

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**

## **FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Dipartimento di Medicina Interna e Specialistica, Endocrinologia

---

Dottorato di Ricerca in Endocrinologia:  
Basi molecolari dell'azione ormonale, XXII° Ciclo  
Coordinatore: Prof. Riccardo Vigneri

---

**Dott.ssa ROBERTA MALAGUARNERA**

### **CARCINOMA TIROIDEO: VIE DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE COINVOLTE NELLA TUMORIGENESI TIROIDEA ED EFFICACIA DI TERAPIE MOLECOLARI MIRATE MULTIPLE**

TESI DI DOTTORATO

Relatore:

Chiar.mo Prof. Riccardo Vigneri

---

**ANNO ACCADEMICO 2009-2010**

## INDICE

Premessa: tumorigenesi tiroidea e sue basi molecolari	pag. 1
Abstract	pag. 11
Introduzione allo studio	pag. 12
Materiali e Metodi	pag. 16
Risultati	pag. 19
Discussione	pag. 24
Legenda Figure	pag. 27
Bibliografia	pag. 30
Figure	pag. 36

## **PREMESSA: TUMORIGENESI TIROIDEA E SUE BASI MOLECOLARI**

### **Introduzione**

Il cancro della tiroide è la neoplasia maligna più comune del sistema endocrino. Più del 95% dei carcinomi tiroidei prende origine dalle cellule follicolari della tiroide, mentre una minoranza (~ 3%) prende origine dalle cellule C-parafollicolari, costituendo i cosiddetti carcinomi midollari della tiroide. I carcinomi derivanti dall'epitelio follicolare comprendono un eterogeneo gruppo di neoplasie con caratteristiche cliniche e istopatologiche diverse (1).

In base alle caratteristiche dell'epitelio da cui originano, essi vengono divisi in tre gruppi(2):

1. ben differenziati (papilliferi (PTC) e follicolari (FTC)),
2. scarsamente differenziati;
3. indifferenziati (anaplastico).

I carcinomi ben differenziati rappresentano circa l'85-90% di tutti i carcinomi tiroidei e, spesso, hanno una evoluzione clinica asintomatica ed una eccellente prognosi.

Nonostante la maggior parte dei PTC e degli FTC venga clinicamente gestita abbastanza bene (con una sopravvivenza a 5 anni superiore al 90%), una percentuale di tali tumori si comporta in modo aggressivo (1).

Il carcinoma indifferenziato o anaplastico, viceversa, sin dal suo esordio si presenta sempre come una forma altamente aggressiva con una prognosi infausta. La sopravvivenza a 5 anni dalla sua diagnosi è inferiore al 10%.

### **Studi epidemiologici**

Recenti studi epidemiologici hanno mostrato un aumentata incidenza del cancro tiroideo in tutto il mondo negli ultimi 20 anni. Secondo le stime attuali su 100.000 abitanti, l'incidenza media nelle donne e negli uomini è rispettivamente 12,9 e 5,0 , in Europa e 15,3 e 5,2 in Italia. Ad oggi, il cancro tiroideo occupa l'ottavo posto tra le neoplasie più comuni nelle donne. Esso rappresenta il 3% di tutti i tumori umani rispetto a 1,7% (e 14° posto) di 20 anni fa, con un incremento annuale di 1,4% dal 1990(2).

Questi studi epidemiologici pongono il problema se il drammatico e diffuso incremento in tutto il mondo del tumore tiroideo sia reale o apparente.

E' del tutto evidente che, accanto a fattori eziologici oggettivamente non trascurabili, quali il peggioramento del sistema ambientale (maggior esposizione a radiazioni, inquinamento, stato nutrizionale...), l'aumentato riscontro di tumori tiroidei debba essere attribuito alle nuove procedure diagnostiche (ecografia e biopsia mediante aspirazione con ago sottile) come pure all'introduzione di più restrittivi parametri di riferimento nei criteri diagnostici del WHO. L'incrementata prevalenza di microcarcinomi supporta tale ipotesi.

Ma, nonostante il miglioramento delle procedure diagnostiche, il numero di pazienti che annualmente soccombe per tale malattia è in lieve crescita. Allora è probabile che l'osservato aumento sia reale piuttosto che apparente.

Il fattore ambientale è considerato un fattore determinante nell'eziopatogenesi del tumore tiroideo. Osservazioni epidemiologiche indicano, p.e, un maggior rischio di sviluppare cancro della tiroide nelle aree vulcaniche (3). Questo supporta l'ipotesi che carcinogeni ambientali, presenti nell'atmosfera, nel terreno o nell'acqua nella zona vulcanica potrebbero promuovere il cancro della tiroide. Tali fattori, tuttavia, non sono ancora completamente conosciuti.

Nell'insieme, le varie ipotesi eziopatogenetiche indicano che diversi sono i fattori coinvolti nella carcinogenesi tiroidea (4, 5).

Tra questi ricordiamo:

- esposizione a radiazioni ionizzanti (derivante sia da uso terapeutico e/o diagnostico che da disastri ambientali);
- fattori nutrizionali (apporto iodico con la dieta);
- fattori ormonali e/o metabolici (prevalenza maggiore nelle donne e nell'obesità);
- storia familiare e personale di gozzo nodulare e/o carcinoma tiroideo;
- anomalie molecolari.

Riguardo a quest'ultime, secondo il modello classico "a tappe multiple" della patogenesi dei tumori, la tumorigenesi tiroidea si basa sull'accumulo sequenziale di alterazioni molecolari della cellula tiroidea.

Questo evento porta alla progressione neoplastica: tessuto tiroideo normale, adenoma follicolare benigno, eteroplasia a differenziazione minore, carcinoma tiroideo scarsamente differenziato (5).

Proprio per la presenza di questo ampio spettro di fenotipi tumorali con diverso grado di crescita, differenziazione e comportamento biologico, il carcinoma

tiroideo rappresenta un modello particolarmente significativo nello studio della tumorigenesi epiteliale.

Epperò i meccanismi molecolari alla base di questo processo sono particolarmente complessi e non tutti ancora ben caratterizzati. Di recente, infatti, è stato visto che all'interno di un tumore esiste un'esigua sotto-popolazione di cellule tumorali, definita "cancer stem cells (CSC) population", aventi caratteristiche simili alle cellule staminali somatiche, presenti nella controparte di tessuto normale (6). La scoperta di tali cellule ha in parte sovvertito il tradizionale modello di tumorigenesi a tappe multiple.

E' stato, infatti, suggerito che tali cellule staminali o i loro immediati precursori siano il sito d'origine di mutazioni responsabili dell'insorgenza del tumore.

Pertanto, secondo questo nuovo modello di tumorigenesi, la formazione tumorale, sarebbe causata o

- da una deregolazione delle vie che controllano la capacità di autorinnovamento delle normali cellule staminali, oppure
- dalle alterazioni precoci di vie di trasduzione del segnale importanti per la loro crescita, proliferazione e differenziazione.

Da qui si deduce l'importanza di studiare sia i meccanismi molecolari sia le vie di trasduzione del segnale, responsabili dell'insorgenza dei carcinomi tiroidei.

I fattori, che regolano il processo di carcinogenesi tiroidea, possono essere distinti, a scopo esemplificativo, in due categorie:

- 1) fattori che promuovono la proliferazione tumorale;
- 2) fattori che inibiscono la proliferazione tumorale.

### **1) Fattori che promuovono la proliferazione tumorale.**

A tale gruppo appartengono: fattori di crescita (e loro recettori) e protooncogeni.

#### *Fattori di crescita:*

Riguardo ai fattori stimolanti la crescita cellulare come TSH, EGF, TGF- $\beta$ , IGF-I, VEGF, è stato notato che una loro alterata sintesi o l'attivazione costitutiva dei recettori e delle vie di trasduzione del segnale, a loro correlate, sono di fondamentale importanza nella formazione dei tumori tiroidei (7).

La ghiandola tiroidea rappresenta un modello esemplificativo, in cui il TSH costituisce il principale fattore di crescita, tessuto specifico, ed il maggiore determinante del destino della cellula follicolare tiroidea (5). Il suo ruolo sulla crescita e differenziazione dei tireociti si manifesta attraverso il legame con il suo recettore, il TSH-R, e la conseguente attivazione delle vie di trasduzione del messaggio intracellulare dipendenti da AMPc (Adenosina Mono Fosfato ciclica) e PLC (Fosfolipasi C).

Sebbene il principale fattore della degenerazione maligna dei tireociti sembri dovuta alla via di attivazione del TSH-R, indipendentemente dal legame con il suo ligando, rare mutazioni di tale recettore sono state descritte nei carcinomi tiroidei rispetto ai tumori tiroidei benigni. E' stato, invece, notato che i livelli del mRNA di TSH-R si riducono in modo direttamente proporzionale alla perdita delle caratteristiche di differenziazione cellulare. Si può, pertanto, ipotizzare che l'alterazione dell'espressione del recettore per il TSH sia un evento tardivo nella progressione tumorale tiroidea (4).

Da notare, inoltre, che alcuni segnali di crescita, come quelli inviati dall'EGF, non solo svolgono un potente effetto mitogeno, ma causano anche la perdita di alcune funzioni di differenziazione, mediate dal TSH, tra cui la capacità di captare iodio e di produrre tireoglobulina ed ormoni (4, 8-10).

#### *Protooncogeni:*

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che i primi stadi della carcinogenesi tiroidea potrebbero dipendere dall'attivazione di protooncogeni, generalmente dovuta a mutazioni a carattere dominante. Tali alterazioni genetiche sono definite "mutazioni con guadagno di funzione", in quanto determinano l'acquisizione, da parte dei protooncogeni, di una insensibilità ai meccanismi di inibizione. Pertanto, essi diventano costitutivamente attivi (oncogeni) e capaci di trasformare in neoplastica la cellula tiroidea normale.

I principali protooncogeni, coinvolti nella tumorigenesi tiroidea, sono: RAS, BRAF e RET/PTC (11, 12).

Le mutazioni che coinvolgono tali geni sono sempre mutuamente esclusive, in quanto non sono mai contemporaneamente presenti nello stesso tumore e coinvolgono tappe diverse nella stessa via di trasduzione del messaggio intracellulare.

L'effetto finale comune è l'attivazione della MAPchinasi (MAPK o ERK), enzima chiave, che agisce, attraverso la fosforilazione di fattori di trascrizione quali c-fos, c-jun, c-myc e S6K, nella regolazione della proliferazione cellulare(13).

Queste evidenze suggeriscono l'importante funzione svolta da questa via nella trasformazione neoplastica e nella perdita di differenziazione della cellula tiroidea.

## **2) Fattori che inibiscono la proliferazione tumorale.**

Tale categoria include: regolatori del ciclo cellulare e geni oncosoppressori.

### *Proteine che regolano il ciclo cellulare:*

La perdita del normale controllo del ciclo cellulare per alterazione dei fattori preposti alla sua regolazione, tra cui le cicline, le chinasi ciclino dipendenti (CDKs) e gli inibitori di queste ultime (CDKI), porta ad anomalie nella proliferazione ed a modifiche molecolari, responsabili della trasformazione maligna e della progressione tumorale(4).

In numerose neoplasie umane e in circa il 35% dei tumori tiroidei (14-17) , infatti, diversi studi hanno evidenziato un incremento dell'espressione dei regolatori positivi (soprattutto la ciclina D1 e la sua rispettiva chinasi) e/o una riduzione dell'espressione dei regolatori negativi (p21, p27, p15, p16).

In quest'ultimo tipo di tumore, le anomalie nell'espressione di tali fattori risultano correlate con l'attività proliferativa e l'aggressività tumorale, confermando un loro importante ruolo nel processo di progressione neoplastica tiroidea nonché un loro possibile significato prognostico (18).

### *Oncosoppressori:*

Gli oncosoppressori sono geni in grado di sopprimere la proliferazione, quando la cellula subisce un danno genomico. La loro attivazione consente, infatti, un arresto della crescita e dunque la possibilità di riparare il danno subito, o, se esso è grave ed irreversibile, l'innescare dell' apoptosi.

Un difettoso funzionamento di tali geni è, in genere, causato da alterazioni genetiche, che portano alla perdita dell'attività oncosoppressoria. Tali alterazioni genetiche sono definite "mutazioni con perdita di funzione".

In genere, queste alterazioni sono a carattere recessivo, poichè coinvolgono un solo allele. L'eliminazione dell'altro allele può avvenire successivamente tramite

eventi secondari, come la perdita di eterozigotà (Loss of Heterozygosity, LOH) e disattivazione del suo promotore (silenziamento genico) (4).

Le principali alterazioni geniche, con “perdita di funzione”, che si verificano nei tumori tiroidei comprendono:

- alterazioni del gene Rb, presenti nel 55% dei carcinomi tiroidei con una maggiore prevalenza nei tumori clinicamente più aggressivi (16, 19);

- mutazioni delle  $\beta$ -catenine, notate nel 60% dei tumori anaplastici (20);

- perdita di eterozigotà di PTEN, riscontrata nel 60% dei carcinomi poco differenziati e nel 25% di quelli differenziati;

- riarrangiamenti PAX/PPAR $\gamma$  evidenziabili nel 20% dei carcinomi follicolari (11, 12);

- mutazioni a carico del gene p53, presenti in più dell'85% dei tumori anaplastici (21).

Similmente a quanto accade nel gruppo degli oncogeni, anche nella categoria degli oncosoppressori esistono proteine, che, indipendentemente da eventi mutazionali, presentano alterata espressione e funzione nel contesto delle neoplasie tiroidee.

Tra queste proteine, sono degne di nota i membri della famiglia di p53 ovvero p63 e p73.

Sebbene alcuni di questi meccanismi molecolari menzionati siano stati ben caratterizzati, essi spiegano solo in parte gli aspetti della tumorigenesi tiroidea.

Ad oggi, infatti, molti interrogativi rimangono aperti. Ci si chiede, p.e:

- quali siano le interazioni geni-ambiente coinvolte nella determinazione delle mutazioni riscontrate nei carcinomi tiroidei;
- cosa determini il sottotipo istologico;
- cosa influenzi il comportamento biologico dei vari tipi di carcinoma tiroideo.
- quale sia il ruolo biologico delle cellule staminali tiroidee

### **Anomalie molecolari di frequente riscontro nei carcinomi tiroidei**

Nonostante sia ancora carente la comprensione dei meccanismi eziopatogenetici del tumore tiroideo, certamente le anomalie genetiche di componenti di vie di trasduzione del segnale, rappresentano il fattore determinante nella formazione di tale tumore.

La deregolazione costitutiva o indotta delle cascate di segnale di MAPK e PI3-K rappresenta un evento comune nel cancro tiroideo e svolge un ruolo importante nello sviluppo di tale patologia (22, 23).

L'alterata attivazione della cascata delle MAPK, attraverso mutazioni e/o riarrangiamenti in RET, RAS e BRAF, si manifesta in circa il 70% dei PTC (22, 23).

Tra queste anomalie, i riarrangiamenti del gene Ret, determinanti l'espressione di una proteina di fusione, contenente un dominio chinasi costitutivamente attivato, si manifestano dal 5% al 30 % dei casi. In generale, mentre rimane poco nota l'origine di mutazioni puntiformi, si ritiene che i riarrangiamenti Ret/PTC (in particolare Ret/PTC1 e Ret/PTC3) siano correlati all'esposizione a radiazioni.

Dall'altra parte, le mutazioni puntiformi di Ras sono state riscontrate in circa il 20-30% dei FTC e le mutazioni di BRAF (V600E) si verificano in circa il 35-70% dei PTC (22, 23).

BRAF rappresenta, pertanto, il gene più frequentemente mutato nei carcinomi della tiroide. La mutazione di BRAFV600E, ma non i riarrangiamenti Ret/PTC, spesso si riscontra nei tumori tiroidei anaplastici, suggerendo che tale oncogene potrebbe essere coinvolto nella progressione del cancro tiroideo verso le forme più aggressive (22, 23). Diversi studi indicano che BRAF mutato rappresenta un fattore predittivo di cattiva prognosi. Tale gene, pertanto, rappresenterebbe un utile marcatore molecolare per la stratificazione del rischio di pazienti affetti da tale patologia (22, 23). Questi risultati, tuttavia non sono stati confermati da altri studi (24).

Ora, il fatto che sia BRAF e altre chinasi della famiglia Raf sono effettori a valle di Ret/PTC e che le mutazioni in HRAS, BRAF e riarrangiamenti in Ret/PTC non coesistono, ha suggerito l'ipotesi che la via di trasduzione del segnale Ret/Ras/Raf/Mek potrebbe rappresentare un cascata di segnale lineare, la cui attivazione promuove la formazione e il mantenimento del cancro tiroideo.

Si noti, inoltre, che i carcinomi tiroidei presentano anche mutazioni di effettori della via del segnale di PI3-K: quali PTEN e PIK3CA. PTEN è iporegolato in circa il

37% dei carcinomi ben differenziati della tiroide e iporegolato o deleto in più del 50% dei tumori tiroidei altamente aggressivi (25). Mutazioni puntiformi o cambiamenti nel numero di copie di PIK3CA sono stati riscontrati in circa il 23% dei carcinomi anaplastici della tiroide, dove essi coesistono con mutazioni sia di RAS sia di BRAF (26). Ed ancora, l'attivazione di Akt è evidente soprattutto nelle forme tumorali invasive e nei linfonodi o metastasi a distanza (26).

Pertanto, la via di segnale di PI3-K potrebbe contribuire alla progressione neoplastica tiroidea e potrebbe cooperare con MAPK nel processo tumorigenico.

La coesistenza di mutazioni riguardanti le vie di traduzione del segnale, PI3-K e MAPK, è stata riportata nei carcinomi scarsamente differenziati della tiroide: si può inferire che un'alterata regolazione di entrambe le vie di segnale possa svolgere un ruolo importante nel mediare la patogenesi del tumore tiroideo. Diverse evidenze indicano che, inoltre, entrambe le vie di segnale MAPK e PI3-K, possono convergere su mTOR, stimolando così la crescita e la proliferazione cellulare.

A valle di MAPK e PI3-K, mTOR integra segnali provenienti da diverse vie di trasduzione del segnale; vie, che se deregolate, possono promuovere crescita e proliferazione (27).

### **Teoria della "oncogene addiction"**

In campo oncologico, è, ormai, considerato un assioma che i tumori umani spesso evolvono attraverso un processo che prevede l'acquisizione progressiva di mutazioni e/o anomalie epigenetiche a carico di geni aventi funzioni biologiche diverse.

Nonostante il genoma delle cellule tumorali presenti multiple alterazioni, è stato visto che la correzione di una o alcune di queste anomalie può profondamente inibire la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali.

Le evidenze sperimentali che supportano tale concetto definito "oncogene addiction", ovvero dipendenza delle cellule tumorali da uno o più geni per il mantenimento del loro fenotipo maligno e della loro sopravvivenza, sono state ottenute in tre diversi sistemi sperimentali (28, 29):

1. modelli di tumori umani in topi geneticamente modificati;
2. studi molecolari *in vitro* su linee cellulari di carcinoma umano;
3. trials clinici che prevedono l'utilizzo di agenti farmacologici rivolti verso specifici bersagli molecolari.

Tale teoria della “dipendenza oncogenica”, ha fornito la base razionale per l'utilizzo di terapie mirate o a bersaglio molecolare (“targeted therapies”), dirette contro una specifica molecola avente un ruolo cruciale nella crescita tumorale (30).

Tra questi farmaci ad azione molecolare mirata ricordiamo:

- il trastuzumab, anticorpo rivolto contro il recettore tirosinchinasico Her2, risultato efficace nell'inibire la crescita di cellule di carcinoma mammario umano (31);
- l'imatinib, rivolto contro le proteine oncogeniche Abl/Bcr e c-Kit, risultato efficace nel trattamento di alcune forme di tumore gastrointestinale e di leucemia mieloide cronica (32, 33);
- il bevacizumab, anticorpo monoclonale contro VEGF, ad attività antitumorale nei carcinomi umani della mammella, colon e rene (34, 35);
- il cetuximab, anticorpo monoclonale contro EGFR, ad azione antitumorale nei carcinomi umani del collo e colon (36, 37);
- il gefinitib ed erlotinib, rivolti contro EGFR ed efficace nel tumore polmonare a piccole cellule (38, 39).
- il sorafenib, inibitore selettivo di RAF, risultato efficace nell'epatocarcinoma e nei tumori renali avanzati (40-42).

Grazie alla loro azione selettiva, questi trattamenti mirati sono capaci di indurre minori effetti indesiderati sui tessuti normali rispetto alle terapie convenzionali. La loro efficacia selettiva sulle cellule tumorali deriva anche dal fatto che nelle cellule tumorali un determinato oncogene può svolgere un ruolo di importanza fondamentale e qualitativamente differente rispetto al suo ruolo svolto nelle cellule normali. In altre parole, le cellule tumorali possono risultare maggiormente dipendenti dall'attività di uno specifico oncogene rispetto alle cellule normali, e quindi più sensibili a trattamenti mirati contro quell'oncogene specifico (43). Tuttavia, si è visto che alcuni tumori possono “sfuggire” al fenomeno dell'oncogene addiction. E ciò, presumibilmente, potrebbe essere dovuto all'instabilità genomica dei tumori, alla loro eterogeneità o alle alterazioni epigenetiche (p.e. metilazione del DNA, cambiamenti della struttura cromatinica....) che portano ad un differente profilo di espressione genica (44). Non è ancora chiaro se il fenomeno di “fuga” dalla dipendenza da un primo oncogene porti all'acquisizione di dipendenza da un secondo oncogene o allo sviluppo di una popolazione di cellule tumorali non più dipendenti. Per tale ragione, e dato che i tumori spesso presentano contemporaneamente mutazioni a carico di più

geni, è improbabile che l'utilizzo di un solo farmaco a bersaglio molecolare risulti clinicamente efficace. Pertanto, si è reso necessario lo sviluppo di terapie mirate multiple (multi-targeted therapies), in grado di agire contemporaneamente su più bersagli molecolari, al fine di ottenere un'inibizione ottimale della crescita tumorale (29).

Alla luce di tali osservazioni, data l'importanza di MAPK, PI3-K ed mTOR nella patogenesi di numerosi tumori umani, compreso quello della tiroide, oggi sono stati disegnati farmaci mirati verso le oncoproteine di tali cascate di segnale o dei loro effettori in grado di indurre la morte delle cellule neoplastiche, in modo specifico e selettivo.

Ad oggi tuttavia la scelta del migliore agente farmacologico a bersaglio molecolare mirato o della più appropriata terapia farmacologica mirata multipla per uno specifico paziente oncologico risulta ancora prettamente empirica. Da qui la necessità di effettuare ulteriori studi molecolari, sia *in vitro* che *in vivo*, al fine di meglio identificare le vie di trasduzione del segnale ed i fattori coinvolti nel fenomeno dell'oncogene addiction nei vari tumori umani.

L'applicazione di tali tecnologie mirate, applicate su alterazioni genetiche specifiche, potrebbe rivelarsi vincente nella lotta contro le malattie tumorali, in quanto potrebbe consentire una terapia specifica, selettiva e sempre più personalizzata.

## ABSTRACT

**Introduzione:** il TSH, agendo attraverso cAMP/PKA, regola la crescita delle cellule follicolari tiroidee e richiede anche l'attivazione di mTOR per esercitare i suoi effetti mitogenici. I carcinomi tiroidei scarsamente differenziati e le linee cellulari tumorali tiroidee cresciute *in vitro*, perdono la dipendenza dal TSH per la loro crescita; essi mostrano, tuttavia, una incrementata attività di mTOR. Poichè entrambe le vie di segnale di MAPK e PI3K svolgono un ruolo importante nella patogenesi del carcinoma tiroideo e possono convergere su mTOR, esse potrebbero rappresentare vie di segnale alternative responsabili dell'attivazione di mTOR e della proliferazione di cellule tumorali tiroidee.

**Materiali e Metodi:** come modello di studio sono state usate le cellule non trasformate di tiroide di ratto (PCCL3) e linee cellulari umane di carcinoma tiroideo aventi mutazioni a carico degli oncogeni RET/PTC, RAS e BRAF.

**Obiettivi:** Valutare se: 1) la via TSH/cAMP/PKA regola l'attivazione di mTOR e la crescita cellulare mediata da tale chinasi; 2) le oncoproteine *RET/PTC3*, *HRAS<sup>SG12V</sup>* e *BRAF<sup>V600E</sup>*, regolano l'attivazione di mTOR; 3) l'inibizione farmacologica di mTOR (usando la rapamicina) da sola o in combinazione con inibitori di MEK e AKT1/2, esercita degli effetti sulla proliferazione cellulare.

**Risultati:** 1) nelle PCCL3, la via TSH/cAMP/PKA è cruciale nel mediare i segnali dipendenti da mTOR. Viceversa, le linee cellulari di carcinoma tiroideo sostituiscono la dipendenza, per la loro crescita e per l'attivazione di mTOR, dal segnale TSH/cAMP/PKA alle vie di segnale dipendenti da MAPK e/o PI3K; 2) nelle PCCL3, tutte e tre le oncoproteine *RET/PTC3*, *HRAS<sup>SG12V</sup>* e *BRAF<sup>V600E</sup>* inducono l'attivazione di mTOR e quest'ultimo è richiesto per la sintesi del DNA indotta dalle oncoproteine tiroidee; 3) nelle linee cellulari tumorali tiroidee, la rapamicina, in monoterapia, inibisce la crescita cellulare in modo variabile. Viceversa, una terapia mirata ad inibire contemporaneamente mTOR e/o MEK e/o AKT1/2 esercita effetti terapeutici benefici in tutte le linee cellulari analizzate, eccetto che in quelle strettamente dipendenti, per la crescita, da una sola via di trasduzione del segnale.

**Conclusioni:** nelle linee cellulari tumorali tiroidee, nelle quali più vie di segnale (quali MAPK, PI3K ed mTOR) concorrono a conferire dipendenza per la crescita, terapie multiple mirate, potrebbero avere effetti terapeutici benefici massimali.

## INTRODUZIONE ALLO STUDIO

Il controllo della crescita delle cellule follicolari tiroidee e la biosintesi ormonale tiroidea sono regolati principalmente dal TSH. Il TSH modula la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione dei tireociti, legandosi a specifici recettori di membrana (TSH-R). Il legame del TSH al suo rispettivo recettore porta all'attivazione della via di segnale dipendente da cAMP/PKA.

Per raggiungere un livello massimale, la crescita cellulare indotta dal TSH richiede la concomitante attivazione di recettori ad attività tirosin-chinasica da parte dell'insulina, IGF-I o EGF(45, 46).

Ne deriva che mutazioni a carico di uno o più effettori di tali vie di segnale giocano un ruolo fondamentale nella patogenesi della patologia nodulare tiroidea benigna e maligna. Per es., adenomi tiroidei, funzionalmente autonomi, sono, spesso, associati a mutazioni attivanti il TSH-R o il GSP (gene codificante per la subunità  $\alpha$  della proteina eterodimerica G) che accoppia il TSH-R all'adenilato ciclasi (47, 48).

Ancora, ricombinazioni geniche, che attivano costitutivamente recettori tirosin-chinasici, quali RET, e mutazioni puntiformi attivanti RAS o BRAF, si presentano, in modo mutuamente esclusivo, nei tumori papilliferi della tiroide (20). In quest'ultimi tumori, inoltre, sono stati riscontrati mutazioni a carico di PTEN e PIK3CA. Queste osservazioni inducono a ritenere che gli effettori delle vie di trasduzione del segnale MAPK e PI3K dipendenti, svolgono un ruolo centrale nella patogenesi di tale patologia.

La risposta mitogenica, esercitata dal TSH-cAMP sulle cellule follicolari tiroidee richiede anche l'attivazione di mTOR (49-51).

È noto che mTOR:

- è una Serin/Treonin chinasi appartenente alle proteine di segnale della famiglia della fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3K);
- regola diversi processi biologici tra cui la trascrizione proteica, le dimensioni, la proliferazione e la sopravvivenza cellulari;
- esiste sotto forma di due differenti complessi multiproteici: mTORC1 (mTOR-raptor), fortemente inibito dalla rapamicina e mTORC2 (mTOR-riCTOR), non direttamente influenzato dagli effetti del suddetto farmaco.

La rapamicina è stata usata per studiare le funzioni biologiche del complesso mTORC1 (27). Una volta attivato, mTORC1 incrementa la trascrizione del mRNA, attraverso l'attivazione della chinasi p70S6 (S6K) e l'inibizione del fattore di iniziazione della trascrizione eucariotica: la proteina 4EBP1.

Nelle cellule eucariotiche, mTOR svolge un ruolo importante in quelle vie di trasduzione del segnale, che rispondono a fattori di crescita e nutrienti (52). Segnali extracellulari, quali fattori di crescita ed ormoni, modulano l'attività del complesso mTORC1, principalmente attraverso l'attivazione di MAPK e PI3K.

Queste due vie di trasduzione del segnale sono interconnesse e convergono sul comune effettore mTOR. L'attività di mTOR è, a sua volta, regolata negativamente da PI3K attraverso S6K. Inoltre, quando mTOR è assemblato nel complesso mTORC2, esso fosforila direttamente ed attiva Akt, il quale, a sua volta, diventa effettore sia a monte che a valle della via di trasduzione del segnale attivata da mTOR (53-55). L'inibizione di mTOR, cui fa seguito l'attivazione di ERK, aggiunge ulteriore complessità alla regolazione della via di trasduzione del segnale mediata da mTOR/S6K (56) (57).

In linee cellulari di tiroide di ratto, immortalate ma non trasformate, il TSH attiva mTOR attraverso la protein-chinasi A (PKA)(49).

I carcinomi tiroidei scarsamente differenziati e le linee cellulari tumorali tiroidee cresciute *in vitro*, perdono la dipendenza dal TSH per la loro crescita; essi mostrano, tuttavia, una incrementata attività di mTOR (58).

mTOR è un effettore critico nelle due vie di trasduzione del segnale, MAPK e PI3K, entrambe le quali, spesso, risultano deregolate nei carcinomi tiroidei.

Come conseguenza del fenomeno dell' "oncogene addiction", cioè dello sviluppo di dipendenza da oncogeni fondamentali per la crescita cellulare, è, quindi, possibile supporre che molti tumori tiroidei abbiano modificato il controllo a monte dell'attivazione di mTOR, invertendolo dal segnale TSH-cAMP-PKA dipendente a quello di RAS-RAF-MAPK e/o PI3K/AKT dipendente.

L'attivazione costitutiva di RET, di RAS e di BRAF si riscontra in più del 70% dei carcinomi papilliferi della tiroide (PTCs)(13, 59) (20).

Mutazioni di PTEN o una sua ridotta espressione si verificano in circa il 40% dei tumori differenziati della tiroide ed in più del 50% dei tumori tiroidei altamente maligni (25, 26).

Mutazioni puntiformi o modifiche nel numero di copie del gene di PI3KCA si riscontrano, invece, in circa il 23% dei tumori tiroidei anaplastici (60). In quest'ultimo istotipo tumorale, inoltre, è stata riscontrata la contemporanea presenza di mutazioni a carico di effettori delle vie di trasduzione del segnale di PI3K e MAPK (26, 60).

Si inferisce, quindi, che:

1) una deregolazione a carico di entrambe queste vie di trasduzione del segnale, potrebbe costituire un fattore di fondamentale importanza nel mediare la patogenesi del tumore tiroideo;

2) mTOR potrebbe rappresentare, per le cellule tumorali tiroidee, un mediatore della risposta proliferativa.

Sulla base di questi ultimi dati, la ricerca si è orientata verso la sperimentazione di farmaci in grado di inibire, in modo il più possibile selettivo e specifico, le chinasi appartenenti alle vie di trasduzione del segnale, spesso deregolate nel carcinoma tiroideo e coinvolte, quindi, nella sua patogenesi.

Nei trials clinici, condotti finora su altri tipi di tumore umano, la risposta tumorale ad inibitori di mTOR si è rivelata variabile e dipendente dal contesto cellulare. La sensibilità all'inibizione di mTOR sembra dipendere dallo stato di attivazione della via di segnale PTEN/PI3K/Akt o dall'iperespressione dei substrati di mTOR, quali p70S6K e 4EBP1 (61-66).

Un altro fattore, che potrebbe influenzare la risposta agli inibitori farmacologici di mTOR, è l'attivazione di segnali compensatori all'inibizione di mTOR stesso. È utile ricordare, p.e, il blocco del feedback negativo operato da S6K su PI3K, attraverso IRS-1, che porterebbe ad una iperattivazione di entrambe le vie di trasduzione del segnale RTK/IRS-1/PI3K e RAS/RAF/MEK/ERK (56, 57, 63, 64).

Nonostante l'esistenza di un forte rationale per lo sviluppo clinico di inibitori di componenti delle vie di MAPK e PI3K per la terapia antitumorale, l'efficacia nella pratica clinica di tale tipo di approccio farmacologico rimane ad oggi ancora da validare. Il primo ed unico inibitore della via di segnale dipendente da MAPK, che è stato ufficialmente approvato nella terapia del carcinoma renale avanzato e dell'epatocarcinoma, è l'inibitore di RAF, il Sorafenib (Nexavar) (Wilhelm S., Nat Rev Drug Discov 2006, 5:835-844)(40, 41). L'utilizzo in trials clinici di altri inibitori selettivi di RAF o MEK o di AKT in monoterapia si è rivelato, ad oggi, variabile e spesso poco soddisfacente.

In questo studio sulle vie di traduzione del segnale, che controllano l'attivazione di mTOR, sono state prese in considerazione le linee cellulari non trasformate di tiroide di ratto (PCCL3) e le linee cellulari umane di carcinoma tiroideo. Quest'ultime, a differenza delle cellule PCCL3, crescono in modo indipendente da TSH/cAMP/PKA. Pertanto, potrebbero richiedere alternative vie di segnale, per indurre l'attivazione di mTOR.

Entrambe le vie di segnale di MAPK e PI3K sono costitutivamente attivate dalle oncoproteine tiroidee RET/PTC, HRAS e BRAF, ed entrambe le vie possono convergere su mTOR.

Il nostro gruppo di studio, ha valutato se l'espressione costitutiva di RET/PTC, HRAS e BRAF, nelle cellule PCCL3, è in grado di indurre l'attivazione di mTOR e se quest'ultimo è richiesto per la crescita di tali cellule.

I risultati da noi ottenuti hanno evidenziato che, nelle cellule PCCL3, tutte e tre le oncoproteine RET/PTC, HRAS e BRAF inducono l'attivazione di mTOR e che quest'ultimo è richiesto per la sintesi del DNA indotta da RET/PTC, HRAS e BRAF.

E' stata, inoltre, condotta un'indagine sulla risposta all'inibizione farmacologica di mTOR in linee cellulari tumorali tiroidee, aventi mutazioni a carico di effettori di entrambe le vie di trasduzione del segnale di MAPK e PI3K.

Si è osservato che la monoterapia con la rapamicina non ha determinato nessun effetto positivo sull'inibizione della crescita delle linee cellulari analizzate. Viceversa, una terapia mirata ad inibire contemporaneamente mTOR e/o MEK e/o AKT1/2 ha avuto effetti terapeutici benefici in quasi tutte le linee cellulari analizzate, ad eccezione di quelle strettamente dipendenti, per la loro crescita, da una sola via di trasduzione di segnale.

Queste osservazioni suggeriscono che, nelle linee cellulari tumorali tiroidee nelle quali più vie di segnale concorrono a conferire dipendenza per la crescita e la sopravvivenza, l'inibizione di una sola via di segnale potrebbe risultare insufficiente ad inibire la crescita tumorale, a causa dell'innescamento di segnali compensatori di crescita.

In tale condizione, pertanto, le terapie multiple mirate, neutralizzando la plasticità e la ridondanza di multipli segnali di crescita, potrebbero avere effetti terapeutici benefici massimali.

## **MATERIALI E METODI**

### Reagenti:

La rapamicina è stata acquistata presso la ditta Calbiochem (NJ, USA) e disciolta, per il suo pronto utilizzo, in dimetil sulfossido (DMSO) alla concentrazione di 1mM. L'inibitore di Mek, U0126, è stato acquistato presso la ditta Promega (Madison, WI) e disciolto in DMSO alla concentrazione di 10mM. Un ulteriore inibitore selettivo di MEK l'AZD6244, è stato fornito dalla ditta Astrazeneca e usato alle concentrazioni di 500nM. L'inibitore selettivo di Akt1/2 è stato fornito dalla ditta farmaceutica Merck&Co, Inc. (NJ, USA) ed usato alla dose di 1µM. Il TSH, l'insulina, l'apotransferrina, l'idrocortisone, la doxiciclina e l'albumina sierica bovina (BSA) sono stati acquistati presso la ditta Sigma (St.Louis, MO)

### Colture cellulari:

Le linee cellulari di differenti istotipi di carcinoma tiroideo umano già disponibili nel nostro laboratorio e utilizzate nel nostro studio, sono state:

- TPC-I, KTC-1 (carcinoma papillifero);
- FTC-133, WRO, FRO (carcinoma follicolare);
- SW-1736, C-643, Hth-83, Hth-104 8505-c, Cal-62, OCUT-1, BHT-101 (carcinoma anaplastico).

Le cellule sono state coltivate rispettivamente:

- le OCUT-1 in mezzo DMEM-HG, supplementato con il 5% di siero bovino fetale (FBS);
- le FTC-133 in mezzo DEM-HG F12, supplementato con il 10% di FBS;
- le BHT-101 in MEM con aggiunta di FBS al 20%.
- le rimanenti linee cellulari in RPMI 1640 supplementato con il 10% di FBS.

In tutte le linee cellulari utilizzate, al mezzo di coltura sono stati aggiunti: glutamina 2mM, penicillina-streptomicina (50U/ml-50µg/ml) e fungizone (2.5µg/ml).

Le cellule PCCL3 RET/PTC 3-5, HRAS-25, BRAF 9.6 derivano dalle cellule tiroidee di ratto PCCL3, non trasformate e ben differenziate, esprimenti rispettivamente RET/PTC3, HRAS<sup>G12V</sup> e BRAFV<sup>600E</sup> (67-69).

Per indurre l'espressione delle oncoproteine tiroidee RET/PTC3, HRAS<sup>G12V</sup> e BRAF<sup>V600E</sup>, le cellule PCCL3 sono state esposte per 24 ore a doxiciclina (1µg/mL).

Le cellule, derivate dalle PCCL3 sono state mantenute in coltura in mezzo Coon's/F12, supplementato con FBS al 5%, TSH (10 mUI/mL), insulina (10 µg/mL), apotransferrina (5µg/mL), idrocortisone (10nmol/L) L-glutammina (0,3mg/mL), penicillina-streptomicina (50U/mL-50µg/mL), G418 (0.3mg/mL).

#### Western Blot:

Le cellule sono state lisate in tampone di lisi RIPA contenente 20mmol/L di Tris-HCL pH 7,5, NaCl 150mmol/L, triton X-100 all'1%, NaF 10mol/L, EDTA 1mmol/L, EGTA 1mmol/L, miscela di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (Sigma, St.Louis, MO). Il contenuto proteico e' stato valutato mediante metodo Bradford (BioRad, Hercules, CA). I campioni, così ottenuti, sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilamide e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. Le proteine di interesse sono state rivelate con anticorpi specifici, mediante il sistema della chemoluminescenza (ECL, Amersham GE Healthcare, British Technology).

Gli anticorpi primari usati sono stati :

- anticorpo anti pAkt(S473), Akt totale, prS6(S232/236), rS6 totale, p4EBP1(Thr37/46), 4EBP1 totale, pMEK (Cell Signaling Technology, Beverly, MA);
- anticorpo anti S6K totale (sc-8418), ERK totale(sc-94), pERK1/2(sc-7383), HRAS (sc-520) e RET (sc-167) (Santa Cruz Biotechnology);
- anticorpo monoclonale anti  $\alpha$ -actina (Sigma, St.Louis, MO);
- anticorpo monoclonale anti myc clone 4A6 (Upstate Technology, Lake Placid, NY);
- anticorpo policlonale anti pS6K(T389) (Epitomics, Inc, Burlingame,CA).

#### Valutazione della sintesi del DNA mediante saggio di captazione della bromodeossiridina (BrdU):

Le cellule sono state incubate con Bromodeossiridina (BrdU) per 24 ore, tripsinizzate e fissate in ETOH al 70%; inoltre, sono state incubate in HCl 2N per denaturare il DNA e successivamente, per neutralizzare la reazione di denaturazione, sono state trattate con sodio borato 0,1 mol/L, pH 8,5.

Dopo la marcatura con anticorpo anti BrDu, coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) (FITC BrdU Flow kits, BD Pharmingen), la percentuale di cellule BrdU positive è stata valutata e quantificata mediante analisi citofluorimetrica (citofluorimetro Coulter ®EPICS, Beckman).

#### Curve di crescita:

Le cellule di carcinoma tiroideo umano sono state impiantate, in triplicato, in piastre a sei pozzetti in numero pari a 60.000 cellule/pozzetto. Il giorno successivo all'impianto sono stati aggiunti al mezzo di coltura e rinnovati ogni 24 ore il DMSO allo 0,1% o la rapamicina o l'8Br-cAMP. Le cellule sono state tripsinizzate e contate ogni due giorni. Per i trattamenti, che prevedevano la combinazione di più farmaci, la rapamicina e/o l'inibitore di Akt1/2 e/o l'inibitore di Mek e/o il DMSO (0,1%) sono stati aggiunti per 4 giorni a dosi costanti e corrispondenti alla loro IC50 (concentrazione inibente il 50% della crescita cellulare). Il mezzo, contenente gli inibitori singoli o in combinazione, è stato rinnovato ogni 24 ore. Le cellule sono state tripsinizzate e sottoposte a conta ogni giorno. La vitalità cellulare ed il numero delle cellule sono stati valutati mediante il metodo di esclusione del tripan blu, usando l'analizzatore Vi-Cell (Beckman, Coulter, Inc, Fullerton, CA).

#### Valutazione del ciclo cellulare mediante tecniche di citofluorimetria (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting analysis):

Per la valutazione del ciclo cellulare, le cellule sono state fissate e permeabilizzate in ETOH al 70% ed incubate con Propidio Ioduro (PI 20µg/ml) ed RNasi A (4µg/ml) per 30' a 37°C. Le cellule sono state, successivamente, sottoposte a lettura citofluorimetrica (FACS usando il citofluorimetro Coulter ®EPICS, Beckman) e ad analisi del ciclo cellulare in base al contenuto di DNA (evidenziato mediante colorazione con PI).

#### Analisi statistica:

I dati ottenuti sono presentati come media  $\pm$  SE. La significatività è stata valutata mediante  $\tau$  di Student a due code per dati non appaiati (\* P< 0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001). L'analisi statistica è stata svolta grazie all'uso del software Microsoft Excel.

## RISULTATI

### **Ruolo di mTOR nella crescita, dipendente da cAMP/TSH, delle cellule tiroidee di ratto PCCL3 e vie di trasduzione del segnale coinvolte nella attivazione di mTOR indotta da cAMP/TSH.**

Il ruolo della via di trasduzione del segnale mTOR/S6K nella proliferazione delle cellule tiroidee fu per la prima volta studiato da Cass et al. (49). Tali ricercatori hanno dimostrato che nelle cellule follicolari tiroidee il TSH, attraverso cAMP, attiva S6K e che questa chinasi è di fondamentale importanza e per la sintesi del DNA e per la progressione del ciclo cellulare indotti dall'cAMP. Gli stessi autori, inoltre, hanno riportato che gli effetti di cAMP su S6K potrebbero essere mediati da distinte vie di trasduzione del segnale, a seconda del tipo cellulare e/o di stimoli mitogenici esterni.

Come mostrato nella Fig.1A, le cellule PCCL3 crescono solo in presenza di TSH o di cAMP. Questa loro dipendenza dal TSH/cAMP è abolita dal trattamento con la rapamicina e con il KT5720, inibitori rispettivamente di mTOR e della protein-chinasi A (PKA). Questo risultato suggerisce che, nelle cellule PCCL3, la proliferazione, dipendente dal TSH/cAMP, richiede l'attivazione di mTOR attraverso segnali mediati da PKA.

Per meglio comprendere se segnali a partenza da cAMP convergano su mTOR e quali vie di trasduzione del segnale siano coinvolte nell'attivazione di mTOR mediata da cAMP, è stato valutato lo stato di fosforilazione di alcuni substrati di mTOR quali S6K, rS6p e 4EBP1. Tale valutazione è stata effettuata dopo esposizione all' 8Br-cAMP, un analogo di cAMP, da solo o in combinazione con l'inibitore di PKA, il KT5720.

Come mostrato in Fig.1B (pannello di sinistra), cAMP induce la fosforilazione della chinasi S6 (S6K), della proteina ribosomiale S6 (rS6p) e di 4EBP1. Questo effetto, mediato da cAMP, inoltre, è abolito dal KT5720 in modo dose dipendente. Una simile risposta inibitoria, operata da KT5720, sulla fosforilazione dei substrati di mTOR è stata anche osservata coltivando le cellule in mezzo contenente TSH (Fig.1B pannello di destra).

Questi dati suggeriscono che l'attivazione di mTOR, mediata dal TSH, si verifica attraverso cAMP in modo dipendente da PKA. Poichè entrambe le vie di segnale di MAPK e PI3K convergono su mTOR, è stato esaminato il relativo

contributo di ERK e AKT1/2 nel regolare l'attivazione di mTOR indotta dal TSH/cAMP nelle cellule PCCL3.

Come mostrato nella Fig.1C, la rapamicina, è stata in grado di abolire completamente la fosforilazione dei substrati di mTOR (paragonare la linea 5 con la linea 6). Viceversa, l'inibitore di MEK, U0126, (Fig.1C pannello di destra, paragonare linea 5 con linea 7) e/o l'inibitore specifico di AKT1/2 (Fig.1C pannello di sinistra, paragonare linea 5 con linea 7) non hanno espletato nessuno effetto inibitorio.

Da questi risultati, dunque, si può inferire che nelle cellule PCCL3:

- mTOR, attraverso segnali dipendenti da PKA, è richiesto per la crescita e la sopravvivenza cellulare mediata da TSH/cAMP;
- segnali provenienti da TSH/cAMP convergono su mTOR;
- l'attivazione di mTOR da parte di TSH/cAMP è dipendente da PKA ma non da ERK e AKT1/2.

### **Contributo di cAMP sulla crescita cellulare e l'attivazione di mTOR in linee cellulari di carcinoma tiroideo umano.**

Nelle cellule tiroidee di ratto PCCL3, il TSH, attraverso cAMP e la via dipendente da PKA, regola la crescita e stimola l'attivazione di mTOR (49, 70).

Le cellule di carcinoma tiroideo umano, viceversa, perdono la dipendenza dal TSH per la loro crescita, sebbene esse presentino un'iperattivazione di mTOR (58).

Sulla base di tali risultati, è sorto l'interrogativo se e quanto i segnali dipendenti da cAMP, a valle del recettore del TSH (TSH-R), siano coinvolti nel mediare la crescita e l'attivazione di mTOR in questo modello cellulare.

Come mostrato nella Fig.2 (pannello A), elevati livelli di cAMP o inibiscono la crescita delle cellule tumorali tiroidee (SW-1736 e Cal-62) o non determinano alcun effetto (Hth-83).

Come si evince dalla Fig.2 (pannello B), dopo esposizione al 8Br-cAMP, lo stato di fosforilazione dei substrati di mTOR non subisce modifiche in tutte le linee cellulari esaminate, sia in condizioni di crescita, che prevedono la presenza di siero nel mezzo di coltura (pannello di sinistra) sia in seguito ad esposizione a BSA allo 0,1% per 48 ore (pannello di destra). Inoltre, il pre-trattamento con l'inibitore di PKA, KT5720, non inibisce l'attivazione di mTOR (dati non mostrati).

Questi risultati implicano che le linee cellulari di carcinoma tiroideo umano crescono indipendente da TSH/cAMP/PKA e richiedono altre vie di trasduzione del segnale per indurre l'attivazione di mTOR.

### **La rapamicina sopprime la sintesi del DNA indotta da RET/PTC3, HRAS<sup>G12V</sup> e BRAF<sup>V600E</sup> nelle cellule di tiroide normale di ratto PCCL3.**

Poichè entrambe le vie di segnale MAPK e PI3K sono critiche nel mediare segnali di crescita nel carcinoma tiroideo ed entrambe le vie possono convergere su mTOR, si è preso in esame il ruolo di mTOR sulla crescita cellulare indotta dalle oncoproteine RET/PTC3, HRAS<sup>G12V</sup> e BRAF<sup>V600E</sup>. Come modello di studio, sono state utilizzate le cellule PCCL3, in cui l'espressione delle oncoproteine tiroidee è indotta in seguito ad esposizione alla doxiciolina.

Come mostrato nella Fig.3, tutte e tre RET/PTC3, HRAS<sup>G12V</sup> e BRAF<sup>V600E</sup> sono in grado di indurre la sintesi del DNA. Questo effetto, essendo inibito dalla rapamicina, richiede l'attivazione di mTOR per il suo espletamento.

### **Ruolo di MEK e AKT1/2 nell'induzione della fosforilazione della proteina rS6 indotta da RET/PTC3, HRAS<sup>G12V</sup> e BRAF<sup>V600E</sup>**

Poichè entrambe le vie di trasduzione del segnale MAPK e PI3K interagiscono con la via di mTOR a diversi livelli, si è esaminato il relativo contributo di MEK e AKT1/2 nell'attivare mTOR nelle cellule PCCL3. Come indicatore dell'attivazione di mTOR è stato valutato lo stato di fosforilazione di un suo substrato: la proteina rS6.

I risultati ottenuti mostrano che tutte e tre le oncoproteine tiroidee, RET/PTC3, HRAS<sup>G12V</sup> e BRAF<sup>V600E</sup>, inducono la fosforilazione della proteina rS6 e questo effetto è inibito dalla rapamicina (paragonare linea 5 con linea 6). RET/PTC3 e BRAF<sup>V600E</sup> stimolano la fosforilazione di rS6p in modo dipendente da MEK, dato che l'inibitore di MEK, U0126, è in grado di inibire totalmente tale fosforilazione (paragonare la linea 5 con la linea 7). Viceversa, l'inibitore di AKT1/2, da solo, ha un blando effetto inibitorio (paragonare la linea 5 con la linea 8). HRAS<sup>G12V</sup>, a differenza delle altre due oncoproteine, richiede segnali dipendenti da entrambi MAPK e AKT per regolare l'attività di mTOR. Infatti, l'inibitore U0126 e l'inibitore di AKT1/2 hanno mostrato, sulla fosforilazione di rS6p, effetti inibitori similari (paragonare la linea 5 con la linea 7 ed 8).

## **Effetti della rapamicina sulla crescita di linee cellulari di carcinoma tiroideo umano.**

A questo punto si sono studiati gli effetti della rapamicina sulla crescita di 12 linee cellulari di carcinoma tiroideo umano, aventi mutazioni a carico di geni codificanti per effettori delle vie di segnale di MAPK o di PI3K o di entrambe (vedi Tabella 1). Usando la rapamicina per 72 ore, la curva di crescita, dose-risposta, ha evidenziato che l'effetto inibitorio raggiungeva il livello massimo alla concentrazione di 10-20nM in tutte le linee cellulari (dati non mostrati). Pertanto, negli esperimenti di crescita, si è deciso di utilizzare la rapamicina alla concentrazione di 20nM.

Come si può osservare nella Fig. 5A, la rapamicina ha un'attività inibitoria sulla crescita delle cellule tumorali tiroidee variabile e tale risposta non è attribuibile alla presenza di mutazioni a carico delle oncoproteine RET/PTC, HRAS, BRAF o PIK3CA. Tuttavia, la linea cellulare FTC-133, che presenta una delezione in omozigosi di PTEN, è risultata molto sensibile alla rapamicina. Quest'ultimo risultato è in accordo con i dati della letteratura ottenuti su altre linee cellulari aventi lo stesso tipo di mutazione (65, 71). Per valutare il meccanismo di inibizione della crescita cellulare esercitato dalla rapamicina, si è anche valutato l'effetto del trattamento farmacologico sul profilo del ciclo cellulare (Fig. 5B). L'esposizione alla rapamicina per 96 ore, ha determinato arresto in fase G1 del ciclo cellulare in 8 su 10 linee cellulari analizzate. L'effetto massimo di blocco del ciclo cellulare è stato riscontrato nelle cellule FTC-133 (25% di cellule arrestate in fase G1). La distribuzione nelle varie fasi del ciclo cellulare delle cellule WRO e BHT-101 si è mostrata invariata in seguito all'esposizione alla rapamicina.

## **Effetto del trattamento multiplo con inibitori selettivi di mTOR, MEK ed AKT1/2 sulla crescita cellulare e sull'attivazione delle vie di trasduzione del segnale MAPK, PI3K ed mTOR in linee cellulari di carcinoma tiroideo umano.**

L'effetto citostatico esercitato in monoterapia dalla rapamicina, sulle cellule di carcinoma tiroideo umano potrebbe essere spiegato dall'attivazione di vie di segnale compensatorie ed alternative. Questo, però, implica che la disattivazione contemporanea di più vie di trasduzione del segnale potrebbe essere necessaria per indurre inibizione della crescita cellulare tumorale.

Poichè entrambe le vie di segnale, MAPK e PI3K, svolgono un ruolo di fondamentale importanza nella patogenesi del carcinoma tiroideo, ci si è chiesto se la

disattivazione contemporanea di segnali dipendenti da MEK e AKT, in combinazione con l'inibizione di mTOR, potesse esortire un effetto inibitorio sulla crescita tumorale maggiore rispetto a quello indotto dalla disattivazione di una singola via di segnale.

Usando diverse linee cellulari di carcinoma tiroideo umano, aventi differenti caratteristiche genetiche, sono stati presi in considerazione come indicatori di efficace inibizione di crescita tumorale:

- il numero di cellule dopo 4 giorni di esposizione ai vari farmaci in mono o politerapia;
- lo stato di fosforilazione della proteina rS6.

I dati ottenuti hanno evidenziato che il trattamento combinato con inibitori di MEK, AKT1/2 e mTOR risulta più efficace rispetto alla monoterapia. Questo effetto si presenta principalmente nelle cellule dipendenti da più vie di trasduzione del segnale. Viceversa, nessun effetto sinergico si osserva nelle cellule dipendenti, per la loro crescita, da una sola via di trasduzione del segnale.

Come mostrato nella Fig. 6, infatti, nelle cellule BHT-101, aventi la mutazione di BRAF<sup>V600E</sup>, la monoterapia con l'inibitore di MEK, AZD6244, si è rivelata sufficiente nel sopprimere, in modo significativo, la crescita cellulare e di defosforilare la proteina rS6. Pertanto si deve ritenere che le cellule BHT-101 sono dipendenti per la loro sopravvivenza esclusivamente dall'attivazione della via di segnale di MAPK. Similmente, le cellule FTC-133, caratterizzate da una delezione in omozigosi di PTEN, mostrano elevata sensibilità al trattamento con la sola rapamicina, in quanto l'iperattivazione di mTOR, mediata da PTEN, prevale rispetto ad altri segnali di crescita. Contrariamente a quanto avviene in queste due linee cellulari, nelle cellule Hth-104 e C-643, caratterizzate rispettivamente da mutazione di BRAF<sup>V600E</sup> e di HRAS<sup>G12V</sup>, la contemporanea soppressione di MEK e di mTOR si è mostrata più efficace del trattamento con i singoli inibitori nel sopprimere la crescita cellulare e la fosforilazione della proteina rS6.

Tale dato supporta l'ipotesi che queste ultime due linee cellulari esibiscono l'attivazione di parallele e multiple vie di segnale convergenti su mTOR.

Pertanto, si può concludere che, in base al contesto cellulare, la contemporanea disattivazione di più di una via di segnale potrebbe essere richiesta al fine di raggiungere effetti terapeutici benefici ottimali.

## DISCUSSIONE

Studi sperimentali hanno chiaramente dimostrato che l'attività di mTOR è richiesta per la regolazione della crescita fisiologica, mediata dal TSH, dei tireociti sia *in vitro* (49) che *in vivo* (72). Tuttavia, gli effettori che trasducono i segnali dal recettore del TSH ad mTOR, rimangono ad oggi poco conosciuti (49-51, 73-75).

Nelle cellule tiroidee di cane, cAMP non attiva né PI3K né Akt e quest'ultimi non sono richiesti per la crescita indotta dal TSH (74, 76, 77).

Questa evidenza è in contrasto con quanto osservato nelle cellule tiroidee immortalate di ratto, dove cAMP, stimolato dal TSH, attraverso la via dipendente da PKA, regola la crescita e stimola l'attivazione di mTOR (49, 70, 74).

Ancora diverso risulta essere il comportamento delle linee cellulari di carcinoma tiroideo umano, le quali mostrano una ridotta o del tutto assente risposta al TSH, nonostante presentino una iperattivazione dell'asse mTOR/S6K/rS6p (58). Questa osservazione suggerisce che, in tale modello cellulare, altri effettori e segnali da loro mediati, potrebbero controllare l'attività di mTOR e modulare la proliferazione cellulare. Probabili candidati includono effettori delle vie di segnalazione di MAPK e PI3K, poichè entrambe le vie sono frequentemente deregolate nei carcinomi tiroidei. Una attivazione costitutiva di PI3K in topi con delezione di PTEN determina, infatti, la formazione di gozzo che non è ulteriormente accentuata dall'iperstimolazione con TSH (78). Questo effetto richiede l'attività del complesso mTORC1 in quanto esso è inibito dall'analogo della rapamicina, RAD001 (75).

In questo lavoro condotto dal nostro gruppo di ricerca, mostriamo che nelle cellule PCCL3 i segnali mediati da mTOR sono dipendenti da PKA, ma indipendenti da MAPK e PI3K. Nelle cellule di carcinoma tiroideo umano, viceversa, PKA non è richiesto per la crescita e l'attivazione di mTOR.

Queste osservazioni suggeriscono che le cellule tumorali tiroidee, aventi mutazioni a carico degli effettori delle vie di trasduzione di segnale MAPK e/o PI3K, potrebbero avere sostituito la dipendenza, per la loro crescita e per l'attivazione di mTOR, dal segnale TSH/cAMP/PKA alle vie di segnale dipendenti da MAPK e/o PI3K.

In accordo con evidenze che mostrano che entrambe le vie di MAPK e PI3K possono convergere sull'asse di segnale mTOR-dipendente, abbiamo osservato che

l'espressione delle oncoproteine RET/PTC3, HRAS<sup>G12V</sup> e BRAF<sup>V600E</sup>, nelle cellule PCCL3, induce l'attivazione di mTOR in modo dipendente da MEK ed AKT1/2.

Abbiamo visto, inoltre, che mTOR è richiesto per la sintesi del DNA indotta da tutte e tre le oncoproteine tiroidee. Nell'insieme, queste osservazioni suggeriscono che, indipendentemente dalla presenza di mutazioni, mTOR potrebbe rappresentare un bersaglio farmacologico nei tumori tiroidei in cui i segnali dipendenti da mTOR e/o le vie di trasduzione del segnale ad esso correlate sono deregolati.

Tuttavia, studi clinici effettuati su altri tipi tumorali, usando inibitori di mTOR in monoterapia, si sono rivelati poco soddisfacenti (79).

Questo potrebbe esserere dovuto:

- all'effetto citostatico della rapamicina o dei suoi analoghi:
- alla presenza di meccanismi di resistenza intrinseci o acquisiti (80):
- all'assenza di predittori genetici o biochimici di sensibilità al farmaco, fatta eccezione per la perdita di funzione di PTEN (62, 65, 66, 71, 81) che sembra essere associata ad una efficace risposta farmacologica. Tuttavia, alcune cellule con PTEN non mutato potrebbero essere ugualmente sensibili all'effetto inibitorio della rapamicina. Ciò suggerisce che altre anomalie genetiche e/o molecolari potrebbero influenzare la risposta al farmaco .

Nel nostro studio l'unica linea cellulare (FTC-133), con delezione in omozigosi di PTEN, è risultata assai sensibile al trattamento con la rapamicina in monoterapia. La perdita di funzione di PTEN de-reprime il segnale PI3K/Akt inducendo di conseguenza iperattivazione del segnale mediato da mTOR. Ci si dovrebbe, pertanto, aspettare che tutte le condizioni che determinano iperattivazione dell'asse dipendente da PI3K causino una elevata sensibilità al trattamento con la rapamicina. Tuttavia, nel nostro studio, le cellule OCUT-1, caratterizzate da una mutazione costitutiva che attiva la sub-unità catalitica di PI3K, si è mostrata relativamente insensibile all'inibizione di mTOR.

Inoltre, mutazioni a carico delle oncoproteine tiroidee RET/PTC, HRAS e BRAF non si sono rivelate degli ottimi predittori di risposta efficace al trattamento con la rapamicina in monoterapia.

Sulla base di tali risultati e dei dati di letteratura, abbiamo ritenuto ragionevole valutare l'effetto della terapia combinata con inibitori di mTOR e/o Mek e/o AKT1/2 sulla crescita cellulare tumorale tiroidea.

I dati da noi ottenuti hanno evidenziato che il trattamento combinato, in alcuni casi, si mostra più efficace rispetto alla monoterapia. Questo risultato è stato principalmente riscontrato nelle cellule dipendenti, per la loro crescita, da più vie di trasduzione del segnale. Viceversa, nessun effetto sinergico è stato osservato nelle cellule dipendenti da una sola via di trasduzione del segnale. Pertanto, in accordo con la teoria “ dell’oncogene addiction”, la contemporanea disattivazione di più di una via di segnale potrebbe essere richiesta al fine di raggiungere effetti terapeutici benefici massimali, almeno in quelle cellule tumorali nelle quali più vie di segnale concorrono a conferire dipendenza per la crescita e la sopravvivenza. Dato che, di frequente, le vie di traduzione del segnale, MAPK e PI3-K, sono deregolate nei tumori tiroidei ed entrambe le vie convergono sul comune effettore mTOR, l’applicazione di tecnologie terapeutiche multiple, mirate alla disattivazione contemporanea di specifici segnali o effettori, potrebbe rivelarsi particolarmente utile nelle forme tumorali più aggressive e resistenti alle comuni terapie farmacologiche.

## LEGENDA DELLE FIGURE

**Figura1: nelle cellule tiroidee di ratto PCCL3 la crescita, dipendente da cAMP/TSH, richiede mTOR attraverso la via di segnale mediata da PKA.**

(A) le cellule PCCL3 sono state cresciute in mezzo (H4) contenente TSH, insulina, idrocortisone, apotransferrina o in mezzo privo di TSH (mezzo H3). 24 ore dopo l'impianto, sono stati aggiunti nel mezzo di coltura 8Br-cAMP (1mM) e/o rapamicina (20nM) e/o KT5720 (10mM). I dati rappresentano la media  $\pm$  SE di conte cellulari effettuate, in triplicato, ai tempi indicati, dopo aver sottratto il numero di cellule impiantate (giorno 0).

(B **pannello di sinistra**): Le cellule sono state impiantate in dischi da 60mm e cresciute in mezzo H4. Il giorno successivo all'impianto il mezzo è stato sostituito con mezzo H3 per 48 ore e, successivamente, con mezzo privo insulina e siero (ma contenente BSA allo 0,1%) per altre 24 ore. Le cellule sono state, quindi, trattate per 60 minuti con 8Br-cAMP (1mM) da solo o preceduto da un trattamento di 30 minuti con KT5720 a differenti dosi.

(B **pannello di destra**): Le cellule sono state mantenute in coltura in mezzo H4 in presenza di FBS al 5%. Dopo 24 ore dall'impianto, le cellule sono state incubate con diverse concentrazioni di KT5720.

(C **pannello di sinistra**): Le cellule sono state mantenute nelle stesse condizioni di coltura descritte in B (pannello di destra). La rapamicina (20nM) e/o l'inibitore U0126 (25 $\mu$ M), sono stati aggiunti al mezzo di coltura 30 minuti prima dell'esposizione all'8br-cAMP.

(C **pannello di destra**): Le cellule sono state mantenute nelle stesse condizioni di coltura descritte in B (pannello di sinistra) e trattate per 60 minuti con 8Br-cAMP in presenza (+) o in assenza (-) di un pretrattamento per 30 minuti con rapamicina (20nM) e/o con l'inibitore di Akt1/2/ (1 $\mu$ M). I lisati cellulari proteici sono stati sottoposti ad analisi Western Blot per la valutazione dei livelli di espressione delle proteine indicate.

**Figura 2: effetto di cAMP sulla crescita cellulare e sull'attivazione di mTOR in linee cellulari di carcinoma tiroideo umano**

(A) le linee cellulari indicate sono state impiantate in triplicato, in condizioni di coltura standard. Il giorno dopo sono state incubate con l'8Br-cAMP (1mM) o con

DMSO (0,1%). Le cellule sono state, quindi, contate ai tempi indicati. I dati rappresentano la media $\pm$  SE.

(B) le cellule indicate sono state impiantate in dischi da 60mm e cresciute in mezzo contenente normali concentrazioni di siero (pannello di sinistra) o BSA allo 0,1% (pannello di destra). Dopo 48 ore dall'impianto, le cellule sono state incubate con 8Br-cAMP (1mM) per 1 ora e processate per ottenere i corrispettivi lisati proteici. Quest'ultimi sono stati sottoposti ad analisi Western Blot per la valutazione dei livelli di espressione delle proteine indicate.

**Figura 3: la rapamicina inibisce la sintesi del DNA indotta dalle oncoproteine RET/PTC3, HRAS<sup>G12V</sup> e BRAF<sup>V600E</sup> nelle cellule tiroidee di ratto PCCL3.**

Le cellule PCCL3 sono state cresciute dapprima in mezzo H4 e dopo 24 ore in mezzo H3 contenente differenti concentrazioni di siero, per una durata complessiva di 3 giorni. Le cellule sono state, quindi, incubate con 10mg/mL di BrdU per 24 ore in presenza o meno di doxiciclina (1 $\mu$ g/mL) e in presenza o meno di rapamicina (20nM) per 24 ore. L'incorporazione della BrdU è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica come descritto nel paragrafo "Materiali e Metodi". I dati rappresentano la media $\pm$  SE. \*p< 0.05; \*\* p< 0.01; \*\*\* p< 0.001; § p>0.5.

**Figura 4: contributo di Mek e Akt1/2 sull'attivazione di mTOR indotta da RET/PTC3, HRAS<sup>G12V</sup> e BRAF<sup>V600E</sup> nelle cellule tiroidee di ratto PCCL3.**

Le cellule PCCL3 sono state impiantate in dischi da 60 mm e cresciute in mezzo H4. Il giorno successivo all'impianto il mezzo è stato rimosso e sostituito con mezzo privo di TSH per 48 ore e, successivamente, con mezzo privo di insulina e siero (ma contenente 0.1% di BSA) per altre 24 ore. Le cellule sono state, quindi, incubate per 24 ore con doxiciclina (1mg/mL) e successivamente con la rapamicina (20nM per 2 ore), da sola o in associazione con un pretrattamento di 30 minuti con U0126 (25 $\mu$ M) e/o con l'inibitore di Akt1/2 (1 $\mu$ M). I lisati proteici (30  $\mu$ g) sono stati analizzati mediante Western Blot con gli anticorpi indicati.

**Figura 5: effetto della rapamicina sulla crescita di linee cellulari di carcinoma tiroideo umano.**

Le cellule indicate sono state impiantate in piastre a sei pozzetti in condizioni di coltura standard. Il giorno seguente all'impianto, al mezzo di crescita sono stati

aggiunti la rapamicina (20nM) o il solvente DMSO (0,1%). Le cellule sono state contate ai tempi indicati come descritto nei Materiali e Metodi. I dati rappresentano le conte cellulari espresse come percentuale rispetto alle cellule non trattate, dopo aver sottratto il numero di cellule impiantate al giorno (0). Le cellule sensibili al trattamento con la rapamicina sono state arbitrariamente definite come quelle la cui crescita ha subito una inibizione > del 50%, dopo 6 giorni di esposizione al farmaco (colonne in bianco). Le colonne nere, invece, indicano le cellule poco sensibili alla rapamicina (inibizione della crescita <50%).

**Figura 6: effetto della contemporanea inibizione di mTOR, Mek ed Akt1/2 sulla crescita cellulare e sulla fosforilazione della proteina rS6 in linee cellulari di carcinoma tiroideo umano.**

(A) Le cellule indicate sono state impiantate in piastre a sei pozzetti in condizioni di coltura standard. Il giorno dopo, sono state incubate con rapamicina (20nM) o con AZD6244 (500nM) o con l'inibitore di Akt1/2 (1 $\mu$ M) in monoterapia o in combinazione a dosi corrispondenti alla loro IC50.

I dati rappresentano la media $\pm$  SE di conte cellulari eseguite in triplicato, ai tempi indicati, dopo aver sottratto il numero di cellule impiantate al giorno (0).

(B) Le cellule indicate sono state impiantate in dischi da 60mm e cresciute in condizioni standard. Il giorno successivo all'impianto, il mezzo è stato sostituito con mezzo contenente BSA allo 0,1% e privo di siero bovino fetale. Dopo 48 ore, il DMSO (0,1%) o la rapamicina (20nM) o l'U0126 (25 $\mu$ M) o l'inibitore di Akt1/2 (1 $\mu$ M), da soli o in combinazione, sono stati aggiunti al mezzo di coltura per 2 ore. I lisati proteici (30  $\mu$ g) sono stati analizzati mediante Western Blot per la valutazione dell'espressione delle proteine indicate.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. **Kondo T, Ezzat S, Asa SL** 2006 Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6:292-306
2. **Franceschi S, Boyle P, Maisonneuve P, La Vecchia C, Burt AD, Kerr DJ, MacFarlane GJ** 1993 The epidemiology of thyroid carcinoma. *Crit Rev Oncog* 4:25-52
3. **Arnbjornsson E, Arnbjornsson A, Olafsson A** 1986 Thyroid cancer incidence in relation to volcanic activity. *Arch Environ Health* 41:36-40
4. **Segev DL, Umbricht C, Zeiger MA** 2003 Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol* 12:69-90
5. **Moretti F, Nanni S, Pontecorvi A** 2000 Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14:517-539
6. **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL** 2001 Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111
7. **Frauman AG, Moses AC** 1990 Oncogenes and growth factors in thyroid carcinogenesis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 19:479-493
8. **Duh QY, Siperstein AE, Miller RA, Sancho JJ, Demeure MJ, Clark OH** 1990 Epidermal growth factor receptors and adenylate cyclase activity in human thyroid tissues. *World J Surg* 14:410-417; discussion 418
9. **Dumont JE, Maenhaut C, Pirson I, Baptist M, Roger PP** 1991 Growth factors controlling the thyroid gland. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 5:727-754
10. **Lamy F, Taton M, Dumont JE, Roger PP** 1990 Control of protein synthesis by thyrotropin and epidermal growth factor in human thyrocytes: role of morphological changes. *Mol Cell Endocrinol* 73:195-209
11. **Soares P, Maximo V, Sobrinho-Simoes M** 2003 Molecular pathology of papillary, follicular and Hurthle cell carcinomas of the thyroid. *Arkh Patol* 65:45-47
12. **Puxeddu E, Fagin JA** 2001 Genetic markers in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30:493-513, x
13. **Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA** 2003 High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63:1454-1457
14. **Hunter T, Pines J** 1991 Cyclins and cancer. *Cell* 66:1071-1074
15. **Ito Y, Kobayashi T, Takeda T, Komoike Y, Wakasugi E, Tamaki Y, Tsujimoto M, Matsuura N, Monden M** 1996 Expression of p21 (WAF1/CIP1) protein in clinical thyroid tissues. *Br J Cancer* 74:1269-1274
16. **Zou M, Shi Y, Farid NR, al-Sedairy ST** 1998 Inverse association between cyclin D1 overexpression and retinoblastoma gene mutation in thyroid carcinomas. *Endocrine* 8:61-64
17. **Basolo F, Caligo MA, Pinchera A, Fedeli F, Baldanzi A, Miccoli P, Iacconi P, Fontanini G, Pacini F** 2000 Cyclin D1 overexpression in thyroid carcinomas: relation with clinico-pathological parameters, retinoblastoma gene product, and Ki67 labeling index. *Thyroid* 10:741-746
18. **Wang S, Lloyd RV, Hutzler MJ, Safran MS, Patwardhan NA, Khan A** 2000 The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in the progression of thyroid cancer. *Mod Pathol* 13:882-887

19. **Farid NR** 1996 Molecular pathogenesis of thyroid cancer: the significance of oncogenes, tumor suppressor genes, and genomic instability. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104 Suppl 4:1-12
20. **Gimm O** 2001 Thyroid cancer. *Cancer Lett* 163:143-156
21. **Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP** 1993 High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 91:179-184
22. **Espinosa AV, Porchia L, Ringel MD** 2007 Targeting BRAF in thyroid cancer. *Br J Cancer* 96:16-20
23. **Chiloeches A, Marais R** 2006 Is BRAF the Achilles' Heel of thyroid cancer? *Clin Cancer Res* 12:1661-1664
24. **Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, Faviana P, Mannavola D, Moretti S, Rossi S, Sculli M, Bottici V, Beck-Peccoz P, Pacini F, Pinchera A, Santeusanio F, Elisei R** 2006 Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer* 13:455-464
25. **Halachmi N, Halachmi S, Evron E, Cairns P, Okami K, Saji M, Westra WH, Zeiger MA, Jen J, Sidransky D** 1998 Somatic mutations of the PTEN tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 23:239-243
26. **Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, Wang Y, Trink A, El-Naggar AK, Tallini G, Vasko V, Xing M** 2007 Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 13:1161-1170
27. **Bjornsti MA, Houghton PJ** 2004 The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:335-348
28. **Sharma SV, Settleman J** 2007 Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev* 21:3214-3231
29. **Weinstein IB, Joe AK** 2006 Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3:448-457
30. **Sebolt-Leopold JS, English JM** 2006 Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature* 441:457-462
31. **Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L** 2001 Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792
32. **Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H** 2002 Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347:472-480
33. **Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, Gathmann I, Bolton AE, van Hoomissen IC, Goldman JM, Radich JP** 2003 Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 349:1423-1432

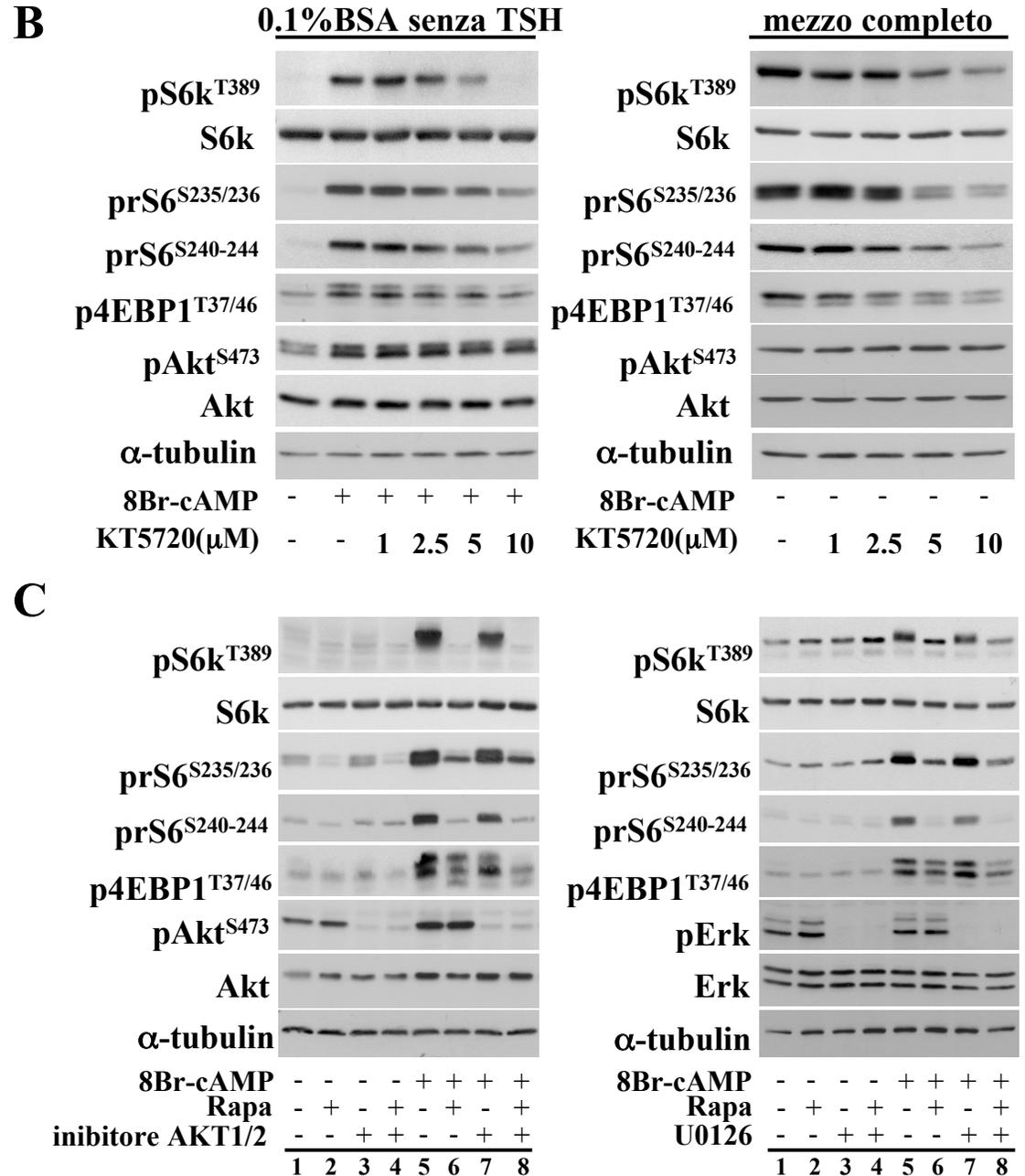
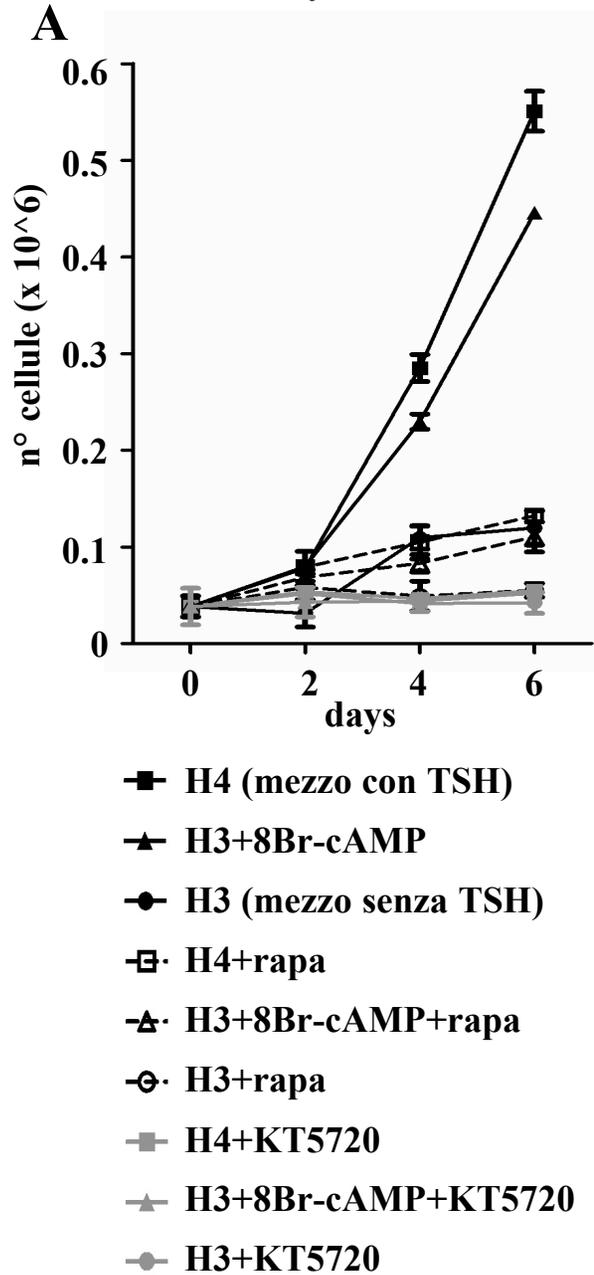
34. **Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS** 2005 Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23:792-799
35. **Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA** 2003 A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 349:427-434
36. **Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E** 2004 Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-345
37. **Baselga J, Trigo JM, Bourhis J, Tortochaux J, Cortes-Funes H, Hitt R, Gascon P, Amellal N, Harstrick A, Eckardt A** 2005 Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 23:5568-5577
38. **Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA** 2004 Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129-2139
39. **Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, Seymour L** 2005 Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353:123-132
40. **Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J** 2008 Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359:378-390
41. **Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S** 2006 Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5:835-844
42. **Stadler WM** 2005 Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 104:2323-2333
43. **Weinstein IB** 2002 Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 297:63-64
44. **Jonkers J, Berns A** 2004 Oncogene addiction: sometimes a temporary slavery. *Cancer Cell* 6:535-538
45. **Rivas M, Santisteban P** 2003 TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* 213:31-45

46. **Vandeput F, Perpete S, Coulonval K, Lamy F, Dumont JE** 2003 Role of the different mitogen-activated protein kinase subfamilies in the stimulation of dog and human thyroid epithelial cell proliferation by cyclic adenosine 5'-monophosphate and growth factors. *Endocrinology* 144:1341-1349
47. **Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grunewald K, Feichtinger H, Duh QY, Clark OH, Kawasaki E, Bourne HR, et al.** 1990 Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science* 249:655-659
48. **Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J, Vassart G** 1993 Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 365:649-651
49. **Cass LA, Meinkoth JL** 1998 Differential effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on p70 ribosomal S6 kinase. *Endocrinology* 139:1991-1998
50. **Cass LA, Meinkoth JL** 2000 Ras signaling through PI3K confers hormone-independent proliferation that is compatible with differentiation. *Oncogene* 19:924-932
51. **Cass LA, Summers SA, Prendergast GV, Backer JM, Birnbaum MJ, Meinkoth JL** 1999 Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. *Mol Cell Biol* 19:5882-5891
52. **Dann SG, Selvaraj A, Thomas G** 2007 mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol Med* 13:252-259
53. **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM** 2005 Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-1101
54. **Manning BD** 2004 Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J Cell Biol* 167:399-403
55. **Manning BD, Logsdon MN, Lipovsky AI, Abbott D, Kwiatkowski DJ, Cantley LC** 2005 Feedback inhibition of Akt signaling limits the growth of tumors lacking Tsc2. *Genes Dev* 19:1773-1778
56. **Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP** 2008 Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 118:3065-3074
57. **Kinkade CW, Castillo-Martin M, Puzio-Kuter A, Yan J, Foster TH, Gao H, Sun Y, Ouyang X, Gerald WL, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C** 2008 Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J Clin Invest* 118:3051-3064
58. **Miyakawa M, Tsushima T, Murakami H, Wakai K, Isozaki O, Takano K** 2003 Increased expression of phosphorylated p70S6 kinase and Akt in papillary thyroid cancer tissues. *Endocr J* 50:77-83
59. **Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simoes M** 2003 BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22:4578-4580
60. **Garcia-Rostan G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, Herrero A, Fusco A, Cameselle-Teijeiro J, Santoro M** 2005 Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res* 65:10199-10207

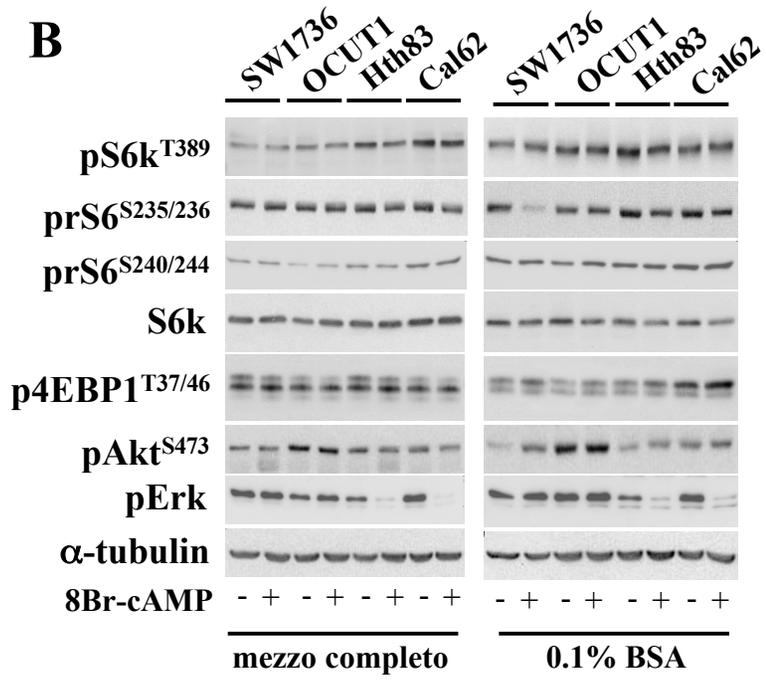
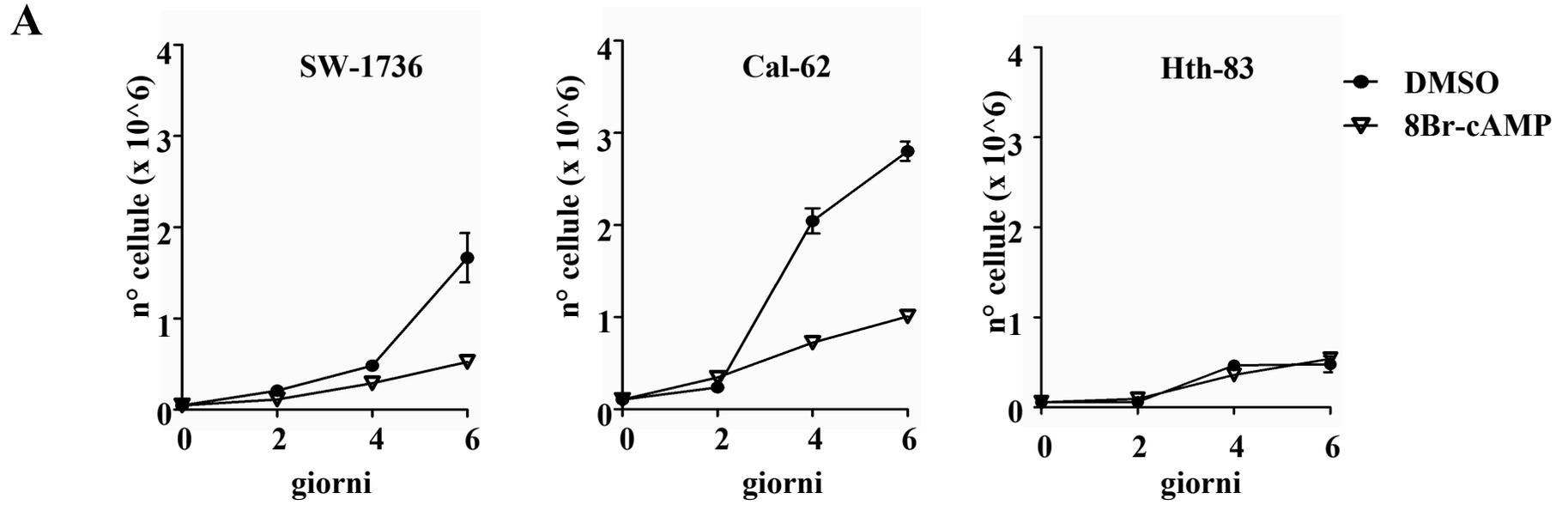
61. **Dilling MB, Germain GS, Dudkin L, Jayaraman AL, Zhang X, Harwood FC, Houghton PJ** 2002 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. *J Biol Chem* 277:13907-13917
62. **Noh WC, Mondesire WH, Peng J, Jian W, Zhang H, Dong J, Mills GB, Hung MC, Meric-Bernstam F** 2004 Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 10:1013-1023
63. **O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N** 2006 mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 66:1500-1508
64. **Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM** 2006 Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22:159-168
65. **Shi Y, Gera J, Hu L, Hsu JH, Bookstein R, Li W, Lichtenstein A** 2002 Enhanced sensitivity of multiple myeloma cells containing PTEN mutations to CCI-779. *Cancer Res* 62:5027-5034
66. **Yu K, Toral-Barza L, Discafani C, Zhang WG, Skotnicki J, Frost P, Gibbons JJ** 2001 mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8:249-258
67. **Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr., Zhang L, Fagin JA** 2005 Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res* 65:2465-2473
68. **Wang J, Knauf JA, Basu S, Puxeddu E, Kuroda H, Santoro M, Fusco A, Fagin JA** 2003 Conditional expression of RET/PTC induces a weak oncogenic drive in thyroid PCCL3 cells and inhibits thyrotropin action at multiple levels. *Mol Endocrinol* 17:1425-1436
69. **Shirokawa JM, Elisei R, Knauf JA, Hara T, Wang J, Saavedra HI, Fagin JA** 2000 Conditional apoptosis induced by oncogenic ras in thyroid cells. *Mol Endocrinol* 14:1725-1738
70. **Blancquaert S, Wang L, Paternot S, Coulonval K, Dumont JE, Harris TE, Roger PP** cAMP-dependent activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) in thyroid cells. Implication in mitogenesis and activation of CDK4. *Mol Endocrinol* 24:1453-1468
71. **Neshat MS, Mellinshoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, Frost P, Gibbons JJ, Wu H, Sawyers CL** 2001 Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10314-10319
72. **Brewer C, Yeager N, Di Cristofano A** 2007 Thyroid-stimulating hormone initiated proliferative signals converge in vivo on the mTOR kinase without activating AKT. *Cancer Res* 67:8002-8006
73. **Coulonval K, Vandeput F, Stein RC, Kozma SC, Lamy F, Dumont JE** 2000 Phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B and ribosomal S6 kinases in the stimulation of thyroid epithelial cell proliferation by cAMP and growth factors in the presence of insulin. *Biochem J* 348 Pt 2:351-358
74. **Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP** 2001 Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 22:631-656

75. **Yeager N, Brewer C, Cai KQ, Xu XX, Di Cristofano A** 2008 Mammalian target of rapamycin is the key effector of phosphatidylinositol-3-OH-initiated proliferative signals in the thyroid follicular epithelium. *Cancer Res* 68:444-449
76. **Uyttersprot N, Allgeier A, Baptist M, Christophe D, Coppee F, Coulonval K, Deleu S, Depoortere F, Dremier S, Lamy F, Ledent C, Maenhaut C, Miot F, Panneels V, Parma J, Parmentier M, Pirson I, Pohl V, Roger P, Savonet V, Taton M, Tonacchera M, van Sande J, Wilkin F, Vassart G, et al.** 1997 The cAMP in thyroid: from the TSH receptor to mitogenesis and tumorigenesis. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31:125-140
77. **Van Keymeulen A, Roger PP, Dumont JE, Dremier S** 2000 TSH and cAMP do not signal mitogenesis through Ras activation. *Biochem Biophys Res Commun* 273:154-158
78. **Yeager N, Klein-Szanto A, Kimura S, Di Cristofano A** 2007 Pten loss in the mouse thyroid causes goiter and follicular adenomas: insights into thyroid function and Cowden disease pathogenesis. *Cancer Res* 67:959-966
79. **Faivre S, Kroemer G, Raymond E** 2006 Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5:671-688
80. **Huang S, Houghton PJ** 2001 Resistance to rapamycin: a novel anticancer drug. *Cancer Metastasis Rev* 20:69-78
81. **Podsypanina K, Lee RT, Politis C, Hennessy I, Crane A, Puc J, Neshat M, Wang H, Yang L, Gibbons J, Frost P, Dreisbach V, Blenis J, Gaciong Z, Fisher P, Sawyers C, Hedrick-Ellenson L, Parsons R** 2001 An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten<sup>+/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10320-10325

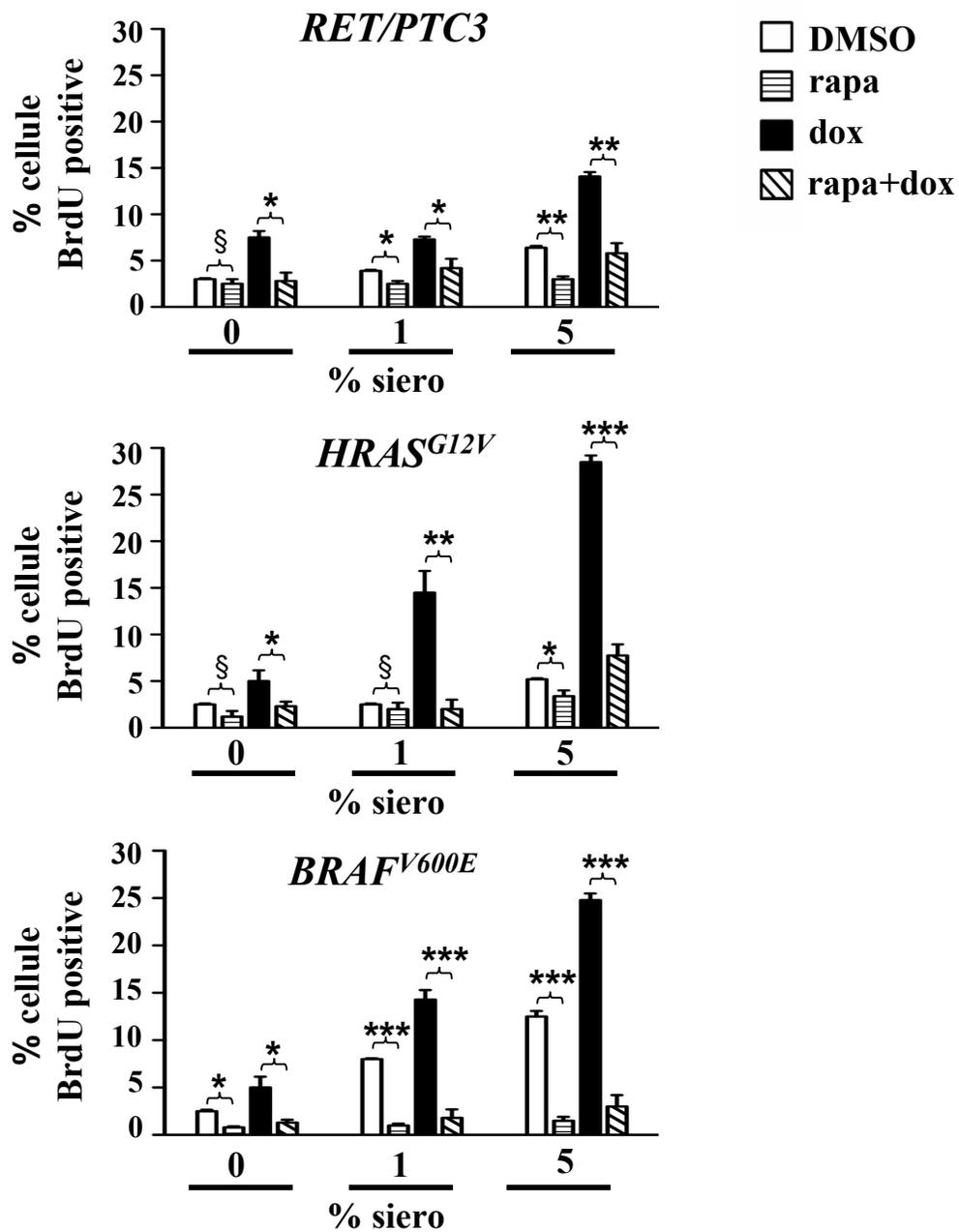
# Figura 1



**Figura 2**



**Figura 3**



# Figura 4

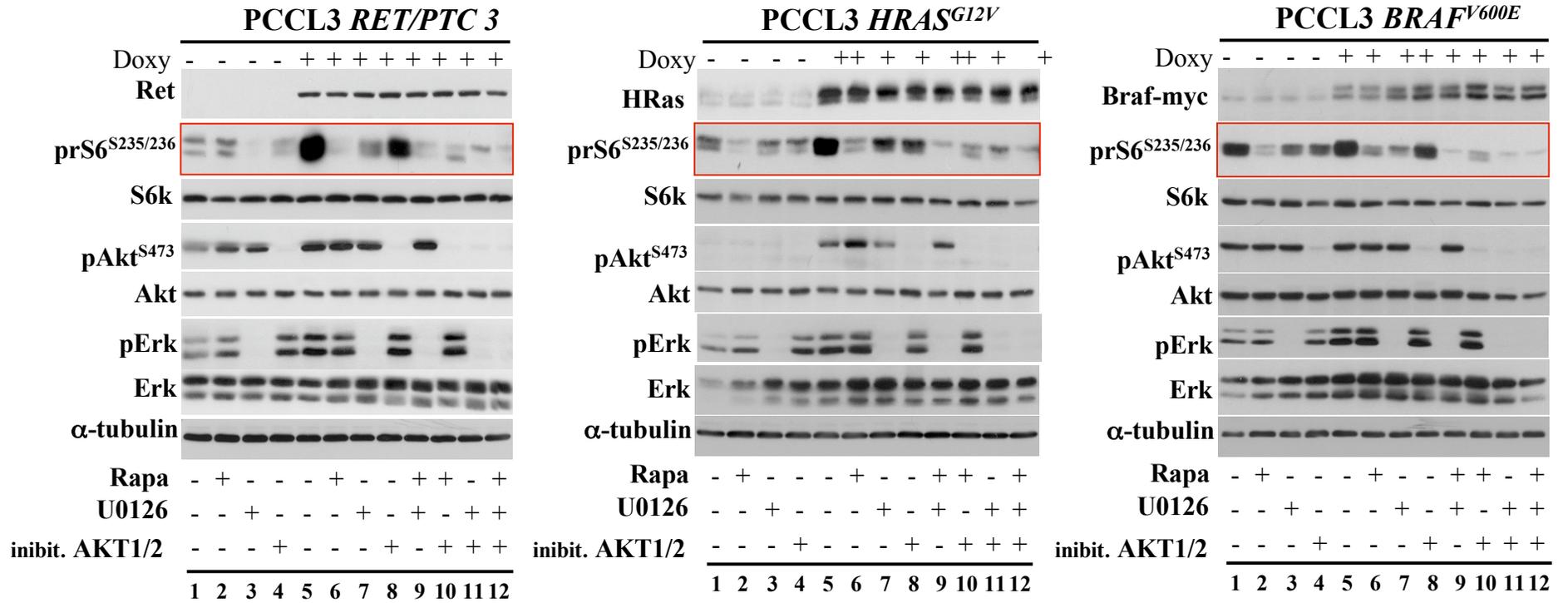
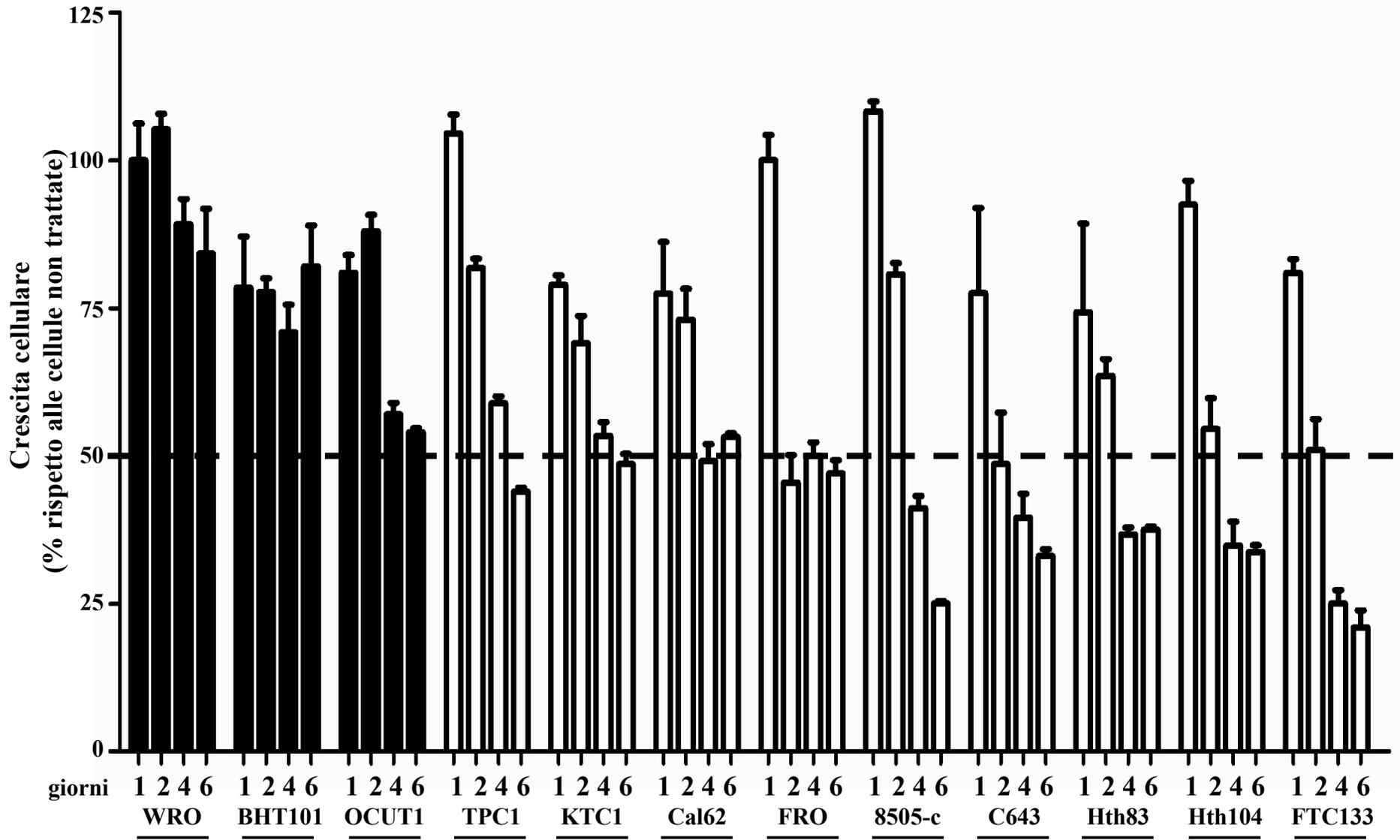
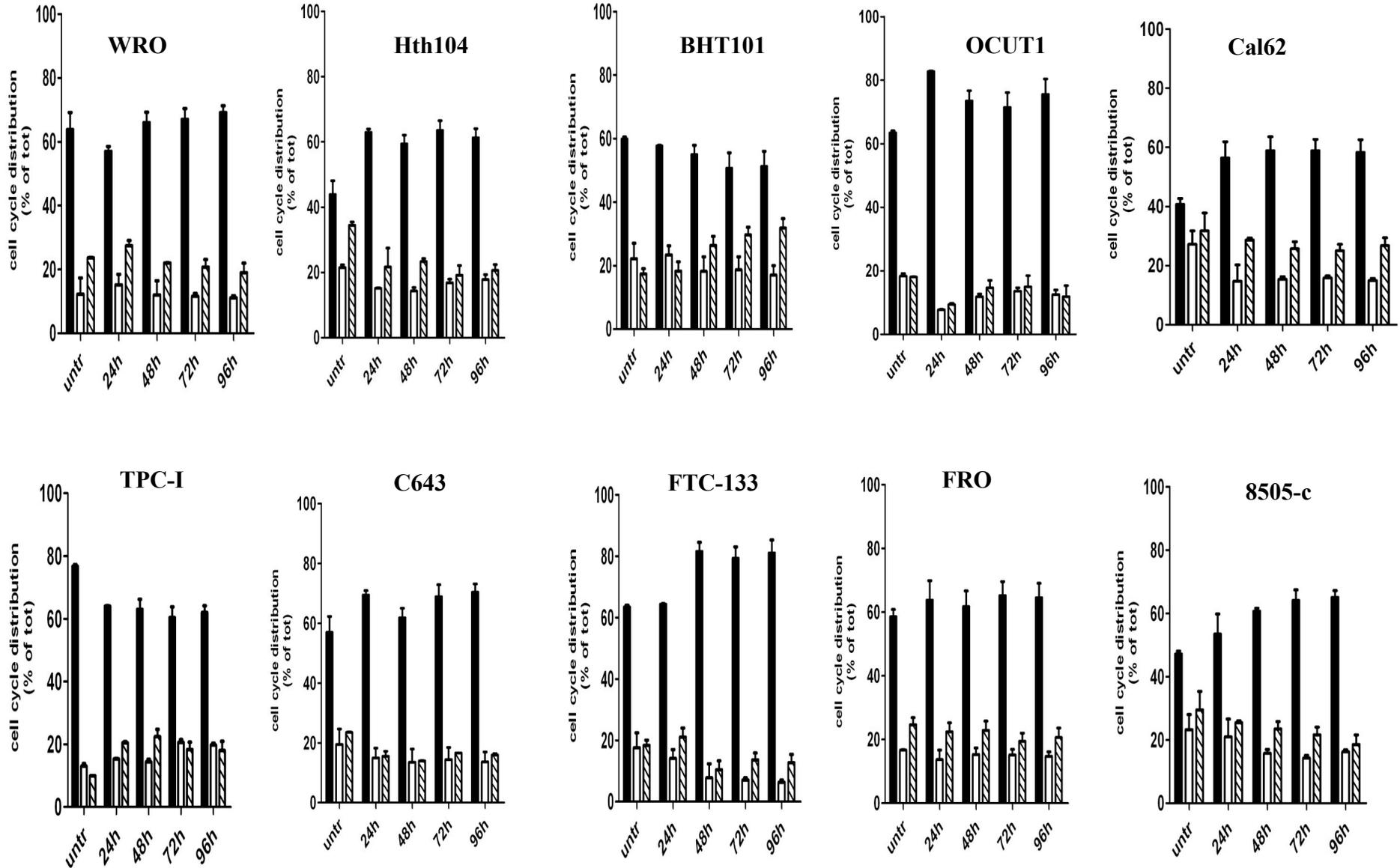


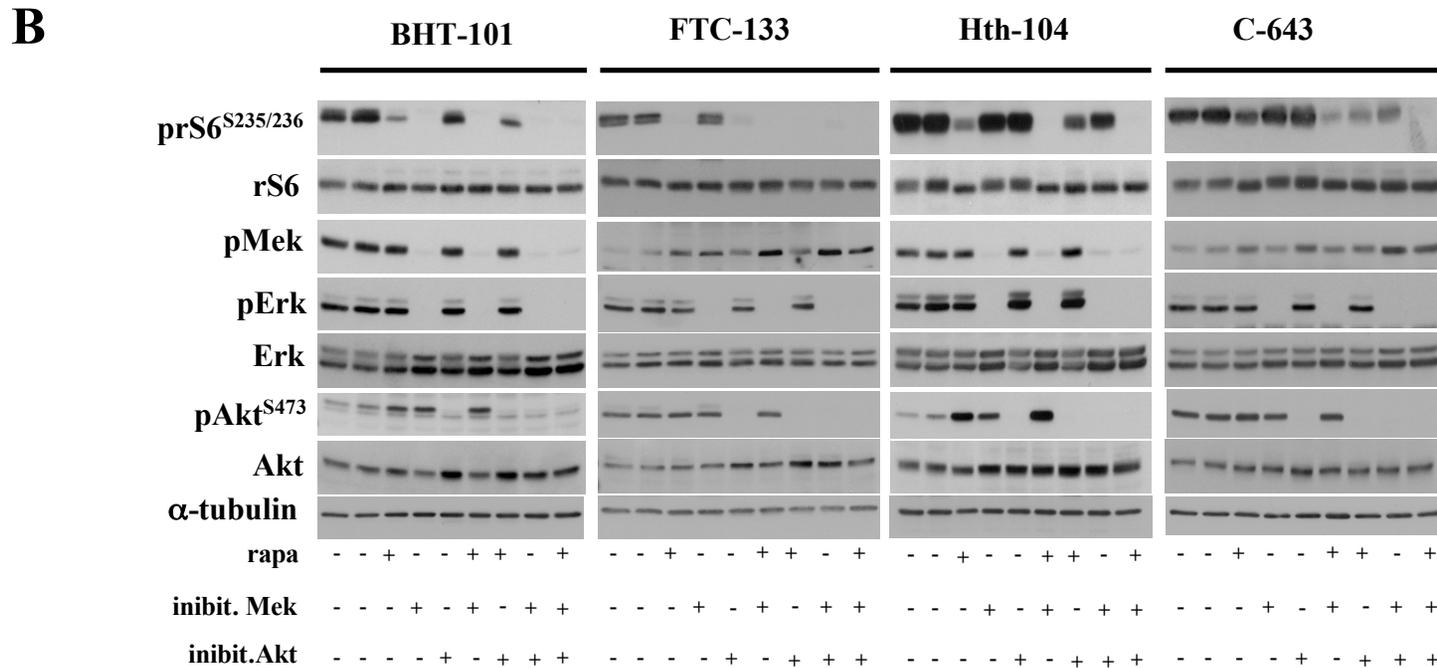
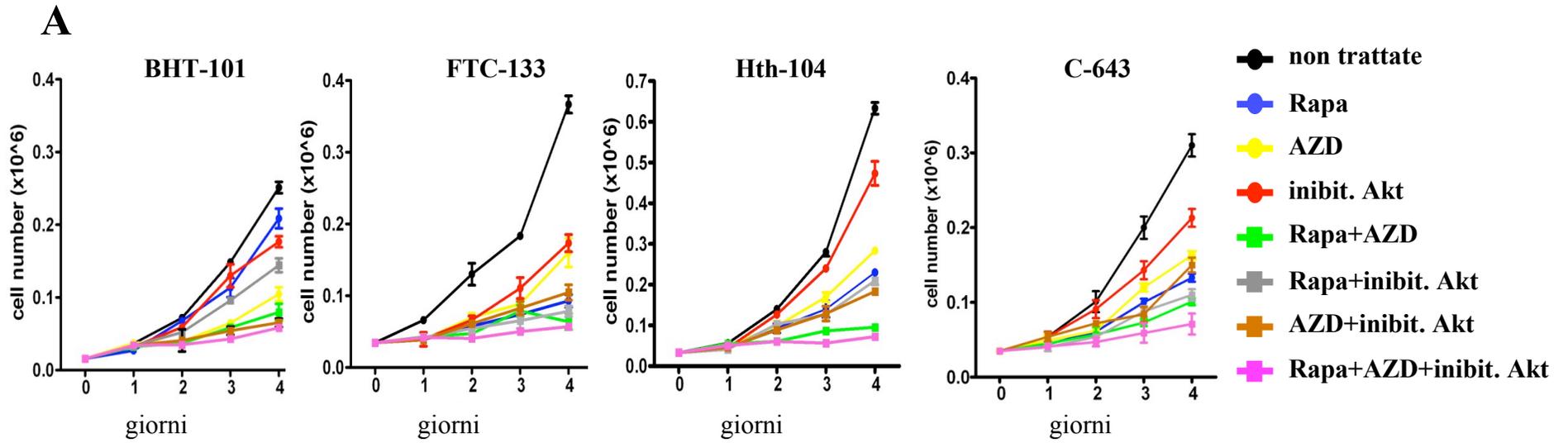
Figura 5A



# Figura 5B



## Figura 6



**Tabella 1: Alterazioni genetiche nelle differenti linee cellulari di tumore tiroideo umano usate in questo studio**

Linee cellulari	Geni							
	<i>PTEN</i> <sup>R130</sup>	<i>PIK3CA</i> <sup>H1047R</sup>	<i>AKT1</i>	<i>BRAF</i> <sup>V600E</sup>	<i>HRAS</i> <sup>G13R</sup>	<i>KRAS</i> <sup>G12R</sup>	<i>NRAS</i> <sup>Q61K</sup>	<i>RET/PTC1</i>
<b>BHT-101</b>	wt	wt	wt	+	wt	wt	wt	wt
<b>WRO</b>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<b>OCUT-I</b>	wt	+	wt	+	wt	wt	wt	wt
<b>TPC-I</b>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+
<b>8505-c</b>	wt	wt	wt	+	wt	wt	wt	wt
<b>KTC-1</b>	wt	wt	wt	+	wt	wt	wt	wt
<b>C-643</b>	nd	wt	wt	wt	+	wt	wt	wt
<b>Hth-83</b>	wt	wt	wt	wt	+	wt	wt	wt
<b>FTC-133</b>	+	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<b>Cal-62</b>	wt	wt	wt	wt	wt	+	wt	wt
<b>FRO</b>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<b>Hth-104</b>	wt	wt	wt	+	wt	wt	wt	wt

wt=wild type      nd=non determinato

Tesi dottorato in Scienze Endocrinologiche:  
 Basi molec. dell'azione ormonale  
 di Roberta Malaguarnera 