38 e CT26, STAT3-KO.

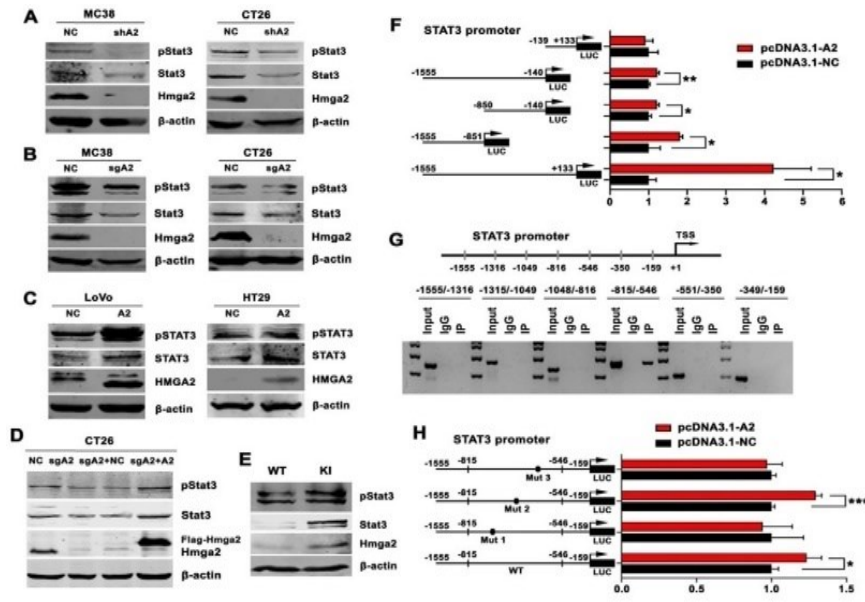


Figura 3: HMGA2 ha attivato direttamente la trascrizione di STAT3. (A-E) Analisi Western blot dei livelli delle proteine pSTAT3^{Tyr705} e STAT3 nelle cellule indicate (A-D) e nei tessuti intestinali di topi WT e KI (E). La β-actina è stata utilizzata come controllo interno. **(F)** Attività della luciferasi di costrutti del promotore di STAT3 a lunghezza intera o troncati quando co-trasfettati con plasmidi di controllo o con sovraespressione di HMGA2 in cellule HEK293T. **(G)** Analisi ChIP dell'arricchimento di HMGA2 nelle regioni indicate del promotore di STAT3. **(H)** Attività della luciferasi di costrutti del promotore di STAT3 contenenti siti WT o mutati (Mut 1, 2 e 3) quando co-trasfettati con plasmidi di controllo o con sovraespressione di HMGA2 in cellule HEK293T. Le barre di errore indicano SD. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

3.4 L'aumento dell'espressione di CCL2 e della migrazione dei macrofagi indotta dalla sovraespressione di HMGA2 nelle cellule CRC dipendono da STAT3

Al fine di comprendere se HMGA2 regoli l'espressione di CCL2 attraverso STAT3, le cellule CT26-NC e CT26-sgA2 sono state trattate con IL-6 murina ricombinante per attivare STAT3 e successivamente co-coltivate con cellule RAW264.7. Il risultato è stato un aumento dell'espressione di pSTAT3^{Tyr705} (Figura 4A), una sovraespressione di CCL2 nelle cellule di CRC (Figura 4B) e una maggior migrazione delle cellule RAW264.7 (Figura 4C). D'altro canto, il knockdown di STAT3 attraverso siRNA, confermato tramite Western blotting, nelle cellule LoVo ha causato la sottoespressione di CCL2 rispetto al controllo LoVo-NC (Figura 4D-E). È stato osservato che nelle cellule che sovraesprimono HMGA2 si ha una maggior espressione di CCL2, ma introducendo siRNA diretti contro STAT3, tale effetto è stato annullato. Questo risultato è coerente con quello del sistema di co-cultura Transwell. Il silenziamento di STAT3 nelle cellule LoVo ha diminuito la migrazione delle cellule THP1 (Figura 4F). Le cellule THP1 co-coltivate con cellule sovraesprimenti HMGA2 (LoVo-A2) mostrano una maggior capacità migratoria rispetto a quelle co-coltivate con le cellule di controllo (LoVo-NC); tuttavia l'aumento della capacità migratoria si annulla con l'introduzione di siRNA STAT3 target.

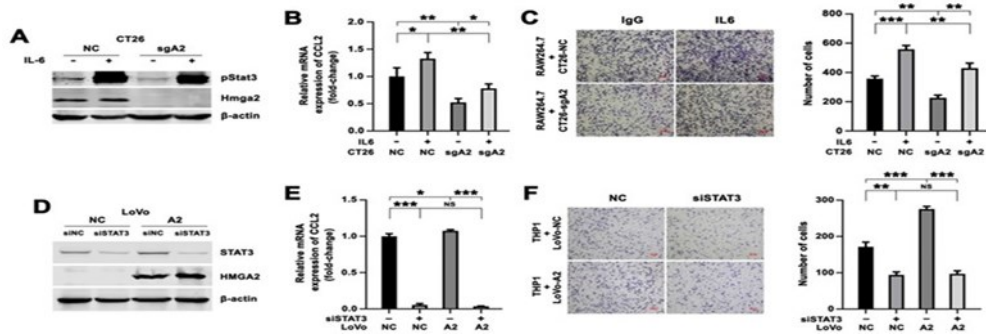


Figura 4: L'aumentata espressione di CCL2 e la maggiore migrazione dei macrofagi indotte dalla sovraespressione di HMGA2 nelle cellule di CRC dipendevano da STAT3. (A-B) Analisi Western blot di pStat3^{Tyr705} e Hmga2 (A) e analisi quantitativa RT-PCR di CCL2 (B) nelle cellule CT26-NC e CT26-sgA2 trattate con proteina IL-6 murina ricombinante o controllo. (C) Immagini rappresentative (sx) e quantificazione (dx) delle cellule RAW264.7 co-coltivate con le cellule CT26 indicate, trattate con controllo o IL-6. (D-E) Analisi Western blot di STAT3 e HMGA2 (D), e analisi quantitativa RT-PCR di CCL2 (E) nelle cellule LoVo-NC e LoVo-A2 trasfettate con controllo o siRNA mirati a STAT3. (F) Immagini rappresentative (sx) e quantificazione (dx) delle cellule THP1 co-coltivate con le cellule LoVo indicate, trasfettate con controllo o siRNA mirati a STAT3. Le barre di errore indicano SD. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

3.5 L'aumento della migrazione dei macrofagi indotta dalla sovraespressione di HMGA2 dipende da CCL2

Per chiarire il ruolo di CCL2 nel reclutamento dei macrofagi, le cellule CT26-NC e CT26-sgA2 sono state trattate con CCL2 murino ricombinante e successivamente co-coltivate con cellule RAW264.7; l'esito ha mostrato che il KO di HMGA2 ha ridotto il potenziale migratorio delle cellule RAW264.7, mentre il trattamento con CCL2 ricombinante lo ha aumentato (Figura 5A). Inoltre, le cellule LoVo-NC e LoVo-A2 sono state trattate con un anticorpo neutralizzante anti-CCL2 e poi utilizzate nel sistema di co-coltura Transwell per studiare come influenzassero la migrazione delle cellule THP1. Mentre la sovraespressione di HMGA2 promuoveva la migrazione delle cellule THP1, il trattamento con anti-CCL2 bloccava tale effetto migratorio (Figura 5B). In aggiunta è stato verificato se HMGA2 facilitasse l'infiltrazione dei TAM attraverso un meccanismo CCL2-dipendente. Per questo scopo sono stati generati modelli murini di allotrapianto tumorale in vivo iniettando cellule CT26-sgA2+NC e CT26-sgA2+A2, topi successivamente trattati con anti-CCL2 o IgG di controllo (Figura 6). Conforme alle aspettative, la sovraespressione di HMGA2 aveva indotto un aumento dell'intensità di CD206, che corrisponde a una maggior presenza dei TAM, mentre l'anticorpo anti-CCL2 l'ha inibito.

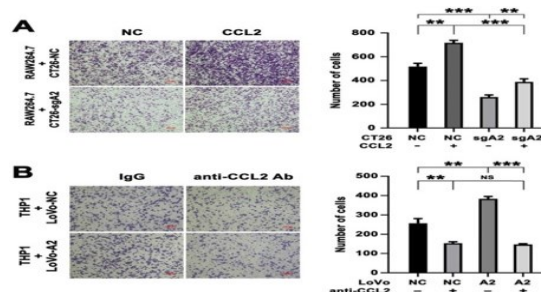


Figura 5: La maggiore migrazione dei macrofagi indotta dalla sovraespressione di HMGA2 nelle cellule di CRC dipendeva da CCL2. (A) Immagini rappresentative (sx) e quantificazione (dx) delle cellule RAW264.7 co-coltivate con le cellule CT26 indicate, trattate con proteina ricombinante CCL2 o controllo. (B) Immagini rappresentative (sx) e quantificazione (dx) delle cellule THP1 co-coltivate con le cellule LoVo indicate, trattate con IgG di controllo o con anticorpo anti-CCL2. Le barre di errore indicano SD. **P < 0.01; ***P < 0.001

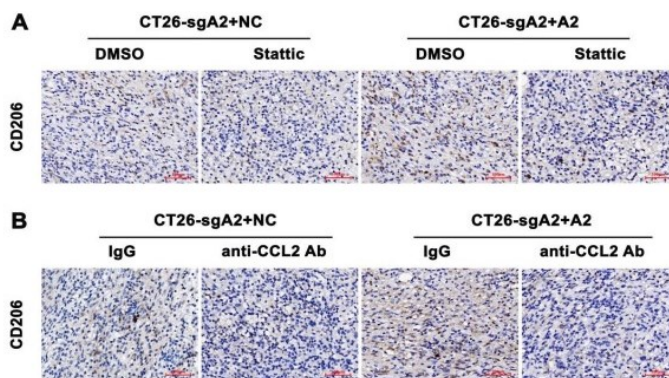


Figura 6: HMGA2 ha promosso l'infiltrazione di TAM in modo dipendente da STAT3 e CCL2 in vivo. (A-B) I topi sono stati iniettati sottocute con cellule CT26-sgA2+NC e CT26-sgA2+A2, seguite dal trattamento con DMSO/Stattic (A) o con IgG/anticorpo neutralizzante anti-CCL2 (B). È stata condotta un'analisi IHC della colorazione CD206 nei tessuti tumorali allotrapiantati indicati.

3.6 Significato clinico dell'espressione di HMGA2 e CD68 nei campioni CRC umani

CD68 è una proteina di membrana associata ai macrofagi, utilizzata come marker nell'immunoistochimica per rilevare la presenza di quest'ultimi. Per approfondire la relazione tra i livelli di HMGA2 e l'infiltrazione dei TAMs nei pazienti con carcinoma coloretto, i ricercatori hanno utilizzato l'immunoistochimica per visualizzare l'espressione di HMGA2 e CD68 in 167 campioni di CRC umano. L'analisi ha evidenziato una forte correlazione positiva tra l'espressione di HMGA2 nelle cellule tumorali e l'espressione di CD68 nello stroma ($R=0,286$; $P<0,001$) (Figura 7A-B). Alla luce di questi risultati, è di particolare interesse determinare, tramite l'analisi di sopravvivenza di Kaplan-Meier, se i livelli di espressione di CD68 possano essere utilizzati per prognosticare l'andamento clinico nei pazienti con CRC. È emerso che tutti i pazienti con alti livelli di CD68 nello stroma hanno mostrato una ridotta sopravvivenza, indicando una prognosi peggiore ($P=0,034$) (Figura 7C). Successivamente, dividendo i pazienti in due sottogruppi in base alla presenza o assenza di metastasi, si è osservato che i pazienti con alti livelli di CD68 presentavano un tasso di sopravvivenza inferiore rispetto a quelli con livelli più bassi, che invece mostravano una sopravvivenza globale favorevole ($P=0,047$) (Figura 7D).

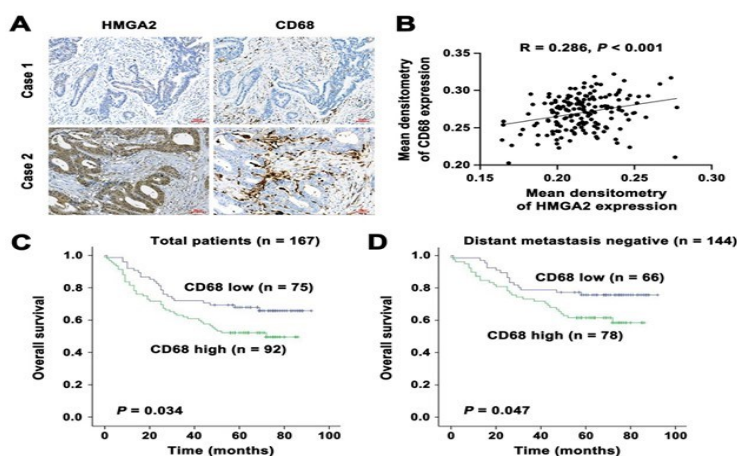


Figura 7: Significato clinico dell'espressione di HMGA2 e CD68 nei campioni di CRC umani.

(A) Immagini rappresentative di colorazione immunoistochimica di HMGA2 e CD68 nei tessuti primari di CRC. Barra di scala, 50 μ m. (B) Correlazione positiva tra l'espressione di HMGA2 e CD68. $R = 0.286$, $P < 0.001$. (C-D) Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier per la sopravvivenza complessiva in tutti i pazienti (C, $n = 167$) e nel sottogruppo con metastasi a distanza negative (D, $n = 144$) in base all'espressione di CD68.

3.7 Discussione

Negli ultimi anni l'immunoterapia, data la sua notevole efficacia, ha rivoluzionato il trattamento di molti tumori; tuttavia, nel TME il crosstalk tra le cellule tumorali e i TAMs ne limita i benefici poiché generano un ambiente immunosoppresso che favorisce la progressione tumorale. Ricerche recenti hanno messo in primo piano il ruolo di HMGA2 nel reclutamento e polarizzazione dei TAMs, migliorando la comprensione del TME. Studi riguardo il glioblastoma multiforme (GBM) hanno scoperto che i M2-TAMs, attraverso l'espressione di HMGA2 mediata da TGF- β 1, riducono l'espressione di miR-340-5p, un microRNA inibitore dell'infiltrazione dei TAMs; evidenziando un loop di feedback tra miR-340-5p e i macrofagi, dove HMGA2 svolge un ruolo cruciale nella polarizzazione dei TAM nel fenotipo M2⁷. Invece, in altri studi sui macrofagi di tipo M1 nella formazione delle cellule staminali tumorali (CSC), è risultato che HMGA2 favorisca lo sviluppo del cancro al seno promuovendo l'attività dei macrofagi M1⁸. L'effetto di HMGA2 di fatto può variare a seconda del tipo di cancro e del relativo microambiente tumorale. Il ruolo di HMGA2 nei confronti dei TAMs nel carcinoma coloretale non era ancora stato chiarito, per cui è stato necessario comprendere il ruolo svolto da HMGA2 nei tumori coloretali al fine di poter poi sviluppare potenziali terapie mirate. Nel complesso è stato scoperto che HMGA2, nelle cellule di CRC, favorisce l'infiltrazione dei TAMs, la loro polarizzazione verso il fenotipo M2 e la produzione di CCL2 nel TME; inoltre, HMGA2 promuove direttamente la trascrizione di STAT3 legandosi direttamente a sequenze specifiche promotoriali. L'analisi dei campioni di CRC umani hanno dimostrato che HMGA2 è positivamente correlata con un maggiore infiltrato macrofagico; è noto che l'elevata infiltrazione di macrofagi nei pazienti affetti da CRC corrisponde a una prognosi sfavorevole. Lo studio ha poi chiarito ulteriormente la modalità con la quale HMGA2 permetta alle cellule tumorali di sfuggire al sistema immunitario: la sovraespressione di HMGA2 nelle cellule di CRC facilita l'infiltrazione e polarizzazione dei macrofagi di tipo M2 aumentando la secrezione di CCL2 attraverso STAT3. In conclusione, il seguente articolo ha messo in luce un nuovo ruolo pro-oncogenico di HMGA2 nella formazione di un microambiente tumorale.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2019)
2. Young AR, Narita M. Oncogenic HMGA2: short or small? *Genes Dev.* (2007)
3. Wu J, Wang Y, Xu X, Cao H, Sahengbieke S, Sheng H. et al. Transcriptional activation of FN1 and IL11 by HMGA2 promotes the malignant behavior of colorectal cancer. *Carcinogenesis.* (2016)
4. Wang Y, Hu L, Wang J, Li X, Sahengbieke S, Wu J. et al. HMGA2 promotes intestinal tumorigenesis by facilitating MDM2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Pathol.* (2018)
5. Yoshimura T. The production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) /CCL2 in tumor microenvironments. *Cytokine.* (2017)
6. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer.* (2014)
7. Liu Y, Li X, Zhang Y, Wang H, Rong X, Peng J. et al. An miR-340-5p-macrophage feedback loop modulates the progression and tumor microenvironment of glioblastoma multiforme. *Oncogene.* (2019)
8. Guo L, Cheng X, Chen H, Chen C, Xie S, Zhao M. et al. Induction of breast cancer stem cells by M1 macrophages through Lin-28B-let-7-HMGA2 axis. *Cancer Lett.* (2019)

5. APPENDICE

Articolo in analisi: Wang X, Wang J, Zhao J, Wang H, Chen J, Wu J. HMGA2 facilitates colorectal cancer progression via STAT3-mediated tumor-associated macrophage recruitment. *Theranostics.* (2022)