



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN TECNOLOGIE BIOMEDICHE IN  
MEDICINA CLINICA  
XXV CICLO**

**Analisi mutazionale dei geni *RET* e *RAS* in un'ampia  
casistica di  
carcinomi midollari della tiroide**

**Dottoranda**

Dott.ssa Giulia Tamburrano

**Coordinatore**

Prof. Sebastiano Filetti

Anno Accademico 2011-2012

<b>CAPITOLO1</b>	<b>4</b>
<b>Il carcinoma della tiroide</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Il carcinoma midollare della tiroide (MTC)</b>	<b>5</b>
1.1.1 Neoplasie endocrine multiple di tipo 2 (MEN 2)	6
<b>1.2 Il protooncogene RET</b>	<b>8</b>
1.2.1 Attivazione oncogenica di <i>RET</i>	11
<b>1.3 Oncogene RAS</b>	<b>14</b>
1.3.1 Pathways attivate da <i>RAS</i>	16
<b>1.4 Angiogenesi tumorale</b>	<b>18</b>
1.4.1 La famiglia dei fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)	19
1.4.2 La famiglia dei fattori di crescita derivati dai periciti (PDGF)	21
1.4.3 La famiglia delle Angiopoietine	21
1.4.4 La pathway di Notch	22
<b>CAPITOLO 2</b>	<b>23</b>
<b>Scopo della ricerca</b>	<b>23</b>
<b>CAPITOLO 3</b>	<b>25</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Analisi genetica</b>	<b>25</b>
3.1.1 Estrazione del DNA	25
3.1.2 Amplificazione (PCR)	26
3.1.3 Elettroforesi su gel di agarosio	26
3.1.4 Purificazione dei prodotti di PCR	27
3.1.5 Sequenziamento	27
3.1.6 Purificazione della reazione di sequenza	27
3.1.7 Corsa e lettura	28
<b>3.2 Analisi di espressione genica e correlazione clinica</b>	<b>28</b>
3.2.1 Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione in cDNA	29
3.2.2 Real Time PCR	30
<b>CAPITOLO4</b>	<b>33</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Analisi genetico-molecolari</b>	<b>33</b>
4.1.1 Mutazioni di <i>RET</i>	34
4.1.2 Mutazioni di <i>RAS</i>	36
<b>4.2 Analisi di espressione genica nei tessuti di carcinoma midollare della tiroide</b>	<b>37</b>
4.2.1 <i>RET</i> -mutato vs <i>RET-wt</i>	37
4.2.2 <i>RET</i> -mutato vs <i>WT (RET e RAS wt)</i>	37
4.2.3 <i>RAS</i> -mutato vs <i>WT (RET e RAS wt)</i>	38

4.2.4 <i>RET</i> -mutato vs <i>RAS</i> -mutato	38
4.2.5 Dati clinici	38
<b>CAPITOLO 5</b>	<b>43</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>46</b>

# CAPITOLO1

---

## ***Il carcinoma della tiroide***

La ghiandola tiroidea è il più grande organo endocrino negli uomini. E' composto da due tipi cellulari in grado di secernere ormoni: le cellule follicolari e le cellule parafollicolari o cellule C. Le cellule follicolari comprendono gran parte dell'epitelio e sono responsabili dell'*uptake* dello iodio e della sintesi degli ormoni tiroidei. Le cellule C sono disperse all'interno dei follicoli o localizzate in zone parafollicolari e sono cellule deputate alla produzione di calcitonina, un ormone che regola il metabolismo del calcio.

I tumori tiroidei sono distinti in tumori benigni, rappresentati essenzialmente dagli adenomi iperplastici, e lesioni maligne, nella grande maggioranza dei casi carcinomi, e possono originarsi sia dalle cellule follicolari che dalle cellule C.

Il carcinoma della tiroide è la neoplasia più comune del sistema endocrino, rappresentando circa l'1% delle neoplasie di nuova diagnosi (Sherman, 2003). Il tasso di incidenza globale, corretto per l'età, varia da 0.5 a 10 casi su 100,000 (De Lellis, 2004) ed è aumentato costantemente nel corso degli ultimi decenni, probabilmente in relazione all'elevata sensibilità di tecniche diagnostiche come l'ecografia del collo (Davies and Welch, 2006).

Tra i fattori di rischio per carcinoma della tiroide si contano quelli ormonali, la familiarità ed i fattori ambientali. Le radiazioni ionizzanti sono il fattore eziologico meglio studiato del carcinoma della tiroide. La loro ampia diffusione negli anni '50 per il trattamento di patologie del timo e disturbi della pelle ha contribuito all'aumentata incidenza dei carcinomi della tiroide (De Lellis *et al*, 2004). L'esplosione della centrale di Chernobyl nel 1986 ha portato ad un significativo aumento nell'incidenza di carcinomi della tiroide in Bielorussia ed in altre aree dell'Ex Unione Sovietica più strettamente vicine al luogo dell'incidente (De Lellis *et al*, 2004). L'aumento di incidenza più suggestivo è stato riscontrato nei bambini, poiché

la crescita della tiroide è più rapida durante l'infanzia e rallenta in età adulta (De Lellis *et al*, 2004; Lloyd *et al*, 2011).

Sulla base di parametri istologici e clinici i carcinomi della tiroide possono essere distinti in tre categorie:

1. carcinomi differenziati:
  - papilliferi (75%)
  - follicolari (15%)
2. carcinomi midollari (5-8%)
3. carcinomi anaplastici (2-5%)

Il tipo midollare (MTC) rappresenta il 5-8% dei tumori tiroidei ed ha caratteristiche peculiari, per diagnosi, prognosi, gestione e follow up; la prognosi è meno buona di quella media di tutti tumori tiroidei ed infatti questo tipo è la causa di circa il 13% della mortalità totale. Sembra essere peggiore per le forme sporadiche, identificate in stadi più avanzati rispetto a quelle ereditarie dove inizia ad esistere un'attenta sorveglianza. La sopravvivenza a 10 anni (influenzata da età, estensione, invasione linfatica, metastasi a distanza e radicalità dell'intervento chirurgico) è del 100% allo stadio I, del 93% al II, del 71% al III e del 21% al IV rispettivamente.

### *1.1 Il carcinoma midollare della tiroide (MTC)*

Il carcinoma midollare della tiroide origina dalle cellule parafollicolari C derivate dalla cresta neurale; viene talvolta definito un "tumore nella tiroide" più che "un tumore della tiroide" perché si tratta dell'unico cancro della ghiandola non derivato dalle cellule epiteliali dei follicoli produttori di ormoni tiroidei.

Il clone neoplastico origina, infatti, da cellule neuroendocrine costituenti solo l'1% della ghiandola; Tali elementi si sviluppano dall'ectoderma delle creste neurali, come la midollare surrenale, i melanociti, il sistema nervoso periferico e autonomo, le meningi e il tessuto connettivo degli archi faringei. Inizialmente formano il corpo ultimo-branchiale, organo a sé stante in alcuni animali. Nei periodi successivi dello sviluppo, le cellule migrano nell'abbozzo della ghiandola tiroidea, di origine endodermica, per localizzarsi riunite in piccoli gruppi nello stroma interfollicolare o più spesso tra la membrana basale e lo strato più profondo dei follicoli, dalla cui posizione il nome di "parafollicolari"; in

genere sono più numerose alla giunzione tra il primo e il secondo terzo dei lobi della ghiandola (Leboulleux et al 2004). Le cellule parafollicolari vengono anche chiamate “C cells”, poiché secernono la calcitonina (CT): un peptide di 32 amminoacidi che partecipa all'omeostasi del calcio e del fosforo, insieme a paratiroidi, rene, intestino, ossa.

Il gene codificante questa sostanza (assieme al CT-gene related peptide) è localizzato sul braccio corto del cromosoma 11 e viene espresso da svariati tessuti in risposta a stimoli infiammatori con la sintesi di pre-pro-calcitonina, trasformata in pro-calcitonina e così secreta. Esclusivamente nel tessuto parafollicolare però avviene il clivaggio definitivo, con la produzione della molecola ormonale attiva.

Le cellule C si attivano principalmente in risposta all'aumento della concentrazione extracellulare di calcio ma sono sensibili anche alla pentagastrina, stimoli  $\beta$ -adrenergici, GHRH e numerosi peptidi intestinali.

La calcitonina agisce su un recettore (CTR) accoppiato a proteine G con attività adenilciclasica e fosfolipasica ed abbassa la calcemia e la fosforemia con meccanismi differenti: aumentando l'escrezione urinaria di calcio e inibendo l'attività osteoclastica, l'assorbimento intestinale di calcio, il riassorbimento di fosfati dai tubuli renali e l'attivazione renale della vitamina D (Pacini et al 2010)

### 1.1.1 Neoplasie endocrine multiple di tipo 2 (MEN 2)

L'MTC nel 25% dei casi si manifesta in forma familiare e nel 75% dei casi in forma sporadica (Kouvaraki et al. 2005). Mutazioni germinali attivanti a carico del protooncogene *RET* sono state descritte nel 95-98% degli MTC di forma familiare e nel 20-25% a livello somatico nelle forme sporadiche (Kouvaraki et al. 2005; Drostén et Putzer 2006). Circa il 60% dei carcinomi midollari della tiroide di tipo sporadico (sMTC) rimane privo di caratterizzazione genetica.

Studi recenti hanno evidenziato un'alta prevalenza di mutazioni a carico del gene *RAS* negli sMTC *RET*-negativi (Moura et al.2011).

Il carcinoma midollare ereditario (hMTC) può essere una manifestazione delle neoplasie endocrine multiple di tipo 2 (MEN 2), sindromi tumorali ereditarie caratterizzate da una trasmissione di tipo autosomico dominante ad elevata penetranza. Le MEN 2 da un punto di vista nosologico sono classificate in tre distinte forme: la MEN 2A, la MEN 2B e il FMTC (carcinoma midollare della tiroide familiare)

## - MEN2A

Si caratterizza per la presenza del carcinoma midollare della tiroide, del feocromocitoma e dell'adenoma o iperplasia delle paratiroidi. È il più comune subtipo.

L' MTC è presente nel 90% dei casi, con penetranza correlata all'età; il test con pentagastrina è positivo nel 95% dei casi a trent'anni.

Il feocromocitoma, a seconda della mutazione, può colpire dal 10 al 50% dei pazienti e la diagnosi è sempre successiva a quella del MTC. Quasi sempre benigno, è bilaterale nel 50% dei casi e perlopiù localizzato nel surrene. I sintomi ad esso correlati sono cefalea, palpitazioni, sudorazione, ansia e, negli stadi avanzati, ipertensione fluttuante. Lo *screening* viene eseguito con la misurazione periodica della metanefrina e normetanefrina nel sangue o nelle urine delle 24 ore. Se queste analisi risultano alterate, si procede con tecniche d'imaging (ecografia, tc, risonanza magnetica o scintigrafia con 123I-meta-iodobenzilguanidina) per la localizzazione.

L'adenoma o l'iperplasia delle paratiroidi insorgono, tendenzialmente dopo i 40 anni, nel 10-25% dei casi di MEN2A, per lo più associati alla mutazione del codone 634 del protooncogene *RET*. Istologicamente si rileva iperplasia delle paratiroidi e adenomi unici o multipli. In ogni caso l'iperparatiroidismo si sviluppa lentamente ed è di tipo lieve. Viene consigliato uno *screening* annuale tramite il controllo del calcio ionizzato sierico e del PTH.

La malattia di Hirschsprung, l'assenza dei plessi mucosi e mioenterici del tratto gastrointestinale, e la notalgia, una forma di lichen amiloidotico cutaneo (LAC), che si caratterizza per lesioni iperpigmentate e pruriginose sulla porzione superiore della schiena, rappresentano altre patologie che seppure raramente possono manifestarsi in pazienti affetti da MEN2A.

## - MEN 2B

Si associano in questa entità l'MTC, il feocromocitoma, la ganglioneuromatosi e l'habitus marfanoide, mentre non viene riscontrato iperparatiroidismo. È la forma più rara.

Il tumore tiroideo ha il comportamento più aggressivo tra tutte le forme. Insorge molto precocemente e tende a superare la capsula tiroidea e a metastatizzare prima della diagnosi.

Il feocromocitoma è presente nella metà dei casi ed è gestito come per la MEN2A.

La ganglioneuromatosi consiste in neuromi della mucosa orale, delle labbra, del tratto gastrointestinale (vomito, costipazione e dolori intestinali con rischio di sviluppare il

megacolon) e occasionalmente anche del tratto genitourinario; questi pazienti soffrono anche d'ipertrofia dei nervi corneali.

L'habitus marfanoide, con la caratteristica facies e le alterazioni scheletriche (estremità fini ed allungate, parte superiore del corpo più sviluppata, iperlassità legamentaria, pectum excavatum), sono abbastanza frequenti.

#### - FMTC

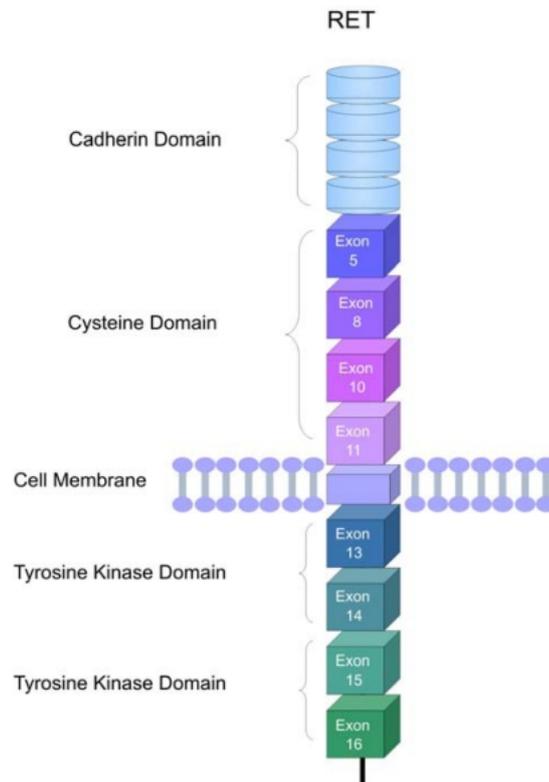
Viene considerato una variante della MEN2A e si caratterizza per la presenza del solo MTC in almeno quattro membri della famiglia, in assenza di feocromocitoma e iperparatiroidismo.

### 1.2 Il protooncogene *RET*

La totalità delle forme ereditarie e circa il 25% dei MTC sporadici sono associati alla mutazione del gene *RET*.

Il gene *RET* è stato identificato per la prima volta nel 1985 da Takahashi et al. trasfettando le cellule NIH3T3 con DNA umano proveniente da un linfoma; le cellule così trasformate possedevano un gene di fusione che era assente nel tumore originario. Questo “nuovo” gene conteneva parte di un gene che codificava per un dominio tirosin chinasi e fu chiamato “REarranged during Transfection gene”.

Il gene *RET* è localizzato sul cromosoma 10 (10q11.2), è lungo circa 55000 bp e contiene 21 esoni (Pasini et al. 1995); la proteina codificata è una tirosinchinasi transmembrana nella cui porzione extracitoplasmatica, in posizione più N-terminale, è presente un dominio che contiene quattro motivi di adesione cellulare simil-caderinici dipendenti dal  $Ca^{+2}$ , per indurre e stabilizzare cambiamenti conformazionali necessari per l'interazione con i ligandi ed i corecettori; in posizione più C-terminale è presente un dominio ricco in cisteine, responsabile della struttura terziaria e della dimerizzazione del recettore. Sono inoltre presenti diversi siti di glicosilazione. Il dominio transmembrana, che comprende i codoni dal 636 al 657, permette l'accostamento dei monomeri *RET* attraverso interazioni inter-recettoriali non covalenti (Machens et al. 2009). Nella porzione intracitoplasmatica è presente un dominio in prossimità della membrana (juxtamembrane domain) ed un dominio tirosin-chinasi che comprende due sottodomini (TK1 e TK2) coinvolti nell'attivazione di numerosi pathways intracellulari di traduzione del segnale (Fig 1). La proteina interamente glicosilata (forma matura) è di 170 KDa ed è presente sulla superficie cellulare; la forma immatura, non glicosilata, pesa 150 KDa ed è presente nel



**Fig1. Struttura del recettore RET**

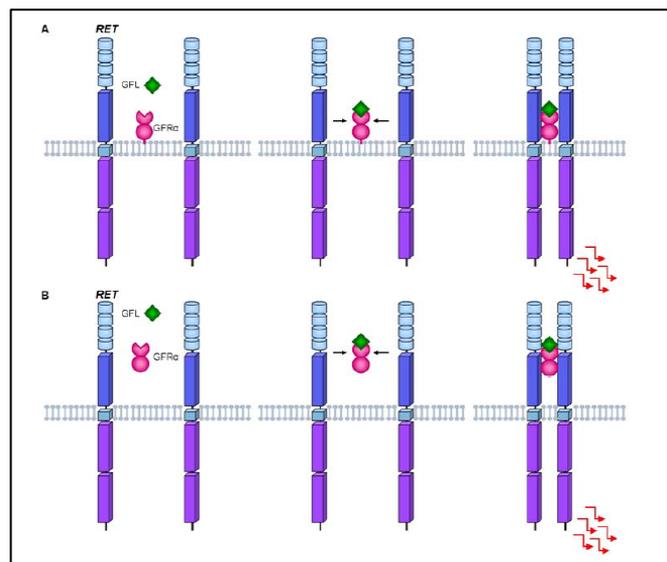
solo reticolo endoplasmatico e nel citoplasma (De Groot et al. 2006). Il recettore *RET* è principalmente espresso nelle cellule precursori della cresta neurale e del tratto uro genitale ed è essenziale per lo sviluppo iniziale dei sistemi nervosi simpatico, parasimpatico ed enterico, dei reni, e della spermatogenesi (De Groot et al. 2006; Kouvaraki et al. 2005). E' quindi presente nelle cellule neuroendocrine e neurali, incluse le cellule C tiroidee, le cellule midollari del surrene, i gangli simpatici, parasimpatici ed enterici, le cellule del tratto urogenitale e le cellule paratiroidi derivanti dagli archi branchiali.

Lo splicing alternativo del gene *RET* produce tre isoforme che contengono 51 (RET51), 43 (RET43) e 9 (RET9) aminoacidi nella coda carbossi.-terminale a valle della glicina 1063 (De Groot et al 2006). Le isoforme RET 51 e RET9 sono quelle più frequenti e meglio caratterizzate *in vivo*, mentre l'isoforma RET43 non è ancora stata ben caratterizzata. Molte osservazioni suggeriscono che le tre isoforme abbiano differenti effetti tessuto-specifici durante l'embriogenesi: studi su topi hanno dimostrato che solo l'isoforma RET9 è necessaria per lo sviluppo dei reni e del sistema nervoso enterico, mentre l'isoforma RET51 partecipa al differenziamento dei reni ed è fondamentale per il metabolismo e la crescita dei neuroni simpatici maturi (Kouvaraki et al. 2005).

La porzione extracellulare forma un complesso con specifici ligandi e corecettori.

Quattro molecole, i GFLs (GDNF Family of Ligands), sono attualmente riconosciute essere ligandi di questo recettore: il glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), la neurturina (NTN), l'artemina (ART) e la persefina (PSP).

Altrettanti sono i corecettori  $GFR\alpha$ s (GDNF Family  $\alpha$  Receptors), che esistono sia in forma solubile sia ancorati al glicosil-fosfatidil-inositolo membranario. Gli  $\alpha$ -corecettori  $GFR\alpha N1$ ,  $GFR\alpha N2$ ,  $GFR\alpha N3$  e  $GFR\alpha N4$  legano in maniera preferenziale rispettivamente il GDNF, l'NTN, l'ART e l'PSP. Il legame con il ligando induce dimerizzazione e autofosforilazione del recettore con fosforilazione di molecole a valle che amplificano il messaggio ormonale all'interno della cellula (Kodama et al. 2005). Viene detta cis l'attivazione con corecettori di membrana e trans quella con corecettori solubili (Fig.2)



**Fig2. Differenti meccanismi di attivazione di RET dipendente dal ligando.**

Nella trasmissione intracellulare sono coinvolte le fosfotirosine, alcune serine (S697, che attiva la via JNK) e i componenti lipidici della membrana (lipid rafts).

Tutti i corecettori  $GFR\alpha$  inducono la fosforilazione degli stessi residui di tirosina nel dominio chinasi ma hanno pattern di espressione specifici, ad indicare che ognuno di essi ha un ruolo differente nell'attivazione di *RET*.

Particolare ruolo è svolto dalla fosfotirosina 1062 (pY 1062) che è presente nelle tre diverse isoforme della proteina Ret e rappresenta un sito di ancoraggio per almeno cinque

diverse molecole coinvolte nella trasmissione del segnale. Ad essa si legano le proteine Shc (src homology collagen-like protein), FRS2, Dok1/4/5, IRS1/2, ed Enigma.

Il reclutamento di Sch porta al legame sia con GRB2-Gab1 sia con il complesso GRB2 - proteina SOS (son of sevenless protein), e attraverso traslocazione e transfosforilazione, induce l'attivazione delle cascate trasduzionali di PI3k/AKT/mTOR (phosphatidylinositol-3-kinase/Ak-thimome/ mammalian target of rapamycin) e di RAS/ERK (extracellular signal-regulated kinase) rispettivamente.

La proteina Ras a sua volta, mediante attivazione chinastica di RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma), una serina/treonina chinasi e quindi di MEK (mapkinase-kinase) una tirosina/serina/treonina chinasi, attiva la via della p38 MAP-K (p38 mitogen-activated-protein kinase) che agisce su differenti substrati intracellulari tra cui i fattori trascrizionali NFκB e CREB.

Un secondo pathway attivato dal legame con la tirosina 1062 vede coinvolto *JNK* (c-Jun N-terminal Kinase).

Altre tirosine che partecipano alla *pathway* sono y752 (legante STAT3), y905 (legante Grb7/10), y928 (legante STAT3), y981 (legante Src), y1015 (legante la fosfolipasi C $\gamma$ , PLC $\gamma$ ), e y1096 (legante Grb2) (Fig.3).

### 1.2.1 Attivazione oncogenica di *RET*

Poiché *RET* è un oncogene, basta una sola mutazione attivante su un allele per indurre la trasformazione neoplastica. Le mutazioni puntiformi attivanti descritte possono essere sia germinali sia somatiche.

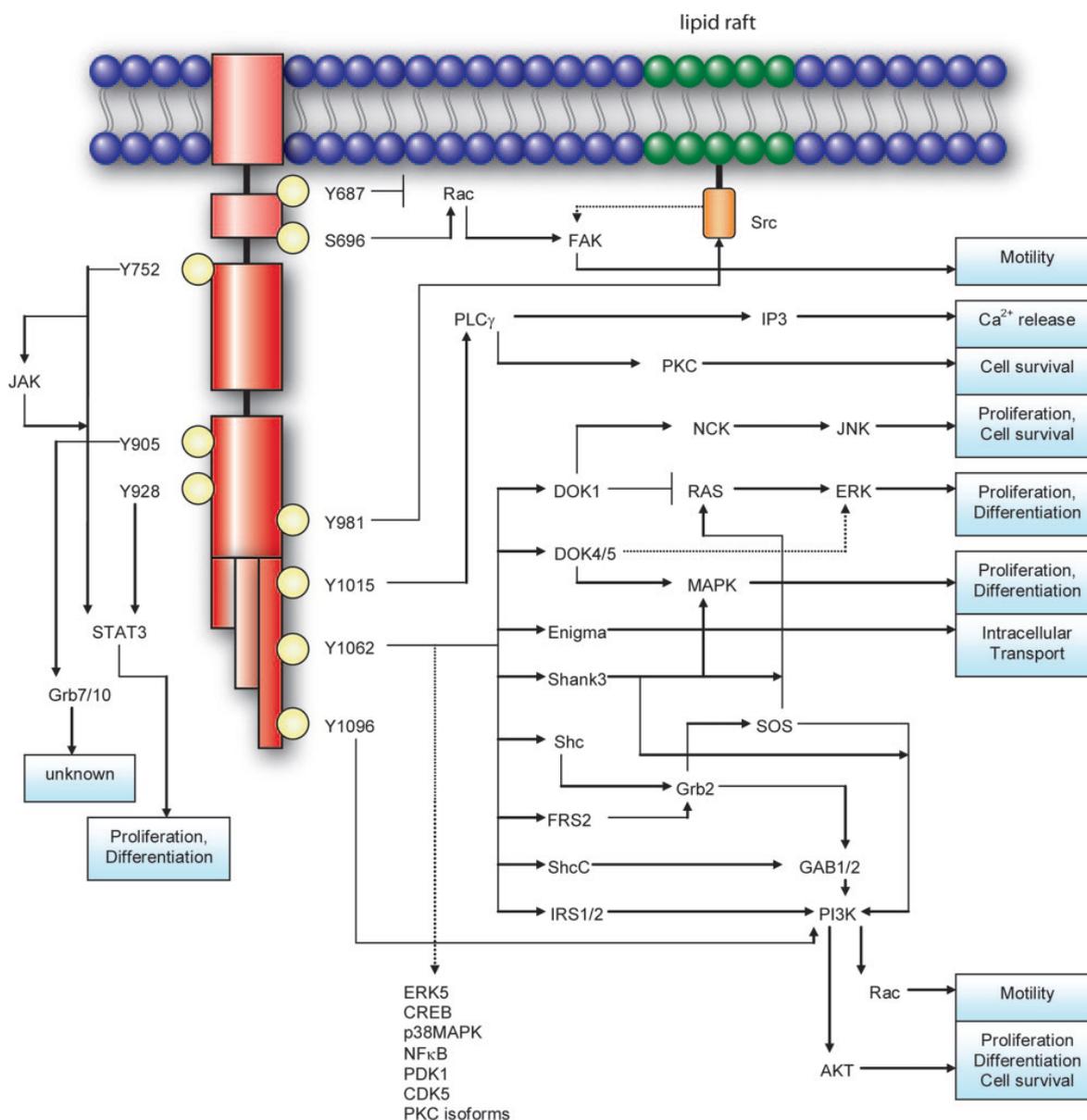


Fig3. Principali pathways di segnalazione di RET. Per semplicità RET è stato disegnato esternamente alla zattera lipidica.

### Mutazioni germinali attivanti di *RET*

Le mutazioni germinali attivanti di *RET* sono presenti nel 98% delle famiglie MEN2A, nell'85% di quelle con FMTC e in più del 98% dei casi di MEN2B (Zbuk et al.2007). Nella MEN2A si riscontrano mutazioni puntiformi che alterano i codoni codificanti la cisteina causandone la sostituzione con un altro aminoacido. Le più comuni sono site nei codoni 609, 611, 618 e 620 dell'esone 10 e nel codone 634 dell'esone 11 (80%), ma si riscontrano anche negli esoni 5, 8, 13, 14, 15, 16. La C634R è presente nella metà dei casi. I residui di cisteina normalmente formano ponti disolfuro intramolecolari che determinano la struttura quaternaria del dominio extracellulare. Quando uno dei residui di cisteina è mutato, il partner con il quale

avrebbe dovuto formare il ponte disolfuro intramolecolare rimane disaccoppiato e forma un ponte disolfuro anomalo con un altro residuo disaccoppiato di un'altra molecola di *RET* mutata; ciò che ne risulta è una dimerizzazione di *RET* che mima il legame del recettore con il ligando portando alla sua attivazione costitutiva (Kloos et al.2009). In alcuni casi di MEN2A sono state descritte mutazioni puntiformi nel dominio chinasico (L790F, Y791F, V804L e S891A) dove sembra facilitino l'accesso delle proteine adattatrici al sito di legame (Machens et al. 2009).

Negli FMTC le mutazioni sono distribuite su tutta la lunghezza della proteina; si trovano più frequentemente nei residui di cisteina del dominio extracellulare e nel 5% dei casi nel dominio transmembrana o nel dominio intracellulare; in alcuni rari casi di MEN2A e FMTC sono state descritte doppie mutazioni, piccole inserzioni, delezioni e piccole inserzioni/delezioni, ma su queste mutazioni non esistono abbastanza informazioni per poter stabilire una correlazione genotipo-fenotipo (De Groot et al2006) (Fig.4)

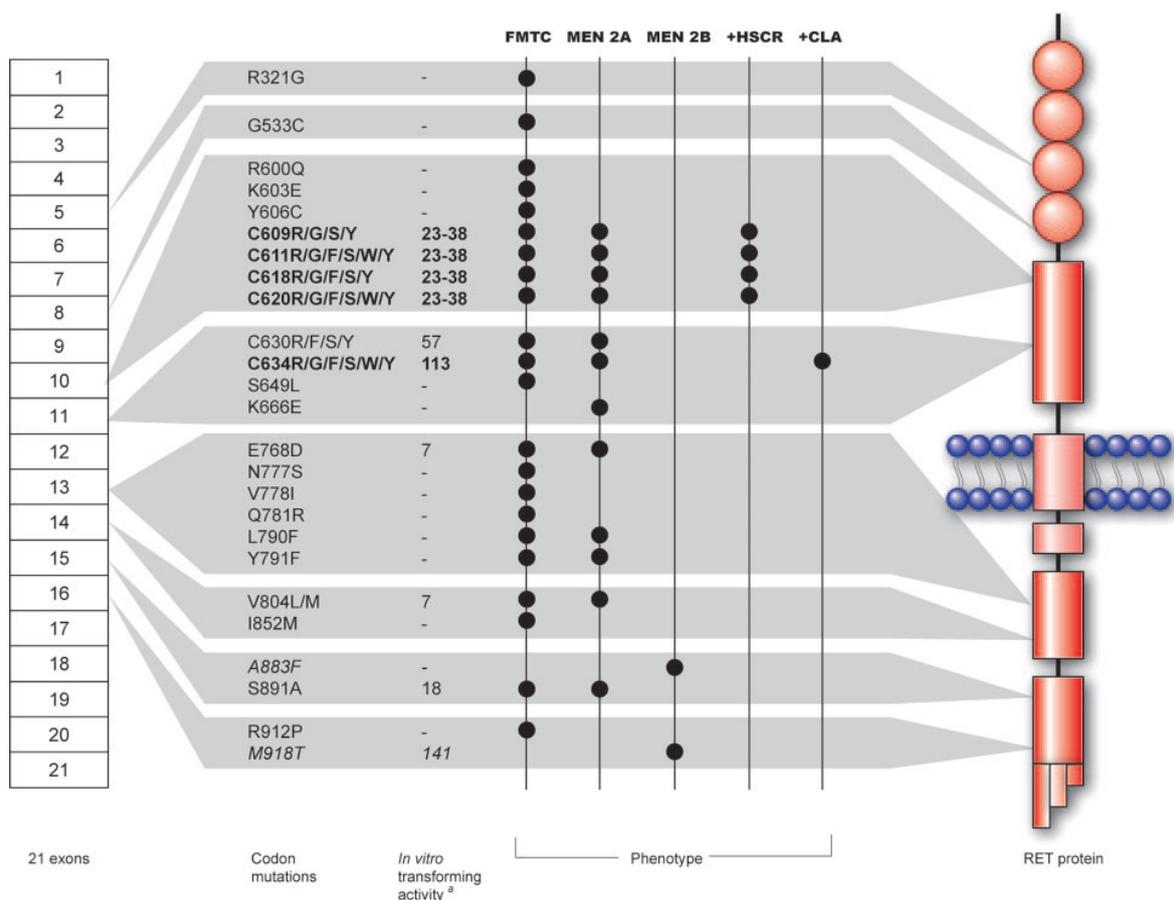


Fig.4 Distribuzione delle mutazioni di *RET*

### Mutazioni somatiche attivanti

Mutazioni somatiche sono state descritte nel 40-50% dei casi di MTC sporadici (Kloos et al. 2009); la più comune è la mutazione M918T (metionina>treonina), ma sono state individuate mutazioni anche in altri codoni, tra cui anche alcune delezioni. Il contributo delle mutazioni

somatiche allo sviluppo del tumore ancora non è noto sebbene i tumori con mutazione al codone 918 sono più aggressivi. Le mutazioni somatiche non sono distribuite allo stesso modo tra il tumore primario e le metastasi, indicando che esse possono comparire durante la progressione del tumore o che l'MTC è una malattia di origine policlonale. Probabilmente in questi casi le mutazioni somatiche di *RET* contribuiscono al tumore ma non lo causano (De Groot et al. 2006).

### 1.3 Oncogene RAS

Il secondo fattore recentemente entrato nel dibattito scientifico sull'eziologia molecolare dei carcinomi midollari della tiroide è il gene *RAS* (RAAt Sarcoma). Nell'uomo sono presenti tre geni *RAS* che codificano per tre distinte proteine ma altamente omologhe, di circa 21KDa: *HRAS*, *NRAS* e *KRAS4A* e *KRAS4B* (*KRAS4A* e *KRAS4B* sono due varianti dello stesso gene *KRAS* prodotte per *splicing* alternativo) (Pylayeva-Gupta et al. 2011). Le proteine Ras rientrano nel gruppo delle “proteine G” (più precisamente delle “smallGTPasi”) la cui caratteristica è la capacità di passare da conformazioni “on” a conformazioni “of” a seconda che siano legate al guanosintrifosfato (GTP) o alla sua forma defosforilata (GDP) rispettivamente. La transizione tra questi due stati è regolata dai *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) che promuovono l'attivazione della proteina RAS attraverso la stimolazione della sostituzione del GDP con il GTP, e dalle *GTPase-activating proteins* (GAPs) che accelerano l'idrolisi del GTP mediata da Ras. Questa inattivazione di *RAS* mediata dalle GAPs è il principale target per le più comuni mutazioni somatiche che sono state trovate nelle varianti oncogeniche degli alleli di *RAS* (Pylayeva-Gupta et al. 2011). Di conseguenza la mutazione Q61 attenua la reazione di idrolisi del GTP portando ad una aumentata attivazione di *RAS* (Buhrman et al. 2010); allo stesso modo sostituzioni nei residui G12 e G13 ostacolano la formazione dei legami di van der Waals tra *RAS* e *GAP*, che porta ad un errato orientamento della glutamina catalitica (Q61) di *RAS* e quindi ad una diminuita idrolisi del GTP (Scheffzek et al. 1997). Il risultato di queste sostituzioni è un'aumentata attivazione di una moltitudine di effettori a valle nella *pathway* di *RAS*.

Studi su pazienti con leucemia e carcinoma della vescia hanno permesso di identificare una correlazione tra specifiche mutazioni di *RAS* ed aggressività della malattia, suggerendo che differenti mutazioni possono portare ad un comune fisiopatologico punto finale (Perentesis et al. 2004). Un'altra questione irrisolta in merito ai principi molecolari di attivazione oncogenica di *RAS*, è se mutazioni in una particolare isoforma porta ad un unico risultato oncogenico. Questa questione è stata principalmente fondata sul modello di distribuzione ben

riconosciuto e non casuale delle isoforme di *RAS* attivate nella varia gamma di tipi di cancro (Karnoub et al. 2008). Quindi mutazioni in *KRAS* sono state trovate più frequentemente nel tumore coloretale, nel carcinoma del polmone e carcinoma pancreatico. Mutazioni in *HRAS* sono associate a tumori della pelle, testa e collo; mutazioni in *NRAS* sono comuni nelle neoplasie ematopoietiche. Queste osservazioni suggeriscono che la predisposizione selettiva delle isoforme di *RAS* a mutagenesi in un particolare tessuto riflette elementi regolatori gene-specifici e non distinti *outputs* funzionali (Fig.5).

Tissue	<i>HRAS</i> *	<i>KRAS</i> *	<i>NRAS</i> *	Incidence rate <sup>§</sup>	Mortality rate <sup>§</sup>
Endocrine	3% (535)	0% (670)	5% (570)	0.7	0.3
Biliary tract	0% (153)	31% (1,679)	1% (287)	NA <sup>§</sup>	NA
Bone	2% (199)	1% (252)	0% (207)	0.9	0.4
Breast	1% (716)	4% (782)	2% (504)	124	24
Central nervous system	0% (964)	1% (1,054)	1% (1,017)	6.5	4.3
Cervix	9% (264)	7% (637)	2% (132)	8.1	2.4
Endometrium	1% (291)	14% (2,251)	0% (314)	23.9	4.1
Eye	0% (33)	4% (90)	1% (106)	0.8	0.1
Haematopoietic and lymphoid tissue	0% (3,076)	5% (5,978)	10% (8,753)	35.2	14.5
Kidney	0% (273)	1% (704)	0% (435)	14.6	4.1
Large intestine	0% (617)	33% (34,013)	2% (1,570)	47.2	17.6
Liver	0% (270)	5% (461)	3% (310)	7.3	5.2
Lung	0% (2,091)	17% (16,348)	1% (3,081)	62	52.5
Oesophagus	1% (161)	4% (375)	0% (161)	4.5	4.4
Ovary	0% (152)	14% (3,181)	5% (191)	12.8	8.6
Pancreas	0% (278)	57% (5,329)	2% (305)	12	10.7
Pleura	0% (19)	0% (45)	0% (30)	NA	NA
Prostate	6% (558)	8% (1,184)	2% (588)	156	24.7
Salivary gland	15% (161)	3% (170)	0% (45)	NA	NA
Skin	6% (2,100)	3% (1,462)	18% (4,956)	22.7	3.5
Small intestine	0% (5)	20% (316)	0% (5)	2	0.4
Stomach	4% (384)	6% (2,793)	2% (215)	7.7	3.8
Testis	4% (130)	4% (432)	3% (283)	5.5	0.2
Thymus	2% (46)	2% (186)	0% (46)	NA	NA
Thyroid	3% (4,137)	2% (5,166)	8% (4,662)	11	0.5
Upper aerodigestive tract	9% (1,083)	3% (1,582)	3% (836)	14	3.7
Urinary tract	11% (1,765)	5% (1,099)	2% (873)	21.1	4.3

Fig.5 Frequenza delle mutazioni di *RAS* nei tumori umani

### 1.3.1 Pathways attivate da RAS

Le proteine Ras trasducono su effettori intracellulari il segnale ricevuto da recettori di membrana tra i quali *RET*, e hanno effetti su *pathway* di proliferazione, differenziazione e apoptosi.

*RAS* oncogenico costituisce un'indipendenza dai fattori di crescita extracellulari ed inibitori di crescita, promuovendo in tal modo l'uscita dalla fase G0 del ciclo cellulare, la progressione attraverso G1 e l'entrata in fase S. *RAS* induce la sovraregolazione trascrizionale dei fattori di crescita e interferisce con il segnale del *TGF-β* attraverso l'inibizione dell'espressione del recettore del *TGF-β* o la segnalazione a valle down-regolando l'espressione di *SMAD3*, nonché l'accumulo nucleare di *SMAD2* e *SMAD3*. *RAS* upregola anche i livelli di ciclina D1 e sopprime la chinasi inibitore ciclina-dipendente (*CDKI*) *p27*. La nuova sintesi di ciclina D1 associata all'attività delle chinasi ciclina-dipendenti *CDK4* e *CDK6*, porta alla fosforilazione di *RB* e la conseguente dissoluzione dei complessi trascrizionali *E2F-RB*. Una volta rilasciato il fattore di trascrizione *E2F* transattiva diversi geni che sono necessari per la progressione del ciclo cellulare, comprese la ciclina E (*CCNE*) e la ciclina A (*CCNA*) che inducono la transizione attraverso il *checkpoint* G1/S (Fig.6). Segnali iperproliferativi dovuti all'attivazione del oncogene *RAS* possono provocare stress replicativo con conseguente danno al DNA. In risposta al danno del DNA la cellula può attivare dei *checkpoint* per arrestare temporaneamente e ripristinare l'integrità del genoma, entrare in uno stato di arresto irreversibile (senescenza) o apoptosi. La riparazione non accurata del danno al DNA può portare a mutazioni e aberrazioni cromosomiche, contribuendo in tal modo alla tumorigenesi.

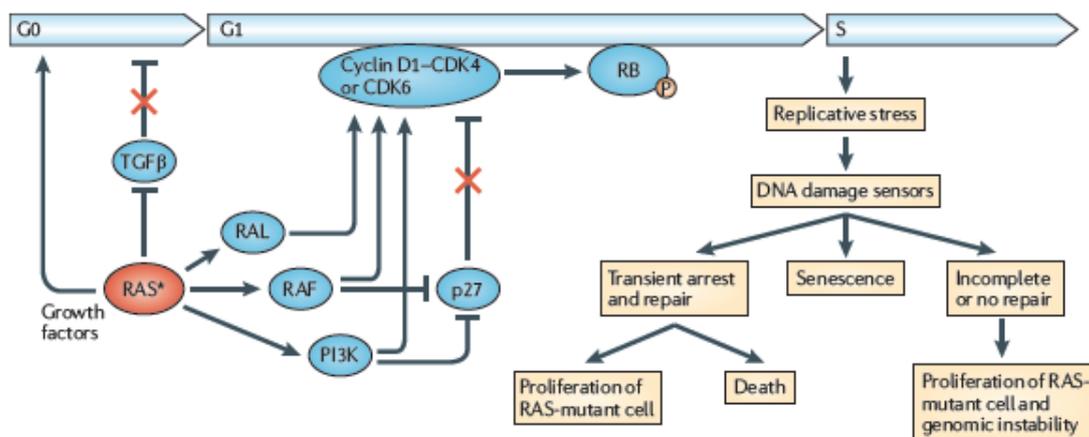


Fig.6 Effetti di RAS sulla proliferazione cellulare

*RAS* ha effetti sull'apoptosi, infatti può avere funzione sia pro-apoptodica sia anti-apoptodica, dipende dallo status degli effettori delle *pathways* di *RAS* e dal macchinario apoptodico. In

molti casi il segnale di *RAS*, attraverso la via di *RAF*, porta ad una risposta apoptotica mediata da *p53*; quindi l'acquisizione del fenotipo oncogenico è contrassegnato dalla soppressione dei mediatori di *RAS* che inducono l'apoptosi. La funzione anti-apoptotica di *RAS* è mediata da diverse vie effettrici, compresa la via *RAS-PI3K*, che regola i livelli della proteina pro-apoptotica *BAK1* e degli inibitori dell'apoptosi (*IAP*), e la *pathway* *RAS-RAF* che regola verso il basso il repressore trascrizionale pro-apoptotico *PAR4*, mentre upregola le proteine anti-apoptotiche *BCL-2* e *ARC*. Entrambi i percorsi sono implicati nella fosforilazione e inattivazione della proteina pro-apoptotica *BCL-2-associated agonist of cell death* (*BAD*) (Fig.7).

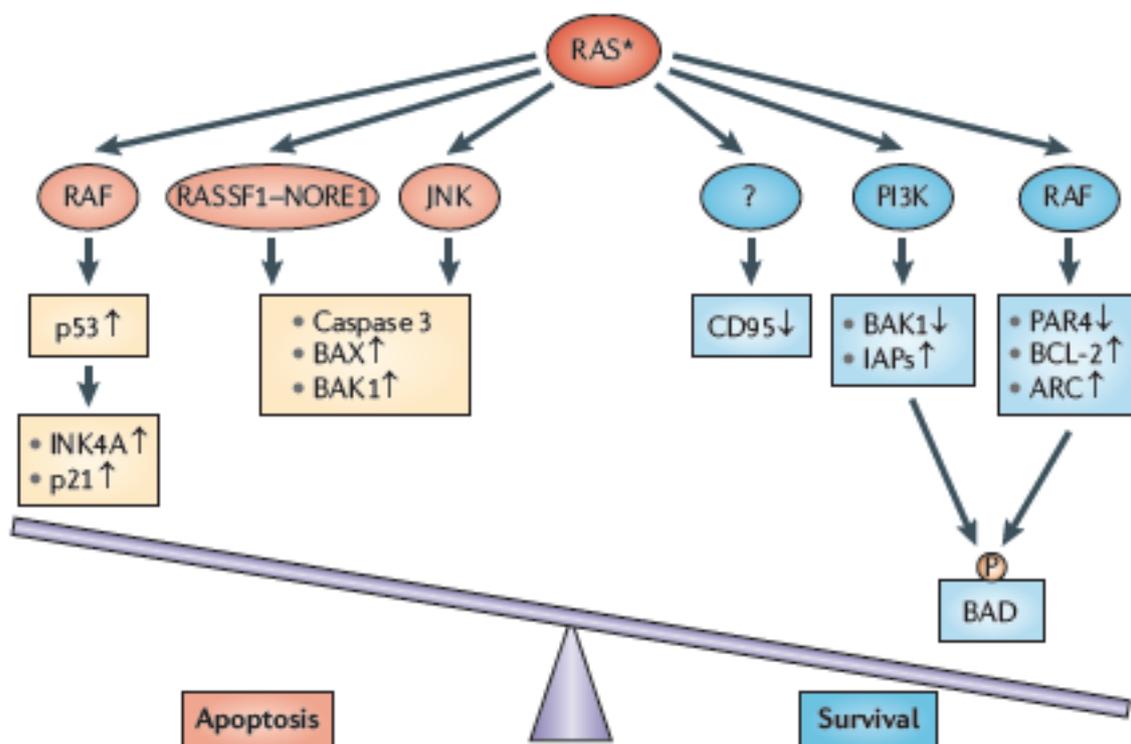


Fig.7 Effetti di *RAS* sull'apoptosi

Nelle cellule neoplastiche *RAS* induce la trascrizione dei fattori di crescita pro-angiogenetici come il *vascular endothelial growth factor A* (*VEGFA*) e *fibroblast growth factor 2* (*FGF2*). *RAS* aumenta la trascrizione del *VEGFA* reclutando i fattori di trascrizione come *SP1*, *SP2*, *AP2* e *ETS* sul promotore di *VEGFA*; può anche aumentare la stabilità del mRNA di *VEGFA* aumentando così la sua traduzione (Mamane et al. 2004). Il complesso *RAS-ERK1* e *ERK2* contribuiscono all'espressione di *COX2* che, a sua volta, aumenta l'espressione di *VEGFA* (Fig.8A). Le cellule tumorali possono rilasciare delle proteasi capaci tagliare le componenti

della matrice extracellulare (ECM) e rilasciare così *VEGFA* e *FGF2* che sono racchiusi nell'ECM. L'espressione delle proteasi e delle metalloproteasi nelle cellule RAS-trasformate è aumentata grazie all'effetto combinato di diversi fattori di trascrizione come ad esempio *ETS* e *JUN*; questi inducono una nuova proliferazione e lo spuntare di micro vasi verso il sito tumorale (Lengyel et al.1995; Jiang et al. 2002) (Fig. 8B). Inoltre le cellule neoplastiche reclutano i macrofagi tramite la produzione di citochine *IL-6* e *IL-8* promuovendo quindi la proliferazione endoteliale (Fig. 8C)

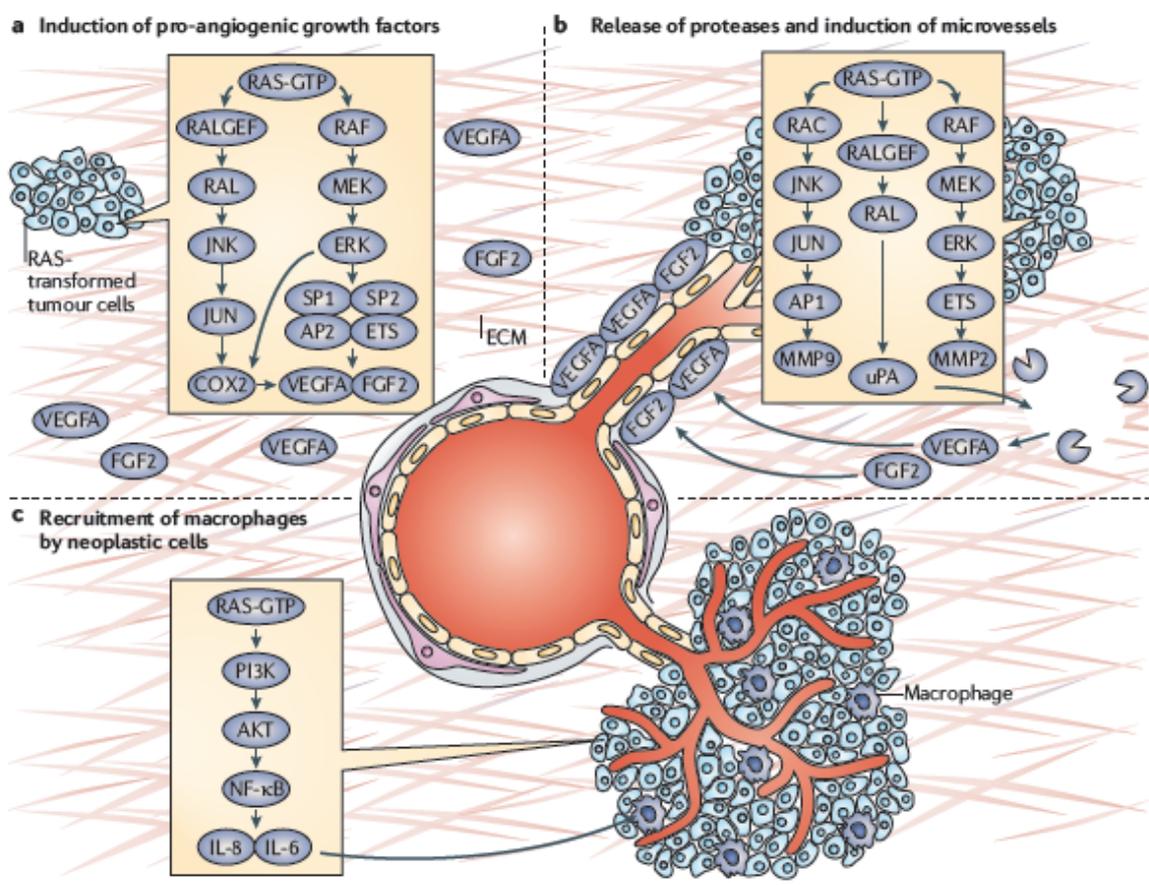


Fig. 8 RAS e angiogenesi: per la descrizione vedi testo.

#### 1.4 Angiogenesi tumorale

Come avviene per i tessuti sani, anche per i tumori solidi l'accrescimento e la sopravvivenza dipendono dalla presenza di un'estesa rete di vasi sanguigni. L'angiogenesi tumorale è un processo di formazione di un *network* vasale all'interno di un tessuto neoplastico ed in partenza dallo stesso.

I tumori di piccole dimensioni, con un diametro inferiore ai 2 millimetri, sono quiescenti e si nutrono per semplice diffusione. Oltre questo limite, il tumore non riesce ad aumentare di volume senza vascolarizzazione a causa della morte cellulare indotta dall'ipossia (Gotink *et al*, 2009). Pertanto va incontro ad un processo detto *switch angiogenico* (produzione di segnali che stimolano l'angiogenesi), causato dall'alterazione dell'espressione genica, responsabile dello squilibrio tra i fattori pro-angiogenici e anti-angiogenici. L'acquisizione di tale fenotipo da parte di alcune cellule tumorali consente la formazione di un'adeguata trama vascolare e la crescita esponenziale della neoplasia.

#### 1.4.1 La famiglia dei fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)

I fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFs) sono i regolatori cruciali dello sviluppo vascolare durante l'embriogenesi (vasculogenesi) e della formazione di nuovi vasi nell'adulto (angiogenesi). Nei mammiferi sono stati identificati cinque ligandi strutturalmente correlati appartenenti a questa famiglia, che includono il VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e il fattore di crescita placentale (PlGF). Questi ligandi si legano a tre recettori tirosin chinasi, noti come VEGFR-1, -2 e -3 e a corecettori, le neuropiline (NRP-1 e-2) (Olsson *et al*, 2006). Il maggior mediatore di angiogenesi tumorale è il VEGF-A, in particolare le sue isoforme circolanti, VEGF<sub>121</sub> e il VEGF<sub>165</sub>. Il VEGF esplica la sua azione principalmente attraverso il recettore VEGFR-2, che è espresso a livelli elevati dalle cellule endoteliali implicate nel processo di angiogenesi e dalle cellule progenitrici endoteliali, derivate dal midollo osseo. Il ruolo di VEGFR-1 risulta essere meno chiaro. Esso lega il VEGF con un'affinità di legame 10 volte più alta rispetto a VEGFR-2, ma ha una debole capacità di trasduzione del segnale (Shibuya *et al*, 2006).

Il *VEGF* è espresso ad alti livelli in molti carcinomi umani e l'aumentata espressione nei tumori è spesso associata con una prognosi meno favorevole. L'induzione o l'aumento di *VEGF* nei tumori umani può essere causato da numerosi fattori ambientali come ipossia, basso pH, citochine infiammatorie (es. interleuchina 6), fattori di crescita (es. fattore di crescita per i fibroblasti) e chemochine (es. fattore 1 derivato dalle cellule stromali). Altre cause includono cambiamenti genetici, quali attivazione di oncogeni o perdita o inattivazione mutazionale di una varietà di oncosoppressori (Kerbel, 2008).

Il legame di VEGF a VEGFR-2 porta ad una cascata di diversi pathway di *signalling*, che risultano nell'*up*-regolazione dei geni coinvolti nella proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali e la loro sopravvivenza e permeabilità vascolare. Per esempio il

legame di VEGF a VEGFR-2 porta alla dimerizzazione del recettore, seguita dall'attivazione intracellulare di *PLCγ-PKC-chinasi Raf-MEK-MAPK pathway* e successivo inizio della sintesi del DNA e crescita cellulare, mentre l'attivazione del *pathway PI3K-Akt* porta ad un'aumentata sopravvivenza delle cellule endoteliali. L'attivazione di *src* può portare a cambiamento del citoscheletro ed induzione della migrazione cellulare. Il recettore VEGFR-3 è espresso preferenzialmente dalle cellule dell'endotelio linfatico e media il processo di linfoangiogenesi attraverso il legame con fattori di crescita VEGF-C e VEGF-D (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006) VEGFR-3 media gli effetti antiapoptotici, la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali linfatiche attraverso Akt e la via di trasduzione del segnale innescata da protein chinasi C-MAPK (Makinen *et al*, 2001) (Fig.9).

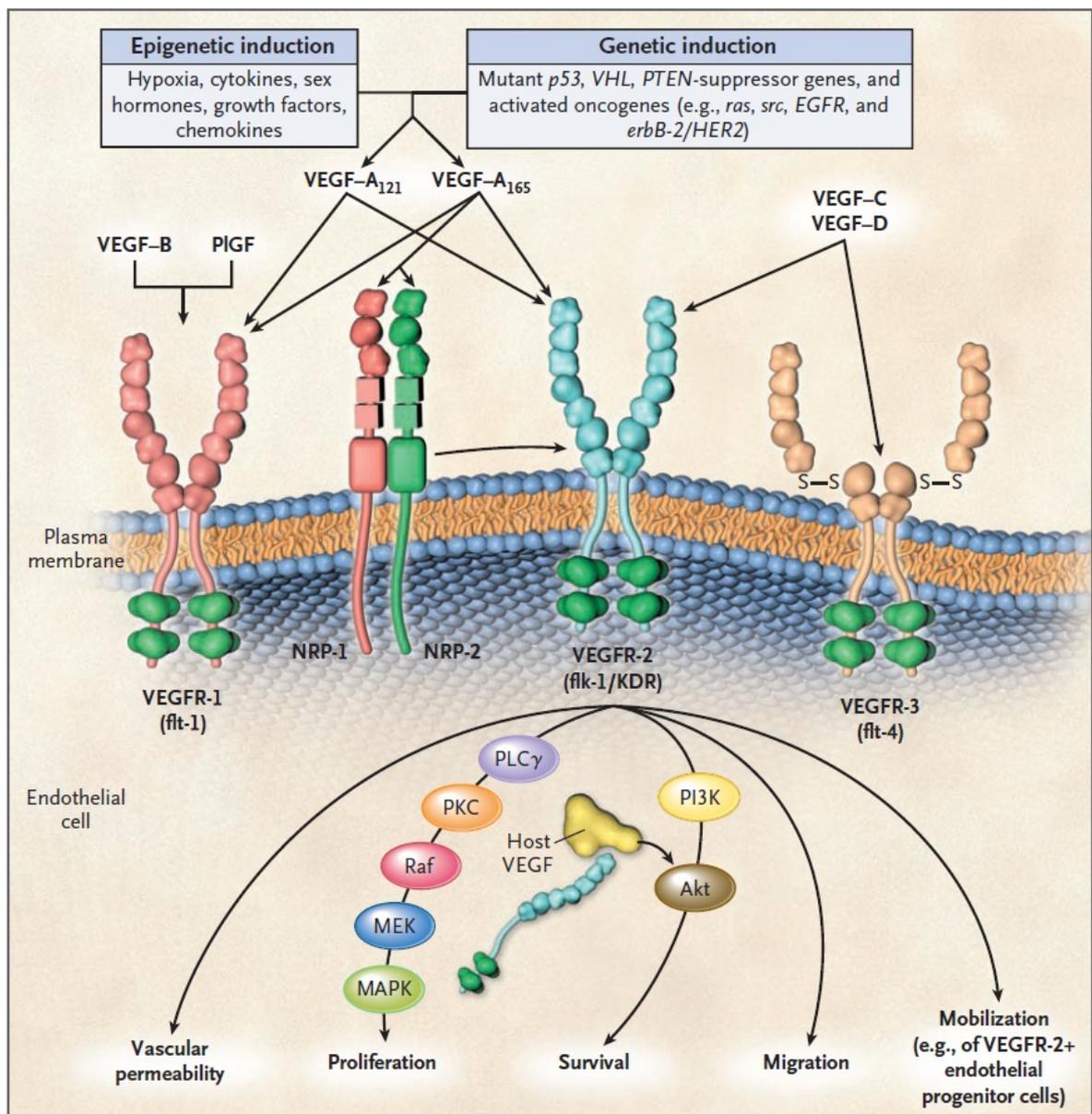


Fig.9 La famiglia dei fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)

#### 1.4.2 La famiglia dei fattori di crescita derivati dai periciti (PDGF)

La famiglia dei fattori di crescita PDGF (platelet-derived growth factor) è rappresentata da cinque proteine, quattro omodimeri (PDGF-AA, -BB, -CC, -DD) ed un eterodimero PDGF-AB (Ostman and Heldin, 2007). Essi mediano i loro effetti cellulari attraverso l'interazione con i recettori alfa e beta (PDGFR- $\alpha$  e  $\beta$ ) che determina la dimerizzazione del recettore, l'autofosforilazione dei residui tirosinici e la sua attivazione.

I membri della famiglia dei fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGF) stimolano la proliferazione, la sopravvivenza e la motilità delle cellule muscolari lisce, dei periciti e delle cellule endoteliali (Heldin and Westermark, 1999). L'*over*-attivazione di *PDGF* è stata inoltre correlata a tumorigenesi e allo sviluppo di altre patologie che coinvolgono l'eccessiva proliferazione cellulare, come l'aterosclerosi e varie condizioni fibrotiche (Ostman and Heldin, 2007). Nel caso dei carcinomi, l'attivazione del recettore del *PDGF* può guidare la crescita tumorale direttamente mediante la stimolazione autocrina del *PDGF* o mutazioni attivanti dei recettori. Il PDGF secreto dalle cellule tumorali, che non rispondono esse stesse al PDGF, può agire in una maniera paracrina sulle cellule non tumorali, come le cellule dei vasi sanguigni tumorali ed i fibroblasti dello stroma, che possono rivestire quindi un ruolo importante nella crescita ed omeostasi tumorale (Pietras *et al*, 2003a).

#### 1.4.3 La famiglia delle Angiopoietine

Un altro pathway di *signaling* dei recettori tirosin chinasi è mediato da tie-2, un recettore espresso principalmente dall'endotelio vascolare. Esistono due principali ligandi per il recettore tie-2, angiopoietina-1 (Ang-1) e angiopoietina-2 (Ang-2). Ang-1 agisce come un agonista, mentre Ang-2 agisce come un antagonista, ma è in grado di promuovere l'angiogenesi, in particolare in cooperazione con VEGF. Le angiopoietine agiscono in concerto con VEGF per la stabilizzazione e maturazione di nuovi capillari. Il blocco del pathway di tie-2 è stato più difficile del blocco del pathway di VEGF, in parte a causa della complessità dei ligandi agonisti e antagonisti per lo stesso recettore e per i problemi correlati alla scoperta di farmaci efficaci e specifici per tie-2 o per le angiopoietine. Tuttavia recentemente sono stati sviluppati anticorpi contro Ang-2, in grado di bloccare l'angiogenesi e la crescita tumorale in modelli pre-clinici (Oliner *et al*, 2004).

#### 1.4.4 La pathway di Notch

I recettori Notch (Notch1, 2, 3 e 4) sono espressi da vari tipi cellulari e sono generalmente coinvolti nel destino cellulare e proliferazione. Questi recettori interagiscono con i ligandi transmembrana (Jagged 1, Jagged 2, Dll1, Dll3 e Dll4) espressi dalle cellule adiacenti. Le cellule dell'endotelio vascolare esprimono i recettori Notch1 e 4 ed i ligandi Jagged 1, Dll1 e Dll4; tra questi, Dll4 è espresso esclusivamente dalle cellule endoteliali (Kerbel, 2008). Il sistema di *signaling* Notch-Dll4 è uno dei maggiori stimolatori di angiogenesi e potrebbe essere un ottimo target, poiché Dll4 viene up-regolato nella vascolarizzazione tumorale (Sainson, 2007), in parte da VEGF (Lobov *et al*, 2007). L'interazione tra Dll4 e i recettori Notch attraverso il contatto con le cellule endoteliali adiacenti porta ad una serie di eventi proteolitici per cui il dominio intracellulare di Notch è tagliato e rilasciato dal complesso gamma-secretasi; il dominio successivamente trasloca nel nucleo, dove interagisce con fattori di trascrizione ed induce l'espressione di vari geni target.

Il segnale derivante dall'interazione Notch-Dll4 previene l'eccessiva angiogenesi e promuove lo sviluppo ordinato di nuovi vasi. Bloccando il segnale, infatti, si altera questo meccanismo di *feedback* negativo che risulta in un aumento della densità vascolare (Noguera-Troise *et al*, 2006). I vasi neoformati sono anormali e la perfusione non è adeguata, ciò comporta un aumento dell'ipossia tumorale (Kerbel, 2008).

## CAPITOLO 2

---

### **Scopo della ricerca**

Il carcinoma midollare della tiroide nel 25% dei casi si manifesta in forma familiare e nel 75% dei casi in forma sporadica (Kouvaraki et al. 2005). Mutazioni germinali attivanti a carico del protooncogene RET sono state descritte nel 95-98% degli MTC di forma familiare e nel 20-25% a livello somatico nelle forme sporadiche (Kouvaraki et al. 2005; Drosten et Putzer 2006). Circa il 60% dei carcinomi midollari della tiroide di tipo sporadico (sMTC) rimane privo di caratterizzazione genetica.

Studi recenti hanno evidenziato un'alta prevalenza di mutazioni a carico del gene *RAS* negli sMTC RET-negativi (Moura et al. 2011). (Pylayeva-Gupta et al 2011).

Mutazioni puntiformi a carico del gene *RAS*, in particolare *N-RAS*, sono state generalmente identificate in tumori derivanti dall'epitelio follicolare sia nelle forme benigne, come ad esempio gli adenomi follicolari (FA), sia nelle forme maligne come ad esempio i carcinomi follicolari (FTC) e nelle varianti papillifere (PTC) (Vasko et al. 2003); tuttavia la ricerca di mutazioni in *RAS* in casi di MTC ha portato risultati discordanti, in un primo momento studi condotti su casistiche ridotte di sMTC non hanno rilevato, o con percentuale molto bassa, mutazioni nel gene *RAS* (Bockhorn et al. 2000; Moley et al. 1991); un'alta prevalenza di mutazioni in *K-RAS* (circa 41%) è stata evidenziata in una casistica greca (Goutas et al 2008), e più recentemente studi condotti da Moura et al hanno rilevato circa il 68% di mutazioni nei geni *H-RAS* e *K-RAS* in casi di sMTC RET-negativi, e solo il 2,5% in casi RET-positivi, suggerendo che le mutazioni somatiche a carico dei geni *RET* e *RAS* sono mutualmente esclusive nella tumorigenesi del carcinoma midollare della tiroide (Moura et al 2011).

È stato condotto uno studio osservazionale multicentrico di tipo retrospettivo. Hanno partecipato i centri di riferimento per la cura dei carcinomi della tiroide "Bologna, Matera, Pisa, Roma e Verona". L'obiettivo della ricerca è stato di stabilire le prevalenze delle alterazioni genetiche in queste neoplasie e di analizzare la correlazione genotipo/fenotipo. "Roma" ha assunto il ruolo di centro coordinatore, raccogliendo i dati clinici e svolgendo le indagini di biologia molecolare.

Queste osservazioni potrebbero aiutare a definire una nuova strategia terapeutica nei casi di sMTC *RET*-negativi.

L'angiogenesi tumorale è un processo di formazione di un *network* vasale all'interno di un tessuto neoplastico ed in partenza dallo stesso.

Le terapie molecolari mirate che inibiscono *RET* e altri recettori tirosina chinasi noti per essere coinvolti nell'angiogenesi stanno mostrando promettenti risultati terapeutici nel trattamento del carcinoma midollare della tiroide metastatico. In particolare la nostra attenzione alle maggiori vie di regolazione angiogenetica: Notch, VEGF, PDGF, angiopoietine e metalloproteasi.

Quindi lo scopo del nostro studio è stato di identificare nuove mutazioni somatiche negli sMTC, e valutare come eventi mutazionali influenzano l'espressione dei geni coinvolti nei *pathway* pro-angiogenetici al fine di individuare nuovi bersagli target di terapia molecolari.

# CAPITOLO 3

---

## ***Materiali e metodi***

È stato condotto uno studio osservazionale multicentrico. Hanno partecipato i centri di riferimento per la cura dei carcinomi della tiroide “Bologna, Matera, Pisa, Roma e Verona”. È stata esaminata una coorte consecutiva di pazienti con diagnosi di carcinoma midollare della tiroide avvenuta tra il 1986 e il 2011. Nel corso del 2011-2012 sono state effettuate ricerche mutazionali sui tessuti tumorali recuperati. L'obiettivo postosi è stato di stabilire le prevalenze delle alterazioni genetiche in queste neoplasie e di analizzare la correlazione genotipo/fenotipo. “Roma” ha avuto il ruolo di centro coordinatore, raccogliendo i dati clinici e svolgendo le indagini di biologia molecolare.

La popolazione complessiva studiata consta di 123 casi. I criteri di inclusione adottati sono stati: la diagnosi istologica di MTC, effettuata sui tessuti di tutti i pazienti dopo l'intervento di tiroidectomia totale; la presenza di campioni di tessuto in paraffina, dai quali sono state preparate fettine su vetrino per la ricerca mutazionale; la possibilità di prelievi sanguigni per la differenziazione tra mutazioni somatiche e germinali, specificatamente per distinguere, nei casi *RET* positivi, la presenza di sindromi familiari.

### ***3.1 Analisi genetica***

Il nostro studio è stato eseguito su una casistica molto ampia (123) di pazienti affetti da MTC. I dati clinici relativi ad ogni individuo reclutato sono stati raccolti ed inseriti in un database clinico. Per ogni paziente abbiamo raccolto un campione di sangue periferico e 10 fettine fissate in formalina ed incluse in paraffina (FFPE) da 10 um ottenute dal tumore. Ogni sezione è stata revisionata dall'anatomopatologo al fine di delineare l'area tumorale.

Il DNA di ciascun campione di MTC è stato analizzato per la ricerca di mutazioni germinali e somatiche nei geni *RET* (esoni 10, 11, 13, 14, 15 e 16), *RAS* (esoni 2,3 e 4 di *H-K-N RAS*) e *BRAF* esone 15.

#### **3.1.1 Estrazione del DNA**

Da ogni fettina è stato estratto il DNA, esclusivamente dalla porzione tumorale precedentemente delineata dall'anatomopatologo, mediante il Kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel). Tale kit si basa su un sistema cromatografico per adsorbimento su matrice

di silice. Una volta rimosso il tessuto dall'area tumorale della fettina, questo è stato lasciato ad incubare per 30' in una soluzione di xilene e, in seguito, è stato lavato con etanolo assoluto. Evaporato l'etanolo, è stata eseguita la lisi cellulare tramite incubazione overnight a 56° con una soluzione di proteinasi K e sodio-dodecil-solfato (SDS) che ha un'azione duplice, enzimatica e detergente. Il DNA estratto è stato poi purificato con l'aggiunta di etanolo e sali caotropici ed il successivo passaggio in colonnine con membrane di silice, che adsorbono in modo reversibile e specifico gli acidi nucleici. Tali matrici silicee sono state lavate mediante passaggi successivi di soluzioni ad alte concentrazioni saline. Infine, il DNA purificato è stato staccato dalle membrane e allo stesso tempo eluito utilizzando un buffer di lavaggio debolmente alcalino a bassa concentrazione salina che veniva raccolto in tubetti sterili.

Per l'estrazione del DNA da sangue venoso periferico abbiamo utilizzato il Mini Kit (Qiagen), il cui principio di funzionamento è basato sempre sull'utilizzo di colonne cromatografiche.

Allo scopo di valutare la purezza e la concentrazione del prodotto ottenuto, 1,5 microlitri di ogni DNA estratto sono stati letti in uno spettrofotometro (Nanodrop); esso, sfruttando la caratteristica assorbanza (260 nm) del DNA, ne calcola la concentrazione e la purezza cioè la possibile presenza di contaminazione da proteine (rapporto 260/280  $\approx$  1,8-1,9) e da fenoli (rapporto 260/230  $\approx$  2-2,2).

### 3.1.2 Amplificazione (PCR)

Ogni regione genomica di interesse, della lunghezza di circa 300-400 bp, è stata amplificata mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) in cappa sterile. 100ng di ogni DNA sono stati introdotti in un volume totale di 50ul di una soluzione così composta: desossiribonucleotidi trifosfati (4 dNTPs, ognuno contenente una delle basi azotate: adenina, citosina, guanina e timina) 200uM, 1,25U di Taq Gold Polimerasi e suo buffer specifico (1x), MgCl<sub>2</sub> 1,5mM e 10pmol di primers forward e reverse, opportunamente disegnati per ogni amplicone.

### 3.1.3 Elettroforesi su gel di agarosio

Sono stati caricati 8 ul di reazione di PCR su gel di agarosio contenete il bromuro di etidio, un intercalante del DNA sensibile ad eccitazione con raggi UV, ed è stata eseguita la corsa elettroforetica a 100 V per circa 30 min. In questo modo, ponendo il gel nel transilluminatore, è stato possibile verificare l'altezza corretta della banda relativa all'amplicone in esame, la specificità della reazione e l'assenza di eventuali contaminazioni.

### 3.1.4 Purificazione dei prodotti di PCR

Una volta verificato il successo della reazione di amplificazione, il materiale genetico amplificato (amplicone) è stato purificato utilizzando il Kit “Isolate PCR and Gel” (BIOLINE) basato su colonnine a membrana di silice in grado di legare il DNA ma non tutti gli altri componenti della PCR. Il lavaggio con opportuni buffer e l'eluizione hanno permesso di purificare il DNA amplificato che è stato poi utilizzato nella successiva reazione di sequenziamento.

### 3.1.5 Sequenziamento

Il principio del sequenziamento utilizzato è stato quello di Sanger o “chain termination method”. Si tratta di un metodo enzimatico fondato sull'utilizzo di nucleotidi modificati (dideoxinucleotidi trifosfato, ddNTPs), molecole artificiali che si differenziano dai nucleotidi naturali per l'assenza del gruppo idrossilico sul carbonio 2' e 3' della molecola. Questa differenza impedisce la formazione del legame fosfodiesterico con altri nucleotidi, bloccando l'allungamento del filamento di neo-sintesi. Inoltre i 4 ddNTPs sono marcati ognuno con una diversa sostanza fluorescente.

Durante la reazione di sequenza i due filamenti di DNA dell'amplicone vengono replicati dalla polimerasi che incorpora i dNTPs e, casualmente, i ddNTPs che, grazie alle loro caratteristiche, terminano la sintesi del filamento e “marcano” la loro posizione con la fluorescenza specifica ad essi associata. Verranno così prodotti molti filamenti di DNA di lunghezza variabile, ognuno dei quali termina con uno dei 4 ddNTPs. È stata dunque preparata una soluzione di volume totale di 10ul in cui erano presenti: 2ul di MIX (contenente la polimerasi e i dNTPs e ddNTPs in proporzione ben definita), 1ul di buffer, 10 pmol di primer specifico (o forward o reverse) ed una quantità di amplicone calcolata mediante la seguente formula: lunghezza amplicone (n° bp)/50.

La reazione di sequenza è avvenuta in un termociclatore, il quale ha eseguito 25 volte il ciclo:

***-1) Denaturazione a 96°C per 10’’***

***-2) Ibridazione a 50°C per 5’’***

***-3) Allungamento a 60°C per 4’***

### 3.1.6 Purificazione della reazione di sequenza

La reazione di sequenza è stata purificata utilizzando le colonne Centri-Sep (Life Technologies). Esse contengono un gel che, una volta idratato, permette di eluire rapidamente

le grandi molecole, e quindi il DNA, e di trattenere tutte le molecole piccole, e quindi gli altri componenti della reazione. Infine, i filamenti di DNA ottenuti dalla reazione di sequenza sono stati denaturati in formammide per 3' a 95°C

### 3.1.7 Corsa e lettura

Le sequenze di DNA così preparate sono state caricate in un sequenziatore automatico (ABI PRISM 3130xl) (Applied biosystems). Questo strumento esegue un'elettroforesi capillare del DNA ed è in grado di separare filamenti che differiscono di una sola base. Alla fine del cammino elettroforetico è posta una CCD camera (cell detection block) che rileva la fluorescenza emessa a seguito dell'eccitazione con laser di ogni ddNTP che passa. In questo modo il sequenziatore acquisisce i segnali emessi e li traduce in picchi colorati (elettroferogramma), in cui ad ogni colore corrisponde un nucleotide (verde, blu, nero e rosso, rispettivamente per ddAMP, ddCMP, ddGMP e ddTMP). La presenza di una sostituzione nucleotidica in omozigosi verrà rappresentata da un picco di colore diverso da quello originale (wild-type), mentre una sostituzione nucleotidica in eterozigosi sarà rappresentata da un doppio picco, uno corrispondente al nucleotide wild-type e l'altro al nuovo nucleotide.

### 3.2 *Analisi di espressione genetica e correlazione clinica*

Per lo studio sono stati raccolti 55 campioni di tessuto tiroideo da altrettanti pazienti affetti da carcinoma midollare della tiroide e sottoposti ad intervento chirurgico di tiroidectomia.

Le informazioni cliniche sulla popolazione oggetto dello studio sono state raccolte in seguito ad una revisione retrospettiva delle cartelle cliniche ed i tumori sono stati classificati in base al sistema TNM.

Ciascun campione prelevato è stato immediatamente congelato in azoto liquido dopo la resezione chirurgica ed in seguito conservato a -80°C fino all'uso.

Tutti i campioni sono stati revisionati da un unico anatomopatologo, che ha confermato la diagnosi ed escluso la presenza di tessuto normale.

Ogni soggetto arruolato nello studio ha fornito il proprio consenso informato scritto affinché i campioni potessero essere sottoposti a studi molecolari.

I 55 campioni di MTC sono stati analizzati per il livello di espressione dei principali fattori proangiogenici. La tecnica di Real-time PCR con TaqMan Low Density Array (TLDA) è stata usata per misurare i livelli di mRNA dei fattori di crescita endoteliali vascolari (VEGF) e la famiglia del recettore VEGF; fattori di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) e loro

recettori; angiopoietine; metalloproteinasi e loro inibitori. Inoltre, sono stati valutati i livelli di espressione di geni relativi alla via di segnalazione di Notch.

### 3.2.1 Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione in cDNA

L'RNA totale è stato estratto da tessuti freschi congelati mediante il reagente *TRIzol* (Invitrogen). Il reagente *TRIzol* è una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato in grado di mantenere l'integrità dell'RNA mediante l'inibizione irreversibile delle ribonucleasi e di lisare le cellule e dissolvere i componenti cellulari durante la fase di omogenizzazione.

Dopo l'aggiunta di 1 ml di *TRIzol* a ciascun campione da processare, la soluzione è stata omogenizzata meccanicamente mediante l'utilizzo di siringhe sterili con aghi di dimensioni 18G e 20G e successivamente centrifugata a 12.000 rpm per 10 minuti a +4°C. Al supernatante sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio (0,2 ml per ogni ml di *TRIzol* utilizzato), la soluzione è stata miscelata vigorosamente per inversione ed incubata a temperatura ambiente per 3 minuti. I campioni sono stati sottoposti a centrifugazione per 15 minuti a 14.000 rpm a 4°C. Questo step permette la separazione di tre fasi: una fase organica inferiore contenente DNA e proteine, un'interfase e una fase acquosa superiore contenente l'RNA. La fase acquosa è stata quindi recuperata e sottoposta a precipitazione mediante l'aggiunta di 500 µl di isopropanolo e successiva incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti. I campioni sono stati centrifugati a 12.000 rpm per 10 minuti a 4°C, il supernatante è stato eliminato ed il pellet contenente l'RNA è stato sottoposto ad un lavaggio con 1 ml di etanolo al 70% freddo per permettere la rimozione di eventuali impurità presenti. Dopo aver centrifugato per 5 minuti a 10.000 rpm a 4°C, il supernatante è stato eliminato ed il pellet è stato eluito in un volume appropriato di H<sub>2</sub>O RNase free (30-40 µl).

L'RNA ottenuto è stato quantizzato tramite lettura spettrofotometrica valutando la sua assorbanza alla lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di 260 nm sullo strumento Nanodrop (ThermoScientific). L'integrità dell'RNA totale è stata verificata tramite elettroforesi su gel di agarosio 1,5% con l'aggiunta di Bromuro di Etidio e visualizzazione delle bande corrispondenti all'RNA ribosomale al transilluminatore.

Due µg di ciascun campione di RNA sono stati successivamente retrotrascritti in cDNA mediante l'utilizzo di 200 U dell'enzima trascrittasi inversa (*Superscript II RT, MoMuLV*; Invitrogen Corp.) e 500 pmol di *random examers* in 100 mM Tris-HCL pH 8.3, 500 mM KCl, 5 mM di ciascun dNTP e 40 U di inibitore dell'Rnasi, in un volume finale di reazione di 20 µl.

### 3.2.2 Real Time PCR

#### 1. Principi generali

La *Real Time-PCR* è una tecnica che, sfruttando la fluorescenza, permette di determinare quantitativamente i livelli di espressione di acido nucleico; la quantità di segnale fluorescente emessa è direttamente correlata a quella di acido nucleico presente.

Questa tecnica integra alla classica reazione a catena della polimerasi (PCR) la possibilità di monitorare la reazione di PCR in tempo reale consentendo la rilevazione in contemporanea del frammento amplificato.

La molecola che emette il segnale fluorescente può intercalare il DNA a doppio filamento in maniera aspecifica (SYBER Green I) oppure può legarsi specificamente al prodotto di amplificazione (amplicone) del DNA/cDNA target (TaqMan Probes)(Livak KJ *et al*, 1995).

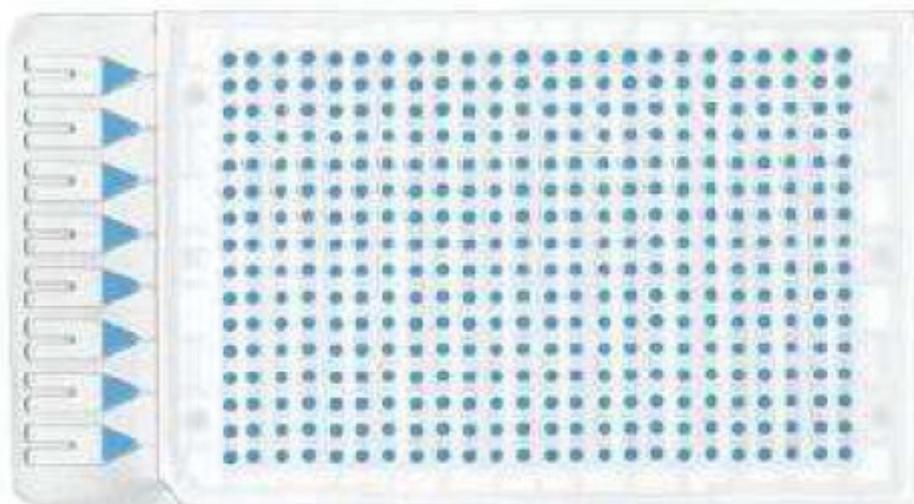
Le sonde specifiche per lo studio del gene in esame e per i geni *housekeeping* sono marcate all'estremità 5' con 6- carbossi- fluorescina "FAM". Queste molecole, definite molecole reporter, vengono usate per monitorare la reazione di PCR.

Nel saggio TaqMan la sonda, oltre ad essere legata all'estremità 5' alla molecola reporter, è legata all'estremità 3' con una diversa molecola fluorescente che agisce come *quencher* della molecola reporter. Quando i due fluorocromi sono legati alle due estremità di una sonda di 20-30 nucleotidi ed il fluorocromo reporter è eccitato da una sorgente di luce esterna, la normale fluorescenza della molecola reporter è assorbita dal vicino *quencher* e nessuna fluorescenza può essere rintracciata. Quando la Taq Polimerasi durante l'estensione incontra la sonda, la digerisce tramite la sua attività 5'-esonucleasica, il *quencher* viene liberato dalla molecola reporter, e la sua fluorescenza può, così, essere direttamente rilevata. La fluorescenza rilevata cresce esponenzialmente al ciclo di amplificazione in maniera proporzionale alla quantità di cDNA presente. Ed è proprio questo segnale fluorescente che viene rilevato da uno scanner laser ed è utilizzato per quantificare il cDNA specifico per il gene studiato.

#### 2. Metodologia sperimentale applicata: TaqMan Low Density Array (TLDA)

In questo studio l'analisi di espressione genica è stata effettuata mediante Real Time PCR, sfruttando la tecnologia *TaqMan® Low Density Array* (TLDA) (Life Technologies), *micro-fluidic cards* da 384 pozzetti che permettono di effettuare fino a 384 reazioni simultanee di Real-Time PCR utilizzando la tecnologia delle sonde TaqMan. In particolare nel nostro esperimento abbiamo utilizzato il sistema *TaqMan® Array for Gene Expression-Format 48*

(Life Technologies), che consente la quantificazione simultanea di 48 geni per 8 campioni (Fig.10).



**Fig 10. TaqMan® Array for Gene Expression-Format 48 (Life Technologies).**

I geni selezionati sono rappresentativi dei principali *pathway* coinvolti nel processo angiogenico. Nelle *micro-fluidic cards* sono inoltre inclusi 3 geni *housekeeping* necessari per la normalizzazione dei dati: i geni Actin-beta (ACTB), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT).

Tutti i saggi TaqMan sono pre-caricati nella micro-fluidic card costituita da otto *lanes* con i rispettivi canali di caricamento, ognuno dei quali è connesso a 48 pozzetti contenenti altrettante sonde.

100 ng di cDNA ottenuto dalla precedente reazione di retrotrascrizione sono stati aggiunti a *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x* (Life Technologies) e dH<sub>2</sub>O fino ad un volume totale di 1 ml. La mix ottenuta è stata trasferita nella *microfluidic card* attraverso le 8 porte di caricamento. La *microfluidic card* è stata centrifugata due volte per un minuto a 1200 rpm al fine di distribuire il campione dalla porta di caricamento in ciascun pozzetto. La *microfluidic card* è stata quindi sigillata e la reazione di amplificazione è stata effettuata nello strumento *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies) utilizzando i seguenti cicli di temperatura: 2' a 50°C, 10' a 95°C seguiti da 40 cicli di 30'' a 97° e 1' a 60°C.

L'analisi dei dati è stata effettuata mediante i software *SDS versione 2.3* e *RQ Manager 1.2* (Life Technologies). I valori di Ct (*Cycle threshold*) ottenuti, definiti come il punto in cui la fluorescenza del gene supera la fluorescenza del *background*, sono stati usati per calcolare il cambiamento dell'espressione della sequenza nucleotidica target nei nostri campioni rispetto

all'espressione della stessa sequenza nel campione calibratore. I valori di Ct maggiori di 33 sono stati esclusi dall'analisi.

Il metodo di calcolo usato per la quantificazione relativa è il metodo "*Comparative Ct*", in base al quale la quantità del gene target, normalizzata per il controllo endogeno (valore  $\Delta Ct$ ) ed espressa rispetto alla quantità del calibratore (valore  $\Delta\Delta Ct$ ), è calcolata mediante la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak *et al* 2001).

La scelta del controllo endogeno per la normalizzazione dei dati è stata effettuata in base all'analisi della variabilità d'espressione di 3 geni endogeni inseriti nelle *microfluidic card* (*ACTB*, *GAPDH* e *HPRT*). Il gene *GAPDH* ha mostrato differenze di espressione più basse tra tutti i campioni da noi analizzati, risultando un buon controllo.

### 3. *Analisi statistica*

I risultati di PCR quantitativa sono stati espressi come media  $\pm$  DS (deviazione standard). Le differenze di espressione per ciascun gene tra i diversi gruppi di pazienti arruolati sono state analizzate mediante test non parametrico *Mann-Whitney* e la significatività statistica attribuita per un valore di  $p$  minore di 0,05.

L'analisi è stata effettuata con l'ausilio del software *StatView 5.0.1* (SAS Institute Inc. Cary, NC-USA).

# CAPITOLO4

## RISULTATI

### 4.1 Analisi genetico-molecolari

Sono stati analizzati 123 campioni, ed il risultato dello *screening* genetico è riassunto in tabella 1.

WT	23 (18,7)		
RAS mutati	22 (17,9)		
RET mutati	78 (63,4)	germinali	17 (21,8)
		somatici	61 (78,2)
Totale	123 (100)		

Tabella 1.

In 78 su 123 campioni (63,4%), sono state individuate mutazioni nel gene *RET*; di queste il 78,2% sono mutazioni somatiche mentre le restanti sono germinali.

In 22/45 pazienti risultati *RET* wt (48,9%) sono state trovate mutazioni nel gene *RAS*. Tali mutazioni sono presenti nel 17,9% di tutti gli MTC analizzati.

Il 18,7% (23/123) degli MTC non erano portatori di mutazioni negli esoni esaminati dei due geni (Fig. 11).

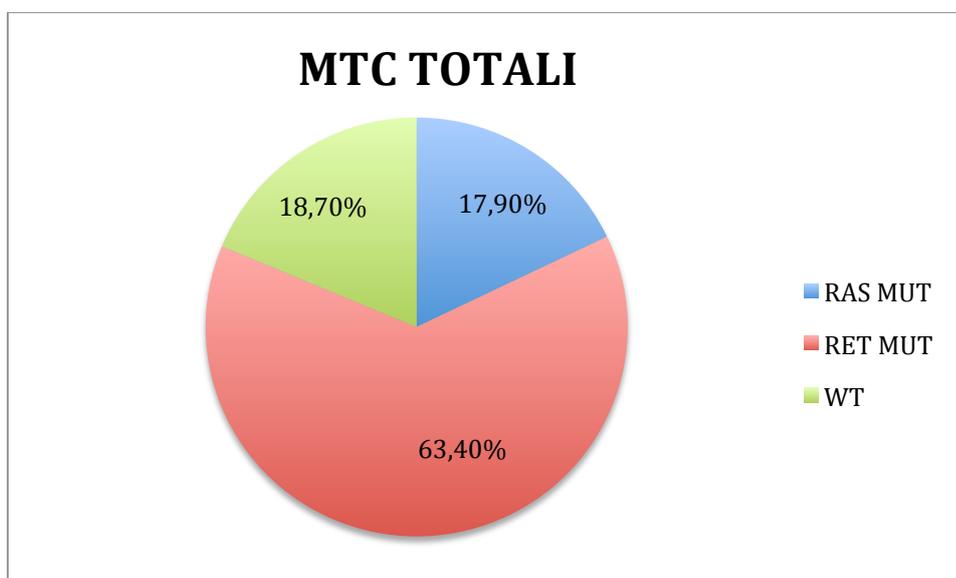


Fig.11 Distribuzione delle mutazioni nei 123 campioni di MTC

#### 4.1.1 Mutazioni di RET

L'analisi di sequenziamento ha rivelato che circa il 54% delle mutazioni di *RET* a livello somatico risiedono nell'esone 16 a livello del codone 918; tale mutazione (ATG>ACG; M>T) determina un fenotipo molto aggressivo sia se è presente a livello somatico sia a livello germinale. Anche l'esone 11 risulta avere un tasso di mutazione elevato, infatti circa il 21% delle mutazioni è a carico di esso, in particolare a livello del codone 634; da notare inoltre la presenza di una mutazione non descritta a livello del codone 631 (D>E) associata ad una piccola delezione di appena due aminoacidi (D632\_E633). Sono state inoltre trovate quattro mutazioni a livello del codone 630.

Circa il 10% delle mutazioni somatiche di *RET* si trova nell'esone 10 a livello del codone 620, mentre nell'esone 14 sono state rilevate cinque mutazioni nel codone 804 di cui una associata ad una seconda mutazione in particolare la M918T. A carico dell'esone **15** sono state ritrovate 4 mutazioni: le sostituzioni A883F e S891A e due piccole delezioni: D898\_E901del e V899\_E902del.

Per quanto riguarda le mutazioni germinali, sono state trovate la sostituzione C630C, non descritta ed associata ad una C634R somatica e sostituzioni sui codoni 634, 891 e 918. Queste ultime sono rispettivamente di rischio ATA "C", "A" e "D". Una delle due mutazioni S891A è associata, a livello somatico, ad un cambiamento nucleotidico non descritto in 898. (Tab. 2 e 3) (Fig. 12).

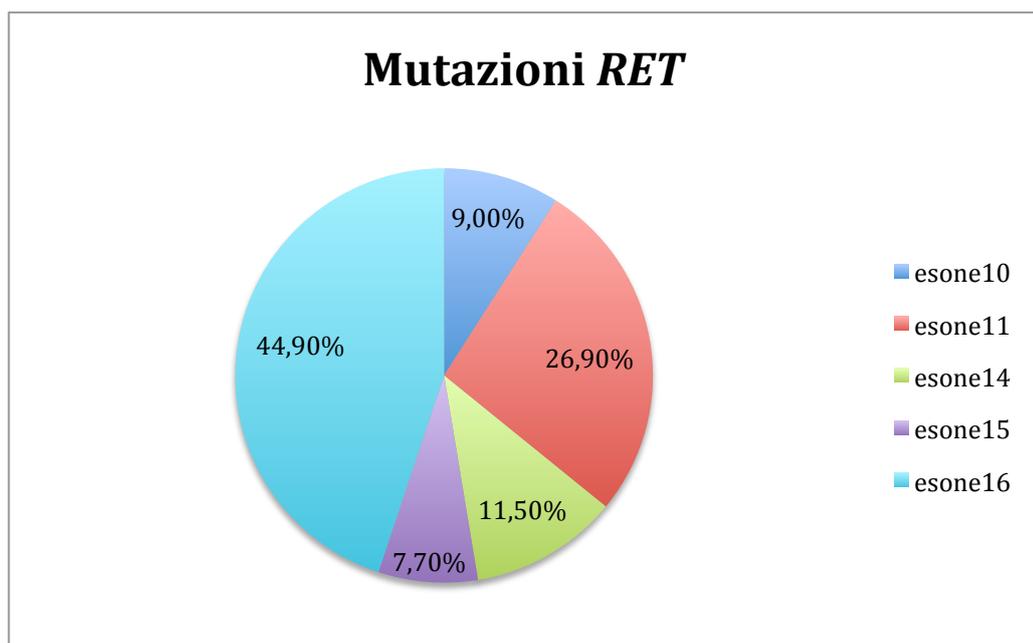


Fig.12 Distribuzione delle mutazioni nel gene *RET*

<i>RET</i> SOMATICO	1a mut	2a mut	numero		%
ESONE 10	C620W		2	6	9,8
	C620R		4		
	C630G		1	13	21,3
	C630R		1		
	C630S		1		
ESONE11	C630W		1		
	D631E	D632_E633del	1		
	C634R		3		
	C634S		1		
	C634Y		4		
ESONE14	V804M		4	5	8,2
	V804M	M918T	1		
ESONE15	A833F		1	4	6,6
	S891A		1		
	D898_E901del		1		
	V899_E902del		1		
ESONE16	M918T		33	33	54,1
<b>TOTALE</b>				<b>61</b>	<b>100</b>

**Tab. 2 Distribuzione delle mutazioni di *RET* a livello somatico negli sMTC**

<i>RET</i> GERMINALE	1a mut	2a mut	numero		%
ESONE10	C620R		1	1	5,9
ESONE11	C611Y		3	8	47
	C630C	C634Rs	1		
	C634F		2		
	C634Y		2		
ESONE14	V804M		3	4	23,5
	V804M	Y791F	1		
ESONE15	S891A		2	2	11,8
ESONE16	M918T		2	2	11,8
<b>TOTALE</b>				<b>17</b>	<b>100</b>

**Tab. 3 Distribuzione delle mutazioni di *RET* negli MTC di tipo familiare**

#### 4.1.2 Mutazioni di RAS

Circa il 77% delle mutazioni coinvolgono il gene *H-RAS* e, nella maggior parte dei casi, mappano a livello del codone 61. In 9 casi su 14 (65%) si tratta di sostituzioni Q>R; nel restante di Q>K (21%) e di Q>L (14%). Le mutazioni G13R rappresentano invece i 3/17 (17,6%) del totale di H-RAS.

Il 20% dei campioni hanno mostrato mutazioni in *K-RAS*. La metà di queste è localizzata nel codone 61 (K>R) e l'altra metà nel 12 (G>R/V), è stata fino ad ora riscontrata una sola mutazione nell'esone 4 di *K-RAS*, a livello del codone 117 (K>N). (Tab.4) (Fig.13).

Nella nostra coorte non sono presenti mutazioni di *N-RAS* in accordo con quanto riportato in letteratura.

Mutazioni RAS	Numero
H_G13R	3
H_Q61K	3
H_Q61L	2
H_Q61R	9
<b>HRAS totali</b>	<b>17</b>
K_G12R	1
K_G12V	1
K_Q61R	2
K_K117N	1
<b>KRAS totali</b>	<b>5</b>
<b>totale RAS mutati</b>	<b>22</b>

Tab. 4 distribuzione mutazioni in RAS in sMTC

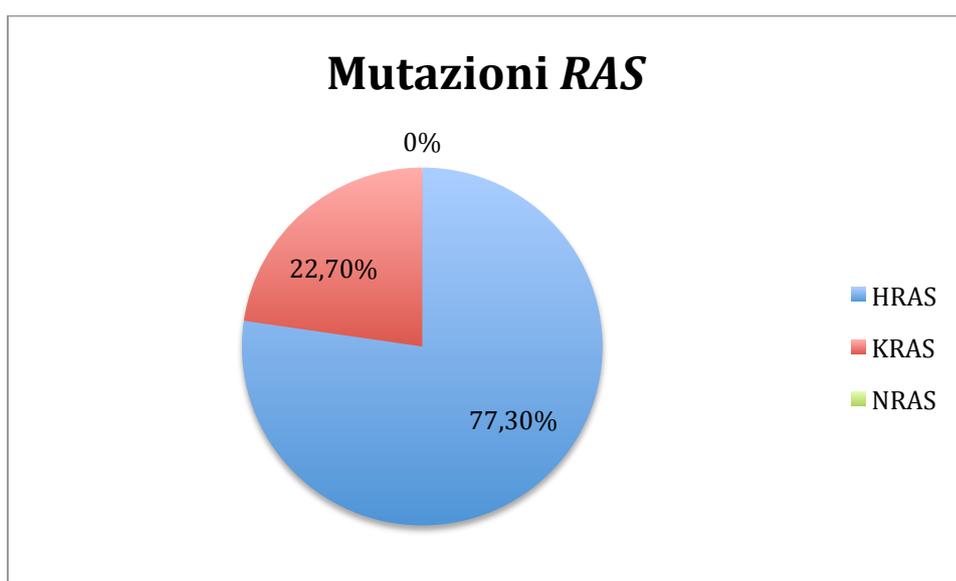


Fig.13 distribuzione mutazioni in RAS in sMTC

#### 4.2 Analisi di espressione genica nei tessuti di carcinoma midollare della tiroide

I campioni di tessuto tiroideo tumorale sono stati sottoposti a studio di espressione genica mediante *Real-Time* PCR sfruttando la tecnologia *TaqMan*® *Low Density Array* (TLDA).

In particolare abbiamo disegnato *microfluidic-card* a 384 pozzetti contenenti sonde e primers specifici per l'analisi di 48 geni. Oggetto di studio sono stati i geni rappresentativi delle principali vie di trasduzione del segnale coinvolte nel processo di angiogenesi (i criteri di selezione sono descritti nella sezione MATERIALI E METODI).

Questa tecnica ci ha permesso di effettuare in maniera rapida la mappatura e lo studio dei livelli di espressione dei geni sopra citati.

I campioni sono stati organizzati in gruppi in base al loro stato mutazionale (presenza/assenza di mutazioni nel gene *RET* e nei geni *RAS*) ed in base alla presenza/assenza di metastasi linfonodali e/o a distanza ed i valori di espressione dei vari geni confrontati in modo da verificare differenze tra i diversi gruppi.

##### 4.2.1 *RET*-mutato vs *RET*-wt

Dall'analisi statistica effettuata mediante test di Mann-Whitney abbiamo riscontrato che per tutti i geni della via di segnalazione di Notch c'è una differenza significativa nell'espressione dei ligandi *JAGGED1-2*, dei recettori *NOTCH1-3*, dei regolatori *TCF3*, *TLE1* e *RBPJ* e dei geni effettori *HEY1-2* ed *HEYL*; infatti i livelli di mRNA di questi geni sono aumentati nei campioni di sMTC con mutazione in *RET* (più frequentemente nel codone 918) rispetto a quelli con *RET*-wild-type. Risultati simili li troviamo nella pathway di *VEGF* e *PDGF*; infatti i livelli di mRNA di *VEGFA* e dei suoi recettori *VEGFR1-3*, *PDGFA* e dei suoi recettori *PDGFR $\alpha$ - $\beta$*  sono significativamente aumentati nei campioni *RET* mutati rispetto a quelli wild-type. Lo stesso tipo di differenze di espressione si riscontrano inoltre nei geni *ANGPT2*, *MMP2* e *CAV*. (tab.5)

##### 4.2.2 *RET*-mutato vs WT (*RET* e *RAS* wt)

Dall'analisi statistica effettuata tra il gruppo *RET* mutati e *RET* e *RAS* wild-type troviamo differenze significative nell'espressione dei geni *JAGGED2* e *PSEN2* della via di Notch, *VEGFR1-2* nella via di *VEGF*, nei recettori *PDGFR $\alpha$ - $\beta$*  della pathway di *PDGF* e nei geni *ANGPT2*, *PTN* e *CALCA*; i livelli di mRNA sono aumentati nel gruppo *RET*-mutato (Tab.6 e Tab.7)

#### 4.2.3 *RAS*-mutato vs *WT* (*RET* e *RAS wt*)

Non si riscontrano differenze di espressione significative tra il gruppo di carcinomi con la mutazione di *RAS* e il gruppo *WT*.

Il gruppo di carcinomi *RAS*-mutato ha un comportamento molto simile al gruppo *wt*. (Tab.6 e Tab.7).

#### 4.2.4 *RET*-mutato vs *RAS*-mutato

Troviamo le stesse differenze di espressione nell'analisi che mette a confronto l'espressione dei fattori angiogenici tra il gruppo di carcinomi *RET*-mutato e quello *RAS*-mutato, con l'overespressione dei geni analizzati in presenza di mutazioni di *RET* vs *wild-type* (Tab.6 e Tab.7).

#### 4.2.5 Dati clinici

Sono state analizzate le differenze di livelli di mRNA dei maggiori fattori proangiogenici tra pazienti con MTC non metastatico (M0N0) e pazienti che presentavano mutazioni linfonodali e/o a distanza (N1 e/o M1); solo per pochi geni si riscontrano differenze significative, con livelli di espressione aumentati nei pazienti N1 e/o M1, in particolare nella via di Notch il ligando *DLL3* ed il gene bersaglio *HEY1*, nella via di *VEGF* il gene *NRP1*, i recettori  $\alpha$  e  $\beta$  del pathway di *PDGF*, ed i geni *ANGPT2*, *TIMP1* e *CALCA* (Tab.8).

<i>RET</i>			
Gene	<i>WT</i> (n: 21)	<i>Mut</i> (n: 34)	<i>P value</i>
<b>Notch pathway</b>			
<i>NOTCH1</i>	1 ± 0.84	1.78 ± 1.37	<b>0.006<sup>a</sup></b>
<i>NOTCH2</i>	1 ± 1.06	1.61 ± 1.19	<b>0.017<sup>a</sup></b>
<i>NOTCH3</i>	1 ± 1.12	1.82 ± 1.23	<b>0.003<sup>a</sup></b>
<i>DLL1</i>	1 ± 0.75	1.00 ± 0.51	0.544 <sup>a</sup>
<i>DLL3</i>	1 ± 1.84	1.28 ± 1.63	0.132 <sup>a</sup>
<i>DLL4</i>	1 ± 0.55	1.54 ± 1.31	0.050 <sup>a</sup>
<i>JAG1</i>	1 ± 1.10	1.20 ± 0.63	<b>0.023<sup>a</sup></b>
<i>JAG2</i>	1 ± 0.66	1.70 ± 1.22	<b>0.005<sup>a</sup></b>
<i>PSEN1</i>	1 ± 0.39	1.22 ± 0.42	0.072 <sup>a</sup>
<i>PSEN2</i>	1 ± 0.42	1.43 ± 0.65	<b>0.009<sup>a</sup></b>
<i>TCF3</i>	1 ± 0.53	1.68 ± 1.44	<b>0.009<sup>a</sup></b>
<i>TLE1</i>	1 ± 0.46	1.58 ± 0.97	<b>0.011<sup>a</sup></b>
<i>DTX1</i>	1 ± 1.23	0.99 ± 1.71	0.283 <sup>a</sup>
<i>RBPJ</i>	1 ± 0.75	1.39 ± 0.89	<b>0.028<sup>a</sup></b>
<i>HES1</i>	1 ± 0.56	1.53 ± 1.15	0.086 <sup>a</sup>
<i>HEY1</i>	1 ± 0.60	1.83 ± 1.27	<b>0.000<sup>a</sup></b>
<i>HEY2</i>	1 ± 0.57	1.92 ± 1.36	<b>0.004<sup>a</sup></b>
<i>HEYL</i>	1 ± 0.75	2.28 ± 1.60	<b>0.000<sup>a</sup></b>
<i>NUMB</i>	1 ± 0.42	1.26 ± 0.47	0.061 <sup>a</sup>
<b>VEGF pathway</b>			
<i>VEGFA</i>	1 ± 1.22	1.45 ± 0.72	<b>0.001<sup>a</sup></b>
<i>VEGFC</i>	1 ± 1.03	1.39 ± 1.32	0.132 <sup>a</sup>
<i>VEGFR1</i>	1 ± 0.80	1.85 ± 1.33	<b>0.008<sup>a</sup></b>
<i>VEGFR2</i>	1 ± 0.71	2.14 ± 1.31	<b>0.000<sup>a</sup></b>
<i>VEGFR3</i>	1 ± 0.93	1.46 ± 0.93	<b>0.044<sup>a</sup></b>
<i>NRP1</i>	1 ± 0.59	1.39 ± 0.82	0.077 <sup>a</sup>
<b>PDGF pathway</b>			
<i>PDGFA</i>	1 ± 0.64	1.70 ± 1.05	<b>0.009<sup>a</sup></b>
<i>PDGFB</i>	1 ± 0.56	1.88 ± 1.51	<b>0.002<sup>a</sup></b>
<i>PDGFR-α</i>	1 ± 1.37	4.22 ± 4.36	<b>&lt; 0.000<sup>a</sup></b>
<i>PDGFR-β</i>	1 ± 1.37	1.80 ± 1.15	<b>0.000<sup>a</sup></b>
<b>Angiopoietins</b>			
<i>ANGPT1</i>	1 ± 0.93	1.47 ± 1.34	0.105 <sup>a</sup>
<i>ANGPT2</i>	1 ± 1.09	1.76 ± 1.52	<b>0.004<sup>a</sup></b>
<b>Matrix MetalloProteinases</b>			
<i>MMP1</i>	---	---	---
<i>MMP2</i>	1 ± 2.75	0.83 ± 0.77	<b>0.013<sup>a</sup></b>
<i>MMP3</i>	---	---	---
<i>MMP9</i>	1 ± 3.47	0.74 ± 2.73	0.518 <sup>a</sup>
<i>TIMP1</i>	1 ± 0.65	1.14 ± 0.49	0.246 <sup>a</sup>
<i>TIMP2</i>	1 ± 1.31	0.67 ± 0.35	0.876 <sup>a</sup>
<i>TIMP3</i>	1 ± 1.22	1.16 ± 1.11	0.103 <sup>a</sup>
<b>Other Genes</b>			
<i>MET</i>	1 ± 1.34	0.69 ± 0.78	0.345 <sup>a</sup>
<i>PTN</i>	1 ± 0.98	1.83 ± 2.11	0.072 <sup>a</sup>
<i>CAV</i>	1 ± 0.89	2.38 ± 4.30	<b>0.043<sup>a</sup></b>
<i>NTRK1</i>	---	---	---
<i>NTRK2</i>	1 ± 1.70	0.66 ± 0.60	0.650 <sup>a</sup>
<i>NTRK3</i>	1 ± 1.74	0.85 ± 1.32	0.892 <sup>a</sup>
<i>CALCA</i>	.8 ± 0.58	1.35 ± 1.74	0.179 <sup>a</sup>

Tab.5 Livelli di espressione dei geni coinvolti nell'angiogenesi nei campioni di MTC *RET* mut vs *RET* wild-type.

Gene	WT (n: 8)	RET-mut (n: 34)	RAS-mut (n: 13)
<b>Notch pathway</b>			
NOTCH1	1 ± 0.78	1.48 ± 1.14	0.73 ± 0.65
NOTCH2	1 ± 1.05	1.43 ± 1.05	0.82 ± 0.89
NOTCH3	1 ± 0.67	1.71 ± 1.16	0.91 ± 1.26
DLL1	1 ± 0.84	0.81 ± 0.41	0.69 ± 0.39
DLL3	1 ± 1.60	0.79 ± 0.91	0.44 ± 0.48
DLL4	1 ± 0.54	1.58 ± 1.35	1.05 ± 0.59
JAG1	1 ± 0.98	0.92 ± 0.48	0.63 ± 0.76
JAG2	1 ± 0.42	1.67 ± 1.20	0.97 ± 0.78
PSEN1	1 ± 0.44	1.27 ± 0.43	1.06 ± 0.39
PSEN2	1 ± 0.46	1.57 ± 0.71	1.16 ± 0.47
TCF3	1 ± 0.60	1.52 ± 1.30	0.85 ± 0.40
TLE1	1 ± 0.57	1.55 ± 0.95	0.98 ± 0.39
DTX1	1 ± 1.35	1.28 ± 2.17	1.00 ± 1.75
RBPJ	1 ± 1.03	1.22 ± 0.78	0.80 ± 0.28
HES1	1 ± 0.70	1.93 ± 1.45	1.42 ± 0.70
HEY1	1 ± 0.57	1.79 ± 1.25	0.96 ± 0.62
HEY2	1 ± 0.42	1.65 ± 1.17	0.77 ± 0.52
HEYL	1 ± 0.48	1.81 ± 1.27	0.66 ± 0.64
NUMB	1 ± 0.52	1.34 ± 0.50	1.09 ± 0.40
<b>VEGF pathway</b>			
VEGFA	1 ± 1.40	1.05 ± 0.52	0.55 ± 0.28
VEGFC	1 ± 1.03	1.54 ± 1.45	1.17 ± 1.23
VEGFR1	1 ± 0.70	2.00 ± 1.43	1.12 ± 0.97
VEGFR2	1 ± 0.77	2.60 ± 1.60	1.33 ± 0.93
VEGFR3	1 ± 0.88	1.49 ± 0.90	0.99 ± 0.99
NRP1	1 ± 0.61	1.40 ± 0.82	1.00 ± 0.61
<b>PDGF pathway</b>			
PDGFA	1 ± 0.57	1.49 ± 0.92	0.81 ± 0.56
PDGFB	1 ± 0.53	1.70 ± 1.37	0.84 ± 0.50
PDGFR- $\alpha$	1 ± 1.15	3.91 ± 4.05	0.88 ± 1.39
PDGFR- $\beta$	1 ± 0.56	2.00 ± 1.26	1.15 ± 1.88
<b>Angiopoietins</b>			
ANGPT1	1 ± 0.32	1.24 ± 1.13	0.82 ± 0.77
ANGPT2	1 ± 0.30	2.12 ± 1.82	1.32 ± 1.55
<b>Matrix MetalloProteinases</b>			
MMP1	---	---	---
MMP2	1 ± 0.41	1.84 ± 1.70	2.94 ± 7.66
MMP3	---	---	---
MMP9	1 ± 0.96	0.34 ± 1.28	0.10 ± 0.10
TIMP1	1 ± 0.88	1.20 ± 0.52	1.08 ± 0.57
TIMP2	1 ± 1.61	0.54 ± 0.28	0.67 ± 0.51
TIMP3	1 ± 1.24	0.89 ± 0.85	0.57 ± 0.64
<b>Other Genes</b>			
MET	1 ± 1.50	0.80 ± 0.90	1.24 ± 1.60
PTN	1 ± 1.46	2.22 ± 2.56	1.34 ± 1.04
CAV	1 ± 1.04	2.10 ± 3.80	0.80 ± 0.65
NTRK1	---	---	---
NTRK2	1 ± 1.36	0.35 ± 0.32	0.23 ± 0.13
NTRK3	1 ± 1.48	0.53 ± 0.82	0.29 ± 0.40
CALCA	1 ± 1.15	3.41 ± 4.41	2.36 ± 1.39

Tab.6 Livelli di espressione dei geni coinvolti nell'angiogenesi nei campioni di MTC wild-type, RET-mut e RASmut.

Gene	P value		
	WT vs RET-mut	WT vs RAS-mut	RET-mut vs RAS-mut
<b>Notch pathway</b>			
NOTCH1	0.223 <sup>b</sup>	0.425 <sup>c</sup>	<b>0.005</b> <sup>d</sup>
NOTCH2	0.168 <sup>b</sup>	0.942 <sup>c</sup>	<b>0.025</b> <sup>d</sup>
NOTCH3	0.958 <sup>b</sup>	0.218 <sup>c</sup>	<b>0.004</b> <sup>d</sup>
DLL1	0.872 <sup>b</sup>	0.310 <sup>c</sup>	0.341 <sup>d</sup>
DLL3	0.510 <sup>b</sup>	0.558 <sup>c</sup>	0.169 <sup>d</sup>
DLL4	0.141 <sup>b</sup>	0.884 <sup>c</sup>	0.111 <sup>d</sup>
JAG1	0.564 <sup>b</sup>	0.111 <sup>c</sup>	<b>0.007</b> <sup>d</sup>
JAG2	<b>0.040</b> <sup>b</sup>	0.468 <sup>c</sup>	<b>0.018</b> <sup>d</sup>
PSEN1	0.124 <sup>b</sup>	0.884 <sup>c</sup>	0.183 <sup>d</sup>
PSEN2	<b>0.036</b> <sup>b</sup>	0.820 <sup>c</sup>	<b>0.045</b> <sup>d</sup>
TCF3	0.116 <sup>b</sup>	0.828 <sup>c</sup>	<b>0.015</b> <sup>d</sup>
TLE1	0.102 <sup>b</sup>	0.971 <sup>c</sup>	<b>0.024</b> <sup>d</sup>
DTX1	0.621 <sup>b</sup>	0.938 <sup>c</sup>	0.342 <sup>d</sup>
RBPJ	0.140 <sup>b</sup>	0.772 <sup>c</sup>	0.054 <sup>d</sup>
HES1	0.050 <sup>b</sup>	0.168 <sup>c</sup>	0.366 <sup>d</sup>
HEY1	0.050 <sup>b</sup>	0.663 <sup>c</sup>	<b>0.001</b> <sup>d</sup>
HEY2	0.140 <sup>b</sup>	0.128 <sup>c</sup>	<b>0.004</b> <sup>d</sup>
HEYL	0.089 <sup>b</sup>	0.111 <sup>c</sup>	<b>0.000</b> <sup>d</sup>
NUMB	0.149 <sup>b</sup>	0.717 <sup>c</sup>	0.144 <sup>d</sup>
<b>VEGF pathway</b>			
VEGFA	0.089 <sup>b</sup>	0.717 <sup>c</sup>	<b>0.001</b> <sup>d</sup>
VEGFC	0.189 <sup>b</sup>	0.663 <sup>c</sup>	0.274 <sup>d</sup>
VEGFR1	<b>0.040</b> <sup>b</sup>	0.884 <sup>c</sup>	<b>0.032</b> <sup>d</sup>
VEGFR2	<b>0.010</b> <sup>b</sup>	0.346 <sup>c</sup>	<b>0.006</b> <sup>d</sup>
VEGFR3	0.157 <sup>b</sup>	0.828 <sup>c</sup>	<b>0.041</b> <sup>d</sup>
NRP1	0.236 <sup>b</sup>	0.884 <sup>c</sup>	0.122 <sup>d</sup>
<b>PDGF pathway</b>			
PDGFA	0.168 <sup>b</sup>	0.277 <sup>c</sup>	<b>0.010</b> <sup>d</sup>
PDGFB	0.105 <sup>b</sup>	0.426 <sup>c</sup>	<b>0.003</b> <sup>d</sup>
PDGFR- $\alpha$	<b>0.007</b> <sup>b</sup>	0.537 <sup>c</sup>	<b>0.000</b> <sup>d</sup>
PDGFR- $\beta$	<b>0.021</b> <sup>b</sup>	0.426 <sup>c</sup>	<b>0.001</b> <sup>d</sup>
<b>Angiopoietins</b>			
ANGPT1	0.652 <sup>b</sup>	0.552 <sup>c</sup>	0.131 <sup>d</sup>
ANGPT2	<b>0.047</b> <sup>b</sup>	0.514 <sup>c</sup>	<b>0.015</b> <sup>d</sup>
<b>Matrix MetalloProteinases</b>			
MMP1	---	---	---
MMP2	0.054 <sup>b</sup>	0.828 <sup>c</sup>	<b>0.046</b> <sup>d</sup>
MMP3	---	---	---
MMP9	0.341 <sup>b</sup>	0.556 <sup>c</sup>	0.867 <sup>d</sup>
TIMP1	0.249 <sup>b</sup>	0.514 <sup>c</sup>	0.461 <sup>d</sup>
TIMP2	0.700 <sup>b</sup>	0.426 <sup>c</sup>	0.617 <sup>d</sup>
TIMP3	0.798 <sup>b</sup>	0.514 <sup>c</sup>	<b>0.017</b> <sup>d</sup>
<b>Other Genes</b>			
MET	0.189 <sup>b</sup>	0.277 <sup>c</sup>	0.225 <sup>d</sup>
PTN	<b>0.027</b> <sup>b</sup>	0.169 <sup>c</sup>	0.405 <sup>d</sup>
CAV	0.910 <sup>b</sup>	>.999 <sup>c</sup>	0.064 <sup>d</sup>
NTRK1	---	---	---
NTRK2	0.078 <sup>b</sup>	<b>0.042</b> <sup>c</sup>	0.485 <sup>d</sup>
NTRK3	0.704 <sup>b</sup>	0.487 <sup>c</sup>	0.580 <sup>d</sup>
CALCA	<b>0.012</b> <sup>b</sup>	<b>0.039</b> <sup>c</sup>	0.889 <sup>d</sup>

Tab.7 Livelli di espressione dei geni coinvolti nell'angiogenesi nei campioni di MTC: <sup>b</sup> RET-mut vs WT (RET- e RAS WT); <sup>c</sup> RAS-mut vs WT (RET- e RAS WT); <sup>d</sup> RET-mut vs RAS-mut.

<b>Gene</b>	<b>N0 M0 (n: 19)</b>	<b>N1 and/or M1 (n: 34)</b>	<b>P value</b>
<b>Notch pathway</b>			
<i>NOTCH1</i>	1 ± 0.53	1.52 ± 1.14	0.243 <sup>a</sup>
<i>NOTCH2</i>	1 ± 0.72	1.61 ± 1.45	0.313 <sup>a</sup>
<i>NOTCH3</i>	1 ± 0.69	1.38 ± 1.13	0.204 <sup>a</sup>
<i>DLL1</i>	1 ± 0.73	0.93 ± 0.47	0.932 <sup>a</sup>
<i>DLL3</i>	1 ± 1.70	2.32 ± 2.65	<b>0.012<sup>a</sup></b>
<i>DLL4</i>	1 ± 0.52	1.42 ± 1.20	0.128 <sup>a</sup>
<i>JAG1</i>	1 ± 0.95	1.26 ± 0.82	0.094 <sup>a</sup>
<i>JAG2</i>	1 ± 0.76	1.26 ± 0.69	0.063 <sup>a</sup>
<i>PSEN1</i>	1 ± 0.30	1.27 ± 0.43	0.919 <sup>a</sup>
<i>PSEN2</i>	1 ± 0.59	1.01 ± 0.40	0.060 <sup>a</sup>
<i>TCF3</i>	1 ± 1.17	0.76 ± 0.35	0.488 <sup>a</sup>
<i>TLE1</i>	1 ± 0.68	0.88 ± 0.45	0.767 <sup>a</sup>
<i>DTX1</i>	1 ± 1.74	0.89 ± 1.53	0.804 <sup>a</sup>
<i>RBPJ</i>	1 ± 0.81	0.76 ± 0.40	0.467 <sup>a</sup>
<i>HES1</i>	1 ± 0.80	0.89 ± 0.57	0.813 <sup>a</sup>
<i>HEY1</i>	1 ± 0.58	1.70 ± 0.99	<b>0.003<sup>a</sup></b>
<i>HEY2</i>	1 ± 0.58	1.01 ± 0.78	0.710 <sup>a</sup>
<i>HEYL</i>	1 ± 0.59	1.63 ± 1.20	0.090 <sup>a</sup>
<i>NUMB</i>	1 ± 0.44	1.02 ± 0.40	0.819 <sup>a</sup>
<b>VEGF pathway</b>			
<i>VEGFA</i>	1 ± 0.92	0.82 ± 0.51	0.722 <sup>a</sup>
<i>VEGFC</i>	1 ± 0.90	1.03 ± 1.11	0.684 <sup>a</sup>
<i>VEGFR1</i>	1 ± 0.55	1.31 ± 1.10	0.612 <sup>a</sup>
<i>VEGFR2</i>	1 ± 0.65	1.50 ± 1.10	0.123 <sup>a</sup>
<i>VEGFR3</i>	1 ± 0.68	1.49 ± 0.90	0.436 <sup>a</sup>
<i>NRP1</i>	1 ± 0.49	1.33 ± 1.01	<b>0.046<sup>a</sup></b>
<b>PDGF pathway</b>			
<i>PDGFA</i>	1 ± 0.59	1.28 ± 0.88	0.294 <sup>a</sup>
<i>PDGFB</i>	1 ± 0.97	1.70 ± 1.37	0.806 <sup>a</sup>
<i>PDGFR-α</i>	1 ± 1.40	0.79 ± 0.40	<b>0.016<sup>a</sup></b>
<i>PDGFR-β</i>	1 ± 0.55	1.85 ± 1.54	<b>0.032<sup>a</sup></b>
<b>Angiopoietins</b>			
<i>ANGPT1</i>	1 ± 0.68	1.96 ± 3.18	0.351 <sup>a</sup>
<i>ANGPT2</i>	1 ± 1.45	1.90 ± 1.47	<b>0.002<sup>a</sup></b>
<b>Matrix MetalloProteinases</b>			
<i>MMP1</i>	---	---	---
<i>MMP2</i>	1 ± 0.86	2.76 ± 5.19	0.070 <sup>a</sup>
<i>MMP3</i>	---	---	---
<i>MMP9</i>	1 ± 1.21	6.13 ± 19.6	0.131 <sup>a</sup>
<i>TIMP1</i>	1 ± 0.63	1.20 ± 0.55	<b>0.017<sup>a</sup></b>
<i>TIMP2</i>	1 ± 1.22	0.62 ± 0.43	0.198 <sup>a</sup>
<i>TIMP3</i>	1 ± 0.89	0.69 ± 0.57	0.165 <sup>a</sup>
<b>Other genes</b>			
<i>MET</i>	1 ± 1.07	0.70 ± 1.07	0.099 <sup>a</sup>
<i>PTN</i>	1 ± 1.61	1.15 ± 1.26	0.446 <sup>a</sup>
<i>CAV</i>	1 ± 0.44	2.26 ± 4.12	0.906 <sup>a</sup>
<i>NTRK1</i>	---	---	---
<i>NTRK2</i>	1 ± 1.03	1.43 ± 2.29	0.381 <sup>a</sup>
<i>NTRK3</i>	1 ± 2.23	1.30 ± 1.81	0.227 <sup>a</sup>
<i>CALCA</i>	1 ± 1.21	0.40 ± 0.30	<b>0.007<sup>a</sup></b>

Tab. 8 Livelli di espressione dei geni coinvolti nell'angiogenesi nei campioni di MTC: N1 e/o M1 vs N0M0

# CAPITOLO 5

---

## **DISCUSSIONE**

La prima finalità dello studio era di caratterizzare lo stato mutazionale dei carcinomi midollari della tiroide sporadici. L'indagine è stata condotta su 123 campioni, il 57,6% della casistica è risultato *RET* positivo, il 20,7% *RAS* positivo e il restante negativo per entrambi. Le mutazioni di *RAS* sono presenti in quasi la metà dei *RET wild-type* e in nessuno di quelli *RET* mutati. In letteratura la ricerca di mutazioni in *RAS* in casi di MTC è riportata con risultati discordanti: in un primo momento studi condotti su casistiche ridotte di sMTC non hanno rilevato, o con percentuale molto bassa, mutazioni nel gene *RAS* (Bockhorn et al. 2000; Moley et al. 1991); un'alta prevalenza di mutazioni in *K-RAS* (circa 41%) è stata evidenziata in una casistica greca (Goutas et al 2008), e più recentemente studi condotti da Moura et al hanno rilevato circa il 68% di mutazioni nei geni *H-RAS* e *K-RAS* in casi di sMTC *RET*-negativi, e solo il 2,5% in casi *RET*-positivi, suggerendo che le mutazioni somatiche a carico dei geni *RET* e *RAS* sono mutualmente esclusive nella tumorigenesi del carcinoma midollare della tiroide (Moura et al 2011), dato da noi confermato.

Le conoscenze sullo stato mutazionale degli MTC si arricchiscono di nuove nozioni. In primo luogo, si è scoperto che i carcinomi midollari della tiroide sono dovuti non solo alle note mutazioni dell'oncogene *RET*, ma anche a quelle di *RAS*; nel caso specifico, l'esplorazione di *RAS* ha permesso di identificare 22 dei 45 tumori che precedentemente sarebbero stati considerati privi di causa molecolare conosciuta. Inoltre le neoplasie non sono mai dovute alla mutazione di entrambi gli oncogeni; probabilmente perchè i prodotti dei geni agiscono sulla stessa *pathway* di segnalazione cellulare ed una volta avvenuta l'attivazione di uno dei due l'altra è superflua per la progressione tumorale. Così si delinea un nuovo subtipo di carcinomi midollari della tiroide che potrebbe presentare differenze importanti per ulteriori ricerche e ai fini della pratica clinica.

Terapie molecolari mirate che inibiscono *RET* e altri recettori tirosin-chinasici noti per essere coinvolti nell'angiogenesi stanno mostrando promettenti risultati terapeutici nel trattamento del carcinoma midollare della tiroide metastatico; nella seconda parte dello studio il nostro obiettivo è stato quello di identificare un profilo di espressione genica angiogenesi-correlata in pazienti MTC, al fine di identificare nuovi bersagli molecolari.

A tal fine abbiamo analizzato 55 campioni MTC per i maggiori fattori angiogenetici. È stata utilizzata la tecnica di Real-time PCR con TaqMan Low Density Array (TLDA) per misurare i livelli di mRNA per fattori di crescita endoteliali vascolari (*VEGF*) e la famiglia dei recettori *VEGF*; fattori di crescita derivati dai periciti e loro recettori; angiopoietine; metalloproteinasi e loro inibitori. Inoltre sono stati valutati i livelli di espressione dei geni relativi alla via di segnalazione di Notch. L'analisi è stata fatta prima in base allo status mutazionale di *RET* e *RAS* e successivamente in base alle caratteristiche cliniche (carcinomi metastatici vs non metastatici); i risultati così ottenuti hanno mostrato che nei pazienti con mutazioni a carico di *RET* i livelli di espressione dei fattori angiogenetici sono significativamente aumentati rispetto ai pazienti *wild-type* (*RET* e *RAS* negativi) ed anche rispetto ai pazienti *RAS* mutati; non si riscontrano differenze significative tra pazienti *wild-type* (*RET* e *RAS* negativi) e *RAS* mutati, suggerendo che questi ultimi hanno un comportamento simile al gruppo *wild-type*.

Non sono state riscontrate differenze significative nel profilo di espressione genica delle principali vie angiogenetiche tra pazienti che non presentavano metastasi (N0M0) e pazienti che presentavano metastasi linfonodali e/o a distanza (N1 e/o M1).

Questi dati preliminari mostrano una iper-espressione dei geni pro-angiogenici in pazienti MTC che portano mutazioni somatiche o germinali in *RET*, suggerendo così l'esistenza di potenziali meccanismi di *cross-talk* tra le vie di trasduzione del segnale di *RET* e le vie angiogenetiche.

Il capostipite dei farmaci biologici per il trattamento dell'MTC è il Vandetanib, una molecola che agisce contemporaneamente sulle tirosinchinasi *RET*, *EGFR* e *VEGFR*. Vandetanib è giunto recentemente alla fase III di sperimentazione. Il trial ha mostrato risposte oggettive nel 45% dei pazienti, e le cause della non efficacia negli altri pazienti non sono note; si ipotizzano meccanismi di resistenza primaria (intrinseca e presente fin dalla tumorigenesi) o secondaria (come ad esempio lo sviluppo di nuove mutazioni durante la terapia).

Si può supporre che una parte dei *non-responders* sia il sottotipo *RAS* mutato, che, avendo un difetto in passaggi trasduzionali successivi a *RET*, non subirebbe effetti di sorta in risposta al blocco di questo recettore. Infatti nella *pathway* delle MAP chinasi il recettore Ret attiva la GTPasi Ras; nel caso questa fosse indipendentemente iperespressa, intervenire sulla tirosinchinasi potrebbe non avere effetto.

D'altro canto il secondo bersaglio del Vandetanib, l'iper-espressione di *VEGF*, dipende dagli ultimi passaggi della *pathway* e quindi è presente in entrambi i sottotipi; si potrebbe allora ipotizzare addirittura di avere tre risposte alla terapia in rapporto al profilo molecolare: massimale negli MTC *RET* mutati, parziale negli MTC *RAS* mutati e mancante nel caso di

altre mutazioni, aggiuntive o alternative alle prime due (subtipo che risulta doppio wt nel nostro studio).

Inoltre molecole con bersaglio Ras o segnalatori più a valle nella cascata enzimatica potrebbero agire ugualmente sui due sottotipi o addirittura meno sui *RET* mutati; in questo caso, alcuni rami della *pathway* non sarebbero interrotti perché superiori al livello di blocco.

La GTPasi codificata dall'oncogene *RAS* è ampiamente studiata come bersaglio di *targeted therapies* per altri tipi di neoplasie. Ad esempio sono stati prodotti inibitori della farnesil-transferasi che agiscono sulle modifiche post-trascrizionali della proteina Ras, le quali sono possibili terapie per gli MTC *RAS* mutati.

In ultimo una gran quantità di nuovi farmaci agenti sulle vie di segnalazione cellulare a valle di Ras Raf/Mek/ERK e PI3k/Akt/mTOR sta passando per le prime fasi di sperimentazione clinica. Potrà essere di grande aiuto alla pratica clinica valutarne l'efficacia sia per il gruppo *RET* positivo che per quello *RAS* positivo, al fine di stabilirne le possibilità di utilizzo.

# BIBLIOGRAFIA

---

**American Thyroid Association Guidelines Task Force, Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley JF, Pacini F, Ringel MD, Schlumberger M, Wells SA Jr.** 2009 Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*. 2009 Jun;19(6):565-612.

**Arighi E, Borrello MG, Sariola H** 2005 RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. Aug-Oct;16(4-5):441-67.

**Bockhorn M, Frilling A, Kalinin V, Schroder S, Broelsch CE** 2000 Absence of *H- and K-ras* oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **108**:49-53.

**Boichard A, Croux L., Al Ghuzlan A., Broutin S, Dupuy C., Leboulleux S., Schlumberger M, Bidart J.M. and Lacroix L.** 2012 Somatic *RAS* Mutations Occur in a Large Proportion of Sporadic *RET*-Negative Medullary Thyroid Carcinomas and Extend to a Previously Unidentified Exon. *J Clin Endocrinol Metab* (Epub ahead of print)

**Buhrman G, Holzapfel G, Fetics S, Mattos C.** 2010 Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 16;107(11):4931-6.

**Cerrato A, De Falco V, Santoro M** 2009 Molecular genetics of medullary thyroid carcinoma: the quest for novel therapeutic targets. *J Mol Endocrinol* 43:143-155.

**Ciampi R, Mian C, Fugazzola L, Cosci B, Romei C, Barollo S, Cirello V, Bottici V, Marconcini G, Pelizzo MR, Borrello MG, Basolo F, Ugolini C, Materazzi G, Pinchera A, Elisei R.** 2012 Evidence of a low prevalence of *RAS* mutations in a large medullary thyroid cancer series. *Thyroid* (Epub ahead of print)

**Davies L, Welch HG.** 2006 Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 295(18): 2164-7.

**de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM.** 2006 RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev*. Aug;27(5):535-60. Epub 2006 Jul 18.

**De Lellis, Lloyd R, Heitz PU, Eng C, editors.** Classification of tumors: pathology and genetics of tumours of endocrine organs. World Health Organization of Tumors. Lyon: IARC Press, 2004.

**Drosten M, Putzer BM** 2006 Mechanisms of Disease: cancer targeting and the impact of oncogenic *RET* for medullary thyroid carcinoma therapy. *Nat Clin Pract Oncol* **3**:564-574.

**Frank-Raue K, Rondot S, Raue F.** 2010 Molecular genetics and phenomics of RET mutations: Impact on prognosis of MTC. *Mol Cell Endocrinol.* Jun 30;322(1-2):2-7. Epub 2010 Jan 18.

**Gotink KJ, Verheul HM.** 2009 Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis.* 2010 Mar;13(1):1-14. Epub 2009 Dec 11.

**Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Bouka M, Lazaris AC, Nasioulas G, Gazouli M** 2008 *BRAF* and *K-RAS* mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer Res* **28**:305-308

**Heldin CH, Westermark B.** 1999 Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* 79: 1283-1316.

**Jiang Y, Muschel RJ.** 2002 Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by translational efficiency in murine prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 2002 Mar 15;62(6):1910-4

**Karnoub AE, Weinberg RA.** 2008 Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jul;9(7):517-31.

**Kerbel RS.** 2008 Molecular Origins of Cancer Tumor Angiogenesis. *The New England Journal of medicine*; 358; 19:2039-2049.

**Kodama Y, Asai N, Kawai K, Jijiwa M, Murakumo Y, Ichihara M, Takahashi M.** 2005 The RET proto-oncogene: a molecular therapeutic target in thyroid cancer. *Cancer Sci.* Mar;96(3):143-8.

**Kouvaraki MA, Shapiro SE, Perrier ND, Cote GJ, Gagel RF, Hoff AO, Sherman SI, Lee JE, Evans DB** 2005 RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid* 15:531-544.

**Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M.** 2004 Medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* Sep;61(3):299-310.

**Lengyel E, Stepp E, Gum R, Boyd D.** 1995 Involvement of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of urokinase promoter activity by c-Ha-ras. *J Biol Chem.* 1995 Sep 29;270(39):23007-12.

**Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K.** Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for

detecting PCR product and nucleic acids hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4:357-362.

**Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods* 2001; 25:402-408

**Lloyd RV, Buehler D, Khanafshar E.** 2011 Papillary thyroid carcinoma variants. *Head and Neck Pathology*; 5: 51-56.

**Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, Wiegand SJ.** 2007 Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104: 3219-24.

**Machens A, Lorenz K, Dralle H.** 2009 Constitutive RET tyrosine kinase activation in hereditary medullary thyroid cancer: clinical opportunities. *J Intern Med.* Jul;266(1):114-25.

**Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K.** 2001 Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J*; 20: 4762-73.

**Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N.** 2004 eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene.* Apr 19;23(18):3172-9.

**Moley JF, Brother MB, Wells SA, Spengler BA, Biedler JL, Brodeur GM** 1991 Low frequency of *RAS* gene mutations in neuroblastomas, pheochromocytomas, and medullary thyroid cancers. *Cancer Res* 51:1596-1599

**Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Domingues R, Santos JR, Cid MO, Bugalho MJ, Leite V.** 2009 Correlation of RET somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Br J Cancer.* Jun 2;100(11):1777-83. Epub 2009 Apr 28.

**Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V** 2011 High prevalence of *RAS* mutations in *RET*-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E863-868.

**Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, Lin HC, Yancopoulos GD, Thurston G.** 2006 Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*; 444: 1032-1037.

**Oliner J, Min H, Leal J, Yu D, Rao S, You E, Tang X, Kim H, Meyer S, Han SJ, Hawkins N, Rosenfeld R, Davy E, Graham K, Jacobsen F, Stevenson S, Ho J, Chen Q, Hartmann T, Michaels M, Kelley M, Li L, Sitney K, Martin F, Sun JR, Zhang N,**

**Lu J, Estrada J, Kumar R, Coxon A, Kaufman S, Pretorius J, Scully S, Cattley R, Payton M, Coats S, Nguyen L, Desilva B, Ndifor A, Hayward I, Radinsky R, Boone T, Kendall R.** 2004 Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell*. 2004 Nov;6(5):507-16.

**Oliner J, Min H, Leal J, Yu D, Rao S, You E, Tang X, Kim H, Meyer S, Han SJ, Hawkins N, Rosenfeld R, Davy E, Graham K, Jacobsen F, Stevenson S, Ho J, Chen Q, Hartmann T, Michaels M, Kelley M, Li L, Sitney K, Martin F, Sun JR, Zhang N, Lu J, Estrada J, Kumar R, Coxon A, Kaufman S, Pretorius J, Scully S, Cattley R, Payton M, Coats S, Nguyen L, Desilva B, Ndifor A, Hayward I, Radinsky R, Boone T, Kendall R.** 2004 Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell*; 6: 507-516.

**Olsson Anna-Karin, Dimberg Anna, Kreuger Johan and Claesson-Welsh Lena.** 2006 VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nature Mol Cell Bio*; 7: 359-371.

**Ostman A, Heldin CH.** 2007 PDGF receptors as targets in tumor treatment. *Adv Cancer Res.*;97:247-74.

**Pacini F, Castagna M.G., Cipri C. and M.Schlumberger,** "Medullary Thyroid Carcinoma: overview" *Clinical Oncology*, no. 22, pp. 475-485, 2010

**Pasini B, Hofstra RM, Yin L, Bocciardi R, Santamaria G, Grootsholten PM, Ceccherini I, Patrone G, Priolo M, Buys CH, et al.** 1995 The physical map of the human RET proto-oncogene. *Oncogene*. 1995 Nov 2;11(9):1737-43.

**Perentesis JP, Bhatia S, Boyle E, Shao Y, Shu XO, Steinbuch M, Sather HN, Gaynon P, Kiffmeyer W, Envall-Fox J, Robison LL.** 2004 RAS oncogene mutations and outcome of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. Apr;18(4):685-92.

**Pietras K, Sjoblom T, Rubin K, Heldin CH and Ostman A.** 2003a PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell* 3: 439-443.

**Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D** 2011 *RAS* oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 11:761-774

**Sainson RC, Harris AL.** 2007 Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis? *Trends Mol Med*;13: 389-395.

**Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A.** 1997 The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*. Jul 18;277(5324):333-8.

**Sherman SI.** 2003 Thyroid carcinoma. *Lancet*; 361: 501-511.

**Shibuya M, Claesson-Welsh L.** 2006 Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*; 312: 549-560.

**Takahashi M, Ritz J, Cooper GM.** 1985 Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell. Sep*;42(2):581-8.

**Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C** 2003 Specific pattern of *RAS* oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **88**:2745-2752.

**Zbuk KM, Eng C.** 2007 Cancer phenomics: RET and PTEN as illustrative models. *Nat Rev Cancer*. Jan;7(1):35-45. Epub 2006 Dec 14.