



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato di Ricerca

Scienze Endocrinologiche Metaboliche ed Andrologiche

XXIX Ciclo

Coordinatore: Prof. Andrea Lenzi

**Espressione del complesso della polarità cellulare PAR nei
carcinomi tiroidei differenziati e indifferenziati: correlazione
con parametri clinico-patologici**

Candidata

Dott.ssa Chiara Tuccilli

Matricola 1097554

Relatore

Prof. Massimino D'Armiento

Sommario

1	Introduzione	2
1.1	La polarità cellulare.....	2
1.2	Il complesso PAR.....	4
1.2.1	PARD3.....	5
1.2.2	aPKC.....	7
1.2.3	PARD6.....	8
1.2.4	Funzioni del complesso PAR	8
1.3	Polarità cellulare e cancro	15
1.3.1	Complesso PAR e cancro	20
1.4	I tumori della tiroide.....	23
1.4.1	Tumori papilliferi della tiroide	25
1.4.2	Tumori anaplastici della tiroide	27
1.5	Tumori della tiroide e alterazioni della polarità cellulare.....	28
2	Scopo della tesi	30
3	Materiali e Metodi.....	32
3.1	Tessuti e parametri clinico-patologici dei pazienti	32
3.2	Determinazione della mutazione <i>BRAF</i> ^{V600E}	33
3.3	Estrazione di RNA e analisi dell'espressione	33
3.4	Estrazione delle proteine e Western Blot.....	35
3.5	Analisi statistica	36
4	Risultati.....	38
4.1	Livelli di mRNA dei geni del complesso PAR.....	38
4.1.1	PTC.....	38
4.1.2	ATC	40
4.2	Correlazioni fra i livelli di mRNA dei vari geni analizzati.....	42
4.3	Livelli di proteina per il complesso PAR nei PTC.....	42
4.4	Correlazioni con i parametri clinico-patologici	43
5	Discussione	47
6	Bibliografia	51

1 Introduzione

1.1 La polarità cellulare

La polarità nel contesto biologico è definita come una distribuzione persistente e asimmetrica di strutture lungo un asse, ed è una proprietà essenziale di cellule, tessuti, organi e interi organismi (Cove, et al., 1999). Con riferimento alla polarità cellulare, essa si stabilisce e si mantiene a seguito di una ripartizione asimmetrica del citoscheletro, della localizzazione, e dell'attività delle proteine. Nelle cellule può stabilirsi la polarità nota come fronte-coda (*Front-Rear Polarity, FRP*), richiesta per il corretto svolgimento dei processi di migrazione che avvengono durante lo sviluppo, la riparazione delle ferite, l'autorinnovamento dei tessuti, o per assicurare lo svolgimento di particolari funzioni cellulari; oppure un diverso tipo di polarità, che si manifesta lungo l'asse apico-basale (*Apical-Basal Polarity, ABP*). Quest'ultimo è il tipo di polarità cellulare più ampiamente studiato, ed è una caratteristica peculiare delle cellule epiteliali ed endoteliali (Sebbagh & Borg, 2014). L'*ABP* forma due distinti compartimenti della membrana plasmatica e del citoplasma: apicale e basale. La regione apicale s'interfaccia con il lume, mentre quella basale è in contatto con la membrana basale e la zona vascolarizzata, in modo da creare le differenze morfo-funzionali necessarie per lo svolgimento delle specifiche funzioni cellulari.

La genesi e il mantenimento della polarità apico-basale sono resi possibili dall'interazione e dalla localizzazione subcellulare di tre complessi proteici evolutivamente conservati, CRUMBS (costituito dalle proteine CRUMBS-PALS1-PATJ), PAR (formato dalle proteine PAR3-PAR6-aPKC) e SCRIBBLE (i cui membri sono LGL-SCRIB-DLG). La funzione principale dei complessi della polarità è determinare e conservare l'identità dei differenti distretti delle cellule polarizzate, rispettivamente apicale, apico-laterale e basale. Si ritiene che

tali funzioni siano svolte attraverso interazioni reciproche fra i tre complessi, con le quali i complessi PAR e CRUMBS, che si co-localizzano nel dominio apicale delle cellule, cooperano per antagonizzare il complesso basolaterale SCRIBBLE (Bilder & Perrimon, 2000; Margolis & Borg, 2005; Suzuki & Ohno, 2006) **[Figura 1]**. I tre complessi partecipano anche alla formazione e alla stabilizzazione delle giunzioni cellulari strette (*Tight Junctions*, *TJs*) e aderenti (*Adherent Junctions*, *AJs*) che, connettendo le cellule polarizzate le une alle altre, svolgono a loro volta un ruolo nella preservazione della polarità apico-basale e nel mantenimento dell'omeostasi tissutale (Assémat, et al., 2008; Khursheed & Bashyam, 2014; Lee & Vasioukhlin, 2008; Lin, et al., 2015).

Nel corso degli ultimi trent'anni, il ruolo dei complessi della polarità cellulare è stato chiarito partendo dallo studio degli organismi modello *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*. Nel 1988 le proteine componenti il complesso PAR sono state identificate in embrioni di *C. elegans*, e valutate essenziali per la compartimentalizzazione dei determinanti precoci e per lo sviluppo della polarità (Kemphues, et al., 1988). Nel 1990, è stato scoperto il ruolo del complesso CRUMBS nel corretto assemblaggio della cuticola, degli epiteli e delle *TJs* negli embrioni di *D. melanogaster* (Tepass, et al., 1990). Nel 2000, un altro studio condotto su embrioni di *D. melanogaster* ha evidenziato il ruolo del complesso SCRIBBLE nel determinare e mantenere l'aspetto della cuticola embrionale, e come regolatore delle *AJs* (Bilder & Perrimon, 2000). Gli studi successivi, su organismi superiori, hanno consentito di far luce sulle funzioni molecolari e sulle interazioni, spesso mutualmente esclusive, dei tre complessi della polarità cellulare. La comprensione dei meccanismi con i quali i tre complessi stabiliscono l'*ABP* e partecipano allo sviluppo ha portato a considerare la polarità cellulare il prerequisito per l'organogenesi, ed essenziale per garantire l'omeostasi tissutale. Essa è un fenomeno cruciale per il corretto svolgimento di molti processi biologici, poiché regola la morfologia e le funzioni specializzate delle cellule, i segnali intracellulari, la divisione cellulare asimmetrica e la migrazione (Khursheed & Bashyam, 2014). Non sorprende che sia la trasformazione neoplastica sia la progressione

cancerosa siano state associate alla perdita della polarità cellulare e della coesività (*Loss Of cell Polarity/Cohesiveness, LOP/C*), al punto da considerarla un'impronta caratteristica del cancro (Royer & Lu, 2011). Inoltre, la *LOP/C* è stata collegata al fenomeno di transizione epitelio-mesenchimale (*Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT*), a sua volta strettamente connesso con lo sviluppo di metastasi (Royer & Lu, 2011).

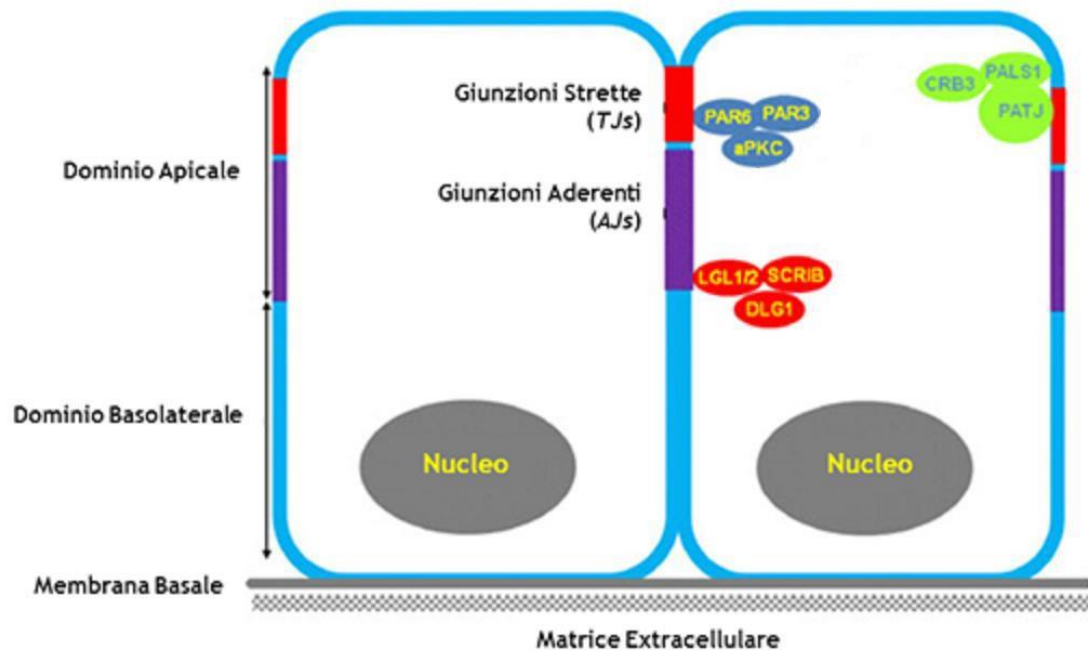


Figura 1. Localizzazione cellulare dei complessi della polarità in una cellula epiteliale. Immagine tratta e tradotta da Khursheed & Bashyam, 2014.

1.2 Il complesso PAR

Il complesso PAR (*PARtitioning defective*) è stato identificato per la prima volta negli embrioni di *C. elegans*, durante uno screening di mutanti letali a effetto materno. I suddetti mutanti non mostravano la polarità apico-basale, e ciò disturbava la divisione cellulare asimmetrica dei blastomeri durante le prime fasi della gastrulazione, portando alla formazione di uno schema corporeo difettivo. Furono scoperti sei geni responsabili dello sviluppo dei fenotipi osservati, chiamati PAR1-6 (Kemphues, et al., 1988). Negli anni successivi, fu scoperto che tre delle proteine identificate, note come PAR3, PAR6 e

aPKC, formavano un complesso denominato PAR. In seguito, fu dimostrato che l'interazione PAR3-aPKC è richiesta per la divisione cellulare asimmetrica durante le fasi precoci di embriogenesi in *C. elegans* (Etemad-Moghadam, et al., 1995; Tabuse, et al., 1998). Successivamente, fu comprovato che nei mammiferi la co-localizzazione nella regione anteriore delle cellule epiteliali di PARD6 e PARD3, e la successiva formazione delle *TJs*, dipendevano dall'attività del dimero PARD6-aPKC, a sua volta subordinata all'interazione fra PARD6 e CDC42, una piccola GTPasi della famiglia RHO (Joberty, et al., 2000). In sintesi, l'interazione di PAR6 con aPKC è costitutiva, mentre quella di PAR3 al suddetto dimero è mediata e stabilizzata dalla presenza di aPKC, e non è necessaria per tutti i processi della polarità. L'estrusione di PAR3 dal complesso avviene a seguito della fosforilazione da parte di aPKC (Ellenbroek, et al., 2012; Horokishi, et al., 2009; Nagai-Tamai, et al., 2002; Suzuki, et al., 2001). È stato, inoltre, riportato che l'associazione di PAR3 con aPKC può inibire l'attività di quest'ultima (Lin, et al., 2000; Lin, et al., 2015).

Il complesso PAR è stato evolutivamente conservato fino ai mammiferi, nei quali sono presenti geni paraloghi codificanti forme diverse di ciascuna proteina appartenente al complesso: *aPKC λ /i*, *aPKC ζ* , *PARD3 α* , *PARD3 β* , *PARD6 α* , *PARD6 β* e *PARD6 γ* . Nei mammiferi, la nomenclatura dei geni e delle rispettive proteine del complesso acquista la lettera "D" finale. Le varie forme sono espresse con livelli differenti nei tessuti adulti e durante lo sviluppo embrionale (Lin, et al., 2000; Louvet-Vallee, et al., 2005; Vinot, et al., 2004; Vinot, et al., 2005).

1.2.1 PARD3

Nei mammiferi esistono due geni codificanti forme diverse della proteina PARD3, α e β , rispettivamente localizzati in posizione 10p11.21 e 2q33.3 nel genoma umano. Il messaggero prodotto dal gene *PARD3 α* è sottoposto a *splicing* alternativo, e vengono generate diverse isoforme della proteina. Tutte le isoforme contengono un dominio N-

terminale di omodimerizzazione (CR1), tre domini PDZ (CR2), e una regione di legame ad aPKC (CR3), che manca nell'isoforma più corta **[Figura 2]**. I domini PDZ sono strutture modulari costituite da 6 beta-filamenti e 2 alfa-eliche che riconoscono gli amminoacidi C-terminali (almeno 4) delle proteine in modo sequenza specifico. Il primo dominio PDZ consente a PARD3 di interagire con PARD6 (Assémat, et al., 2008).

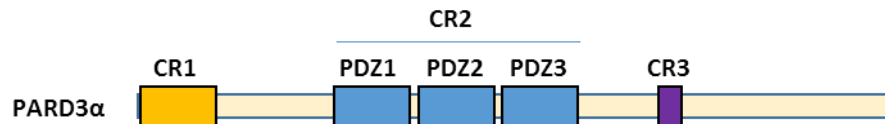


Figura 2. Struttura dell'isoforma più lunga di PARD3α. Nell'isoforma più corta non è presente il dominio CR3, di legame ad aPKC.

La proteina PARD3α si localizza prevalentemente a livello delle *TJs*, che essa stessa contribuisce a formare. Il legame di PARD3α al dimero aPKC-PARD6 è dinamico e non necessariamente richiesto per tutti i processi governati dalla polarità cellulare. La fosforilazione di PARD3α aPKC-dipendente può, infatti, espellere la proteina dal complesso ternario (Horokishi, et al., 2009).

Il gene *PARD3β* codifica anch'esso per una proteina che possiede tre domini PDZ e una regione omologa a quella di legame ad aPKC di PARD3α. La proteina PARD3β condivide la localizzazione con PARD3α ma, diversamente da quest'ultima, non interagisce con aPKC, e non è chiara l'interazione con PARD6 (Assémat, et al., 2008). Inoltre, proprio a causa della mancata interazione con aPKC, sembra non partecipare alla formazione delle *TJs*. Tale evidenza dimostra che la formazione del complesso ternario non è richiesta per la localizzazione. Probabilmente, PARD3β si localizza a livello delle *TJs* sfruttando il legame con le JAMs (*Junctional Adhesion Molecules*), come avviene per la forma *alpha* della proteina PARD3. Le JAMs sono proteine appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, e sono componenti delle giunzioni cellulari strette. (Assémat, et al., 2008;

Gao, et al., 2002; Kohjima, et al., 2002).

1.2.2 aPKC

La proteina aPKC (*atypical PKC*) è una Ser/Thr chinasi appartenente alla famiglia PKC (*Protein Kinase C*), la cui attivazione è indipendente dagli ioni calcio e dal diacilglicerolo (DAG). Nei mammiferi esistono due forme di aPKC che condividono il 70% di identità di sequenza: aPKC ζ e aPKC ι . La seconda forma è denominata *lambda* nel topo, e *iota* nell'uomo. Il gene che codifica aPKC ζ è localizzato in posizione 1p36.33-p36.2 del genoma umano, mentre il gene che codifica aPKC ι è localizzato in posizione 3q26.3 (Lin, et al., 2015).

Le due proteine paraloghe tradotte possiedono struttura simile: un dominio *N-terminale* *Phox/Bem1* (PB1) che interagisce con PARD6, una sequenza pseudosubstrato o regione autoinibitoria (PS), un dominio costituito da un singolo motivo *zinc-finger* ricco in cisteina (C1) che non risponde all'attivazione da parte degli esteri del forbolo, un dominio catalitico che lega l'ATP (Adenosina trifosfato) (C3), e un dominio chinasi *C-terminale*. Diversamente dalle altre chinasi della famiglia PKC, non possiedono il dominio C2 e ciò determina la non responsività della proteina agli ioni calcio e al DAG (Assémat, et al., 2008). L'attivazione dell'aPKC può avvenire mediante i fosfatidilinositoli, l'acido fosfatidico, l'acido arachidonico e il ceramide. La Trh410 nel loop di attivazione può essere fosforilata dall'enzima piruvato deidrogenasi chinasi 1 (PDK1) (Xiao & Liu, 2013). L'interazione con il fosfatidilinositolo (3,4,5) trifosfato (PIP3), invece, induce la chinasi aPKC a rimuovere l'autoinibizione e ad autofosforilare la Trh560 nel loop di attivazione. Sia PIP3 sia PDK1 sono necessarie per la completa attivazione e stabilizzazione dell'aPKC (Xiao & Liu, 2013) [Figura 3].

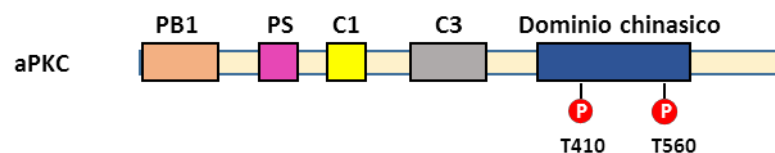


Figura 3. Struttura di aPKC, comune ad entrambe le forme della proteina. I residui di treonina indicati in figura sono quelli fosforilati per la completa attivazione della chinasi.

La localizzazione cellulare di aPKC ζ e aPKC ι è condivisa, e risiedono principalmente nel citoplasma, a ridosso della membrana apicale e delle *TJs*, in complesso con le proteine PAR.

1.2.3 *PARD6*

Nei mammiferi sono espresse tre proteine omologhe PARD6, codificate da tre geni diversi: *PARD6 α* , *PARD6 β* e *PARD6 γ* , localizzati nel genoma umano nelle posizioni 16q22.1, 20q13.13 e 18q23 rispettivamente.

Possiedono struttura conservata e presentano un dominio *N-terminale Phox/Bem1* (PB1), necessario per l'interazione con aPKC e PARD3, un dominio semi-CRIB d'interazione e legame con CDC42/RAC1, e un dominio PDZ (Noda, et al., 2001) **[Figura 4]**.



Figura 4. Struttura di PARD6, comune a tutte le forme della proteina.

Riguardo alla localizzazione subcellulare, PARD6 α è presente prevalentemente sia a livello delle *TJs* sia nel citoplasma; PARD6 β è localizzato prevalentemente nel citoplasma; PARD6 γ si concentra sulle *TJs* (Gao & Macara, 2004). Tuttavia, alcuni studi hanno descritto altre localizzazioni di PARD6 α e PARD6 γ ; in particolare, la prima è stata identificata sia negli *speckles* nucleari sia nel centrosoma, mentre la presenza della seconda è stata descritta nel centriolo madre delle cellule epiteliali (Cline & Nelson, 2007; Dormoy, et al., 2013). Come PARD3, PARD6 agisce come proteina ponte di aPKC, e il suo ruolo principale è quello di connettere la suddetta chinasi a PARD3 e agli altri suoi bersagli.

1.2.4 *Funzioni del complesso PAR*

La funzione principale del complesso PAR è determinare e mantenere il compartimento

apico-laterale delle cellule epiteliali, contribuendo alla polarizzazione apico-basale. Caratteristica peculiare di questo dominio cellulare nelle cellule epiteliali è la presenza delle giunzioni strette (*TJs*), che il complesso PAR contribuisce direttamente a formare e a stabilizzare. Le giunzioni cellulari, strette e aderenti, originano in un sito definito adesione primordiale (PA), nel quale si trovano tutte le molecole che costituiranno le strutture mature. Fra questi elementi molecolari vi sono le JAMs (*Junctional Adhesion Molecules*), che fanno parte delle *TJs*. Le JAMs sono legate dagli omodimeri PARD3 α , attraverso i domini PDZ (Ebnet, 2001; Itoh, et al., 2001). Una volta localizzata correttamente e stabilizzata, PARD3 α agisce come proteina ponte per aPKC e PARD6, avvicinandole alla regione di formazione delle *TJs* (Ebnet, 2001; Suzuki, et al., 2002). Mediante il dominio PB1, PARD6 lega aPKC formando un dimero inattivo (Yap & Kovacs, 2003) [Figura 5].

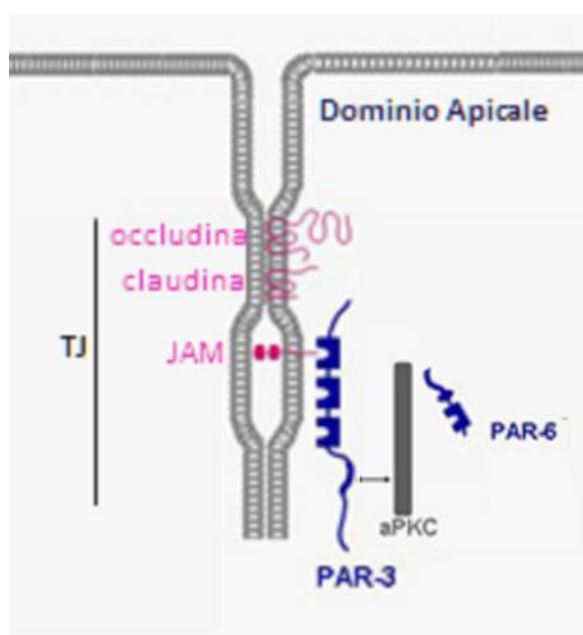


Figura 5. Ruolo del complesso PAR nella genesi di una giunzione cellulare stretta. In figura è rappresentata una giunzione stretta primordiale, e sono indicate le proteine costituenti la *TJ*: occludina, claudina e JAM. Per una maggiore chiarezza dell'immagine, le strutture delle proteine sono state disegnate solo in una delle due cellule. Al fine di formare la giunzione, PAR3 interagisce con le proteine JAM attraverso il dominio PDZ1, mentre con il dominio CR3 lega il dimero aPKC-PAR6 (attivo) attraverso la chinasi.

Il dimero aPKC-PARD6 si lega a PARD3 solo dopo l'attivazione, la quale dipende da un segnale per il differenziamento dei due tipi di giunzione. Il suddetto segnale parte dai contatti primordiali intercellulari fra le caderine e fra le nectine, entrambe componenti le *AJs*, che si stabiliscono nei siti PA. Tali contatti attivano la proteina CDC42 (una piccola GTPasi della famiglia RHO), considerata un membro aggiuntivo del complesso PAR poiché interagisce con PARD6 attraverso il dominio semi-CRIB. Quando CDC42 attivata (CDC42-GTP) lega PARD6, induce un cambiamento conformazionale che promuove la fosforilazione e l'attivazione di aPKC e, successivamente, il legame del dimero PARD6-aPKC con PARD3 (Yamanaka, et al., 2001). aPKC attiva PARD3 mediante fosforilazione sui residui di Ser827 e Ser829, e rinforza così la restrizione spaziale del complesso PAR a livello delle *TJs*, poiché PARD3 rimane più saldamente associata a queste (Hirose, et al., 2002; Suzuki, et al., 2002). Contemporaneamente, aPKC interviene sugli effettori a valle, che portano a compimento il processo di formazione della giunzione cellulare (Iden & Collard, 2008). PARD3 α rimane nel sito di origine delle *TJs* sia durante sia dopo la loro formazione, al fine di stabilizzarle. Per consentire il consolidamento delle *TJs* appena formate, PARD3 α lega TIAM-1 (*T-lymphoma invasion and metastasis*), l'attivatore di RAC1 (piccola GTPasi della famiglia RHO), lo localizza nel sito di formazione delle giunzioni e ne inibisce l'attività. L'inibizione di TIAM-1 regola negativamente e localmente l'attività di RAC1, la cui forma attiva è necessaria perché avvenga il contatto fra filamenti di actina e il sito di assemblaggio delle nuove *TJs*, affinché queste ultime possano formarsi. L'inibizione di RAC1, dunque, impedisce la creazione di nuovi contatti fra l'actina e le molecole costituenti la giunzione (Chen & Macara, 2005).

L'attività del complesso PAR nello stabilimento e nel mantenimento dell'*ABP* si esplica anche attraverso la capacità di aPKC di interagire con i membri degli altri complessi della polarità, al fine di localizzarli correttamente. L'interazione fra aPKC e membri del complesso CRUMBS consente di restringere spazialmente CRUMBS nella regione apicale

e, contemporaneamente, permette l'inibizione, nella porzione apicale della cellula, del terzo complesso della polarità, SCRIBBLE, confinandolo così nel dominio basale. Il confinamento basale di Scribble avviene attraverso la fosforilazione della proteina LGL da parte di aPKC. LGL interagisce inizialmente con PAR6-aPKC, poi, dopo l'attivazione di aPKC, viene fosforilata e si sposta in posizione latero-basale **[Figura 6]** (Assémat, et al., 2008; Bergstralh, et al., 2013).

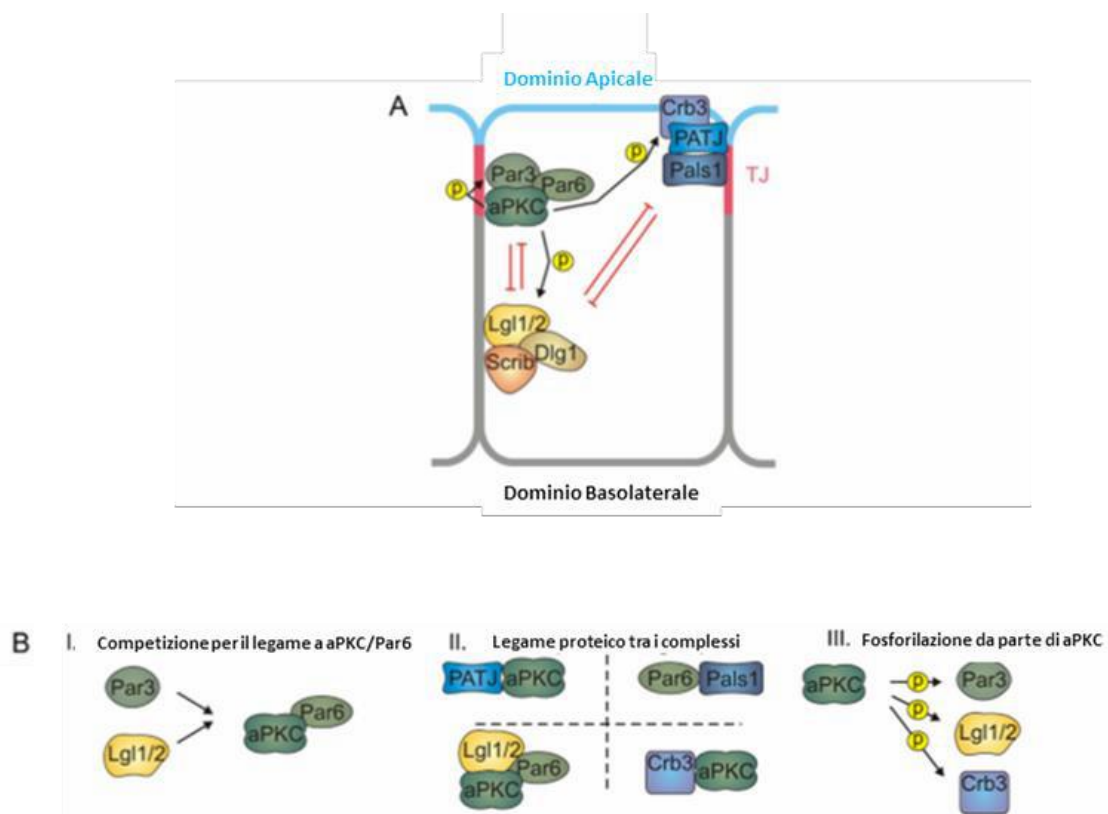


Figura 6. (A) Localizzazione delle proteine dei complessi della polarità e interazione mutualmente esclusiva. Nelle cellule epiteliali, i complessi PAR e CRUMBS si localizzano nella regione apico-laterale e apicale in prossimità delle *TJs*. Interazioni mutualmente esclusive fra le proteine di questi due complessi e quelle appartenenti al complesso basolaterale SCRIBBLE localizzano quest'ultimo nella sua regione di competenza, stabilendo la polarità apico-basale della cellula. (B) Diversi tipi di interazione sono possibili fra le proteine dei tre complessi, inclusa la competizione di legame fra LGL1/2 e PAR3 per il dimero PAR6-aPKC (I), il legame fra proteine dei diversi complessi (II), la fosforilazione di PAR3, LGL1/2 e CRB3 da parte di aPKC (III), per ottenere l'esclusione reciproca dei complessi dai propri domini cellulari.

Il complesso PAR partecipa anche al processo di migrazione cellulare, fisiologicamente

importante durante la morfogenesi, il rinnovamento e la riparazione dei tessuti adulti. Le cellule interessate dal fenomeno sviluppano la polarità fronte-coda (*FRP*), in presenza di fattori ambientali che promuovono la migrazione. Nel fronte migratorio, le cellule formano delle protrusioni, quali *lamellipodia* o *filopodia*, che consentono l'ancoraggio temporaneo della superficie cellulare con la matrice extracellulare (ECM, *extracellular matrix*) lungo il percorso da compiere. Contemporaneamente, nel versante opposto, la coda, le cellule si distaccano dall'ECM e viene generata la forza contrattile di trazione nel verso della migrazione. L'attività protrusiva è consentita dal rimodellamento del citoscheletro attraverso la polimerizzazione e depolimerizzazione dei filamenti di actina e dei microtubuli. I regolatori di questo processo sono le proteine RHO, RAC e CDC42, tutte piccole GTPasi. CDC42 e RAC devono essere attivate nel fronte migratorio, mentre l'attività di RHO è richiesta nella coda. Nel fronte migratorio, le integrine del complesso delle adesioni focali, richiesto per l'adesione delle cellule all'ECM, reclutano CDC42, la quale attiva PAR6-aPKC (Etienne-Manneville & Hall, 2001). L'attività di aPKC è quindi ristretta al fronte migratorio, dove fosforila GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 beta*) su una serina inibitoria, consentendone il distacco da APC (*Adenomatous Polyposis Coli*). APC è quindi libera di legare i microtubuli e ancorarli alla membrana cellulare, riorganizzando il citoscheletro e ridistribuendo con esso tutti gli organelli cellulari in modo polarizzato nel verso della migrazione (Etienne-Manneville & Hall, 2003). Contemporaneamente, il dimero aPKC- PARD6 attivato regola RHOA nel fronte migratorio, inducendone la degradazione mediata da SMURF1 (E3 ubiquitina-ligasi). La forma attiva di RHOA rimane quindi confinata nel polo posteriore della cellula in migrazione. Qui RHOA consente la depolimerizzazione dei filamenti di actina, provocandone il distacco dall'ECM (Wang, et al., 2003) [Figura 7].

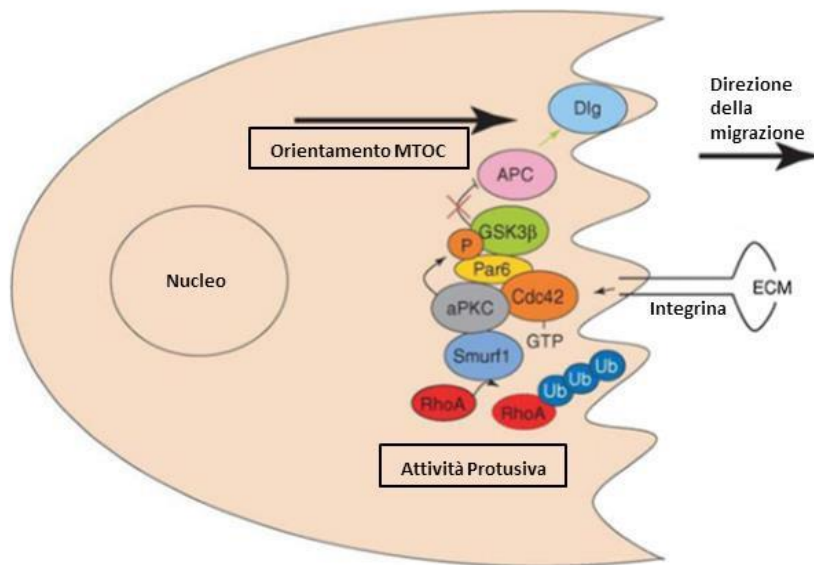


Figura 7. Rappresentazione della regolazione della migrazione cellulare nel fronte migratorio. Immagine tratta e tradotta da Khursheed & Bashyam, 2014.

L'attività di PAR6-aPKC-CDC42 nella migrazione può essere indotta da diversi stimoli, fra i quali il TGF β , una via di segnalazione deregolata nel cancro e associata al fenomeno di *EMT* (Bose & Wrana, 2006; Xiao & Liu, 2013). Il TGFR- β (*TGF- β Receptor*) fosforila PARD6 sulla S345 (Ozdamar, et al., 2005), e sembra che tale modificazione sia incrementata dalla presenza di aPKC. Una volta fosforilata, PARD6 induce la degradazione di RHO attraverso SMURF, conducendo alla dissoluzione delle *TJs*. Contemporaneamente, il TGFR- β attiva la via di segnalazione di SMAD, che produce una riduzione dell'espressione di E-caderina, con conseguente dissoluzione delle *AJs*. La dissoluzione delle giunzioni cellulari è uno dei primi eventi che avvengono nelle cellule che subiscono la transizione epiteliomesenchimale (Gunaratne, et al., 2013) **[Figura 8]**.

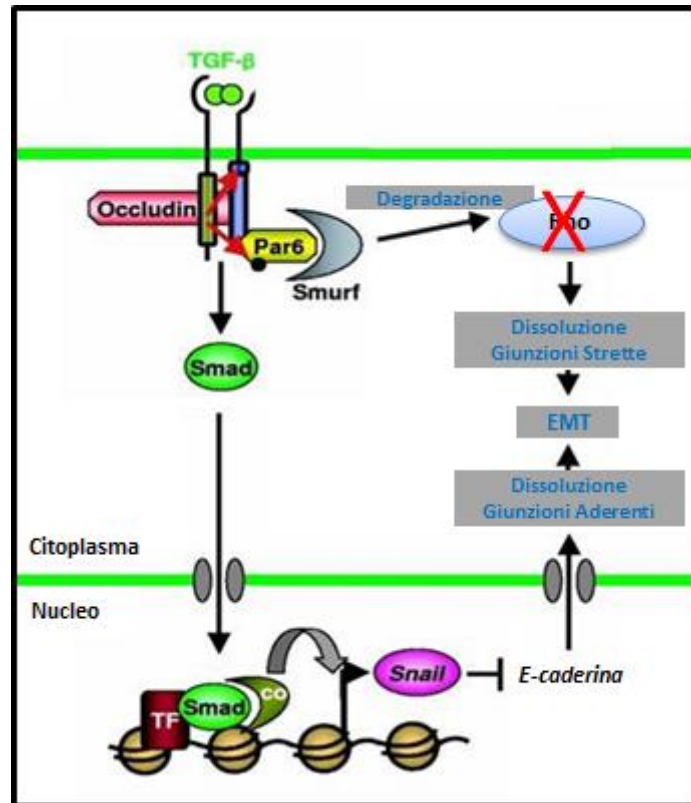


Figura 8. Ruolo del dimero aPKC-PAR6 nel processo di EMT

Il complesso PAR, inoltre, contribuisce alla regolazione della divisione cellulare asimmetrica. Durante lo sviluppo e il rinnovamento dei tessuti adulti, le cellule si dividono asimmetricamente per produrre due cellule che differiscono per dimensioni e contenuto citoplasmatico al fine di subire destini diversi. Una cellula segue il processo di differenziamento terminale, l'altra mantiene il compartimento dei progenitori cellulari. Affinché avvenga la divisione cellulare asimmetrica, la cellula madre deve segregare dei componenti chiamati determinanti del destino cellulare e posizionare il piano di divisione, e dunque il fuso mitotico, in modo asimmetrico. Il complesso PAR è coinvolto nella regolazione di questi meccanismi. Il suo ruolo è ben noto in organismi quali *C. elegans* e *D. melanogaster*, nei quali i geni PAR sono stati scoperti proprio nel contesto dello sviluppo embrionale, mentre poco si conosce dei meccanismi molecolari nei mammiferi. In *C. Elegans* e in *D. melanogaster* è stato dimostrato che il complesso PAR è essenziale per

orientare il piano della mitosi e assicurare così la corretta segregazione dei determinanti del destino cellulare nello zigote e nei neuroblasti, rispettivamente (Kemphues, et al., 1988; Schober, et al., 1999). Nei mammiferi, alcune evidenze sperimentali hanno indotto a ritenere che la divisione asimmetrica sia regolata da forme diverse delle proteine PAR sia fra i vari tessuti sia nell'ambito dello stesso tessuto. Ad esempio, PARD3 α è richiesto per il differenziamento dei progenitori nella ghiandola mammaria, mentre PARD3 β mantiene la nicchia staminale (Huo & Macara, 2014; McCaffrey & Macara, 2009).

1.3 Polarità cellulare e cancro

La tumorigenesi è innescata da eventi mutazionali che insorgono nelle cellule normali in cooperazione con fattori microambientali, tali da determinare l'assunzione di un fenotipo trasformato. In particolare, la trasformazione maligna si compie tramite l'acquisizione di alcune capacità fondamentali, quali un potenziale replicativo illimitato, l'indipendenza dai segnali proliferativi o anti-proliferativi, l'insensibilità agli stimoli apoptotici, l'induzione della neoangiogenesi e l'invasività (Hanahan & Weiber, 2011). Tali cambiamenti derivano da eventi mutazionali a carico di geni importanti per il controllo di processi biochimici implicati nella divisione e nella sopravvivenza cellulare. Evidenze recenti suggeriscono che la distruzione dei meccanismi della polarità giochi un ruolo fondamentale nella tumorigenesi. La trasformazione maligna può essere indotta, ad esempio, dagli oncogeni virali e dall'attivazione di vie di segnalazione dei fattori di crescita, che non solo stimolano la proliferazione cellulare, ma inducono la distruzione dei contatti cellula-cellula, alterano la *ABP* e, talvolta, inducono la *EMT*. La disregolazione dei meccanismi della polarità cellulare, inoltre, può perturbare, come già accennato, i meccanismi di divisione cellulare asimmetrica. Nel cancro quest'ultima è strettamente connessa con il mantenimento delle *CSC* (*Cancer Stem Cells*), le quali sostengono la tumorigenesi e la progressione cancerosa (Lee & Vasioukhlin, 2008) [Figura 9].

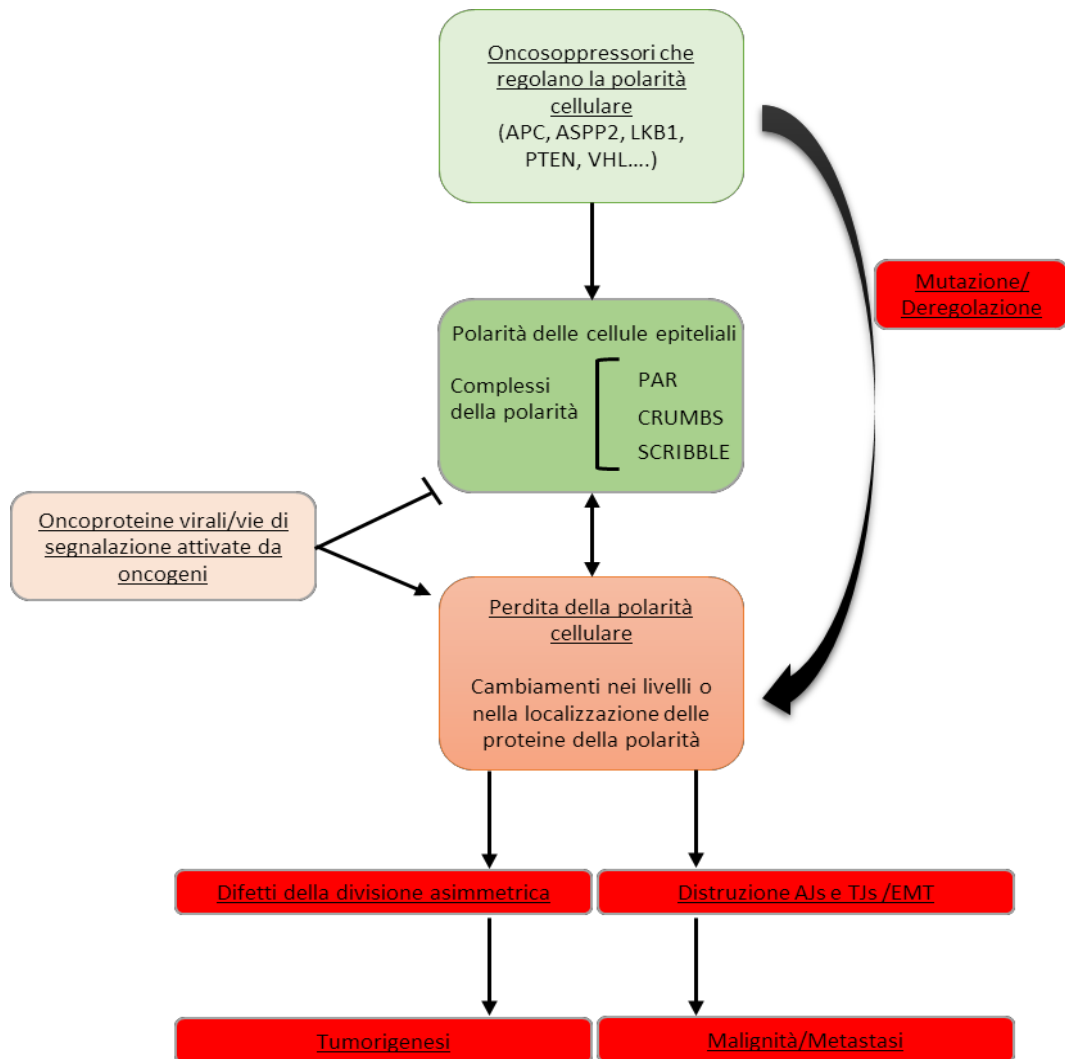


Figura 9. Ruolo della perdita della polarità cellulare nella tumorigenesi. Immagine tratta e tradotta da Royer & Lu, 2011.

La perdita della polarità cellulare e della coesività (LOP/C) è dunque considerata un'impronta caratteristica del cancro (Royer & Lu, 2011). La polarità degli epiteli, infatti, può essere valutata un fattore onco-soppressivo poiché mantiene l'organizzazione e l'architettura del tessuto. Con questa prospettiva è stato ipotizzato un modello che spiega come la polarità cellulare può agire bloccando la tumorigenesi. Le cellule normali utilizzano i meccanismi della polarità cellulare per stabilire e mantenere la struttura del tessuto, e tale azione è consolidata dalla presenza delle giunzioni cellulari. La presenza di queste ultime è in grado di

rinforzare la polarità delle cellule limitrofe nelle quali sono intervenute mutazioni nelle vie di segnalazione connesse alla polarità cellulare stessa. Nel caso in cui le mutazioni avvenute siano tali da compromettere l'integrità delle giunzioni cellulari, le cellule interessate non sono riconosciute dalle vicine normali e sono eliminate. L'interruzione che si crea nel tessuto è riparata, e l'omeostasi è mantenuta (Lee & Vasioukhlin, 2008) [Figura 10].

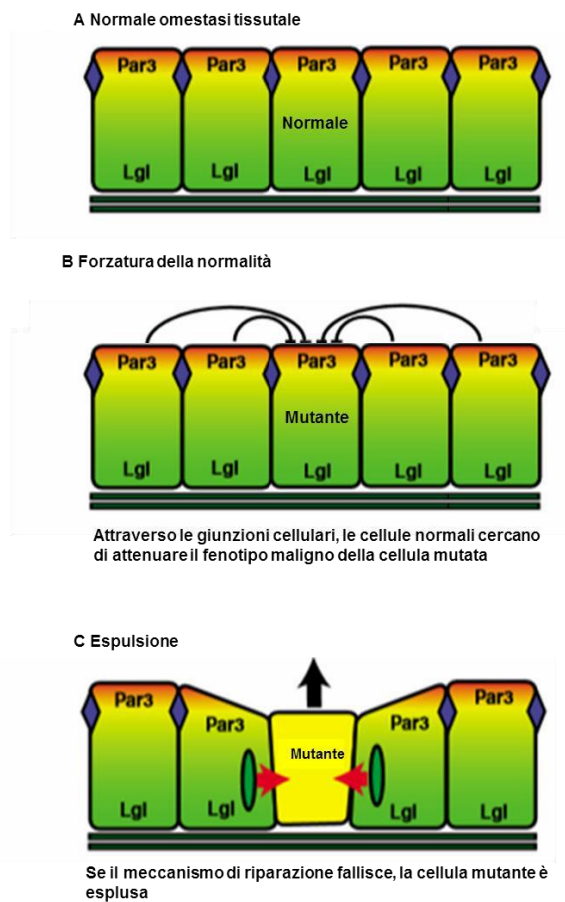


Figura 10. Meccanismo ipotetico del ruolo antitumorale della polarità cellulare e tissutale. (A) Nei tessuti normali, le cellule usano le giunzioni cellulari per connettere i meccanismi interni della polarità cellulare con l'organizzazione polarizzata del tessuto. (B) I cambiamenti pro-tumorigenici nelle cellule mutanti possono distruggere i meccanismi interni di polarità cellulare. Se le cellule mutanti esprimono le proteine giunzionali, le cellule normali vicine possono usare le giunzioni per mantenere la polarità e attenuare l'effetto pro-tumorigenico delle cellule mutanti. (C) Quando le cellule mutanti non sono capaci di formare le giunzioni con le loro vicine normali, queste ultime ne interpretano la mancata presenza come un'interruzione del tessuto, e come tale viene riparata estrudendo la cellula tumorale e colmando lo spazio vuoto attraverso i meccanismi di *wound healing*. Quando i meccanismi in B e C falliscono, le cellule mutanti possono progredire originando il tumore. Immagine tratta e tradotta da Lee & Vasioukhlin, 2008.

Nel corso degli anni, diversi studi hanno dimostrato anche la deregolazione dei membri dei complessi della polarità durante la carcinogenesi (Tabella 1) (Khursheed & Bashyam, 2014). Dagli studi condotti su *Drosophila melanogaster* fino a quelli più recenti sui mammiferi, è stato progressivamente definito il ruolo oncosoppressivo o oncogenico dei diversi componenti dei tre complessi della polarità. Nella maggior parte dei casi, in tali studi sono stati deleti o indotti singoli geni codificanti i membri dei complessi. Ad oggi, però, la disponibilità di una grande mole di dati genomici da pazienti affetti da cancro fornisce una visuale unica sul ruolo delle suddette proteine nei diversi tipi di cancro. Infatti, il gran numero dei geni della polarità paraloghi e di loro isoforme proteiche riscontrato nei mammiferi induce a ipotizzare che ciascun tessuto epiteliale, e di conseguenza ciascun istotipo di cancro che da esso può originare, utilizzi uno specifico sottogruppo di proteine della polarità (Lin, et al., 2015). Ciò porta a ritenere che la deregolazione dei membri dei complessi, in termini di espressione genica e/o di localizzazione proteica, sia peculiare per ciascun tipo di cancro.

La relazione fra alterazioni della polarità cellulare e cancro, dunque, è sia diretta sia indiretta: molti oncosoppressori e oncogeni sono proteine direttamente coinvolte nel mantenimento della polarità cellulare, ma esistono anche diverse vie di segnalazione cellulare che connettono proteine rilevanti per la tumorigenesi con i meccanismi della polarità (Lee & Vasioukhlin, 2008).

Tabella 1 Alterazioni delle proteine dei complessi della polarità cellulare nelle cellule epiteliali umane trasformate e nel cancro. Abbreviazioni: NSCL=carcinoma non a piccole cellule del polmone; PDAC=adenocarcinoma del pancreas; OSCC=carcinoma esofageo a cellule squamose. Tratta e tradotta da Khursheed & Bashyam, 2014.

Complessi della polarità nel cancro					
Complesso della polarità	Componenti	Alterazioni	Cancro	Origine	Referenza
SCRIB	SCRIB	Perdita dell'espressione e delocalizzazione	Cancro della cervice	Tumore primitivo	(Nakagawa, et al., 2004)
		//	Cancro del colon	//	(Navarro, et al., 2005)
		//	Cancro della mammella	//	(Zhan, et al., 2008)
	DLG1	Perdita dell'espressione e delocalizzazione	Cancro della cervice	Tumore primitivo	(Cavatorta, et al., 2004)
		Perdita dell'espressione	Cancro del colon	Tumore primitivo	(Gardiol, et al., 2006)
	LGL1	Perdita dell'espressione	Cancro del colon, mammella, dell'ovaio e della prostata	Tumore primitivo	(Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012; Schimanski, et al., 2005)
		Alterazioni dello splicing	Carcinoma epatocellulare	Tumore primitivo e linee cellulari	(Lu, et al., 2009)
	LGL2	Perdita dell'espressione e delocalizzazione	Cancro dello stomaco	Tumore primitivo	(Lisovsky, et al., 2009; Nam, et al., 2014)
CRUMBS	CRB3	Perdita dell'espressione	Carcinoma della mammella	Modello murino	(Karp, et al., 2008)
		Delocalizzazione	Carcinoma della mammella	//	(Roh, et al., 2003)
PAR	aPKC ζ	Aumento dell'espressione	Carcinoma epatocellulare	Tumore primitivo	(Tsai, et al., 2000)
		//	Carcinoma della vescica, della mammella, testa-collo, e PDAC	Tumore primitivo e linee cellulari	(Cunliffe, et al., 2012; Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012)
	aPKC ι	Aumento dell'espressione e delocalizzazione	Carcinoma dell'ovaio, carcinoma epatocellulare, NSCLC e PDAC	//	(Kojima & Akimoto, 2008; Regala, et al., 2005)
	PARD6 α	Aumento dell'espressione	Cancro della mammella e NSCLC	//	(Nolan, et al., 2008)
	PARD6 β	Perdita dell'espressione	Cancro della mammella	Tumore primitivo	(Cunliffe, et al., 2012)
	PARD3 α	Delezione e perdita dell'espressione	OSCC	Tumore primitivo	(Zen, et al., 2009)
		Perdita dell'espressione	Cellule di cute di topo	Modello murino	(Iden, et al., 2012)

1.3.1 Complesso PAR e cancro

Diversi studi hanno indagato il rapporto fra la disregolazione del complesso PAR e l'insorgenza e/o la progressione del cancro. Le evidenze collezionate hanno consentito di definire un'attività oncogenica/oncosoppressiva contesto-dipendente dei membri del suddetto complesso (Aranda, et al., 2008).

Nei carcinomi umani e murini non a piccole cellule del polmone (NSCLC, *non small cell lung cancer*), dell'ovaio, della mammella, nel carcinoma epatocellulare (HCC, *hepatocellular carcinoma*), nel carcinoma a cellule squamose testa-collo (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*), e nell'adenocarcinoma pancreatico duttale, è stata rilevata un'elevata espressione e/o mis-localizzazione di aPKC λ/ι (Eder, 2005; Kojima & Akimoto, 2008; Lee & Vasioukhlin, 2008; Regala, et al., 2005). Inoltre, è stata evidenziata una correlazione fra l'aumento dei livelli di aPKC ι e lo stadio e la prognosi peggiore dei pazienti affetti da NSCLC (Regala, et al., 2005). Nell'HCC è stato dimostrato che l'accumulo citoplasmatico e nucleolare della proteina impedisce la formazione delle giunzioni cellulari laterali (*TJs* e *AJs*), con diminuzione di E-caderina e accumulo citoplasmatico di β -catenina. L'espressione di aPKC ι è stata correlata allo stadio di differenziazione, alla dimensione, all'invasività e alle capacità metastatizzanti del tumore. La disregolazione di aPKC ι è stata dunque indicata sia come marker prognostico, in associazione alla diminuita espressione di E-caderina e all'accumulo citoplasmatico di β -catenina, sia un potenziale target terapeutico nell'HCC (Du, et al., 2009). Anche i livelli di mRNA e proteina aPKC ζ sono stati riscontrati elevati nel carcinoma epatocellulare, della prostata, della vescica, della mammella, e nel carcinoma a cellule squamose testa-collo (Awadelkarim, et al., 2012; Cohen, et al., 2006; Evans, et al., 2003; Langzam, et al., 2001; Tsai, et al., 2000; Yao, et al., 2010).

Alcuni studi, tuttavia, hanno evidenziato un ruolo opposto della forma aPKC ζ , come oncosoppressore. Da uno studio realizzato su pazienti affetti da cancro colon-rettale, è emerso che alti livelli di aPKC ζ erano associati ad una prognosi migliore (Ma, et al., 2012). Anche

nel cancro della vescica, è stata mostrata la correlazione fra alti livelli di aPKC ζ e un più esteso intervallo libero da malattia dei pazienti (Namdarian, et al., 2013).

La duplice attività oncogenica/occosoppressiva contesto-dipendente è stata dimostrata anche per PARD3 α . Usando topi *knock-out* condizionali e un classico modello di cancro della cute doppio-stadio indotto dalle mutazioni attivanti di RAS, è stato documentato che la delezione del gene PARD3 α produceva una riduzione del numero e della dimensione dei papillomi, causata dall'aumento dell'apoptosi e dalla riduzione della proliferazione. Tuttavia, le poche papille formate nella cute dei topi *knock-out* per PARD3 α mostravano un comportamento maggiormente invasivo, e rapidamente formavano cheratoacantomi, una forma aggressiva del cancro che raramente si manifesta nei topi *wild-type* (Iden, et al., 2012).

La maggiore aggressività dei tumori prodotti dalla mancata espressione del gene PARD3 α è stata provata anche in uno studio condotto su linee cellulari derivanti da cancro della mammella iniettate in topo. È stato osservato che il silenziamento di PARD3 α , in presenza dell'oncogene RAS attivo, riduce la latenza e aumenta l'aggressività del tumore prodotto rispetto a quello originato dalle cellule in cui, pur essendo attivo l'oncogene, l'espressione di PARD3 α è mantenuta. Nello stesso studio, le analisi condotte sui tessuti dei pazienti arruolati hanno evidenziato che la riduzione dell'espressione di PARD3 α , sia in termini di mRNA che di proteina, correlava con una modesta, ma statisticamente significativa, riduzione della probabilità di sopravvivenza (McCaffrey, et al., 2012). Nel carcinoma mammario, inoltre, è stato dimostrato che la perdita dell'espressione di PARD3 α incrementava la capacità metastatica del tumore (Xue, et al., 2012). La riduzione dell'espressione di PARD3 α è stata osservata anche nel carcinoma esofageo a cellule squamose umano, e correlava con la presenza di metastasi (Zen, et al., 2009). In contrasto, nel carcinoma epatocellulare umano, è stato dimostrato che l'aumento dell'espressione di PARD3 α era predittivo della formazione di metastasi e della ridotta sopravvivenza dei pazienti (Jan, et al., 2013). Anche nel carcinoma renale a cellule chiare è stata evidenziata la correlazione fra aumentata espressione di

PARD3 α e maggiore aggressività del tumore, con aumento della mortalità. Inoltre, studi su linee cellulari provenienti dallo stesso tumore hanno mostrato che l'aumento dei livelli di espressione di PARD3 α induceva la migrazione cellulare e alterava l'organizzazione del citoscheletro (Dugay, et al., 2014).

Nessuna ricerca, finora, ha preso in considerazione lo studio dell'espressione di PARD3 β nel cancro.

Nel carcinoma duttale della mammella è stato riscontrato l'aumento dell'espressione di PARD6 α sia nelle lesioni precancerose sia nei tumori primari avanzati, suggerendo che esso regolasse sia l'inizio sia la progressione del cancro. Esperimenti condotti su linee cellulari hanno dimostrato che l'aumento dei livelli di PARD6 α induceva la proliferazione cellulare indipendente da fattori di crescita e lo sviluppo di acini iperplastici, senza perturbare la polarità apico-basale. Quest'effetto sembrava dipendere dalla capacità di PARD6 α di interagire con aPKC e CDC42, sostenendo l'attivazione del signaling MEK/ERK (Nolan, et al., 2008). Il legame di PARD6 α ad aPKC è stato ritenuto fondamentale anche nel NSCLC. In questo tumore, infatti, PKC ι promuoveva la crescita delle cellule attraverso l'attivazione di RAC1, la quale dipendeva dalla formazione del complesso PKC ι -Par6 α . Il complesso guidava la crescita ancoraggio-indipendente e l'invasione tissutale attraverso l'attivazione dell'espressione della metallo-proteasi MMP-10 (Frederick, et al., 2008). In cellule di NSCLC è stato anche osservato che PARD6-PKC ι potrebbe promuovere la migrazione cellulare durante la transizione epitelio-mesenchimale. PARD6, infatti, viene fosforilata da TGFR- β , e promuove la degradazione di RHO e la conseguente dissoluzione delle *TJs* (Gunaratne, et al., 2013).

In linee cellulari di cancro della mammella è stata individuata l'amplificazione della regione genica codificante PARD6 β , alla quale corrispondeva un aumento dei livelli di mRNA e proteina. Diversamente da quanto osservato in altri studi (Gao, et al., 2002), l'aumento di espressione di PARD6 β correlava con la formazione delle *TJs*, mentre l'utilizzo di un siRNA

specifico induceva la perdita di tali giunzioni, ma non influenzava le AJs. IHC condotte per rilevare l'espressione di PARD6 β ne hanno evidenziato l'espressione specifica nelle cellule epiteliali e differenze quantitative minime fra tessuti normali e tumorali adiacenti. Tuttavia, la colorazione è apparsa ridotta e citoplasmatica in diversi tumori scarsamente differenziati (Cunliffe, et al., 2012; Nolan, et al., 2008). È stato inoltre dimostrato che l'aumento di espressione di PARD6 β nelle cellule epiteliali della mammella, induceva l'attivazione del segnale delle MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) e promuoveva la proliferazione indipendentemente dai fattori di crescita (Aranda, et al., 2008).

In cellule di adenocarcinoma colon-rettale è stato osservato che la deplezione o l'inibizione di PARD6 β o aPKC producevano un fenotipo identico alla perdita di CDC42, con disorientamento del fuso mitotico, malposizionamento della nascente superficie apicale e formazione di cisti aberranti con lumi multipli. Inoltre, la deplezione o l'inibizione di aPKC inducevano una massiccia morte cellulare per apoptosi e riducevano in modo significativo sia il numero che la dimensione delle cisti. PARD6 β si localizzava sulla superficie apicale delle cisti formate dalle cellule di adenocarcinoma ed era richiesta per reclutare aPKC in questo compartimento, la quale proteggeva PARD6 β dalla degradazione mediata da proteasoma (Durgan, et al., 2011)

In merito al ruolo di PARD6 γ nel cancro, alcuni studi hanno individuato la delezione della regione cromosomica 18q23, che comprende il gene *PARD6 γ* (Bashyam, et al., 2005). Un unico studio riferisce della sua attività di oncosoppressore nelle cellule derivanti da carcinoma mammario (Marques, et al., 2016).

1.4 I tumori della tiroide

La patologia nodulare tiroidea è molto diffusa, soprattutto nelle regioni geografiche definite a carenza iodica, ovvero caratterizzate da un insufficiente apporto alimentare di iodio.

Il nodulo tiroideo è una formazione anatomico-clinica descrivibile come un accrescimento volumetrico circoscritto, unico o multiplo, spesso asintomatico, nell'ambito di una ghiandola di dimensioni normali o ingrandite. L'ultrasonografia è la metodica diagnostica di prima scelta per lo studio delle caratteristiche macroscopiche del nodulo, quali la grandezza, la forma, la consistenza, i margini e il flusso sanguigno, mentre il suo stato funzionale è determinato tramite la scintigrafia tiroidea, che prevede l'uso di un tracciante radioattivo (iodio o tecnecio) captato dalla ghiandola. L'immagine scintigrafica consente di distinguere i noduli in caldi, freddi e isocaptanti. I noduli caldi sono dotati di autonomia funzionale e capacità di inibire la captazione da parte del tessuto tiroideo sano, e sono definiti "tossici" quando producono un eccesso di ormoni tiroidei circolanti; i noduli isocaptanti sono caratterizzati da tessuto normofunzionante, mentre i noduli freddi sono caratterizzati da tessuto ipo- o non funzionante.

I noduli tiroidei sono generalmente di natura benigna (oltre il 95% dei casi). I rari noduli maligni presentano in ecocolordoppler un aspetto solido (ipoecogeno) o misto (ipo-anecogeno), aumentata vascolarità, frequenti microcalcificazioni e margini irregolari, e all'analisi scintigrafica risultano quasi esclusivamente freddi.

I noduli maligni possono consistere in:

- tumori primitivi di origine follicolare e parafollicolare
- linfomi e sarcomi
- metastasi tiroidee da altri tumori

La maggior parte dei noduli maligni è costituita da carcinomi differenziati a carico delle cellule follicolari (DTC), ossia carcinomi follicolari (FTC) e carcinomi papillari (PTC), mentre sono meno frequenti i carcinomi anaplastici (ATC), costituiti da cellule indifferenziate. Altrettanto infrequenti sono i carcinomi midollari (MTC), questi ultimi

derivanti dalle cellule C della tiroide (Pacini & Pinchera, 2003). I tumori differenziati della tiroide hanno solitamente una prognosi favorevole, con un tasso di sopravvivenza a 10 anni di circa il 90%. Tuttavia, circa il 20% dei pazienti affetti da DTC va incontro a ricorrenza di malattia e a morte cancro-relata. Ad oggi, la prognosi dei pazienti affetti da TC è ancora legata ai parametri clinico-patologici come l'età, l'istologia, la dimensione del tumore, la presenza di metastasi linfonodali e a distanza. Il sistema TNM (*Tumor size, lymph Node and distant Metastasis*) è il sistema di stadiazione più ampiamente utilizzato per i pazienti affetti da TC, ed è fortemente influenzato dall'età del paziente. Ciò comporta l'inclusione di pazienti con parametri di malattia simili in classi di rischio di mortalità alta o bassa in base all'età superiore o inferiore ai 45 anni. Analogamente può accadere che pazienti con diversa progressione della malattia e differente intervallo di sopravvivenza siano inseriti nella stessa classe di rischio. Inoltre, il sistema TNM è carente nella predizione del rischio di ricorrenza di malattia. Al fine di migliorare la prognosi dei pazienti, la European (ETA) e l'American Thyroid Associations (ATA) hanno proposto delle linee guida integrando i parametri TNM con altre caratteristiche cliniche, come la variante istologica del tumore, il risultato della scintigrafia post-ablativa, e i livelli di tireoglobulina sierica. Tuttavia, le suddette linee guida non hanno completamente risolto il limite del sistema TNM. Pertanto, avere a disposizione dei marcatori molecolari affidabili potrebbe essere di notevole aiuto per definire la prognosi dei pazienti affetti da TC. Diversi biomarcatori molecolari sono stati valutati, e alcuni fra questi hanno mostrato una potenziale affidabilità, sebbene siano necessari ulteriori studi su casistiche più ampie, come nel caso dell'aumento dei livelli del miR-146b, o dell'espressione di uPA (*urokinase plasminogen activator*), uPAR (*cell membrane uPA receptor*), PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), o la riduzione dell'espressione di ER β (*estrogen receptor β*) (Baldini, et al., 2013; Baldini, et al., 2014).

1.4.1 Tumori papilliferi della tiroide

Il carcinoma papillifero della tiroide (PTC) è la neoplasia endocrina più frequente. Esso

si presenta come un tumore non capsulato o parzialmente capsulato, spesso multifocale e, in alcuni casi, con aree di necrosi. Ne esistono diverse varianti, tra cui quelle *classica*, *follicolare* e *a cellule alte*. A livello microscopico è apprezzabile la presenza di papille, focali o diffuse, costituite da un asse connettivo-vascolare e rivestite da epitelio cubico pluristratificato, le cui cellule hanno nuclei con aspetto caratteristico, più voluminosi rispetto a quelli dei tireociti normali, pallidi, con membrana nucleare ispessita, contorni irregolari e talvolta inclusioni di materiale citoplasmatico. Segni patognomonicici tipici sono: la presenza di corpi psammomatosi (calcificazioni lamellari) nelle papille o nello stroma tumorale e infiltrazione linfocitaria alla periferia del tumore **[Figura 11]**. L'invasione linfonodale da parte del tumore è frequente e precoce (Longo, et al., 2012).

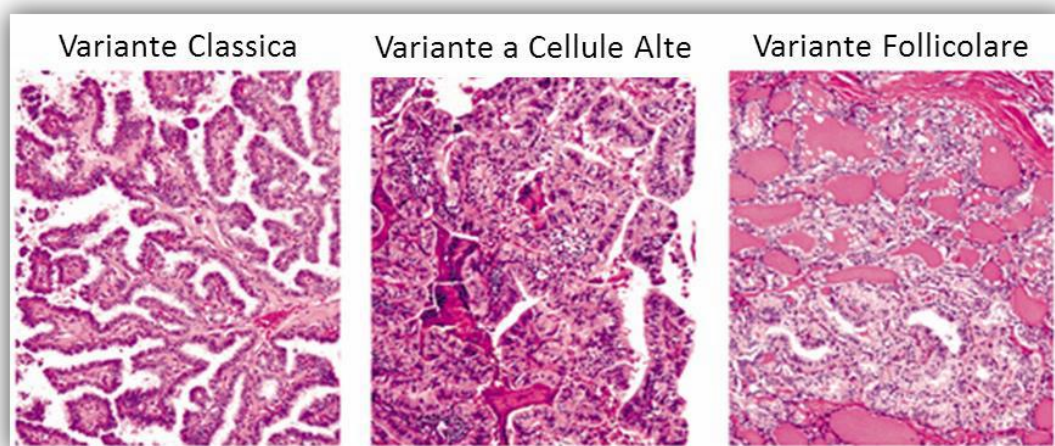


Figura 11. Alcune varianti di carcinoma papillifero a confronto.

In generale, il PTC ha buona prognosi con un tasso di sopravvivenza libero da malattia a 10 anni del 90%. La prognosi dipende essenzialmente dall'età del paziente alla diagnosi. Pazienti di età inferiore ai 45 anni hanno una prognosi largamente favorevole a prescindere dall'interessamento dei linfonodi, dal grado di invasione vascolare, dall'estensione del tumore e anche dalla presenza di metastasi a distanza. Invece, nei pazienti con più di 45 anni tutti i predetti fattori giocano un ruolo significativo nel

determinarne la sopravvivenza nel medio-lungo periodo. Inoltre, con l'aumentare dell'età sono più frequenti le forme scarsamente differenziate, maggiormente invasive e correlate ad una prognosi peggiore (Pacini & Pinchera, 2003). Una delle alterazioni genetiche più comuni nel PTC è la mutazione $BRAF^{V600E}$, la quale è stata associata allo stadio avanzato di malattia, all'estensione extra-tiroidea (Kimura et al., 2003; Soares et al., 2003), e alle metastasi linfonodali e a distanza (Elisei et al., 2008).

1.4.2 Tumori anaplastici della tiroide

Il *carcinoma anaplastico (ATC)* rientra nel gruppo dei tumori umani più aggressivi, con un decorso rapidamente fatale nell'arco di 6-10 mesi dalla diagnosi. Il tumore, molto raro, è completamente indifferenziato, con una crescita rapida, invasione dei tessuti adiacenti e metastasi a distanza. Tipicamente è composto da cellule sottili, poligonali e giganti in varie proporzioni, spesso con foci di cellule squamose e sarcomatoidi. La cheratina è il marcatore epiteliale più utile, presente nel 40-100% dei casi. Sono inoltre da considerarsi anaplastici quei carcinomi differenziati che presentano focolai di cellule indifferenziate, poiché seguono un comportamento biologico analogo ai primi (Longo, et al., 2012) **[Figura 12]**.

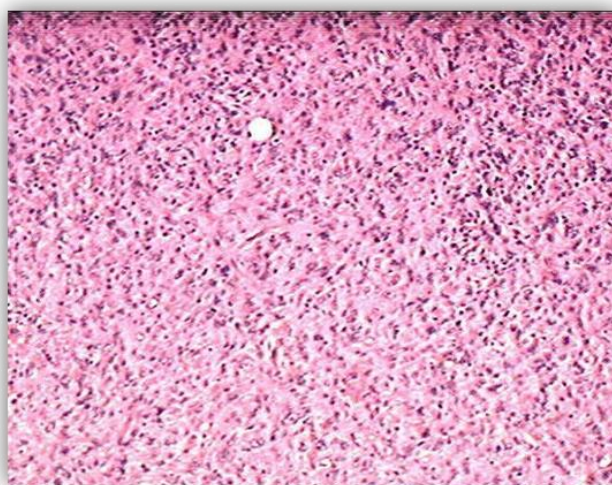


Figura 12. Carcinoma anaplastico

1.5 Tumori della tiroide e alterazioni della polarità cellulare

Pochi studi sono stati condotti per valutare le alterazioni della polarità cellulare nei carcinomi tiroidei. In questi è stata valutata l'espressione di alcune molecole costituenti le giunzioni intercellulari e di proteine che, pur non essendo implicate nel mantenimento del contatto cellula-cellula o della polarità cellulare, sono distribuite in membrana in modo polarizzato. I primi studi si sono concentrati sulle alterazioni strutturali delle *TJs*. Poiché la polarità cellulare è strettamente connessa alla formazione e al mantenimento di questo tipo di giunzioni cellulari, alcuni autori hanno investigato la possibile correlazione fra le alterazioni delle giunzioni strette e la malignità e il grado di differenziazione dei tumori tiroidei. Mentre gli adenomi e i carcinomi follicolari mostravano una struttura essenzialmente regolare delle *TJs*, i carcinomi anaplastici perdevano completamente questo tipo di giunzioni cellulari. Interruzioni focali delle *TJs* sono state osservate invece nei PTC, soprattutto in quelli maggiormente invasivi. Lo spettro di cambiamenti delle *TJs* non correlava però con il comportamento tumorale (Kerjaschki, et al., 1979). In un altro studio, la proteina ZO-1 (*zona occludens-1*) delle *TJs* è stata osservata debolmente espressa lungo la membrana apicale nelle biopsie non neoplastiche. Al contrario, un aumento sia citoplasmatico sia di membrana nella regione apicale è stato riscontrato nei PTC, mentre la colorazione nucleare specifica per ZO-1 è stata osservata in alcuni PTC scarsamente differenziati (Fluge, et al., 2001). Uno studio è stato focalizzato sulla distribuzione di membrana delle β 1-integrine, normalmente espresse nella membrana basale delle cellule. Nella ghiandola normale e nel gozzo nodulare la presenza delle β 1-integrine è ristretta alla membrana basale delle cellule, mentre la distribuzione polarizzata è persa negli adenomi e nei carcinomi differenziati. Inoltre, le suddette proteine sono espresse ad alti livelli sia nelle lesioni benigne sia in quelle maligne (Vitale & et al., 1994). Altri studi hanno indagato la localizzazione dei recettori per i fattori di crescita. Il recettore EGFR varia la sua localizzazione cellulare se si confrontano tessuti tiroidei normali con campioni provenienti da gozzo nodulare e da neoplasie. Nello specifico, esso è localizzato nella regione basale o baso-laterale nei tessuti normali e nel

gozzo tossico diffuso, ma si trova nel compartimento citoplasmatico nei tessuti neoplastici, inducendo a ipotizzare che la localizzazione non polarizzata di EGFR indichi una perdita della normale polarità epiteliale che può essere interpretata come segno precoce di dedifferenziamento. Inoltre, l'espressione del recettore aumenta progressivamente passando dalle lesioni benigne a quelle maligne (Westermarck & et al., 1996). Anche l'espressione e la localizzazione di MET (Recettore Tirosin-chinasico per HGF) sono state indagate nei tessuti tiroidei normali, nei quali è espresso sulla membrana basale, e nei PTC, in cui l'espressione aumenta e la proteina si localizza anche nel citosol e sulla membrana apicale (Fluge, et al., 2001). Solo due studi hanno concentrato l'attenzione sulle modificazioni morfologiche dei tessuti tumorali ascrivibili al fenomeno *LOP/C* nel fronte invasivo del PTC. In entrambi è stata valutata la presenza di *LOP/C* e la sua correlazione con i parametri clinico-patologici dei pazienti. La valutazione istologica è stata realizzata nel fronte invasivo dei tumori, in altre parole l'interfaccia fra il tumore e il tessuto adiacente non neoplastico, quando il tumore ha mostrato una crescita invasiva. Nella maggior parte dei casi è apparso chiaro che la perdita di polarità e di coesività occorrono entrambe nei campioni, e che la *LOP/C* non è una caratteristica peculiare di una specifica variante di PTC. La correlazione fra *LOP/C* e parametri clinici ha evidenziato un'associazione con invasione extratiroidea, dimensione del tumore (pT) e metastasi linfonodali, mentre non vi è rapporto con genere ed età del paziente. I risultati prodotti da questi studi hanno indotto a ritenere la *LOP/C* un marcatore morfologico utile come indicatore di metastasi linfonodali e comportamento aggressivo del tumore (Bai, et al., 2009; Liu, et al., 2011). Ad oggi, nessuno studio si è concentrato sui complessi della polarità cellulare e la loro alterazione nei carcinomi tiroidei, in particolare sul complesso PAR. Tuttavia, è presente in letteratura un unico studio in cui è stata evidenziata la delezione omozigote di *PARD3α* in colture primarie derivate da ATC. Gli autori, inoltre, hanno riportato che l'espressione esogena di *PARD3α* era in grado di ridurre la proliferazione cellulare, la motilità, l'invasività, e di ripristinare i contatti cellula-cellula (Garg, et al., 2015).

2 Scopo della tesi

La deregolazione dell'espressione e/o della localizzazione dei membri dei complessi della polarità cellulare sono responsabili delle alterazioni e della perdita della polarità cellulare, considerata una caratteristica peculiare del cancro. In questo studio si è scelto di indagare l'espressione dei membri del complesso della polarità PAR nei carcinomi papilliferi (PTC) e nei carcinomi anaplastici della tiroide (ATC). I carcinomi tiroidei sono la patologia endocrina più frequente, e particolarmente diffuso è il PTC. Diversi studi hanno dimostrato che l'alterazione dei livelli di espressione e/o della localizzazione subcellulare dei membri del complesso PAR sono coinvolte nella tumorigenesi e nella progressione del cancro, ma ad oggi non sono disponibili dati nei carcinomi tiroidei (TC). In altri tipi di tumore, inoltre, la deregolazione dell'espressione di alcuni componenti del complesso è stata associata alla prognosi del paziente. Nel presente lavoro è stata analizzata l'espressione delle varie forme dei membri del complesso PAR (α PKC ι , PARD3 α , PARD3 β , PARD6 α , PARD6 β , e PARD6 γ) in una casistica costituita da 95 pazienti affetti da PTC e 12 pazienti affetti da ATC. L'obiettivo principale è stato quello di misurare l'espressione dei trascritti nei carcinomi differenziati di tipo papillifero, che più frequentemente interessano la ghiandola tiroidea, e nei carcinomi anaplastici. Il razionale che ha indotto ad includere i secondi nello studio è che essi, caratterizzati da cellule totalmente indifferenziate, avrebbero potuto mostrare un'importante alterazione dell'espressione dei suddetti geni. Il confronto fra i due tipi di tumori avrebbe quindi fornito maggiori informazioni qualora fosse stato identificato un trend nell'alterazione dell'espressione dei geni. Dopo aver confermato la disregolazione dei geni del complesso PAR, ne è stata valutata la valenza prognostica per i pazienti affetti da PTC al fine di individuare potenziali biomarcatori prognostici affidabili nella predizione di recidiva

della malattia neoplastica tiroidea. Il sistema di stadiazione utilizzato per i TC, il TNM, è lacunoso sotto quest'aspetto, nonostante l'affiancamento della valutazione di altri parametri clinico-patologici quali l'età del paziente e l'istologia del tumore. Nel corso degli ultimi anni, diverse ricerche si sono concentrate sull'individuazione di biomarcatori prognostici, e alcuni di questi si sono rivelati potenzialmente utili in clinica, sebbene sia necessario estendere gli studi su casistiche più ampie. In questo lavoro si è scelto di esplorare la ricerca di tali marcatori nell'ambito di un fenomeno essenziale per il mantenimento dell'omeostasi del tessuto epiteliale: la polarità cellulare. Esso, infatti, è anche strettamente connesso ad un processo di enorme rilevanza clinica, la transizione epitelio-mesenchimale, il quale determina la disseminazione metastatica delle cellule tumorali.

3 Materiali e Metodi

3.1 Tessuti e parametri clinico-patologici dei pazienti

Per l'analisi dell'espressione genica a livello di mRNA, i campioni di tessuto tiroideo affetto da carcinoma papillifero e quello sano dal lobo controlaterale sono stati collezionati da 95 pazienti (19 maschi e 76 femmine, di età compresa fra 11 e 83 anni, e mediana di 44 anni) sottoposti ad intervento di tiroidectomia totale presso il Dipartimento di Scienze Chirurgiche della "Sapienza" Università di Roma (38 pazienti) o il Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università degli Studi di Padova (57 pazienti); mentre i campioni di tessuto tumorale di carcinoma anaplastico sono stati prelevati da 12 pazienti (4 maschi e 8 femmine, di età compresa fra 57 e 79 anni, e mediana 69 anni) sottoposti ad intervento di tiroidectomia totale presso il Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università degli Studi di Padova (7 pazienti) o il Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Pisa (5 pazienti). Il consenso informato dei pazienti è stato ottenuto prima della procedura (Protocollo No. 2615). I campioni sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo, il quale è stato vincolato alla conferma della diagnosi istologica da parte di due anatomopatologi, in accordo con la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. Nella casistica dei pazienti affetti da PTC, 72 pazienti presentavano la variante classica, 18 quella follicolare, 2 quella a cellule alte e 2 quella oncocitica. Inoltre, 59 pazienti erano in stadio I, 1 in stadio II, 29 in stadio III e 6 in stadio IV. Al momento dell'intervento, 39 pazienti presentavano metastasi linfonodali. Approssimativamente dopo 50 giorni dall'intervento i pazienti sono stati sottoposti a terapia con I^{131} seguita da terapia sostitutiva o soppressiva con ormone tiroideo. Per escludere la persistenza della malattia, 4 o 5 mesi dopo l'intervento chirurgico tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ecografia del collo e dosaggio della Tg sierica. Le recidive

sono state diagnosticate attraverso il dosaggio dei livelli di Tg sierica, sia in condizioni basali sia a seguito di stimolazione con TSH umano ricombinante; citologia su FNA e/o determinazione della Tg nel wash-out FNA da linfonodo; diagnosi istologica seguita alla resezione chirurgica della lesione. Il follow-up è stato seguito per 79 pazienti (in un intervallo di tempo compreso tra 5 e 141 mesi), e sono state registrate 16 recidive. I pazienti affetti da ATC sono tutti deceduti a causa della malattia (con intervallo di sopravvivenza compreso fra 1 e 25 mesi, e mediana di 6 mesi).

3.2 Determinazione della mutazione *BRAF*^{V600E}

Il DNA genomico è stato estratto da tessuti congelati mediante l'utilizzo di DNeasy Blood and Tissues kit (QIAGEN, Milan, Italy), in accordo con le indicazioni del produttore. Lo stato dell'esone 15 del gene *BRAF* è stato valutato sia attraverso sequenziamento diretto che con PCR specifica per l'allele mutante con sostituzione del nucleotide 1799 T con A (V600E), usando la procedura precedentemente descritta (Barollo, et al., 2010).

3.3 Estrazione di RNA e analisi dell'espressione

I tessuti tumorali e le loro controparti sane congelati sono stati omogeneizzati tramite ULTRA- TURRAX® con 1 ml di reagente di lisi Isol-RNA (5 PRIME GmbH, Germania), in ghiaccio. Da 5µg di RNA totale, è stato purificato e retro-trascritto il messaggero con M-MLV trascrittasi inversa e primers di ancoraggio oligo(dT)23 (Sigma Chemicals Co.). Il cDNA prodotto è stato analizzato in PCR quantitativa utilizzando SYBR Premix Ex Taq II (ThliRNase H Plus) (Takara, Otsu, Shiga, Giappone), lo strumento LightCycler (Roche Diagnostic, Mennheim, Germania), e le coppie di primers elencate nella Tabella 1. *GAPDH*, *RPL13A* e *SDHA* sono stati utilizzati come geni housekeeping. La specificità degli ampliconi è stata controllata mediante elettroforesi su gel di agarosio 2% con bromuro di etidio, valutazione delle temperature di melting, sequenziamento automatico (Bio-Fab Research,

Roma, Italia). Le curve standard per tutti i geni sono state create con diluizioni progressive di 5 volte di una mistura di cDNA estratto da tessuti tiroidei umani. La quantificazione dell'espressione genica nei PTC è stata realizzata con il software Relative Expression Software Tool (REST 2009), confrontando i risultati ottenuti dai tessuti patologici e sani controlaterali di ciascun paziente. L'espressione genica, indicata come variazione relativa, è stata giudicata alterata quando si è riscontrato variazione relativa $\neq 1 \pm 20\%$. Il 20% di variabilità corrisponde a tre volte la deviazione standard inter-dosaggio, calcolata su tre pool di RNA, su un totale di 20 dosaggi consecutivi. I risultati dell'espressione genica negli ATC, invece, sono stati utilizzati per operare un confronto con l'espressione nei PTC. Non disponendo di tessuto sano controlaterale per i carcinomi anaplastici, sono state confrontate le espressioni esclusivamente nei due tipi di tessuto tumorale attraverso il metodo del $\Delta\Delta Ct$. Il ΔCt per ciascun gene d'interesse di ogni paziente è stato calcolato usando la media geometrica dei geni *housekeeping*, mentre il $\Delta\Delta Ct$ è stato ottenuto sottraendo i ΔCt dei campioni con minore espressione di ciascun gene ai ΔCt precedentemente determinati.

Tabella 2 Sequenza e posizione genomica dei primers utilizzati in qRT-PCR per i geni d'interesse e gli *housekeeping*. Nella tabella è anche indicata la lunghezza degli ampliconi prodotti.

Gene	Sequenza Primer	Esone	Lunghezza amplicone
<i>GAPDH</i>	F: 5'-ATCATCAGCAATGCCTCCTG-3'	6-7	136 bp
	R: 5'-GGCCATCCACAGTCTTCTG-3'	8	
<i>RPL13A</i>	F: 5'-ACCGTGCGAGGTATGCTG-3'	4-5	148 bp
	R: 5'-TAGGCTTCAGACGCACGAC-3'	6	
<i>SDHA</i>	F: 5'-GCATAAGAACATCGGAACTGC-3'	12	147 bp
	R: 5'-GGTCGAACGTCTTCAGGTG-3'	13	
<i>aPKCα</i>	F: 5'-CTAAGGAACGATTGGGTTGTC-3'	16	126 bp
	R: 5'-TGAGAATCAAAGTTGTCCAAACC-3'	17	
<i>PARD3α</i>	F: 5'-GATAATCAGAGGCAGGGGATG-3'	19	115 bp
	R: 5'-TGTGTCTTCTTCCAAGGTCTCC-3'	20	
<i>PARD3β</i>	F: 5'-AACCACCTCTAGGCGAAATG-3'	12	139 bp
	R: 5'-AGAATGTGGTGTGGAGAAGG-3'	13	
<i>PARD6α</i>	F: 5'-CCTCACCAACGACGACAG-3'	2	107 bp
	R: 5'-AGAGAGTTGGAGGCAAAAGC-3'	3	
<i>PARD6β</i>	F: 5'-TTTCAACGGCCAATCCAC-3'	1	147 bp
	R: 5'-TGTCAGGACGCAATACGTTG-3'	2	
<i>PARD6γ</i>	F: 5'-TCAGACCTTGCGATTCTACG-3'	1	147 bp
	R: 5'-TTGGAGATATGGTGGGTGTG-3'	2	

3.4 Estrazione delle proteine e Western Blot

L'estrazione delle proteine è stata realizzata dai tessuti tumorali di PTC e dalle loro controparti sane provenienti da 12 pazienti, per i quali erano disponibili campioni di dimensioni sufficienti per permettere contemporaneamente l'estrazione proteica e di RNA. I suddetti tessuti sono stati omogeneizzati tramite ULTRA-TURRAX® in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% sodio deossicolato, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM AEBSF, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 1 mM sodio ortovanadato, 10 mM sodio pirofosfato in ddH₂O) addizionato di inibitori di fosfatasi e proteasi (P0044 Phosphatase Inhibitor Cocktail 3, Sigma Aldrich). I campioni sono stati sonicati e centrifugati per 15 minuti a 14000g. Le proteine totali recuperate sono state dosate mediante

saggio Bradford. Aliquote di 25 µg di proteine sono state addizionate di Laemmli buffer 5X (120 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glicerolo, 0.01% Blue di Bromofenolo) contenente mercaptoetanolo 5%, bollite a 95°C per 5 minuti, e separate tramite elettroforesi SDS-PAGE 10%. In seguito, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa, la quale è stata poi colorata con Rosso Ponceau per controllare l'esito della corsa elettroforetica. La membrana è stata poi lavata con TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) e saturata con latte non grasso 5% in TBST o con BSA5% in TBST per 2 ore. Per l'immunoblotting sono stati usati gli anticorpi primari: anti-aPKC λ 1 (1:1000) (*sc-11399, Rabbit pAb, Santa Cruz Biotechnology, INC.*), anti-PARD3 α (1:1000) (*NBP1-88861, Rabbit pAb, Novus Biologicals*), anti-PARD3 β (1:1000) (*Ab122264, Rabbit pAb, Abcam*), anti-PARD6 α (1:1000) (*sc-25525, Rabbit pAb, Santa Cruz Biotechnology, INC.*), anti-PARD6 β (1:1000) (*sc-67392, Rabbit pAb, Santa Cruz Biotechnology, INC.*), anti-PARD6 γ (1:1000) (*orb35046, Rabbit pAb Biorbyt*), anti-GAPDH (1:40000) (*Anti-GAPDH Mouse mAb, AbCam*). Gli anticorpi primari sono stati incubati con latte non grasso 2,5% in TBST o con BSA5% in TBST per tutta la notte. Le membrane sono state poi incubate con opportuni anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano (1:1000) (Thermo Fisher Scientific, Pierce Rockford, IL), con latte non grasso 2,5% in TBST. L'immunoreattività è stata rilevata tramite una reazione di chemiluminescenza, utilizzando i substrati LiteAbLot PLUS e LiteAbLot EXTEND (Euroclone, Milano, Italia). Le intensità relative delle bande sono state misurate mediante analisi densitometrica, utilizzando il software ImageJ (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

3.5 Analisi statistica

La distribuzione dei dati è stata analizzata mediante il test di verifica della normalità Shapiro-Wilk, che ha evidenziato una distribuzione non normale delle variabili considerate nello studio. Pertanto, la significatività statistica dei dati è stata valutata mediante i test non

parametrici di Wilcoxon, Rho di Spearman e Mantel-Cox, utilizzando il software SPSS-IBM® (IBM, Armonk, NY, USA), e le variazioni riscontrate sono state considerate significative unicamente per valori di probabilità inferiori a 0.05. Il test di Wilcoxon è stato applicato per determinare le eventuali differenze statisticamente significative fra i livelli di espressione dei trascritti dei geni analizzati confrontando: maschi vs femmine; variante classica PTC vs altre varianti istologiche; BRAF^{V600E} vs WT BRAF; PTC con (N1) vs senza metastasi linfonodali (N0); PTC con dimensioni T₁₋₂ vs T₃₋₄; PTC con stadiazione TNM I-II vs III-IV; PTC con recidiva (R1) vs senza recidiva (R0); i pazienti affetti da PTC vs quelli affetti da ATC. Il test Rho di Spearman è stato utilizzato per valutare la significatività statistica delle correlazioni bivariate fra i livelli di mRNA dei membri del complesso PAR tra loro e con l'età dei pazienti. Per valutare l'associazione indipendente dell'età dei pazienti, del genere, della dimensione del tumore, delle varianti istologiche, dello stato mutazionale di BRAF, delle metastasi linfonodali, dello stadio e dei livelli di trascritti dei membri del complesso PAR con le recidive, è stata utilizzata la regressione di Cox *stepwise* con *backward elimination*. L'impatto dell'espressione di ciascun membro del complesso PAR sull'intervallo libero da malattia è stato valutato mediante l'analisi Kaplan-Meier combinata con il test Mantel-Cox log-rank. Per quest'ultimo, i valori sono stati classificati sulla base del seguente criterio: variazione relativa >1,2 è stato considerato “aumentato”; variazione relativa < 0,8 è stato considerato “diminuito”; $0,8 \leq \text{variazione relativa} \leq 1,2$ è stato considerato “invariato”.

4 Risultati

4.1 Livelli di mRNA dei geni del complesso PAR

4.1.1 PTC

L'analisi quantitativa dell'espressione genica a livello di mRNA di *aPKC λ* , *PARD3 α* , *PARD3 β* , *PARD6 α* , *PARD6 β* e *PARD6 γ* è stata condotta su 95 campioni di PTC. I risultati sono mostrati in [Figura 13], nella quale i casi sono suddivisi in tre sottogruppi rispetto ai livelli di espressione di ciascun gene (ridotti, invariati e aumentati). I livelli di mRNA sono stati considerati variati quando il rapporto fra l'espressione del gene nel tessuto tumorale e quella nella controparte sana era diverso da $1 \pm 20\%$. L'espressione dei suddetti geni è alterata (aumentata o ridotta) nella maggior parte dei casi dei PTC (60-80%). In particolare, *aPKC λ* è ridotto in 33/95 (34,7%) casi, invariato in 27/95 (28,4%) casi, e aumentato in 35/95 (36,8%) casi; *PARD3 α* è ridotto in 27/95 (28,4%) casi, invariato in 25/95 (26,3%) casi, e aumentato in 35/95 (36,8%) casi; *PARD3 β* è ridotto in 29/95 (30,5%) casi, invariato in 40/95 (42,1%) casi, e aumentato in 26/95 (27,4%) casi; *PARD6 α* è ridotto in 61/95 (64,2%), invariato in 14/95 (14,7%) casi, e aumentato in 20/95 (21,1%) casi; *PARD6 β* è ridotto in 22/95 (23,2%) casi, invariato in 20/95 (21,1%) casi, e aumentato in 53/95 (55,8%) casi; e *PARD6 γ* è ridotto in 63/95 (66,3%) casi, invariato in 15/95 (15,8%) casi e aumentato in 17/95 (17,9%) casi.

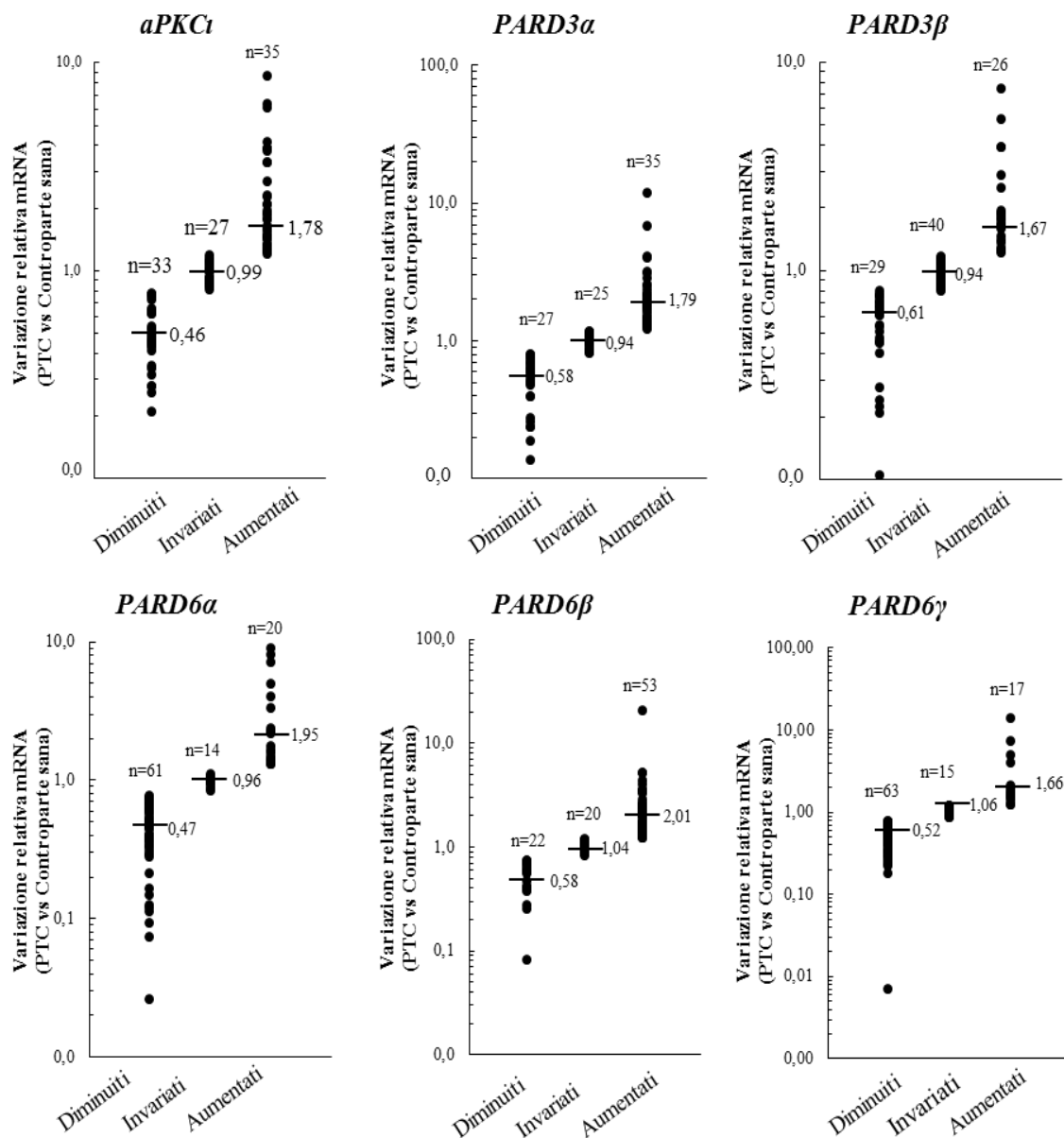


Figura 13. Variazione relativa dei livelli di mRNA dei geni del complesso PAR nei pazienti affetti da PTC fra il tessuto tumorale e sano controlaterale. Per ogni gruppo (diminuiti, invariati aumentati), “n” indica il numero di casi da cui è composto, mentre la barretta nera rappresenta la mediana dei livelli di mRNA del gene. Il valore mediano è riportato accanto alla barra.

4.1.2 ATC

L'analisi quantitativa dell'espressione genica a livello di mRNA di *aPKC ι* , *PARD3 α* , *PARD3 β* , *PARD6 α* , *PARD6 β* e *PARD6 γ* è stata realizzata anche su 12 campioni di ATC. Non avendo tessuto sano controlaterale contro cui normalizzare l'espressione, i risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione dell'mRNA nei carcinomi anaplastici sono stati utilizzati esclusivamente per operare un confronto con l'espressione degli stessi geni nei tessuti di carcinoma papillifero (non normalizzati con i tessuti sani controlaterali). L'espressione dei geni d'interesse è minore nei tessuti di carcinoma anaplastico, e i risultati sono mostrati nella **[Figura 14]**.

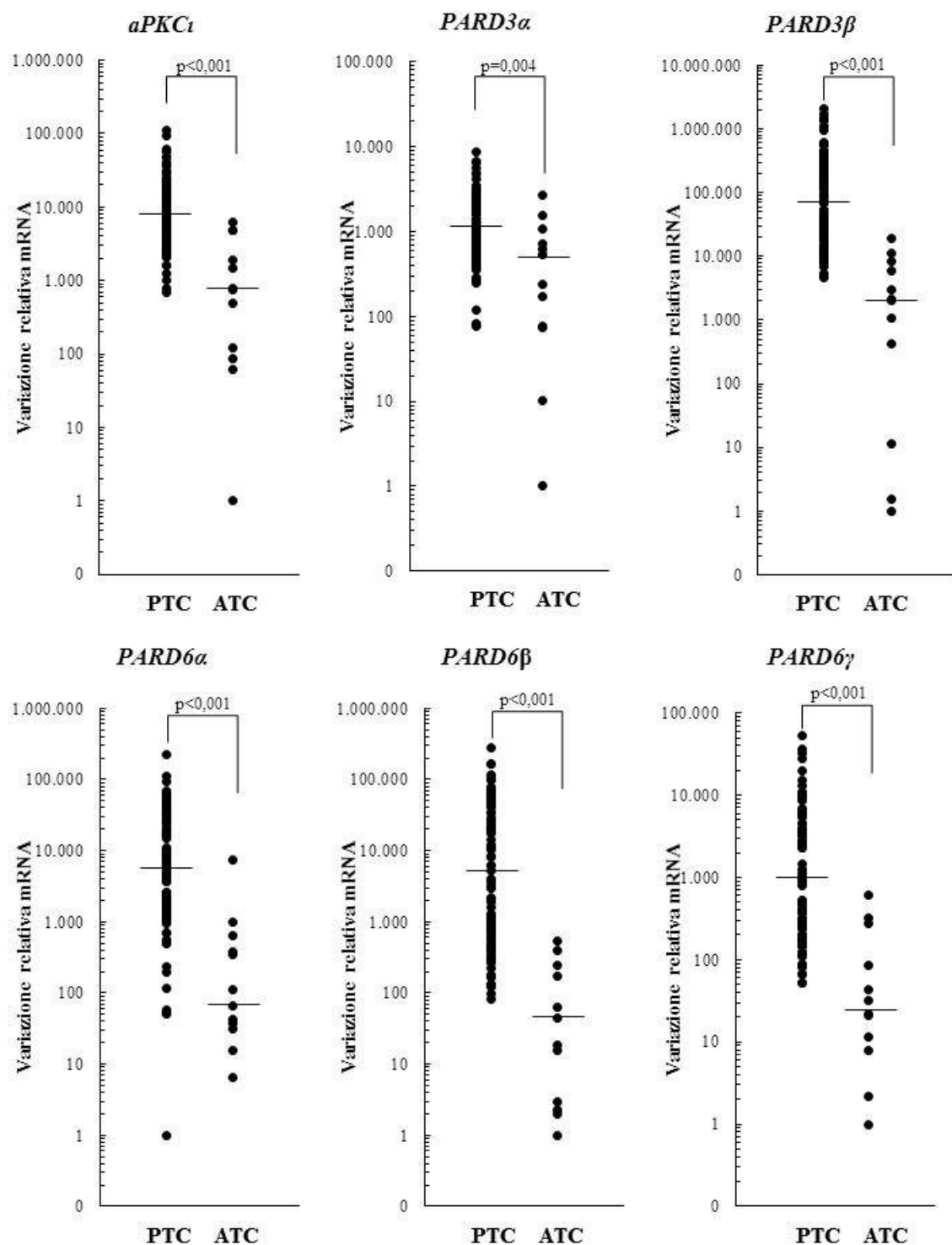


Figura 14. Confronto dell'espressione dei trascritti dei geni del complesso PAR tra tessuti affetti da PTC e da ATC. La variazione relativa è stata calcolata con il metodo del $\Delta\Delta C_t$ descritto nella sezione materiali e metodi. La barra indica il valore mediano della distribuzione.

4.2 Correlazioni fra i livelli di mRNA dei vari geni analizzati

Il test Rho di Spearman ha evidenziato correlazioni bivariate statisticamente significative con andamento positivo fra tutti gli mRNA dei geni. L'unica eccezione è rappresentata dalla coppia di variabili *PARD6α-PARD6β*, per la quale non viene restituito un *p value* significativo (Tabella 3).

Tabella 3. Analisi di correlazione bivariata fra i livelli di mRNA dei componenti del complesso PAR nei pazienti affetti da PTC.

	<i>Coefficienti di correlazione e p-values</i>					
	<i>aPKC_l</i>	<i>PARD3α</i>	<i>PARD3β</i>	<i>PARD6α</i>	<i>PARD6β</i>	<i>PARD6γ</i>
<i>aPKC_l</i>	1.000 -	0.718 <0.0001	0.439 <0.0001	0.279 0.006	0.489 <0.0001	0.497 <0.0001
<i>PARD3α</i>		1.000 -	0.555 <0.0001	0.367 <0.0001	0.507 <0.0001	0.538 <0.0001
<i>PARD3β</i>			1.000 -	0.347 0.001	0.570 <0.0001	0.667 <0.0001
<i>PARD6α</i>				1.000 -	0.150 0.142	0.371 <0.0001
<i>PARD6β</i>					1.000 -	0.466 <0.0001
<i>PARD6γ</i>						1.000 -

4.3 Livelli di proteina per il complesso PAR nei PTC

L'analisi dei livelli delle proteine dei componenti del complesso PAR è stata realizzata su un numero limitato di tessuti di PTC e loro controparti sane (n=12). Gli esperimenti di *western blot* hanno confermato la deregolazione dell'espressione dei vari membri del complesso (aumento o riduzione), nella maggior parte dei tessuti considerati [Figura 15].

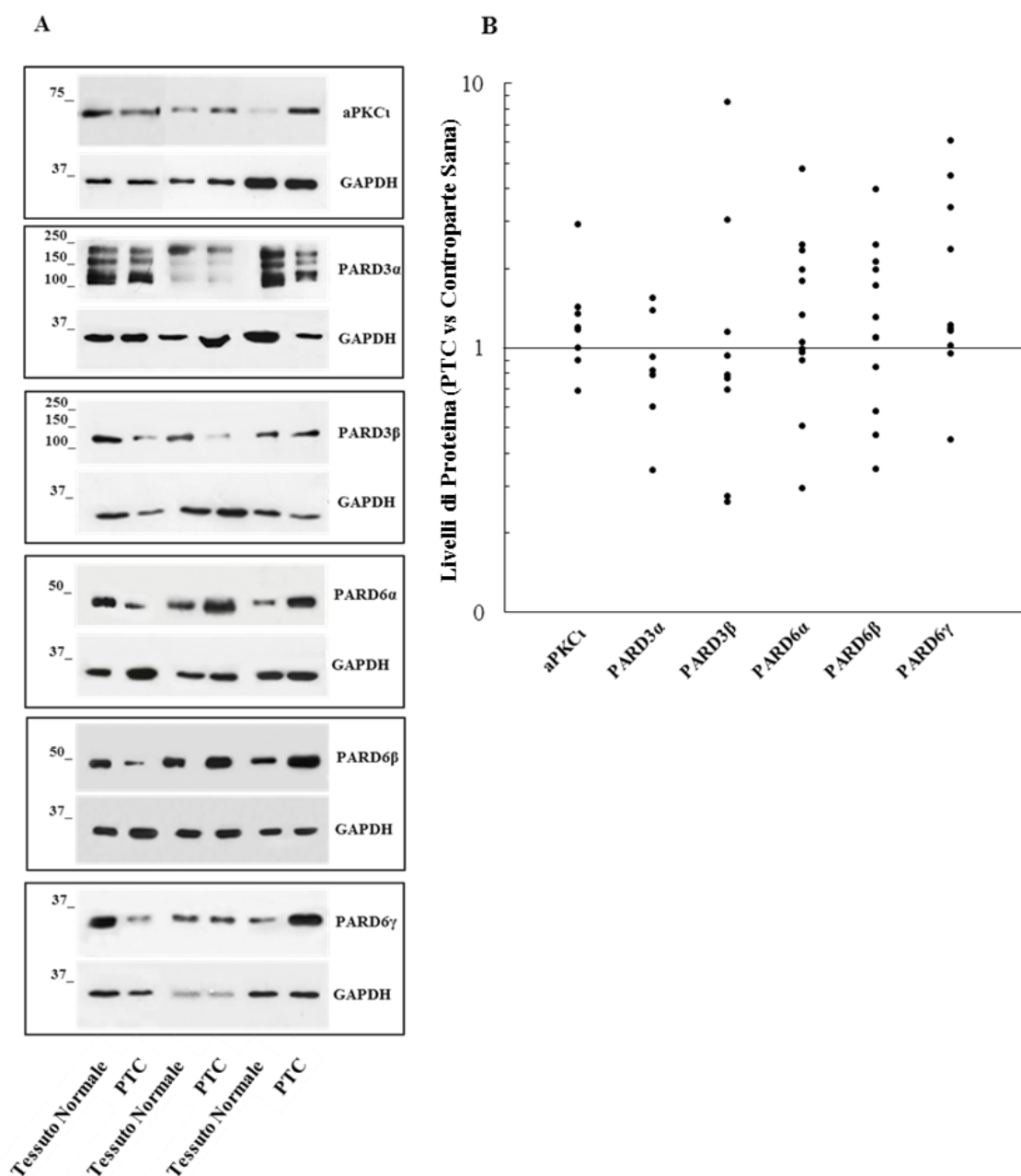


Figura 15. **A.** Nelle foto sono proposti casi in cui l'espressione delle proteine è diminuita, invariata o aumentata nei tessuti tumorali rispetto alla controparte sana. **B.** Nel grafico sono rappresentati i livelli di espressione delle proteine dei membri del complesso PAR nei 12 pazienti affetti da PTC analizzati, normalizzando l'espressione nel tessuto tumorale con quella nel tessuto sano controlaterale.

4.4 Correlazioni con i parametri clinico-patologici

I livelli di mRNA di ciascun gene indagato sono stati correlati con i parametri clinico-patologici (età, genere, stadiazione TNM, istologia, presenza di recidiva), e con lo stato

mutazionale di BRAF. Considerato l'esiguo numero di casi con Stadio II e IV, questi sono stati accorpati, rispettivamente, allo Stadio I e III. Altrettanto è stato fatto con la dimensione del tumore (T): i gruppi T₂ e T₄, sono stati uniti, rispettivamente, ai gruppi T₁ e T₃. Nessuna associazione statisticamente significativa è stata riscontrata fra i livelli di mRNA dei geni considerati nello studio e il genere, l'età, l'istotipo tumorale, le metastasi linfonodali, e la stadiazione TNM. Un'associazione statisticamente significativa è stata invece riscontrata fra i minori livelli di mRNA dei geni *aPKC ι* , *PARD3 β* e *PARD6 γ* e una maggiore dimensione del tumore. Inoltre, l'analisi della popolazione per lo stato mutazionale di BRAF ha evidenziato una differenza statisticamente significativa per il gene *PARD6 β* (p=0,037) fra il gruppo *wild type* e il gruppo con la mutazione BRAF^{V600E}. La significatività statistica si raggiunge anche nell'analisi della comparsa di recidiva per il gene *PARD3 β* (p=0,034). Le mediane dei livelli di mRNA di ciascun gene indagato sono maggiori nel gruppo che non presenta recidiva rispetto al gruppo con recidiva. I risultati dell'analisi statistica univariata sono sintetizzati in **Tabella 4**. È interessante notare che l'analisi Kaplan-Meier ha dimostrato una correlazione significativa dei livelli di *PARD3 β* con l'intervallo libero da malattia dei pazienti (DFI). In **[Figura 16]** il DFI è rappresentato per i pazienti raggruppati in tre categorie, in base ai livelli di mRNA di *PARD3 β* : aumentati, invariati e diminuiti. Appare evidente che i più bassi livelli di trascritto *PARD3 β* influenzano negativamente il DFI.

Tabella 4. Risultati dell'analisi statistica univariata sui livelli dei trascritti dei membri del complesso PAR in relazione ai parametri clinico-patologici dei pazienti affetti da PTC. Per ogni gene è riportata la mediana dei valori di mRNA. Le differenze statisticamente significative sono cerchiare in rosso.

	<i>aPKC1</i>	<i>p value</i>	<i>PARD3a</i>	<i>p value</i>	<i>PARD3β</i>	<i>p value</i>	<i>PARD6a</i>	<i>p value</i>	<i>PARD6β</i>	<i>p value</i>	<i>PARD6γ</i>	<i>p value</i>
Genere												
Maschi (n=19)	1,02	0,948	1,05	0,357	0,82	0,176	0,65	0,985	1,14	0,515	0,59	0,367
Femmine (n=76)	0,99		1,15		0,94		0,63		1,32		0,66	
Età												
Coeff. Correlazione	0,082	0,427	0,131	0,205	-0,075	0,468	0,028	0,791	-0,050	0,628	0,025	0,810
Istologia												
Variante Classica (n=79)	1,01	0,897	1,07	0,804	0,91	0,132	0,61	0,819	1,32	0,850	0,59	0,352
Altre Varianti (n=16)	0,91		1,22		1,09		0,70		1,28		0,84	
BRAF												
Wild Type (n=38)	1,04	0,458	0,95	0,374	0,90	0,467	0,66	0,897	1,16	0,037	0,69	0,844
V600E (n=38)	1,01		1,12		0,92		0,62		1,52		0,64	
pT												
T1-2 (n=39)	1,21	0,014	1,29	0,581	1,12	0,004	0,65	0,653	1,53	0,263	0,74	0,019
T3-4 (n=56)	0,91		0,95		0,86		0,62		1,22		0,58	
pN												
N0 (n=56)	1,00	0,581	1,19	0,650	0,99	0,449	0,66	0,623	0,47	0,159	0,67	0,200
N1 (n=39)	0,99		0,96		0,86		0,62		0,18		0,56	
Stadio TNM												
I-II (n=60)	0,95	0,434	1,08	0,579	0,95	0,176	0,61	0,576	1,40	0,579	0,67	0,357
III-IV (n=35)	1,01		1,15		0,88		0,68		1,21		0,59	
Recidiva												
No (n=63)	1,06	0,076	1,21	0,230	1,01	0,017	0,65	0,591	1,41	0,161	0,69	0,102
Si (n=16)	0,80		0,84		0,74		0,51		1,01		0,51	

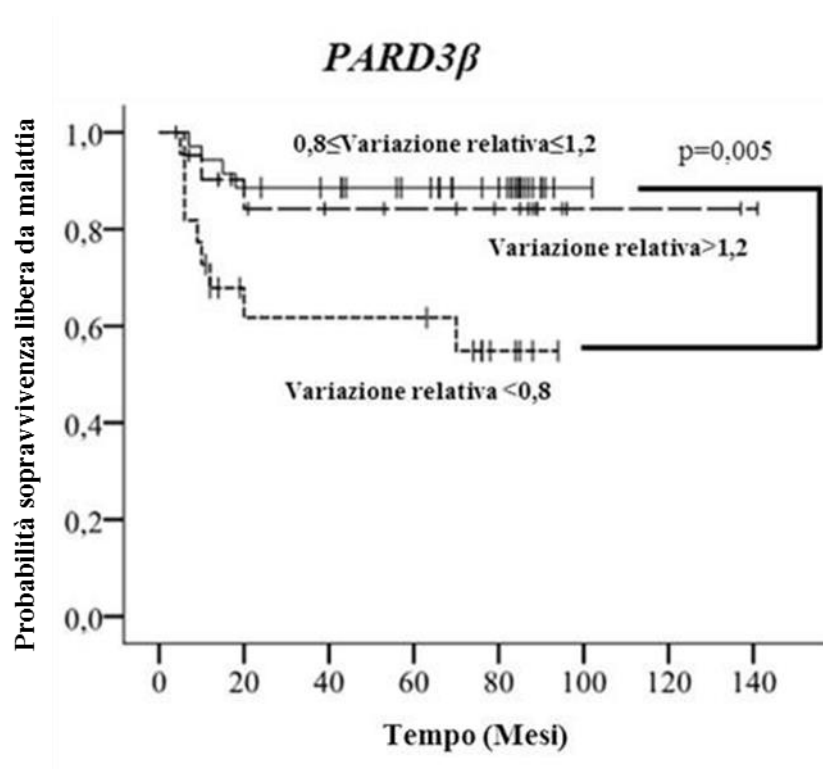


Figura 16. Curva di Kaplan-Meier combinata con test statistico *log-rank* di Mantel-Cox, eseguita sui livelli di mRNA di *PARD3 β* di 79 pazienti affetti da PTC seguiti in follow-up da 5 a 141 mesi.

Inoltre, l'analisi statistica multivariata ha indicato *PARD3 β* e la presenza di metastasi linfonodali alla diagnosi come le uniche variabili indipendentemente associate alla comparsa di recidiva (**Tabella 5**).

Tabella 5. Risultato dell'analisi statistica multivariata, operata con regressione di Cox *stepwise* con *backward elimination*. Sono riportate solo le variabili risultate indipendentemente associate alla comparsa di recidiva nei pazienti affetti da PTC.

Variabile	Rischio Relativo	95%IC	p value
Riduzione mRNA <i>PARD3β</i>	3,04	1,12-8,24	0,029
Metastasi Linfonodali	8,21	1,85-35,53	0,006

5 Discussione

La deregolazione dell'espressione dei membri del complesso PAR è stata associata allo sviluppo e alla progressione di vari tipi di cancro (Ellenbroek, et al., 2012). Tuttavia, nessuna ricerca ha studiato la loro espressione e il loro ruolo nello sviluppo e/o nella progressione nel cancro della tiroide. In letteratura è presente un solo studio che evidenzia la delezione omozigote di *PARD3α* in due colture primarie derivate da un paziente affetto da ATC, prodotte dal tumore primario e da una sua metastasi linfonodale. Gli autori hanno, inoltre, riportato che l'espressione esogena di *PARD3α* era in grado di ridurre la proliferazione cellulare, la motilità, l'invasività, e di ripristinare i contatti cellula-cellula (Garg, et al., 2015). Nella casistica del presente studio, sono stati indagati i livelli di mRNA dei geni paraloghi codificanti i membri del complesso PAR nei PTC e negli ATC. I risultati hanno indicato che l'espressione di tutti i geni era deregolata nei tessuti PTC rispetto alla controparte sana, e che i trascritti dei geni erano significativamente ridotti nei tessuti tumorali anaplastici rispetto a quelli papilliferi. Queste osservazioni potrebbero suggerire che la riduzione dell'espressione dei geni *aPKCι*, *PARD3α*, *PARD3β*, *PARD6α*, *PARD6β* e *PARD6γ* contribuisca alla progressione e al dedifferenziamento dei TC, come ipotizzato nel carcinoma esofageo a cellule squamose, nel quale i livelli ridotti di trascritto *PARD3α* sono stati associati con il dedifferenziamento (Zen, et al., 2009). La riduzione dell'espressione di *PARD3α* è stata associata anche con la maggiore aggressività del cancro della mammella (McCaffrey, et al., 2012; Xue, et al., 2012). Per contro, alcuni studi hanno evidenziato che in tipi diversi di tumore, quali il carcinoma epatocellulare e quello renale a cellule chiare, le forme più aggressive sono associate ad un aumento dell'espressione di *PARD3α* (Dugay, et al., 2014; Jan, et al., 2013). Riguardo *PARD6α* e *PARD6β*, studi recenti hanno dimostrato un aumento della

loro espressione nel carcinoma mammario, dove attivano la via di trasduzione del segnale di MEK/ERK e aumentano il tasso di proliferazione delle cellule cancerose (Cunliffe, et al., 2012; Nolan, et al., 2008). Nella casistica analizzata in questo studio, invece, i livelli di mRNA *PARD6α* sono diminuiti nel 65% dei casi di PTC analizzati, e sono significativamente ridotti negli ATC rispetto ai PTC, mentre l'espressione di *PARD6β* è stata riscontrata aumentata in più del 50% dei tessuti di PTC analizzati. Il confronto fra l'espressione di quest'ultimo nei tessuti tumorali papilliferi e anaplastici ha, tuttavia, indicato una significativa riduzione nei secondi. Qualora vi fosse una correlazione positiva fra espressione di mRNA e proteina, tale evidenza sarebbe in accordo con quanto riportato nel carcinoma mammario da Cunliffe e colleghi, che hanno mostrato che la riduzione della proteina *PARD6β* è associata al fenotipo scarsamente differenziato (Cunliffe, et al., 2012). Riguardo *PARD6γ*, i dati sono in accordo con uno studio condotto su linee cellulari del cancro della mammella che suggeriscono un suo ruolo oncosoppressivo (Marques, et al., 2016). In ultimo, l'aumento dell'espressione di *aPKCι*, come dimostrata nel 37% dei PTC valutati, è stata riportata nei cancri dell'ovaio, del polmone, del fegato, del pancreas e testa-collo (Eder, 2005; Kojima & Akimoto, 2008; Lee & Vasioukhlin, 2008; Regala, et al., 2005). Tuttavia, l'analisi di espressione genica condotta in questo studio ha evidenziato anche la riduzione del trascritto *aPKCι* in circa il 35% dei tessuti tumorali dei pazienti affetti da PTC, e nei tessuti di ATC rispetto a quelli di PTC. In letteratura non sono presenti studi in cui sia stata registrata la riduzione dell'espressione di *aPKCι* nel cancro. Anche l'espressione di *aPKCι*, dunque, potrebbe essere diversamente deregolata in base al tipo tumorale, come dimostrato per gli altri membri del complesso (Khursheed & Bashyam, 2014). Nell'insieme, queste osservazioni inducono a supportare l'ipotesi dell'attività oncogenica/oncosoppressiva contesto-dipendente dei geni PAR (Iden, et al., 2012; Khursheed & Bashyam, 2014).

Di particolare interesse potrebbe essere l'estensione dello studio di espressione a livello

proteico. Nonostante in questo studio sia stata confermata anche l'alterazione dell'espressione proteica dei membri del complesso PAR nei PTC, la paucità dei campioni non ne permette una valutazione statistica. Studi funzionali successivi sarebbero auspicabili per determinare il ruolo patogenetico dei membri del complesso nella progressione del TC. In particolare, sarebbe interessante indagare il ruolo delle diverse forme di PARD6 nel dedifferenziamento. Oltre a quanto sopra riferito riguardo la riduzione della proteina PARD6 β e l'associazione al fenotipo scarsamente differenziato del carcinoma della mammella, infatti, è stato anche dimostrato che PARD6 viene fosforilata da TGFR- β , e ciò produce la dissoluzione delle TJs che, insieme con la dissoluzione delle AJs TGF- β indotta, contribuisce alla transizione epitelio-mesenchimale (Ozdamar, et al., 2005).

In questo studio è stato successivamente valutato se la deregolazione dell'espressione dei diversi membri del complesso PAR avesse valore prognostico. Nell'analisi statistica univariata, diverse associazioni significative sono emerse tra i parametri clinico-patologici dei pazienti PTC, tra le quali l'associazione fra l'aumento del livello di mRNA *PARD6 β* e la mutazione *BRAF*^{V600E}. Uno studio condotto in topi affetti da PTC ha dimostrato una maggiore suscettibilità del tumore ad andare incontro al fenomeno di transizione epitelio-mesenchimale negli animali con la mutazione *BRAF*^{V600E} (Knauf, et al., 2011). In precedenza era stato dimostrato che la mutazione *BRAF*^{V600E} era in grado di indurre la secrezione di TGF β nella linea cellulare PCCl3 (Riesco-Eizaguirre, et al., 2009). Inoltre, come sopra riferito, TGFR- β fosforila PARD6, innescando la dissoluzione delle TJs. Tale evento è uno dei primi che intervengono nel fenomeno EMT. L'associazione statisticamente significativa tra i più alti livelli di mRNA *PARD6 β* e la mutazione *BRAF*^{V600E} riscontrata nel presente lavoro potrebbe, dunque, essere un segno dell'innescamento del processo di EMT. Per investigare tale ipotesi, ulteriori studi andrebbero condotti ampliando la casistica a disposizione e valutando la presenza delle caratteristiche istologiche di EMT. Tuttavia, la più interessante delle associazioni riscontrate era quella fra i bassi livelli di mRNA *PARD3 β* e la recidiva del

tumore. Questo risultato è stato confermato dall'analisi di sopravvivenza Kaplan-Meier e dall'analisi statistica multivariata, la quale ha identificato la riduzione dell'espressione dell'mRNA *PARD3β* come un fattore prognostico indipendente per il DFI. Quanto dimostrato potrebbe avere rilevanza clinica, poiché, ad oggi, la prognosi dei pazienti PTC è ancora legata a variabili clinico- patologiche come età, dimensione del tumore, istologia, metastasi linfonodali o a distanza, che non sono accurate nella predizione dell'evoluzione a lungo termine della malattia (Baldini, et al., 2014; Gospodarowicz, et al., 2011; Ulisse, 2011). Pertanto, l'identificazione di nuovi biomarcatori molecolari strettamente connessi al rischio di recidiva del PTC è necessaria.

In conclusione, i dati qui riportati, sebbene necessitino di una conferma attraverso l'indagine di casistiche di maggiori dimensioni, dimostrano che l'espressione dei membri del complesso PAR è deregolata nella maggior parte dei tessuti di PTC e ATC. Inoltre, l'mRNA *PARD3β* potrebbe rappresentare un utile biomarcatore prognostico per i pazienti affetti da PTC.

6 Bibliografia

Aranda, V., et al., 2008. Par complex in cancer: a regulator of normal cell polarity joins the dark side. *Oncogene*, Volume 27, pp. 6878-6887.

Assémat, E. et al., 2008. Polarity complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1778, pp. 614-630.

Awadelkarim, K. D. et al., 2012. Quantification of PKC family genes in sporadic breast cancer by qRT-PCR: evidence that PKC α/λ overexpression is an independent prognostic factor. *International Journal of Cancer*, Volume 131, pp. 2852-2862.

Bai, Y. et al., 2009. Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma and periostin expression. *Cancer Letters*, Volume 281, pp. 188-195.

Baldini, E. et al., 2014. Emerging molecular markers for the prognosis of differentiated thyroid cancer patients. *International Journal of Surgery*, Volume 12, pp. S52-S56.

Baldini, E. et al., 2013. New Molecular Approaches in the Diagnosis and Prognosis of Thyroid Cancer Patients. *Global Journal of Oncologist*, Volume 1, pp. 20-29.

Barollo, S. et al., 2010. BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancer: the relationship with (131)I and 2-[(18F)fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability. *European Journal of Endocrinology*, Volume 163, pp. 659-663.

Bashyam, M. D. et al., 2005. Array based comparative genomic hybridization identifies localized DNA amplifications and homozygous deletions in pancreatic cancer. *Neoplasia*, Volume 7, pp. 556-562.

Bergstralh, D. T. et al., 2013. Epithelial polarity and spindle orientation: intersecting pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Volume 368.

Bilder, D. & Perrimon, N., 2000. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature*, Volume 403, pp. 676-680.

Bose, R. & Wrana, J. L., 2006. Regulation of Par6 by extracellular signals. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 18, pp. 206-212.

Cavatorta, A. L. et al., 2004. Differential expression of the human homologue of drosophila discs large oncosuppressor in histologic samples from human papillomavirus-associated lesions as a marker for progression to malignancy. *International Journal of Cancer*, Volume 111, pp. 373- 380.

Chen, X. & Macara, 2005. Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nature Cell Biology*, Volume 7, pp. 262-269.

Cline, E. G. & Nelson, W. J., 2007. Characterization of mammalian Par6 as a dual-location protein. *Molecular and Cellular Biology*, Volume 27, pp. 4431-4443.

Cohen, E. E. et al., 2006. Protein kinase C zeta mediates epidermal growth factor-induced growth of head and neck tumor cells by regulating mitogen-activated protein kinase. *Cancer Research*, Volume 66, pp. 6296-6303.

Cove, D. J. et al., 1999. Polarity in Biological Systems. In: *Development*. New York: Springer-Verlag, pp. 507-524.

Cunliffe, H. E. et al., 2012. PARD6B is required for tight junction formation and activated PKC ζ localization in breast cancer. *American Journal of Cancer Research*, Volume 2, pp. 478-491.

Dormoy, V. et al., 2013. Par6 γ is at the mother centriole and controls centrosomal protein composition through a Par6 α -dependent pathway. *Journal of Cell Science*, Volume 126, pp. 860-870.

Dugay, F. et al., 2014. Overexpression of the polarity protein PAR-3 in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor prognosis. *International Journal of Cancer*, Volume 134, pp. 2051-2060.

Du, G. S. et al., 2009. Expression of P-aPKC-iota, E-cadherin, and beta-catenin related to invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, Volume 16, pp. 1578-1586.

Durgan, J. et al., 2011. Par6B and atypical PKC regulate mitotic spindle orientation during epithelial. *The Journal of Biological Chemistry*, Volume 286, pp. 12461-12474.

- Ebnet K., et al., 2001. The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO Journal*, Volume 20, pp. 3738-3748.
- Eder, A.M. et al., 2005. Atypical PKC ζ contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Volume 102, pp. 12519-12524.
- Elisei R. et al, 2008. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Volume 93, pp. 3943-3949.
- Ellenbroek, S. J. et al., 2012. Cell polarity proteins and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, Volume 22, pp. 208-15.
- Etemad-Moghadam, B., Guo, S. & Kemphues, K. J., 1995. Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell*, Volume 83, pp. 743-752.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A., 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell*, Volume 106, pp. 489-498.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A., 2003. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*, Volume 421, pp. 753-756.
- Evans, J. D. et al., 2003. Expression patterns of protein kinase C isoenzymes are characteristically modulated in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 119, pp. 392-402.
- Fluge, Ø. et al., 2001. Difference in patterns of Met expression in papillary thyroid carcinomas and nonneoplastic thyroid tissue. *World Journal of Surgery*, Volume 25, pp. 623-631.
- Frederick, L. A. et al., 2008. Matrix metalloproteinase-10 is a critical effector of protein kinase C α -Par6 α -mediated lung cancer. *Oncogene*, Volume 27, pp. 4841-4853.
- Gao, L. et al., 2002. Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by PAR6. *Current Biology*, Volume 12, pp. 221-225.
- Gao, L. & Macara, I. G., 2004. Isoforms of the Polarity Protein Par6 Have distinct Functions.

The Journal of Biological Chemistry, Volume 279, pp. 41557-41562.

Gao, L. et al., 2002. Multiple splice variants of Par3 and of a novel related gene, Par3L, produce proteins with different binding properties. *Gene*, Volume 294, pp. 99-107.

Gardiol, D. et al., 2006. Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. *International Journal of Cancer*, Volume 119, pp. 1285-1290.

Garg, M. et al., 2015. Establishment and characterization of novel human primary and metastatic anaplastic thyroid cancer cell lines and their genomic evolution over a year as a primagraft. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 100, pp. 725-735.

Gospodarowicz, M. K. & O'Sullivan B., 2003. Prognostic factor in cancer. *Seminars in Surgical Oncology*, Volume 21, pp. 13-18.

Gunaratne, A. et al., 2013. Atypical protein kinase C phosphorylates Par6 and facilitates transforming growth factor β -induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Biology*, Volume 33, pp. 874-886.

Hanahan, D. & Weiber, R. A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, Volume 5, pp. 646-674.

Hirose, T. et al., 2002. Involvement of ASIP/PAR-3 in the promotion of epithelial tight junction formation. *Journal of Cell Science*, Volume 115, pp. 2485-2495.

Horokishi, Y. et al., 2009. Interaction between PAR-3 and aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *Journal of Cell Science*, Volume 122, pp. 1595- 1606.

Huo, Y. & Macara, I. G., 2014. The Par3-like polarity protein Par3L is essential for mammary stem cell maintenance. *Nature Cell Biology*, Volume 16, pp. 529-537.

Iden, S. & Collard, J. G., 2008. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Volume 9, pp. 846-859.

Iden, S. et al., 2012. Tumor type-dependent function of the PAR3 polarity protein in skin tumorigenesis. *Cancer Cell*, Volume 22, pp. 389-403.

Itoh, M. et al., 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, Volume 154, pp. 491-497.

Jan, Y. J. et al., 2013. Expression of partitioning defective 3 (par-3) for predicting extrahepatic metastasis and survival with hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, Volume 14, pp. 1684-1697.

Joberty, G. et al., 2000. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nature Cell Biology*, Volume 2, pp. 531-539.

Karp, C. M. et al., 2008. Role of the polarity determinant crumbs in suppressing mammalian epithelial tumor progression. *Cancer Research*, Volume 68, pp. 4105-4115.

Kemphues, K. J. et al., 1988. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell*, Volume 52, pp. 311-320.

Kerjaschki, D. et al., 1979. The Structure of Tight Junctions in Human Thyroid Tumors. *American Journal of Pathology*, Volume 96, pp. 207-225.

Khursheed, M. & Bashyam, M. D., 2014. Apico-basal polarity complex and cancer. *Journal of Biosciences*, Volume 39, pp. 145-155.

Kimura, E.T. et al., 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 Research*, Volume 63, pp. 1454-1457.

Knauf, J.A. et al., 2011. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGF β signaling. *Oncogene*, Volume 30, pp. 3153-3162.

Kohjima, M. et al., 2002. PAR3beta, a novel homologue of the cell polarity protein PAR3, localizes to tight junctions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 299, pp. 641-646.

Kojima, Y. & Akimoto, K., 2008. The overexpression and altered localization of the atypical protein kinase C lambda/iota in breast cancer correlates with the pathologic type of these tumors. *Human Pathology*, Volume 39, pp. 824-831.

- Langzam, L. et al., 2001. Patterns of protein kinase C isoenzyme expression in transitional cell carcinoma of bladder. Relation to degree of malignancy. *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 116, pp. 377-385.
- Lee, M. & Vasioukhlin, V., 2008. Cell polarity and cancer - cell and tissue polarity as a non canonical tumor suppressor. *Journal of Cell Science*, Volume 121, pp. 1141-1150.
- Lin, D. et al., 2000. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nature Cell Biology*, Volume 2, pp. 540-547.
- Lin, V. H. et al., 2015. Expression of polarity genes in human cancer. *Cancer Informatics*, Volume 14, pp. 15-28.
- Lisovsky, M. et al., 2009. Cell polarity protein Lgl2 is lost or aberrantly localized in gastric dysplasia and adenocarcinoma: an immunohistochemical study. *Modern Pathology*, Volume 22, pp. 977-984.
- Liu, Z. et al., 2011. Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma, a novel prediction for lymph node metastasis; possible morphological indicator of epithelial mesenchymal transition. *Journal of Clinical Pathology*, Volume 64, pp. 325-329.
- Longo, D. et al., 2012. *Harrison Manual of Medicine*. s.l.:McGraw Hill Professional.
- Louvet-Vallee, S. et al., 2005. Mitotic spindles and cleavage planes are oriented randomly in the two-cell mouse embryo. *Current Biology*, Volume 15, pp. 464-469.
- Lu, X. et al., 2009. Aberrant splicing of Hsp1-1 is associated with hepatocellular carcinoma progression. *Clinical Cancer Research*, Volume 15, pp. 3287-3296.
- Ma, L. et al., 2012. Control of nutrient stress-induced metabolic reprogramming by PKC ζ in tumorigenesis. *Cell*, Volume 152, pp. 599-611.
- Margolis, B. & Borg, J., 2005. Apicobasal polarity complexes. *Journal of Cell Science*, Volume 118, pp. 5157-5159.
- Marques, E. et al., 2016. PAR6G suppress cell proliferation and is targeted by loss-of-function mutations in multiple cancers. *Oncogene*, Volume 35, pp. 1386-1398.

Martin-Belmonte, F. & Perez-Moreno, M., 2012. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature Reviews Cancer*, Volume 12, pp. 23-38.

McCaffrey, L. M. & Macara, I. G., 2009. The Par3/aPKC interaction is essential for end bud remodeling and progenitor differentiation during mammary gland morphogenesis. *Genes & Development*, Volume 15, pp. 1450-1460.

McCaffrey, L. M. et al., 2012. Loss of the Par3 polarity promotes breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer Cell*, Volume 22, pp. 601-614.

Nagai-Tamai, Y. et al., 2002. Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells*, Volume 7, pp. 1161-1171.

Nakagawa, S. et al., 2004. Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix. *British Journal of Cancer*, Volume 90, pp. 194-199

Namdarian, B. et al., 2013. Loss of APKC expression independently predicts tumor recurrence in superficial bladder cancers. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, Volume 31, pp. 649-655.

Nam, K. H. et al., 2014. Deregulation of the cell polarity protein Lethal giant larvae 2 (Lgl2) correlates with gastric cancer progression. *Gastric Cancer*, Volume 17, pp. 610-620.

Navarro, C. et al., 2005. Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene*, Volume 24, pp. 4330-4339.

Noda, Y. et al., 2001. Human homologues of the *Caenorhabditis elegans* cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C. *Genes to Cells*, Volume 6, pp. 107-119.

Nolan, M. E. et al., 2008. The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. *Cancer Research*, Volume 68, pp. 8201-8209.

Ozdamar, B. et al., 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*, Volume 307, pp. 1603-1609.

Pacini, F. & Pinchera, A., 2003. *Tumori della Tiroide*. Milano-Firenze-Napoli: Mediserve.

Regala, R. P. et al., 2005. Atypical protein kinase C ι is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, Volume 65, pp. 8905-8911.

Riesco-Eizaguirre G. et al., 2009. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Research*, Volume 69, pp. 8317-8325.

Roh, M. H. et al., 2003. The Crumbs-Pals1 complex participated in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *Journal of Cell Science*, Volume 116, pp. 2895-2906.

Royer, C. & Lu, X., 2011. Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer? *Cell Death and Differentiation*, Volume 18, pp. 1470-1477.

Schimanski, C. C. et al., 2005. Reduced expression of HUGL-1 the human homologue of *Drosophila* tumor suppressor gene *lgl*, contributes to progression of colorectal cancer. *Oncogene*, Volume 24, pp. 3100-3109.

Schober, M. et al., 1999. Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell division in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*, Volume 402, pp. 548-551.

Sebbagh, M. & Borg, J. P., 2014. Insight into planar cell polarity. *Experimental Cell Research*, Volume 328, pp. 284-295.

Soares P. et al, 2003. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*, Volume 22, pp. 4578-4580.

Suzuki, A. et al., 2002. aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *Journal of Cell Science*, Volume 115, pp. 3565-3573.

Suzuki, A. & Ohno, S., 2006. The PAR-aPKC system: lesson in polarity. *Journal of Cell Science*, Volume 119, pp. 979-987.

Suzuki, A. et al., 2001. Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved Par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia specific junctional structures. *Journal of Cell Biology*, Volume 152, pp. 1183-1196.

Tabuse, Y. et al., 1998. Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish

embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, Volume 125, pp. 3607-3614.

Tepass, U., et al., 1990. Crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell*, Volume 61, pp. 787-799.

Tsai, J. H. et al., 2000. Alteration in the expression of protein kinase C isoforms in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, Volume 161, pp. 171-175.

Ulisse, S. et al., 2011. High expression of the urokinase plasminogen activator and its cognate receptor associated with advanced stages and reduced disease-free interval in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, Volume 96, pp. 504-508.

Vinot, S. et al., 2004. Two PAR6 proteins become asymmetrically localized during establishment of polarity in mouse oocytes. *Current Biology*, Volume 14, pp. 520-525.

Vinot, S. et al., 2005. Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Developmental Biology*, Volume 282, pp. 307-319.

Vitale, M. & et al., 1994. Loss of polarity and de novo expression of the beta 1 family of integrins in thyroid tumors. *International Journal of Cancer*, Volume 59, pp. 185-190.

Wang, H. R. et al., 2003. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science*, Volume 302, pp. 1775-1779.

Westermarck, K. & et al., 1996. EGF-receptors in human normal and pathological thyroid tissue. *Histopathology*, Volume 28, pp. 221-227.

Xiao, H. & Liu, M., 2013. Atypical protein kinase C in cell motility. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Volume 70, pp. 3057-3066.

Xue, B. et al., 2012. Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nature Cell Biology*, Volume 15, pp. 189-200.

Yamanaka, T. et al., 2001. PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells*, Volume 6, pp. 721- 731.

Yao, S. et al., 2010. PRKC- ζ Expression Promotes the Aggressive Phenotype of Human

Prostate Cancer Cells and Is a Novel Target for Therapeutic Intervention. *Genes Cancer*, Volume 1, pp. 444-464.

Yap, A. S. & Kovacs, E. M., 2003. Direct cadherin-activated cell signalign: a view from the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*, Volume 160, pp. 11-16.

Zen, K. et al., 2009. Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PARD3) in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*, Volume 28, pp. 2910-2918.

Zhan, L. et al., 2008. Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell*, Volume 135, pp. 865-878.

Al termine di questo percorso formativo, ma consapevole che non si smette mai di imparare, desidero ringraziare il Professor Massimino D'Armiento e il Professor Salvatore Ulisse, per avermi permesso di lavorare al presente progetto di ricerca, e per aver creduto nelle mie capacità, sia ammettendomi a partecipare a diversi studi da loro coordinati sia incoraggiandomi a presentare progetti personali. Tutto ciò mi ha consentito di imparare molto, e di costruire le fondamenta per la crescita professionale.

Ringrazio la Dottoressa Enke Baldini, per essere stata la mia mentore nell'attività di laboratorio, per la pazienza e l'affetto che ha sempre mostrato nel sostenermi, e spesso nell'accudirmi, non solo professionalmente.

Ringrazio i miei genitori, mio fratello, e i miei nonni. Li ringrazio per avermi supportata sempre, soprattutto per quelle volte in cui non hanno condiviso le mie scelte. Li ringrazio perché per me ci sono stati, ci sono, e so che ci saranno, nonostante tutto.

Ringrazio tutti i miei amici, per quanto abbiamo condiviso in questi lunghi anni di università, sia sul piano accademico sia sul piano personale, spesso intrecciando i due. In particolar modo, ringrazio Daniele, Giovanni e Ilaria, che nell'ultimo anno mi hanno offerto la loro spalla, davvero preziosa in molti momenti.

Ringrazio Natalie, Alessandra, Ilenia, Valentina e Sara, per avermi rallegrato le giornate di lavoro, e per essere andate oltre accordandomi fiducia e amicizia.

Ringrazio Michele, perché mi costringe a migliorarmi.

Ringrazio tutti quelli che ho incontrato lungo questo cammino, perché ognuno mi ha arricchito personalmente, e ciascuno, a modo suo, è stato importante, anche solo regalandomi un sorriso e strappandone uno dal mio viso, forse troppo spesso, cupo.

Grazie.