

SOMMARIO

Il carcinoma papillare tiroideo (PTC) costituisce circa l'80% di tutti i tumori maligni della tiroide. Ad oggi, sono state identificate mutazioni a carico del gene *BRAF* in circa il 40% di casi, mentre riarrangiamenti che coinvolgono il gene *RET* (*RET/PTC*) sono presenti in circa il 20% dei casi. Infine, mutazioni nei geni *RAS* e riarrangiamenti dei geni *TRK* e *PPARG* occorrono in circa il 5% dei casi ciascuno.

Tuttavia, nonostante la presenza di alterazioni genetiche che possano dare inizio al processo canceroso, il tumore è il risultato del progressivo accumulo di mutazioni in geni che conferiscono un vantaggio di crescita sulle cellule circostanti. Pertanto, una conoscenza più approfondita delle alterazioni molecolari del carcinoma papillare tiroideo è fondamentale per migliorare gli aspetti diagnostici e prognostici, e la risposta individuale ai trattamenti farmacologici.

Alla luce di ciò, il mio progetto di dottorato ha avuto come obiettivo principale l'analisi del trascrittoma del PTC al fine di individuare nuovi eventi molecolari che possano essere implicati in questo tipo di cancro.

La prima parte di questo progetto è stata focalizzata sul sequenziamento - mediante RNA-Seq - di 22 RNA isolati da biopsie di tiroide (18 tiroidi affette da carcinoma papillare tiroideo, 4 tiroidi non tumorali) per identificare trascritti di fusione e mutazioni somatiche in geni espressi. I risultati sono stati validati sul DNA dei medesimi pazienti mediante sequenziamento diretto di Sanger. Inoltre, l'analisi mutazionale è stata estesa ad ulteriori 50 pazienti affetti da carcinoma papillare tiroideo e 30 individui sani. Mediante quest'approccio sono state identificate nuove mutazioni puntiformi nei geni *CBL*, *NOTCH1*, *PIK3R4* e *SMARCA4*. Inoltre, l'analisi ha rivelato la presenza di mutazioni somatiche nei geni *DICER1*, *MET* e *VHL*, già note nella patogenesi in altri tipi di cancro, ma ad oggi non note nel PTC. Inoltre, è stato individuato un nuovo evento di fusione intra-cromosomico generato dalla fusione tra il primo esone del gene *WNK1* (*lysine deficient protein kinase 1*) e il secondo esone del gene *B4GALNT3* (*beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 3*).

I geni codificanti rivestono un ruolo di primo piano nella genetica del cancro, ma negli ultimi anni, molti studi si sono concentrati su una nuova classe di RNA non

codificanti, i *long non coding RNA* (lncRNAs), che regolano l'espressione dei geni codificanti. I livelli di espressione dei lncRNA sono spesso alterati in diversi tipi di tumori, suggerendo che essi possano agire sia da oncogeni sia da oncosoppressori. Al fine di valutare il loro potenziale ruolo nella tumorigenesi del PTC, la seconda parte di questo progetto è stata focalizzata sull'analisi computazionale dei lncRNA, sia nuovi che annotati, nei nostri dataset di RNA-Seq. Attraverso l'utilizzo di approcci per la ricostruzione *ab initio* del trascrittoma e di una *pipeline* computazionale sono stati indentificati i lncRNA significativamente deregolati nei campioni tumorali. Inoltre, per individuare i lncRNA che potessero regolare l'espressione genica *in cis*, alcuni di essi sono stati associati - per vicinanza al TSS (*transcription start site*) - a geni *driver* in diversi tipi di cancro. Infine, mi sono focalizzata su un lncRNA non annotato nei *database* pubblici, associato all'oncogene *MET*, ma trascritto dal filamento opposto. Si tratta pertanto di un lncRNA antisenso al gene *MET*, chiamato in questo lavoro di tesi *MET-AS*. Entrambi i geni sono significativamente sovra-espressi in una sotto-classe di PTC - vale a dire i pazienti con mutazioni del gene *BRAF* e riarrangiamenti dell'oncogene *RET* - chiamati *BRAF-like*-, rispetto ai campioni tumorali PTC, con profilo trascrizionale simile ai campioni mutati nei geni *RAS* - chiamati *RAS-like* - e campioni di tiroide "non-tumorali". Esperimenti preliminari condotti *in vitro* su una linea cellulare di carcinoma papillare tiroideo, TPC-1, indicano che il silenziamento del lncRNA *MET-AS* induce una down-regolazione dell'oncogene *MET*, e induce un blocco del ciclo cellulare in fase G1, suggerendo che il lncRNA potrebbe essere un nuovo regolatore dell'oncogene *MET*.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi confermano l'eterogeneità genetica del carcinoma papillare della tiroide rivelando che l'espressione genica correla più con il profilo mutazionale dei pazienti che con la stadiazione del tumore. Inoltre, questo studio fornisce nuove informazioni sulle alterazioni genetiche del PTC, suggerendo potenziali terapie adiuvanti farmacologiche per questo tipo di cancro.