



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea  
SCIENZE BIOLOGICHE

---

**INFIAMMAZIONE E CANCRO: LA REGOLAZIONE DEL GENE PTX3**

**INFLAMMATION AND CANCER: REGULATION OF PTX3 GENE**

Relazione finale di:  
Maria Teresa Norcia

Docente Referente  
Chiar.mo Prof. Marco Barucca

**Sessione straordinaria Febbraio 2021**  
**Anno Accademico 2019/2020**

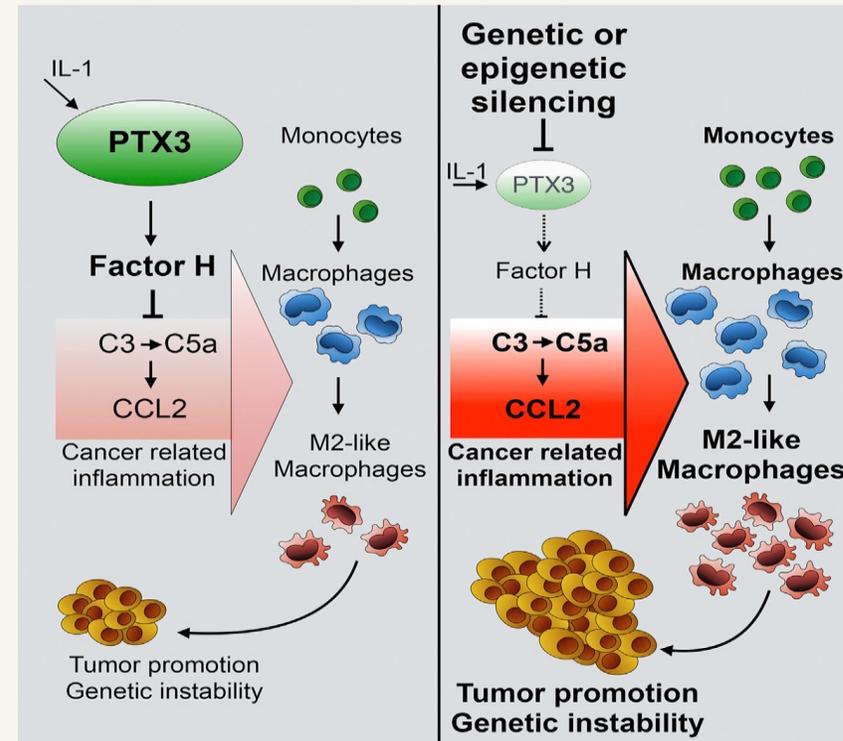
# INTRODUZIONE

Il gene PTX3 codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle pentrassine e rappresenta una componente del sistema immunitario innato coinvolto nella resistenza microbica e nella regolazione dell'inflammatione. (Garlanda et al., 2005)

La proteina ptx3 è prodotta da diversi tipi di cellule in risposta a segnali infiammatori, quali il fattore di necrosi tumorale (TNF $\alpha$ ) e interleuchina-1 (IL-1).

Nell'inflammatione legata al cancro (CRI), il gene si comporta come oncosoppressore interagendo con il fattore H e bloccando così la cascata del complemento. In alcune forme tumorali come il cancro del colon-retto (CRC) e il fibrosarcoma, esso viene tuttavia silenziato.

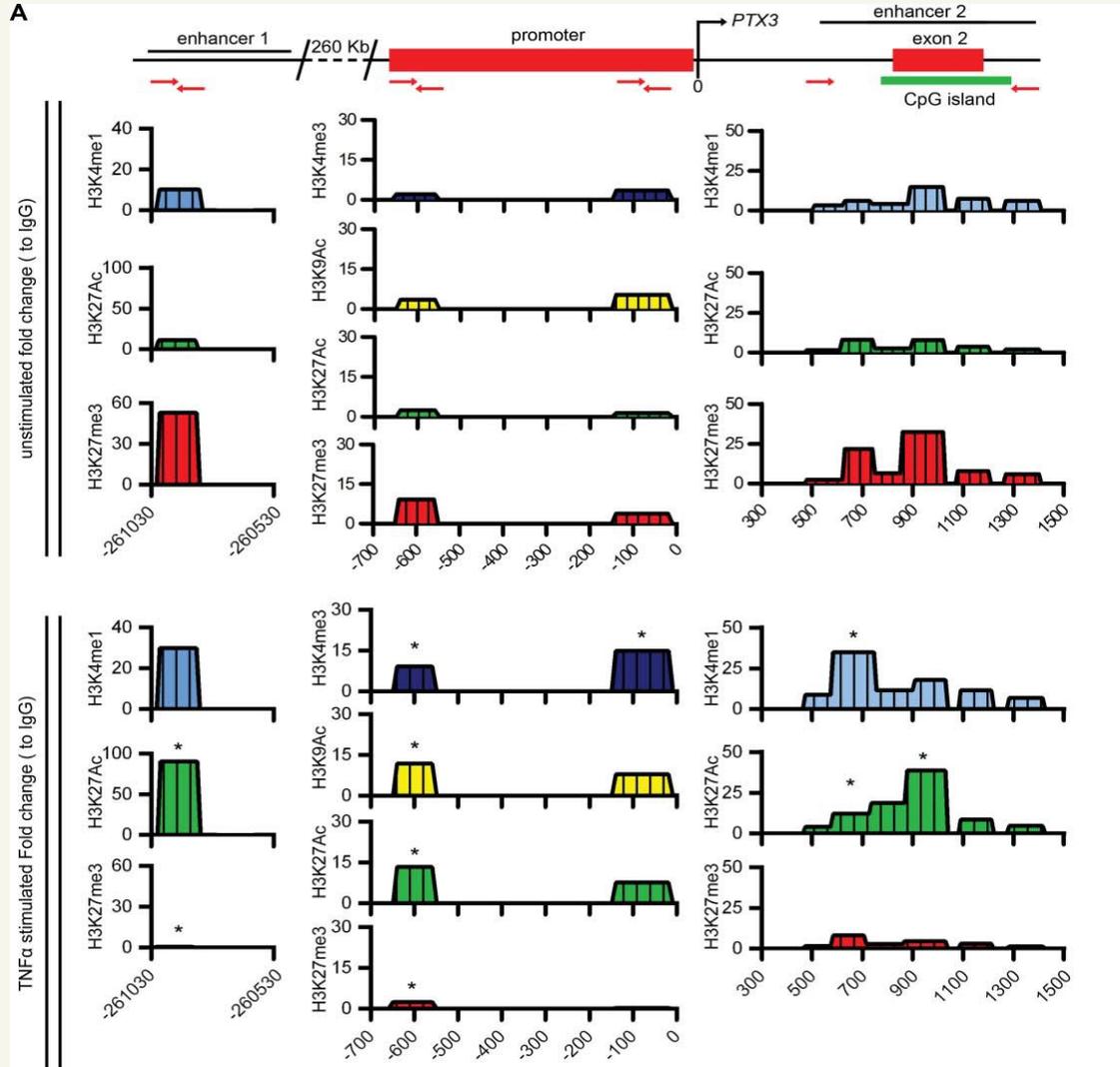
*Lo studio condotto dal centro Humanitas si pone l'obiettivo di identificare gli elementi di regolazione e le relative modifiche epigenetiche che influenzano l'espressione di PTX3 in condizioni normali e patologiche.*



**Figura 1: Meccanismo d'azione di PTX3.**

Quando PTX3 è attivo interagisce con il fattore H bloccando la cascata del complemento e la progressione del tumore. Quando, invece, il gene è silenziato, l'inflammatione favorisce il differenziamento dei macrofagi in macrofagi di tipo M2 e quindi la proliferazione del tessuto tumorale. (Bonavita et al., 2015)

A



**Figura 2: Identificazione degli enhancer di PTX3 tramite analisi delle modificazioni istoniche.** Analisi delle modificazioni istoniche H3K4me1, H3K4me3, H3K9Ac, H3K27Ac, e H3K27me3 su enhancer 1, promotore ed enhancer 2 eseguite con CHIP, in macrofagi umani in condizioni basali ed infiammatorie (TNF $\alpha$  20ng/mL, 4h).

## FASI DELLO STUDIO

### IDENTIFICAZIONE DEI DUE ENHANCER

Tramite un saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP-assay) per diversi marcatori istonici e l'uso dello strumento web GREAT sono stati identificati due enhancer attivi:

- **Enhancer 1**, localizzato a 230kb a monte del promotore
- **Enhancer 2**, localizzato 350bp a valle del sito di inizio della trascrizione (TSS)

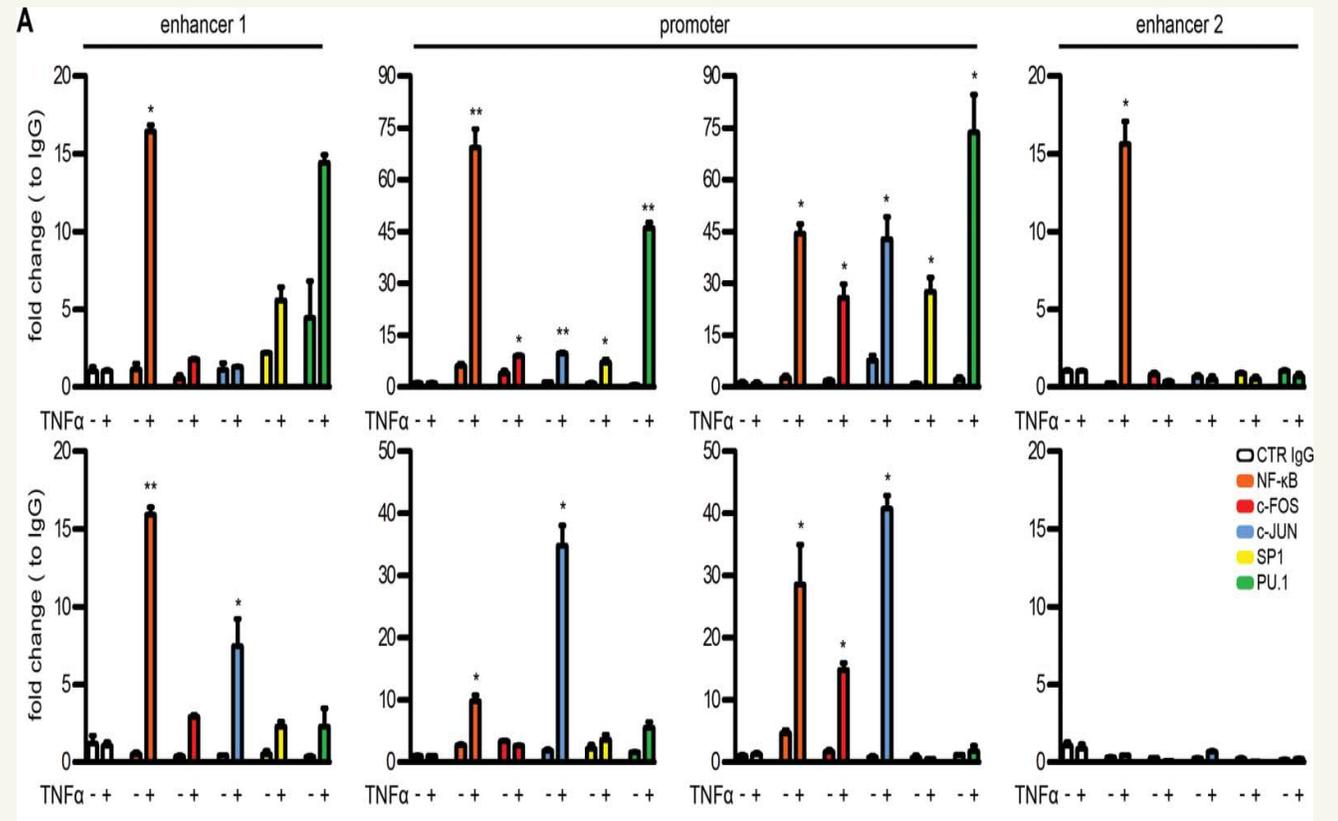
Trattando per 4h con TNF $\alpha$ , citochina pro-infiammatoria, macrofagi, cellule appartenenti alla linea cellulare 8387 del fibrosarcoma e cellule epiteliali del colon è stato visto che sia i due enhancer che il promotore vengono attivati ed, inoltre, il maggior grado di acetilazione dell'enhancer 1 ne suggerisce un ruolo maggiore nella mediazione degli effetti infiammatori dei fattori di trascrizione (TF).

## CARATTERIZZAZIONE DEI FATTORI CHE INTERAGISCONO CON GLI ENHANCER

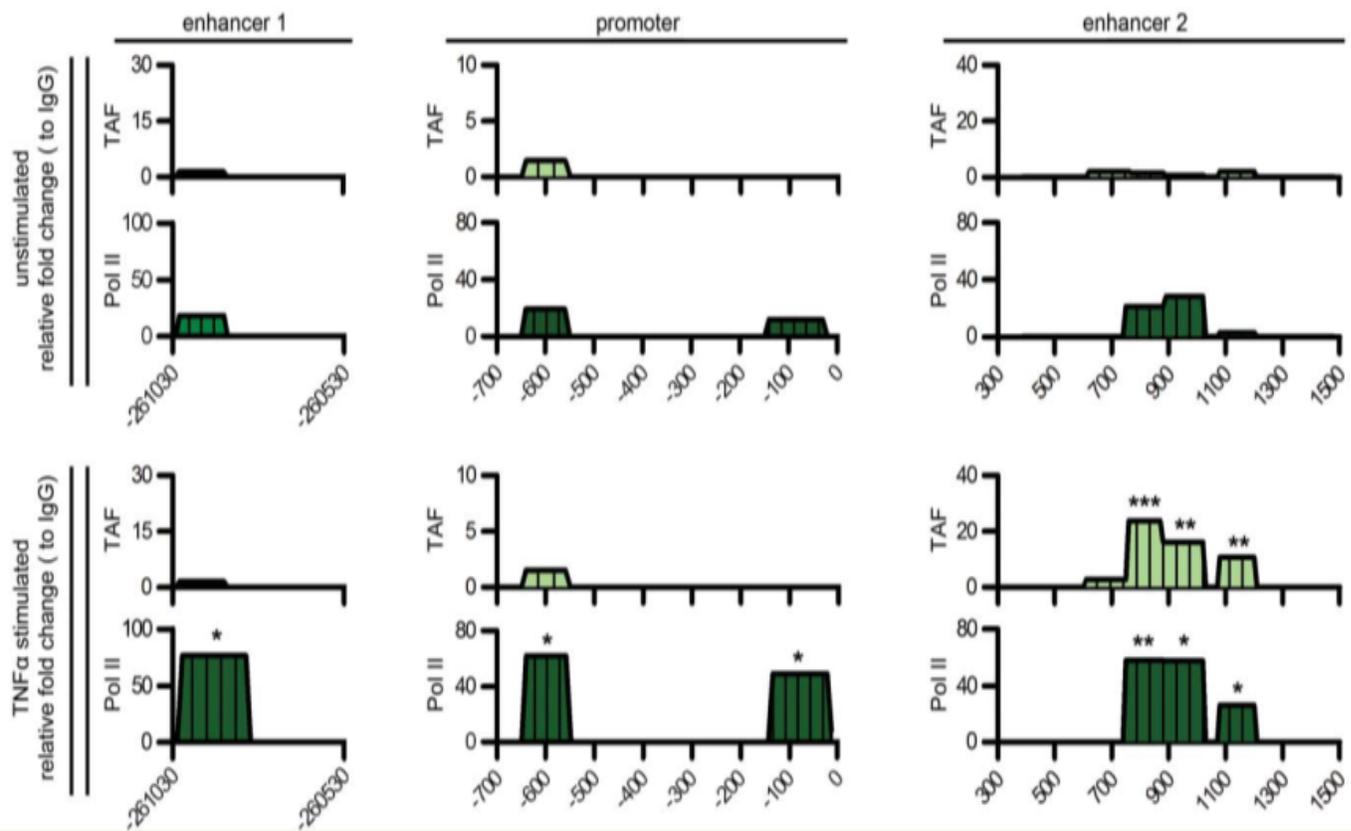
TF coinvolti nell'attivazione delle risposte infiammatorie ed immunitarie che si legano all'enhancer 1 e al promotore:

- **NF-kB**
- **c-Jun e c-Fos**
- **Sp.1**
- **Pu.1**

Il trattamento con TNF $\alpha$  induce il legame di tutti i fattori al promotore mentre si notano differenze nei due enhancer.

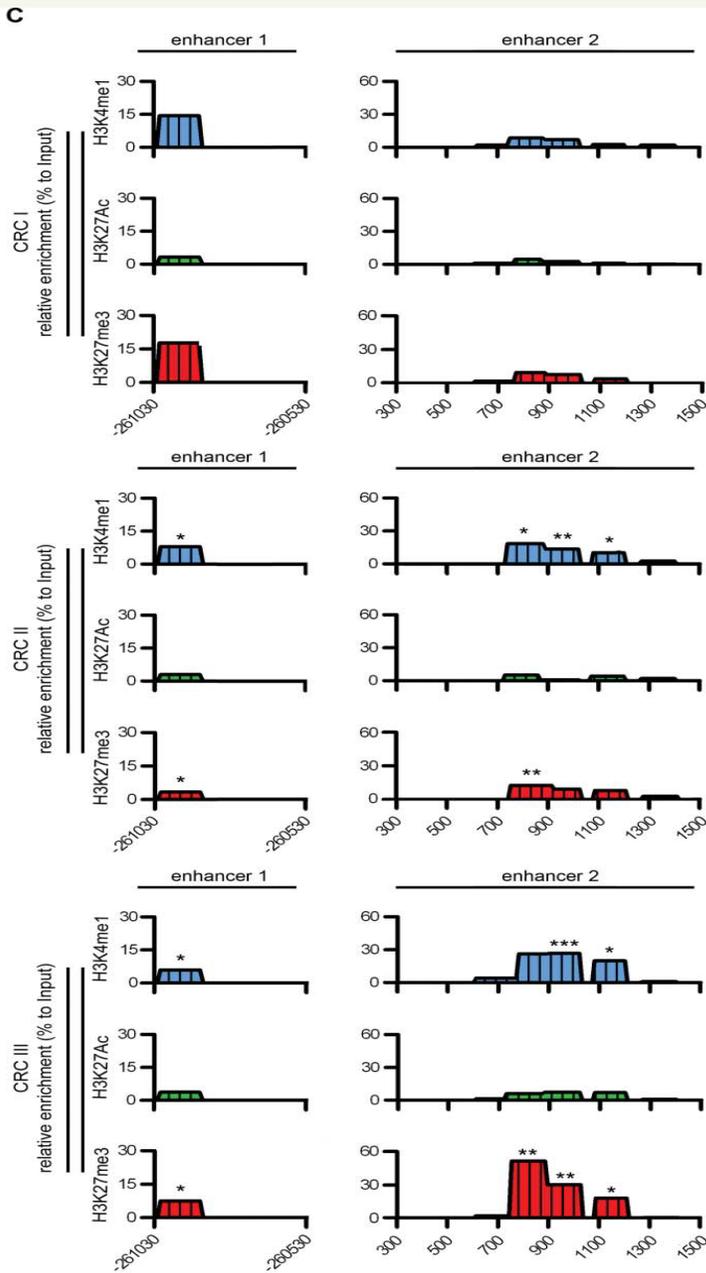


**Figura 3:** ChIP-assay per TF infiammatori nei macrofagi (in alto) e cellule della linea 8387 del fibrosarcoma (in basso) in condizioni basali ed infiammatorie (20ng/mL di TNF $\alpha$  per 4h).



**Figura 4:** ChIP-assay per TAF1 e RNA polimerasi II nei macrofagi in condizioni basali ed infiammatorie

Dopo la stimolazione con TNF $\alpha$  anche **TAF1**, la subunità del fattore di inizio della trascrizione TFIID associata a TBP, è in grado di legarsi all'enhancer 2 e permette l'assemblaggio del complesso di pre-inizio (PIC) che, in condizioni basali, è impedito dal polycomb repressive complex (PRC2).



## ENHANCER INATTIVI NEL CRC

Con MIRA (il saggio di recupero delle isole CpG) e ChIP- assay è stato visto come la metilazione del DNA dei vari elementi regolatori influenza l'espressione di PTX3 nelle varie fasi di progressione del CRC.

### STADIO INIZIALE

- Enhancer 1 *ipermetilato*
- Enhancer 2 *ipometilato*

### STADIO AVANZATO

- Enhancer 1 *ipometilato*
- Enhancer 2 *ipermetilato*

Provando a trattare le regioni regolatorie con 5-AZA-2'-deossicitidina, un inibitore della metilazione, e TNF $\alpha$ , è stata indotta l'attivazione di PTX3.

Perciò, la repressione del gene nel CRC è associata all'ipermetilazione degli enhancer ed è dipendente dallo stadio del tumore.

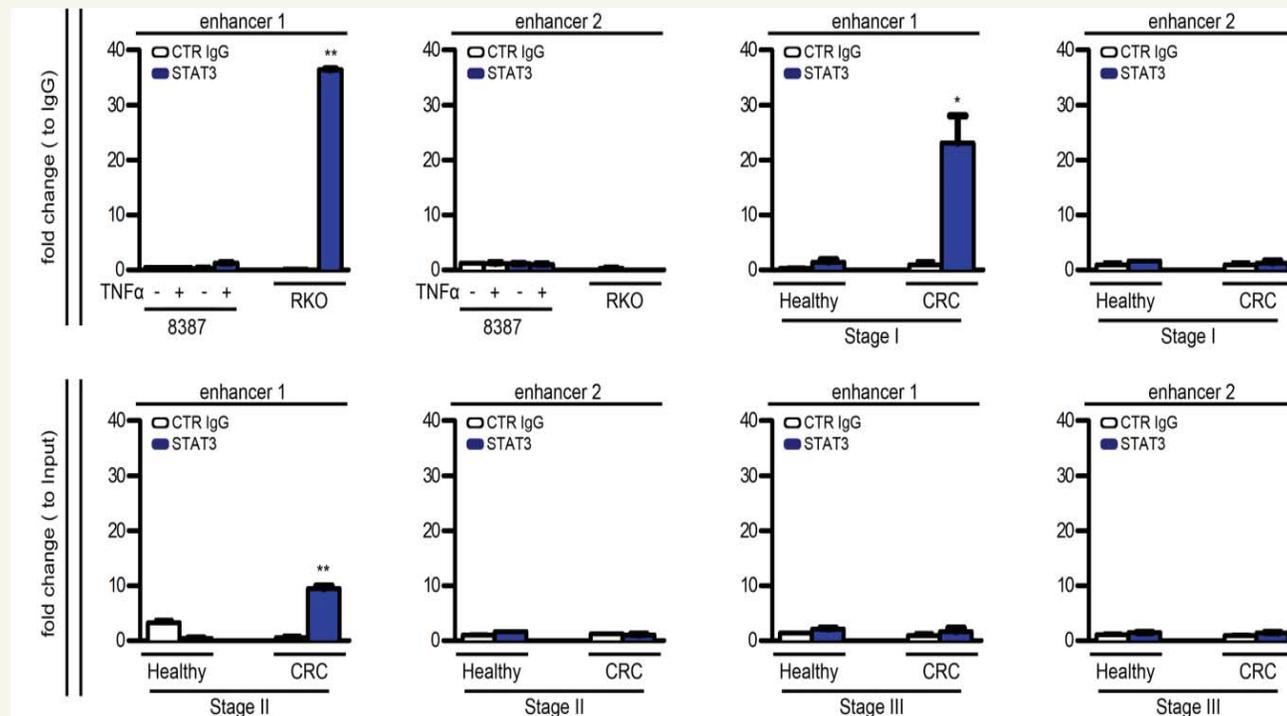
**Figura 5:** Analisi delle modificazioni istoniche H3K4me1, H3K27Ac, e H3K27me3 negli stadi I, II e III del CRC, con saggio ChIP.

## IL RUOLO DI STAT3 NEL SILENZIAMENTO DI PTX3 NEL CRC

Con JASPAR e ChIP-assay è stato identificato un motivo di legame per STAT3.

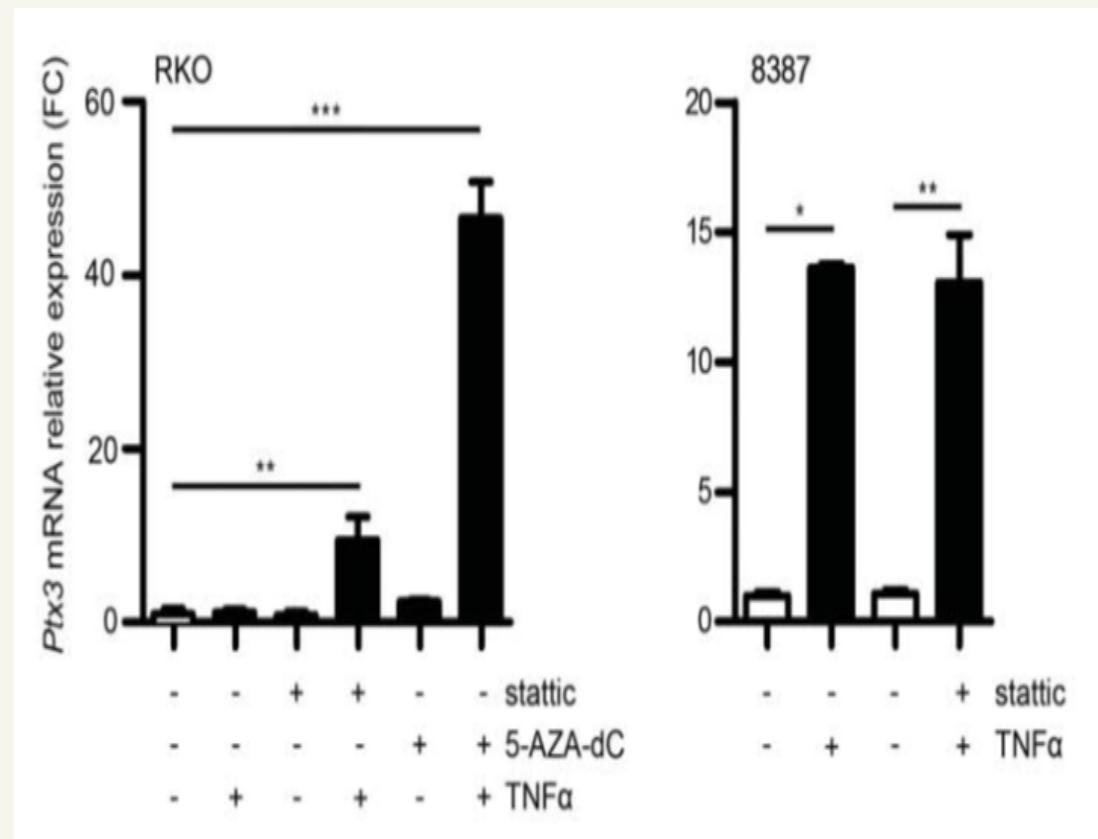
**STAT3** è il fattore di trascrizione maggiormente associato a condizioni infiammatorie: promuove la proliferazione del cancro intestinale ed è coinvolto nel reclutamento della DNA metiltransferasi-1 (DNMT1).

Si lega all'enhancer 1 nelle prime fasi del tumore, contribuendo al suo silenziamento. In nessun caso STAT3 lega l'enhancer 2.



**Figura 6:** ChIP-assay per STAT3 in RKO (linea cellulare di CRC) e nella linea 8387 del fibrosarcoma in condizioni basali e nei tre stadi del CRC comparati a tessuto sano.

Effettuando un trattamento con *Stattic*, inibitore di STAT3, viene ridotta la metilazione dell'enhancer 1 portando ad un aumento della produzione di pentrassina-3 nel CRC.



**Figura 7:** espressione dell'mRNA di PTX3 in RKO e linea 8387 trattate con 15  $\mu$ M di 5'-AZA-2'-dC per 72h, 1  $\mu$ M di Stattic per 48h, e 20 ng/mL di TNF $\alpha$  per 4h.

Tuttavia il trattamento con 5-AZA-2'-dC risulta più efficiente di Stattic nella riduzione della metilazione.

## **CONCLUSIONI**

*L'espressione del gene oncosoppressore PTX3 è sotto il controllo di due enhancer e il loro differente grado di metilazione, nei vari stadi del CRC, determina il silenziamento del gene favorendo quindi la proliferazione cellulare.*

*Le scoperte su questo gene aprono molte strade a nuove terapie per il cancro indirizzate non più alla distruzione delle cellule tumorali, ma alla regolazione del microambiente infiammatorio, fondamentale per la sua proliferazione.*

## **REFERENZE**

Bonavita E, Gentile S, Rubino M, Maina V, Papait R, Kunderfranco P, Greco C, Feruglio F, Molgora M, Laface I, Tartari S, Doni A, Pasqualini F, Barbati E, Basso G, Galdiero MR, Nebuloni M, Roncalli M, Colombo P, Laghi L, Lambris JD, Jaillon S, Garlanda C, Mantovani A. *PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer*. Cell. 2015 Feb 12;160(4):700-714. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.004. PMID: 25679762.

Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. *Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility*. Annu Rev Immunol. 2005;23:337-66. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115756. PMID: 15771574.

Rubino M, Kunderfranco P, Basso G, Greco CM, Pasqualini F, Serio S, Roncalli M, Laghi L, Mantovani A, Papait R, Garlanda C. *Epigenetic regulation of the extrinsic oncosuppressor PTX3 gene in inflammation and cancer*. Oncoimmunology. 2017 May 30;6(7):e1333215. doi: 10.1080/2162402X.2017.1333215. PMID: 28811977; PMCID: PMC5543905.

## RIASSUNTO

Lo studio in esame è incentrato nell'analisi dell'attività del gene per la pentrossina 3 e di come la sua regolazione sia fondamentale nello sviluppo di particolari tumori. È una componente del sistema immunitario innato ed è coinvolto nell'infiammazione legata al cancro (CRI) attivandosi in risposta a segnali infiammatori e agendo come oncosoppressore attraverso il controllo della cascata del complemento.

Gli elementi che regolano la sua attività sono due enhancer: uno coinvolto nell'amplificazione degli effetti dei fattori trascrizionali e l'altro nel reclutamento delle componenti del complesso di pre-inizio della trascrizione. Tali elementi, in condizioni basali, sono silenziati dal polycomb repressive complex (PRC2).

In tumori come il cancro del colon-retto (CRC) e il fibrosarcoma, PTX3 subisce delle metilazioni a livello delle regioni regolatorie che inducono il silenziamento del gene provocando, quindi, la perdita della funzione oncosoppressiva e la proliferazione incontrollata delle cellule tumorali.

Anche il fattore trascrizionale STAT3 contribuisce al silenziamento già dalle prime fasi di progressione del tumore, promuovendo il reclutamento della DNA metiltransferasi-1 a livello dell'enhancer 1.

Perciò la regolazione dell'espressione di PTX3 risulta fondamentale nell'infiammazione e nel cancro.