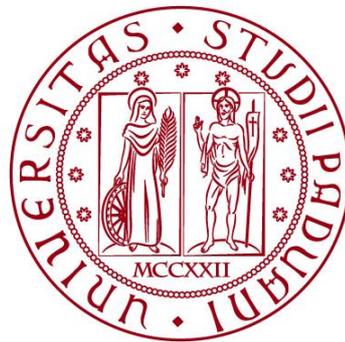


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**RUOLO DEL GENE PAK4 NELLA
SUSCETTIBILITÀ AL CARCINOMA
FAMILIARE NON MIDOLLARE DELLA
TIROIDE**

**Tutor: Prof. Giovanni Vazza
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Mia Vukovic

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. ABSTRACT	5
2. INTRODUZIONE	6
CARCINOMA TIROIDEO NON-MIDOLLARE (NMTC)	6
IL FNMTc: CARATTERISTICHE, AGGRESSIVITÀ E DIFFERENZE RISPETTO ALLA FORMA SPORADICA	6
LE FORME SINDROMICHE E NON-SINDROMICHE DI FNMTc	7
GENI SOSPETTI PER LA SUSCETTIBILITÀ AL FNMTc	8
UN NUOVO GENE CANDIDATO PER L'INSORGENZA DEL FNMTc: <i>PAK4</i>	8
3. MATERIALI E METODI	10
<i>CRITERI DI INCLUSIONE PER I PEDIGREE FAMILIARI</i>	10
<i>WHOLE-EXOME SEQUENCING [5]</i>	10
<i>SELEZIONE DEI GENI CANDIDATI</i>	11
<i>PREDIZIONE DELLA STRUTTURA PROTEICA</i>	12
<i>IMMUNOISTOCHEMICA</i>	12
<i>COLTURE CELLULARI</i>	12
<i>COSTRUZIONE E TRASFEZIONE DI VETTORI LENTIVIRALI SOVRAESPRESSI</i> ..	13
<i>STUDI FUNZIONALI IN VITRO</i>	13
<i>PREPARAZIONE ANIMALI IN VIVO</i>	13
<i>SEQUENZIAMENTO ED ANALISI DEL TRASCrittOMA, IMMUNOPRECIPITAZIONE</i>	14
<i>ANALISI STATISTICHE</i>	14
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	14
<i>Identificazione del PAK4 come gene candidato per la famiglia FNMTc</i>	14
<i>Predizione funzionale della proteina PAK4 I417T</i>	18
<i>Saggi nelle colture cellulari</i>	20
<i>PAK4 I417T dimostra una notevole capacità di metastasi in vivo.</i>	22

<i>PAK4 WT e MUT modulano l'espressione di diverse famiglie di metalloproteinasi della matrice attraverso la via di segnalazione del fattore di necrosi tumorale</i>	23
<i>PAK4 I417T attiva la via di segnalazione del percorso TNF promuovendo i livelli di fosforilazione di PAK4, JNK, NFκB e c-Jun</i>	24
5. BIBLIOGRAFIA	30
6. APPENDICE	31
STAGE	31

ABSTRACT

Il carcinoma tiroideo non midollare (NMTC) è il tumore endocrino più comune, originato dalle cellule epiteliali follicolari della tiroide. La variante familiare (FNMTC), definita quando due o più parenti di primo grado sono affetti senza altri fattori ambientali, si manifesta precocemente con un esito peggiore rispetto ai casi sporadici. La predisposizione genetica del FNMTC e i suoi meccanismi sono poco chiari, sottolineando l'importanza della ricerca sui geni di suscettibilità per migliorare diagnosi e trattamento. Si intende qui analizzare un articolo recente, pubblicato nel 2024, in cui è stato condotto uno studio su una famiglia con cinque membri affetti dalla malattia. Analisi di whole-exome sequencing hanno portato ad individuare in tali soggetti, nonché in altri pazienti con FNMTC e con carcinoma tiroideo non midollare sporadico, una mutazione missenso del gene PAK4 (I417T). Inoltre, sono stati condotti esperimenti sul fenotipo cellulare in vitro e modelli di metastasi a distanza polmonare in vivo per poter confrontare le differenze tra le linee cellulari PAK4 wild-type e PAK4 mutanti. Studi funzionali di PAK4 I417T mostrano che questa mutazione altera la struttura della proteina compromettendone la stabilità, l'idrofobicità e i siti di fosforilazione. Rispetto alla linea cellulare wild-type, PAK4 I417T dimostra una maggiore proliferazione, invasività e inibizione dell'apoptosi. I risultati ottenuti suggeriscono che PAK4 possa essere un potenziale gene di suscettibilità per FNMTC.

INTRODUZIONE

CARCINOMA TIROIDEO NON-MIDOLLARE (NMTC)

Il carcinoma tiroideo non midollare (NMTC) è la forma più comune di cancro alla tiroide, rappresentando oltre il 95% dei casi e negli ultimi decenni è diventato la neoplasia endocrina più frequente. Secondo l'ultima classificazione dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) dei tumori della tiroide, e in conformità con quella precedente rilasciata nel 2004, le neoplasie tiroidee di origine follicolare sono classificate in papillari versus follicolari e benigne versus maligne. [1] [2]

Il tumore alla tiroide è il tumore maligno in più rapido aumento nel mondo, principalmente a causa del carcinoma tiroideo papillare sporadico. Le forme maligne possono essere classificate in base alle caratteristiche istologiche in carcinoma papillare della tiroide (PTC), carcinoma follicolare della tiroide (FTC), carcinoma tiroideo scarsamente differenziato (PDTC) e carcinoma anaplastico della tiroide (ATC). Il PTC rappresenta circa l'85% di tutti i tumori della tiroide mentre il FTC è meno frequente (ma più frequente nelle donne), rappresentando solo il 15% di tutti i tumori della tiroide. Il resto dei tumori della tiroide è rappresentato dai tumori rari, che occorrono in 5% dei casi. [1] [2]

Le alterazioni somatiche coinvolte nella patogenesi dei tumori derivati dalle cellule follicolari sporadiche sono ben conosciute, mentre le alterazioni predisponenti implicate nei tumori follicolari ereditari sono meno note.

IL FNMT: CARATTERISTICHE, AGGRESSIVITÀ E DIFFERENZE RISPETTO ALLA FORMA SPORADICA.

Il carcinoma tiroideo non-midollare (NMTC) è la forma più comune di tumore alla tiroide e costituisce 1-5% di tutti i tumori. NMTC origina dalle cellule epiteliali follicolari della tiroide e si verifica spesso all'interno di una famiglia. La forma familiare di NMTC (FNMT) viene definita come la comparsa della malattia in due o più parenti di primo grado del paziente, in assenza del contributo dei fattori

ambientali [1]. I casi di NMTC familiare sono multifocali, bilaterali, presentano metastasi ai linfonodi, mostrano un tasso di recidiva più alto ed un'età di insorgenza più precoce. Sebbene ancora dibattuto, sembra che FNMTC sia più aggressivo rispetto alla controparte sporadica.

Negli studi clinico-patologici esaminati in un altro lavoro, pubblicato nel 2002, si notano nette differenze clinico-patologiche tra il FNMTC e SNMTC; la disseminazione intraghiandola del tumore è risultata più frequente nei pazienti con FNMTC rispetto ai pazienti con carcinoma tiroideo sporadico, noduli multipli benigni sono stati riscontrati più frequentemente nei pazienti con FNMTC e la recidiva del tumore è stata osservata più frequentemente nei pazienti con FNMTC rispetto ai pazienti con carcinoma tiroideo sporadico. La tiroidectomia totale, la tiroidectomia subtotale e la dissezione dei linfonodi sono state più frequenti nei pazienti con FNMTC rispetto ai pazienti con carcinoma tiroideo sporadico. [3]

Una revisione critica delle diverse famiglie con individui affetti da NMTC ha suggerito che FNMTC mostra un modello di ereditarietà compatibile con un carattere autosomico dominante con penetranza variabile o con un disturbo poligenico probabilmente associato ad alleli a bassa penetranza e un alto grado di eterogeneità genetica. Tuttavia, il modello di ereditarietà, monogenico o poligenico, è ancora dibattuto. [1]

LE FORME SINDROMICHE E NON-SINDROMICHE DI FNMTC

FNMTC costituisce circa il 5-15% di tutti i casi di NMTC, includendo sia le forme sindromiche che quelle non-sindromiche. Anche se le forme sindromiche si verificano a bassa frequenza, sono stati identificati diversi geni responsabili di diverse sindromi, come per esempio *PTEN* nella sindrome di Cowden, *APC* nella sindrome di Gardner e *DICER1* nella sindrome di DICER1. [1] Tuttavia, le alterazioni genetiche alla base della forma non-sindromica sono ancora in gran parte sconosciute. Questa mancanza di conoscenza sulla biologia del carcinoma tiroideo familiare non-sindromico (NS-FNMTC) potrebbe essere dovuta all'assenza di un consenso sulla definizione clinica di NS-FNMTC, alla mancanza di caratteristiche istopatologiche tipiche del tumore e al numero di geni di

suscettibilità al NS-FNMTC potenzialmente descritti. Gli studi clinici mostrano che l'NS-FNMTC presenta una maggiore estensione extratiroidea, multifocalità, combinazione con noduli tiroidei benigni e malattia di Hashimoto, e un'età di insorgenza più giovane [2]

GENI SOSPETTI PER LA SUSCETTIBILITA' AL FNMTC

Mutazioni in geni come *SRGAP*, *FOXE1*, *DUOX2*, *CHEK2* e *NOP53* sono state segnalate come potenzialmente partecipanti alla suscettibilità di FNMTC. Tuttavia, in altri geni di suscettibilità noti, come *MNG1*, *PTCSC1*, *SRRM2*, *MAP2K5* e *HABP2*, la maggior parte delle variazioni esiste solo in famiglie specifiche studiate (assenti nelle altre famiglie) o non possono essere replicate nell'ereditarietà. [1]

UN NUOVO GENE CANDIDATO PER L'INSORGENZA DEL FNMTC: *PAK4*

Un lavoro recente, su cui si concentra questo elaborato di tesi, ha individuato un nuovo gene candidato per l'insorgenza della malattia FNMTC. Si tratta del gene *PAK4* che codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle chinasi attivate da p21 (PAK). Queste chinasi sono coinvolte in una varietà di processi cellulari e sono importanti per la regolazione del ciclo cellulare, controllo della motilità e adesione cellulare, sviluppo, differenziamento e cancerogenesi.

Un fattore che distingue *PAK4* dagli altri membri della famiglia PAK è il loro modello di espressione. *PAK4* è espresso in tutti i tessuti e la sua eliminazione nei topi porta alla letalità embrionale. Tuttavia, in molti tessuti adulti, i livelli di proteina *PAK4* sono bassi e la sovraespressione di *PAK4* è spesso collegata al cancro. *PAK1* è altamente espresso nel cervello, nei muscoli e nella milza. *PAK2* è elevato nelle cellule endoteliali, mentre *PAK3* è principalmente espresso nel cervello. *PAK5* si trova principalmente nel cervello e nel pancreas, mentre *PAK6* è rilevato nei testicoli, nella prostata e nel cervello. Nella maggior parte delle cellule tumorali, *PAK1* e *PAK4* sono spesso sovraregolati e iperattivati.

Attualmente, un numero crescente di studi ha dimostrato che *PAK4* è sovraespresso in vari tumori e che la sua disfunzione è associata alla progressione del cancro. Inoltre, gli inibitori di piccole molecole di *PAK4* sono già entrati nella fase I degli

studi clinici. Pertanto, *PAK4* è considerato un potenziale nuovo biomarcatore e un attraente bersaglio terapeutico per la diagnosi e la terapia del cancro. [4]

Una forma mutata di *PAK4* ha mostrato una funzione oncogenica che coinvolge diversi meccanismi, indicando il suo potenziale come nuovo marker molecolare diagnostico per FNMTC.

MATERIALI E METODI

CRITERI DI INCLUSIONE PER I PEDIGREE FAMILIARI

- Tre o più parenti di primo grado diagnosticati con il carcinoma tiroideo non midollare;
- Presenza di controlli adulti anziani, rappresentati dai parenti del primo grado che avevano più di 50 anni e nessuna storia di tumori;
- Nessun matrimonio interetnico;
- Nessuna consanguineità tra i coniugi;
- Nessuna chiara storia di esposizione a radiazioni;
- Nessuna altra malattia genetica.

È stata inclusa una famiglia composta da cinque membri affetti, con tutti i membri sottoposti a screening sanitario, inclusi esami ecografici della tiroide e dei linfonodi cervicali, nonché test sierologici della funzione tiroidea. Inoltre, sono stati ottenuti i campioni di DNA del sangue periferico da una coorte di validazione comprendente la famiglia con 5 membri affetti, ulteriori 31 pazienti con FNMTTC e 280 pazienti con carcinoma tiroideo sporadico senza una storia familiare.

WHOLE-EXOME SEQUENCING [5]

Il sequenziamento dell'intero esoma (WES) è stato eseguito a partire dal DNA genomico estratto dal sangue periferico di ciascun componente della famiglia.

Il WES (Whole Exome Sequencing) è una tecnica che permette di identificare varianti geniche nella porzione esonica del DNA (circa l'1,2% dell'intero genoma). Inizialmente, il campione di DNA di partenza del paziente viene frammentato. Poiché l'interesse è focalizzato sugli esoni, si utilizzano tecniche di cattura o amplificazione per isolare tali porzioni. Una volta isolati gli esoni, si procede con il sequenziamento tramite NGS (Next-Generation Sequencing), utilizzando piattaforme come Illumina o PacBio.

Il sequenziamento produce dati grezzi (*raw data*) che necessitano di ulteriore elaborazione per interpretare i risultati. Il processamento dei dati grezzi avviene tramite applicazioni bioinformatiche, che includono il controllo di qualità e la rimozione del rumore di fondo. Successivamente, le sequenze dell'esoma vengono confrontate con l'esoma di riferimento umano, permettendo l'identificazione delle varianti geniche presenti nel paziente e rilevando eventuali cambiamenti nella sequenza.

SELEZIONE DEI GENI CANDIDATI

Attraverso l'analisi dei dati WES, sono state ricercate varianti di sequenza condivise dai cinque pazienti affetti (II1, II2, II9, III1 e III6) all'interno di questa specifica famiglia. Successivamente, sono state escluse le varianti introniche, le mutazioni sinonimo e le varianti omozigoti in tutti i soggetti analizzati.

Gli esami patologici hanno rilevato che tutti e cinque i pazienti sono affetti da carcinoma papillare tiroideo e risultano positivi alla sindrome di Hashimoto. Inizialmente, gli autori hanno ipotizzato una possibile correlazione tra la sindrome di Hashimoto e una maggiore suscettibilità al carcinoma tiroideo. Tuttavia, questa ipotesi è stata successivamente scartata, poiché l'analisi del paziente II5 ha rivelato la presenza della sindrome senza evidenza di carcinoma. L'intera indagine clinico-patologica è riassunta nella Tabella 1.

	<i>II2</i>	<i>II9</i>	<i>III1</i>	<i>III6</i>
Pathology type	Papillary thyroid carcinoma	Papillary thyroid carcinoma	Papillary thyroid microcarcinoma	Papillary thyroid microcarcinoma
Number of tumoral foci	4	2	4	1
Maximum diameter, cm	3	4.5	0.3	0.8
Overall diameter, cm	5.9	6.6	0.8	0.8
Extrathyroidal extension	No	Yes	No	No
Central lymph node metastasis	1/23	2/2	2/12	9/26
Lateral lymph node metastasis	No	7/14	No	5/32
Hashimoto's disease	Yes	Yes	Yes	Yes
Stage (TNM) at diagnosis	T2N1aM0	T3bN1aM0	T1aN1aM0	T1aN1bM0
Number of treatments with radioiodine 131	0	4	1	1
Total follow-up period, months	54	144	84	102
Stage (TNM) after the end of follow-up	T2N1aM0	T4bN1bM1	T1aN1aM0	T1aN1bM0

Tabella 1 Nella tabella sono riportati i risultati di vari esami patologici condotti su cinque pazienti affetti da carcinoma papillare tiroideo. Si nota che i pazienti II2 e II9 presentano tumori di dimensioni più rilevanti rispetto ai pazienti III1 e III6, mentre la sindrome di Hashimoto è presente in tutti e cinque i pazienti. Dopo il trattamento con radioiodio 131, nei pazienti III1 e III6 lo stadio del carcinoma è rimasto invariato. Per il paziente II9 la malattia è progredita al quarto stadio, mentre il paziente II2, che non è stato trattato, è rimasto nello stadio II/III.

Oltre a tali filtri, sono state escluse le mutazioni con la frequenza >0.001 utilizzando due banche dati, ExAC e gnomAD. Le varianti di sequenza restanti sono state prioritizzate utilizzando previsioni in silico di patogenicità prodotte da PolyPhen-2, SIFT e MutationTaster. L'accento è stato posto sui geni associati alla funzione della tiroide e al cancro. Per confermare le varianti considerate candidate e la loro co-segregazione con il fenotipo nella famiglia è stato utilizzato il sequenziamento Sanger.

PREDIZIONE DELLA STRUTTURA PROTEICA

La predizione della struttura e le informazioni sulla conservazione genica sono state ottenute dal *Ensembl Genome Browser*. La predizione di struttura tridimensionale è ricavata utilizzando *Swiss-Model Server*, mentre la previsione dei siti di fosforilazione delle proteine è stata eseguita utilizzando il server *NetPhos*. *DeepSite* è stato utilizzato come predittore dei siti di legame.

IMMUNOISTOCHEMICA

I campioni di tessuto tiroideo da pazienti con FNMTTC e SNMTC sono stati raccolti e fissati. In questo caso, il tessuto del paziente con SNMTC ha il genotipo WT del gene *PAK4* mentre il tessuto proveniente dal paziente con FNMTTC ha il genotipo *PAK4* mutato. L'immunoistochimica è stata eseguita incubando i campioni con anticorpi primari (p-PAK4) specifici per le proteine target, seguita da incubazione con anticorpi secondari.

COLTURE CELLULARI

Per gli studi in vitro sono state utilizzate due tipi di cellule; *Nthy-ori-3-1* e *TPC-1*. Queste linee cellulari sono state impiegate per vari saggi funzionali, tra cui formazione delle colonie, proliferazione e divisione cellulare, migrazione, regolazione dell'espressione di specifiche proteine e regolazione dell'apoptosi.

La linea cellulare di tiroide umana *Nthy-ori-3-1* è stata acquistata dalla *European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)*. Le cellule epiteliali follicolari tiroidee umane primarie normali sono state trasfettate con un plasmide contenente un genoma SV40 per immortalizzarle. L'antigene T del virus delle scimmie 40

(SV40) si è dimostrato estremamente efficace nella regolazione della proliferazione cellulare manipolando il ciclo cellulare dell'ospite.

La linea TPC-1 deriva invece da tumore papillare tiroideo umano ed è stata acquistata dalla *American Type Culture Collection (ATCC)*. Le cellule sono state mantenute in RPMI o nel mezzo di coltura modificato da Dulbecco, integrato con il 10% di siero fetale bovino a 37°C e 5% di CO₂ in un incubatore per colture cellulari.

COSTRUZIONE E TRASFEZIONE DI VETTORI LENTIVIRALI SOVRAESPRESSI

Utilizzando il vettore *Oligobio-LV-003*, sono stati creati costrutti per sovraesprimere il trascritto del gene *PAK4* di tipo selvatico (WT) e mutante (MUT), oltre ai lentivirus di controllo. Questi costrutti sono sotto il controllo del promotore *PCDH-CMV-MSCEF1-copGFP-T2A-Puro*. L'efficienza della trasfezione è stata infine verificata mediante qPCR e Western blotting.

STUDI FUNZIONALI IN VITRO

Sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza cellulare, saggi di vitalità cellulare, saggi di formazione di colonie, saggi di guarigione delle ferite, saggi transwell, saggi di incorporazione di 5-etinil-2'-deossipuridina (EDU) e citofluorimetria.

PREPARAZIONE ANIMALI IN VIVO

Topi BALB/c femmine di quattro settimane (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) sono state isolate nel centro sperimentale.

I topi BALB/c sono tra i più comunemente utilizzati nei campi della ricerca oncologica, infiammatoria e autoimmunitaria. I sottogruppi BALB/c sono particolarmente noti per la produzione di plasmocitomi mediante iniezione con olio minerale [6], un processo importante per la produzione di anticorpi monoclonali. Hanno una bassa incidenza di tumori mammari, ma sviluppano altri tipi di tumori

in età avanzata, più comunemente neoplasie reticolari, tumori polmonari e tumori renali.

Le cellule TPC-1-NC, TPC-1-WT e TPC-1-MUT sono state raccolte, lavate con soluzione salina tamponata con fosfati, risospese in un mezzo privo di siero e preparate in una sospensione di 100 µL per topo con 1×10^5 cellule. Successivamente, la sospensione cellulare è stata iniettata nella vena della coda per stabilire un *modello di metastasi polmonare*.

SEQUENZIAMENTO ED ANALISI DEL TRASCRITTOMA, IMMUNOPRECIPITAZIONE

Le cellule Nthy-ori-3-1-NC, Nthy-ori-3-1-WT e Nthy-ori-3-1-MUT sono state utilizzate per il sequenziamento del trascrittoma mentre TPC-1-WT e TPC-1-MUT sono state utilizzate per gli esperimenti di immunoprecipitazione e saggio a luciferasi duale, usato per studiare l'attivazione e la regolazione dell'espressione genica.

ANALISI STATISTICHE

È stato utilizzato il software SPSS (IBM SPSS Statistics). Le figure sono state create con il software GraphPad Prism ed R. Tutti gli esperimenti sono ripetuti indipendentemente almeno tre volte. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo per entrambi i test. Tutti i test erano a due code.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Identificazione del PAK4 come gene candidato per la famiglia FNMTC

Attraverso il processo di screening, rappresentato nella Figura 1, sono state identificate due varianti di geni candidati *PAK4* e *CLDN17* (Tabella 2), in base alla loro frequenza allelica e l'analisi in silico. Entrambe le varianti sono considerate dannose o potenzialmente dannose dalle analisi in silico ed entrambi i geni sono coinvolti nella cancerogenesi. Tuttavia, non ci sono prove solide che *CLDN17* sia coinvolto nella cancerogenesi della tiroide. Inoltre, le frequenze della variante di

CLDN17, prese dai database gnomAD e ExAC, superano leggermente 0.001, suggerendo una possibile ricorrenza della variante nella popolazione.

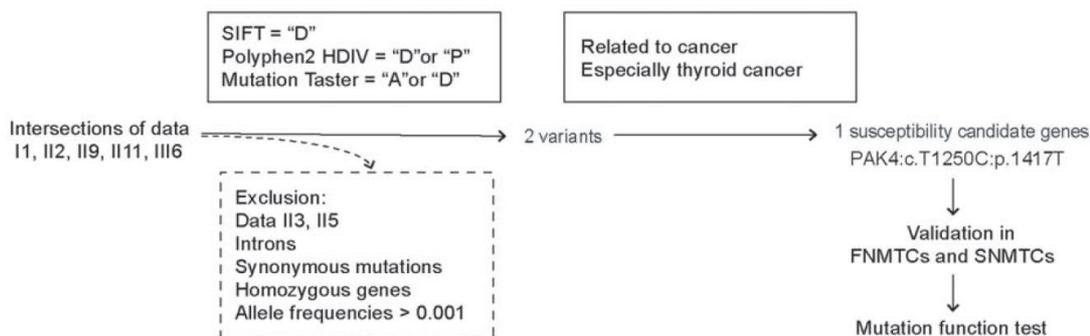


Figura 1 Dalle analisi di sequenziamento dell'esoma intero (WES), sono stati applicati filtri per selezionare geni candidati escludendo pazienti anziani, varianti introniche, mutazioni sinonime, omozigoti per il gene di interesse e varianti comuni. Successivamente, previsioni in silico con SIFT, PolyPhen-2 HDIC e MutationTaster hanno identificato due varianti genetiche per ulteriori studi. Test sul loro coinvolgimento nella cancerogenesi tiroidea hanno portato all'identificazione del gene umano *PAK4* come nuovo candidato per la suscettibilità al carcinoma papillare tiroideo non midollare familiare.

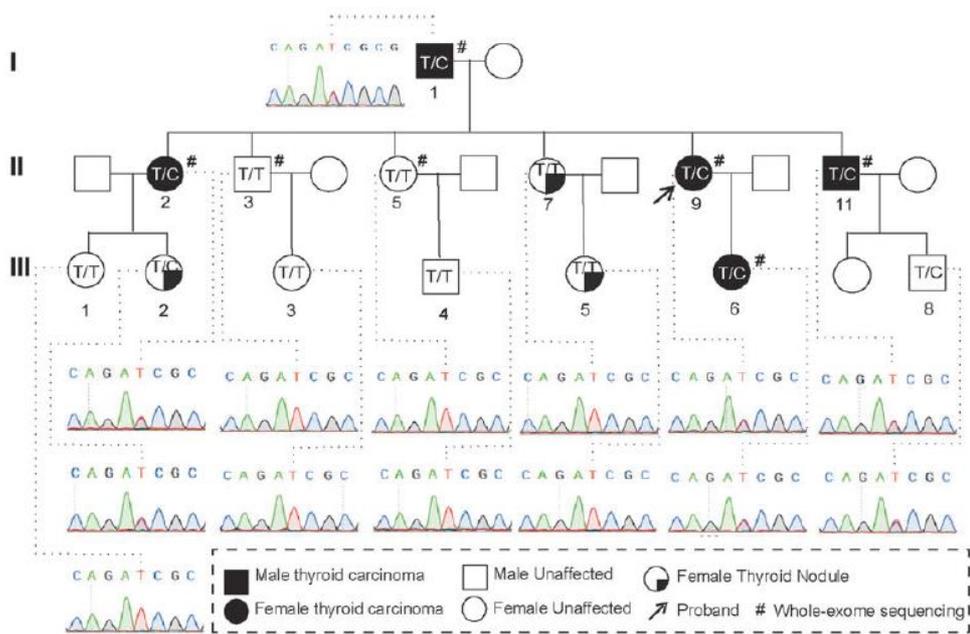
Gene	CytoBand	SNP	AA change	ExAC_EAS	gnomAD	In silico tools			Cancer gene	Related to thyroid
						SIFT	Polyphen2	MutationTaster		
<i>PAK4</i>	19q13.2	chr19-39665969-T-C	I417T	0.0003	0.00023	D	D	D	Yes	Yes
<i>CLDN17</i>	21q22.11	chr21-31538643-C-T	G98D	0.0012	0.00145	D	D	D	Yes	—

Tabella 2 Attraverso la selezione descritta nella Figura 1, sono state identificate due varianti geniche candidate per la suscettibilità al carcinoma papillare tiroideo. Successivamente, ulteriori filtri di selezione, basati su modelli di previsione, hanno permesso di valutare se una variante fosse potenzialmente dannosa. Lo studio del loro coinvolgimento nella cancerogenesi ha rivelato che solo il gene *PAK4* è associato alla cancerogenesi tiroidea. Inoltre, la tabella fornisce informazioni aggiuntive utili per studi successivi, tra cui la posizione della variante, l'aminoacido mutato, la frequenza allelica e gli SNP associati.

La variante *PAK4*:c.T1250C: p.I417T è stata selezionata per ulteriori studi. La sua frequenza allelica è risultata essere 0.00023 in gnomAD e 0.0003 in ExAC_EAS confermando che si tratta di una variante estremamente rara. Inoltre, esistono informazioni a supporto del coinvolgimento del gene *PAK4* nella cancerogenesi della tiroide.

A quanto rappresentato nel pedigree sotto, il sequenziamento Sanger ha rivelato che i soggetti non affetti II7, III1, III3, III4 e III5 sono WT, mentre III2 e III8 portano la mutazione *PAK4* I417T ma non presentano il carcinoma. La presenza di questi due casi sostiene l'ipotesi di una penetranza variabile associata a questa variante

genica. Per confermare questa ipotesi, sarebbe necessario disporre di un numero maggiore di famiglie affette per esaminare diversi pedigree e determinare la frequenza della penetranza variabile. Inoltre, un'analisi più approfondita di questi due pazienti potrebbe rivelare le cause del silenziamento di questa variante e offrire potenziali spunti per una cura. Tuttavia, ciò non è attualmente possibile in quanto il paziente III2 presenta noduli tiroidei sospetti rilevati durante un'ecografia ed è sottoposto a stretto monitoraggio, mentre il paziente III8 ha solo 10 anni e non può essere sottoposto a ulteriori studi.



Pedigree Dal pedigree è possibile identificare il probando, ovvero il primo membro della famiglia a cui viene diagnosticata la malattia. Si tratta della femmina II9, portatrice della variante I417T e affetta da carcinoma tiroideo. Analizzando i suoi antenati, si è riscontrato che II1 ha il carcinoma tiroideo ed è portatore della stessa variante. È interessante notare la possibile presenza di penetranza ridotta, poiché III2 e III8 portano la variante di interesse nel loro genotipo ma non manifestano il carcinoma. Tuttavia, è rilevante che III2 presenti noduli tiroidei. T/C sta per eterozigote per un allele.

La mutazione I417T non è stata rilevata nei 280 casi sporadici aggiuntivi né nel database TCGA. Tra i dati del sequenziamento Sanger di altri 31 pazienti FNMTTC, un paziente è risultato portatore della stessa mutazione. Purtroppo, nessun altro paziente di questa famiglia (composta da tre membri) era disponibile per l'analisi molecolare. È, però, importante notare che la presenza della stessa mutazione in un paziente di una diversa famiglia, combinata con la funzione oncogenica esibita dal

PAK4 I417T, indica il suo potenziale come nuovo gene di suscettibilità per il FNMTC.

I risultati dell'immunoistochimica (Figura 2) dei tessuti del FNMTC e SNMTC hanno rivelato che la proteina p-PAK4 era espressa sia nel citoplasma che nel nucleo nei pazienti con FNMTC (genotipo mutante PAK4), mentre non è stata rilevata un'espressione significativa nei pazienti con SNMTC (genotipo WT PAK4).

Questa osservazione suggerisce che potrebbero esserci differenze nei meccanismi sottostanti dell'insorgenza della malattia tra individui con FNMTC e SNMTC, il che è coerente con le caratteristiche genetiche del FNMTC. Inoltre, questo fatto conferma l'ipotesi del *PAK4* come gene candidato in quanto, come spiegato nell'*Introduzione*, la proteina PAK4 è di solito sottoespressa nelle cellule umane sane. Il fatto che la sua elevata espressione sia stata osservata solo in FNMTC, ma non in SNMTC, potrebbe fungere da conferma che *PAK4* è coinvolto solo con la forma familiare del cancro.

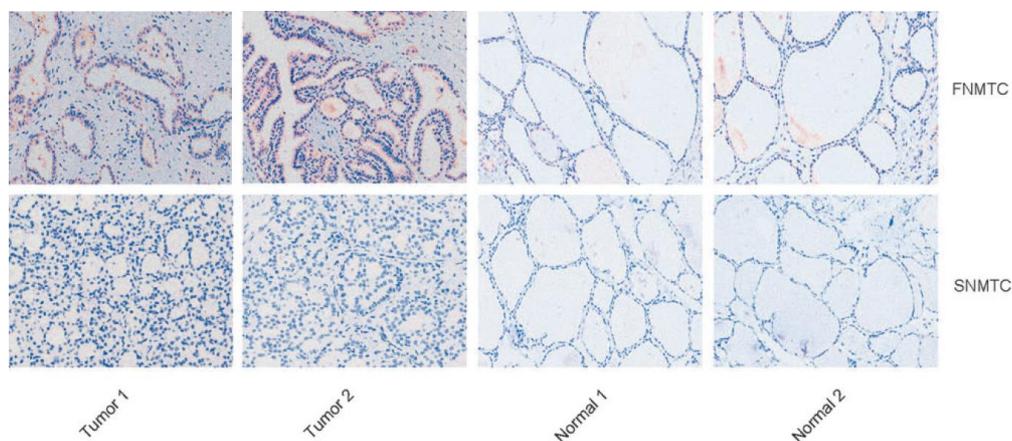


Figura 2 La figura mostra sezioni istologiche di tessuto tiroideo di due pazienti: uno con carcinoma papillare tiroideo familiare (FNMTC) e uno con carcinoma papillare tiroideo sporadico (SNMTC). Nella riga superiore, le immagini del FNMTC mostrano, a destra, tessuto tiroideo sano con follicoli ben formati e cellule normali, e a sinistra, tessuto alterato con follicoli disorganizzati e cellule con nuclei grandi e scuri. Nella riga inferiore, le immagini del SNMTC mostrano, a destra, tessuto sano con follicoli più piccoli e, a sinistra, cellule anomale con nuclei grandi e alterata organizzazione follicolare.

(Figura 4) rivela che il cambiamento aminoacidico è situato su una beta-elica. Nella Figura 5a, ottenuta attraverso NetPho prediction, risulta presente un nuovo sito di fosforilazione che potrebbe portare alle alterazioni nella fosforilazione della proteina.

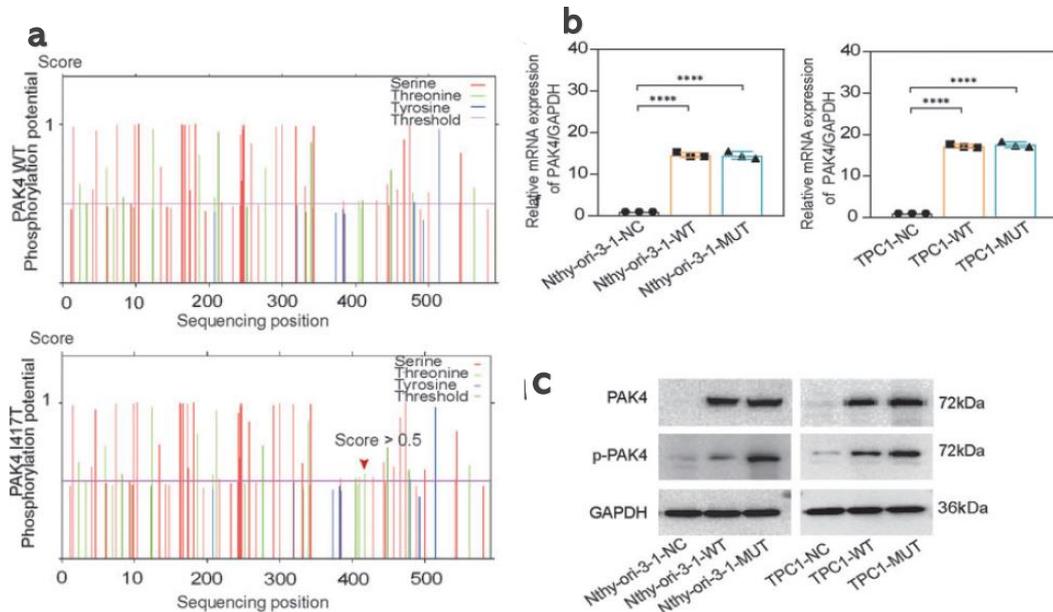


Figura 5 a. Sono mostrati due grafici che illustrano condizioni diverse: uno rappresenta il genotipo WT per il gene *PAK4* (in alto) e l'altro la variante di interesse, *PAK4* I417T (in basso). Questi grafici descrivono il potenziale di fosforilazione di ciascun amminoacido, indicato con le posizioni nella sequenza. Nella variante mutata, si evidenzia un nuovo sito di fosforilazione nella posizione 417, con uno score superiore a 0.5, un valore significativo che altera il normale pattern di fosforilazione della proteina. b. Formazione delle linee cellulari, WT e MUT, e conseguente controllo dell'espressione della proteina *PAK4*. È possibile osservare quasi equa espressione di partenza in tutte e due linee cellulari. c. Controllo della presenza delle proteine attraverso il loro isolamento e la corsa elettroforetica.

Gli scienziati hanno ipotizzato che la presenza della treonina in questa posizione induca la formazione di un ulteriore legame idrogeno intramolecolare con l'asparagina presente nella posizione 413. Di conseguenza, ciò comporta l'instabilità strutturale della proteina e suggerisce che il residuo mutato potrebbe formare nuove interazioni con altre molecole o ligandi, influenzando così la funzione o la stabilità della proteina. Inoltre, la sostituzione della treonina in posizione 417 porta ad un aumento dei siti di fosforilazione e di legame nella proteina *PAK4*. La mutazione *PAK4* I417T può promuovere la traslocazione e l'espressione nucleare della proteina *PAK4* fosforilata. Inoltre, promuove i livelli di fosforilazione di *JNK*, *NFκB* e *c-Jun*, attivando il pathway del *TNF*.

Saggi nelle colture cellulari

A partire dalle cellule Nthy-ori-3-1 e TPC-1 sono state create le linee cellulari che sovraesprimono PAK4 MUT e PAK4 WT, come confermato dall'analisi dell'espressione di mRNA e l'espressione delle proteine (Figura 5b-c). L'immunofluorescenza cellulare ha confermato una continua espressione di PAK4 nel citoplasma mentre PAK4 fosforilato era localizzato sia nel citoplasma che nel nucleo (Figura 6). La linea PAK4 MUT ha mostrato una maggiore intensità di fluorescenza nucleare e livelli di espressione proteica di p-PAK rispetto al gruppo WT (Figura 7), come previsto, poiché la forma mutata della proteina presenta un sito di fosforilazione aggiuntivo.

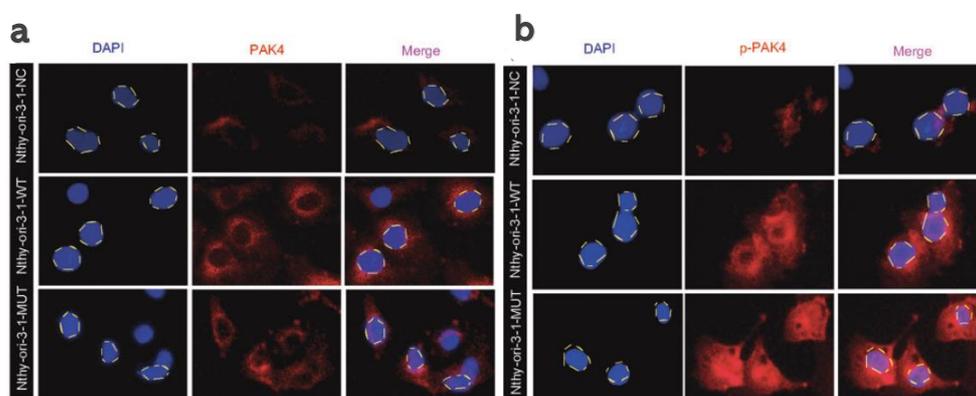
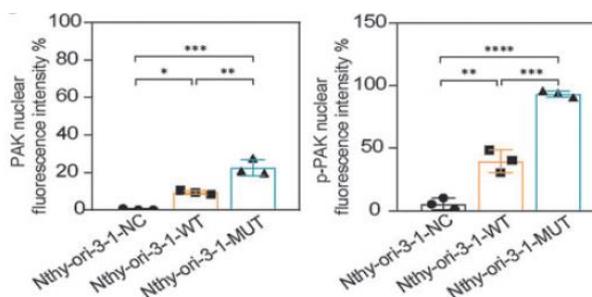


Figura 6 La figura mostra i risultati di un esperimento di immunofluorescenza che evidenzia la localizzazione delle proteine PAK4 e p-PAK4 in condizioni di tipo selvatico (WT) e mutato (MUT) nella linea cellulare Nthy-oro-3-1. La prima colonna mostra immagini con DAPI, un colorante per i nuclei cellulari, per tre genotipi cellulari. La colonna centrale presenta cellule colorate in rosso per la proteina PAK4, mentre l'ultima colonna mostra il "merge", che combina i due coloranti per determinare la localizzazione della proteina. Si osserva che p-PAK4 è maggiormente espressa nella linea MUT rispetto alla proteina non fosforilata e si trova sia nel nucleo che nel citoplasma.

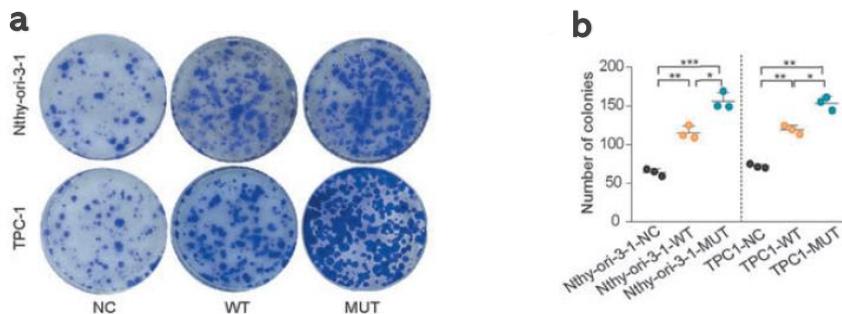
Figura 7 Questa figura confronta statisticamente a quanto notato nella figura 6.; nel grafico a barre sinistro è rappresentata l'espressione della proteina PAK4 mentre in quello a destra l'espressione della p-PAK4. Si nota che la differenza nell'espressione di p-PAK4 tra il genotipo WT e quello MUT sia più significativa rispetto alla differenza di espressione della proteina non fosforilata nel primo grafico.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, e **** $p < 0.001$



La sovraespressione di PAK4 MUT aumenta significativamente la proliferazione cellulare rispetto al WT, come mostrato dalla formazione di colonie (Figura 8a-b), dai saggi di proliferazione CCK-8 e dai saggi EDU (Figura 8c-d). Inoltre, le cellule

che sovraesprimono PAK4 MUT mostrano una maggiore invasività e capacità migratoria rispetto al gruppo WT nei saggi transwell (Figura 8e-f) e nei saggi di migrazione. La sovraespressione di PAK4 MUT porta a una riduzione del numero delle cellule in fase G1 e conseguente aumento delle cellule nella fase S, risultando in una divisione cellulare accelerata. Questo effetto potrebbe essere dovuto alla sovraregolazione dell'espressione di Cyclin D1 e CDK4/6 (Figura 9g). Entrambi i gruppi WT e MUT mostrano inibizione dell'apoptosi cellulare, con il MUT che mostra un effetto più forte e statisticamente significativo rispetto al WT in quanto la sovraespressione di PAK4 promuove l'espressione di Bcl-2, mentre inibisce l'espressione di Bax e caspase-3, sopprimendo così l'apoptosi cellulare.

Questi esperimenti hanno in parte verificato l'ipotesi iniziale del coinvolgimento di PAK4 come gene di suscettibilità al FNMTC. In tutti i casi, le caratteristiche tumorali aumentano (o compaiono) nella linea MUT, mentre sono trascurabili (o addirittura assenti) nella linea WT.



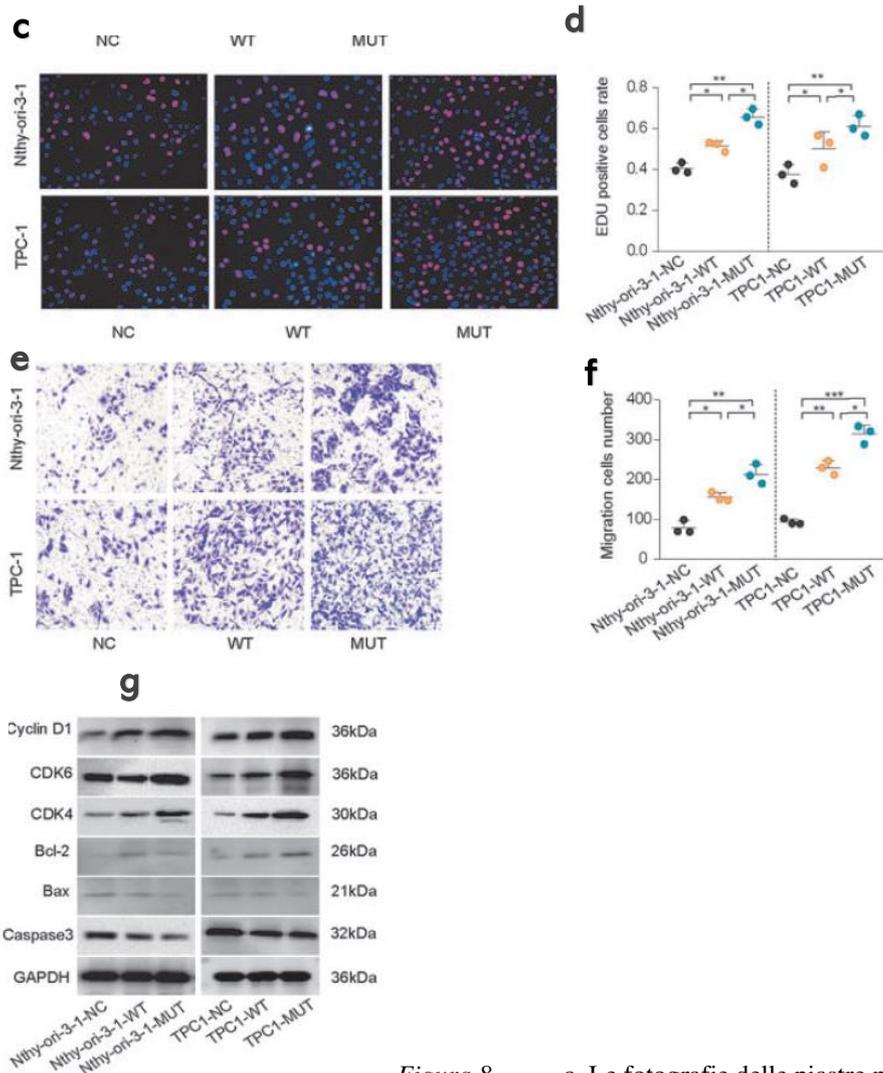


Figura 8 a. Le fotografie delle piastre mostrano che le cellule con il genotipo MUT formano colonie e si dividono più rapidamente rispetto alle cellule WT, sia nelle linee TPC1 che Nthy-ori-3-1. b. I dati statistici confermano che il numero di colonie è significativamente maggiore nelle cellule MUT rispetto a quelle WT. c. Il saggio EdU evidenzia una maggiore proliferazione cellulare nelle cellule PAK4 MUT rispetto a WT e controllo. d. I risultati statistici dell'EdU confermano che la proliferazione è significativamente più alta nelle cellule MUT rispetto a WT e controllo. e. e f. Le immagini e i dati del saggio transwell mostrano che la migrazione è più pronunciata nelle cellule MUT rispetto a WT e controllo. g. L'elettroforesi proteica mostra un aumento di Cyclin D1 e CDK6, suggerendo una maggiore proliferazione cellulare, mentre l'assenza di Bax e Bcl-2 indica un'inibizione dell'apoptosi, più evidente nelle cellule MUT.

PAK4 I417T dimostra una notevole capacità di metastasi in vivo.

Dopo otto settimane dalla somministrazione delle cellule TPC1-NC,-WT e -MUT, i topi sono stati sacrificati, i polmoni sono stati rimossi, fissati con formaldeide al 4% e colorati con ematossilina ed eosina per l'analisi istologica.

Il gruppo MUT ha mostrato una maggiore incidenza di metastasi polmonari rispetto ai gruppi NC e WT, il che ha confermato l'ipotesi dell'aggressività di FNMTC

- **MMP3**, noto anche come *stromelisi-1*, è un enzima che degrada diverse proteine della matrice extracellulare (collagene di tipo III, fibronectina, laminina e proteoglicani). Ha un ruolo importante nella degradazione del tessuto connettivo durante i processi di riparazione e rimodellamento. In contesti tumorali, MMP3 può contribuire alla progressione del cancro facilitando l'invasione e la metastasi delle cellule tumorali attraverso la degradazione della matrice extracellulare e la promozione dell'angiogenesi.
- **MMP9**, nota anche come *gelatinasi B*, è specializzata nella degradazione del collagene di tipo IV, uno dei principali componenti della membrana basale. È coinvolta nella rimodellazione tissutale, infiammazione, e angiogenesi. Nel cancro, MMP9 è spesso associata a una maggiore capacità invasiva e metastatica delle cellule tumorali, poiché facilita la degradazione della membrana basale e della matrice extracellulare circostante, permettendo alle cellule tumorali di invadere i tessuti adiacenti e diffondersi ad altre parti del corpo.

PAK4 I417T attiva la via di segnalazione del percorso TNF promuovendo i livelli di fosforilazione di PAK4, JNK, NFκB e c-Jun

Il TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) è una citochina pro-infiammatoria che gioca un ruolo cruciale nella regolazione dell'infiammazione, dell'apoptosi e dell'immunità. Il legame del TNF- α al suo recettore (TNFR1 o TNFR2) sulla superficie cellulare innesca una cascata di eventi di segnalazione intracellulare, tra cui l'attivazione delle vie NF- κ B e JNK.

Con l'attivazione del TNFR, viene fosforilata la porzione che manteneva inattivo NF- κ B che, di conseguenza, viene rilasciato. Una volta libero, NF- κ B trasloca nel nucleo e attiva l'espressione di geni coinvolti in processi infiammatori, immunitari, di sopravvivenza e proliferazione cellulare, tra cui anche i geni di MMP. L'attivazione persistente di NF- κ B, tipica in alcuni tipi di cancro, può portare a un aumento della trascrizione di MMP3 e MMP9. Inoltre, l'attivazione di JNK porta alla fosforilazione e all'attivazione di c-Jun, un componente del fattore di trascrizione AP-1, che regola l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare, differenziazione e apoptosi. Una volta attivato, AP-1 si lega al DNA e

stimola la trascrizione di geni, inclusi quelli delle MMP. La sovraregolazione della via JNK, come accade in condizioni tumorali (es. stress ossidativo) può contribuire alla sovraespressione di MMP-3 e MMP-9.

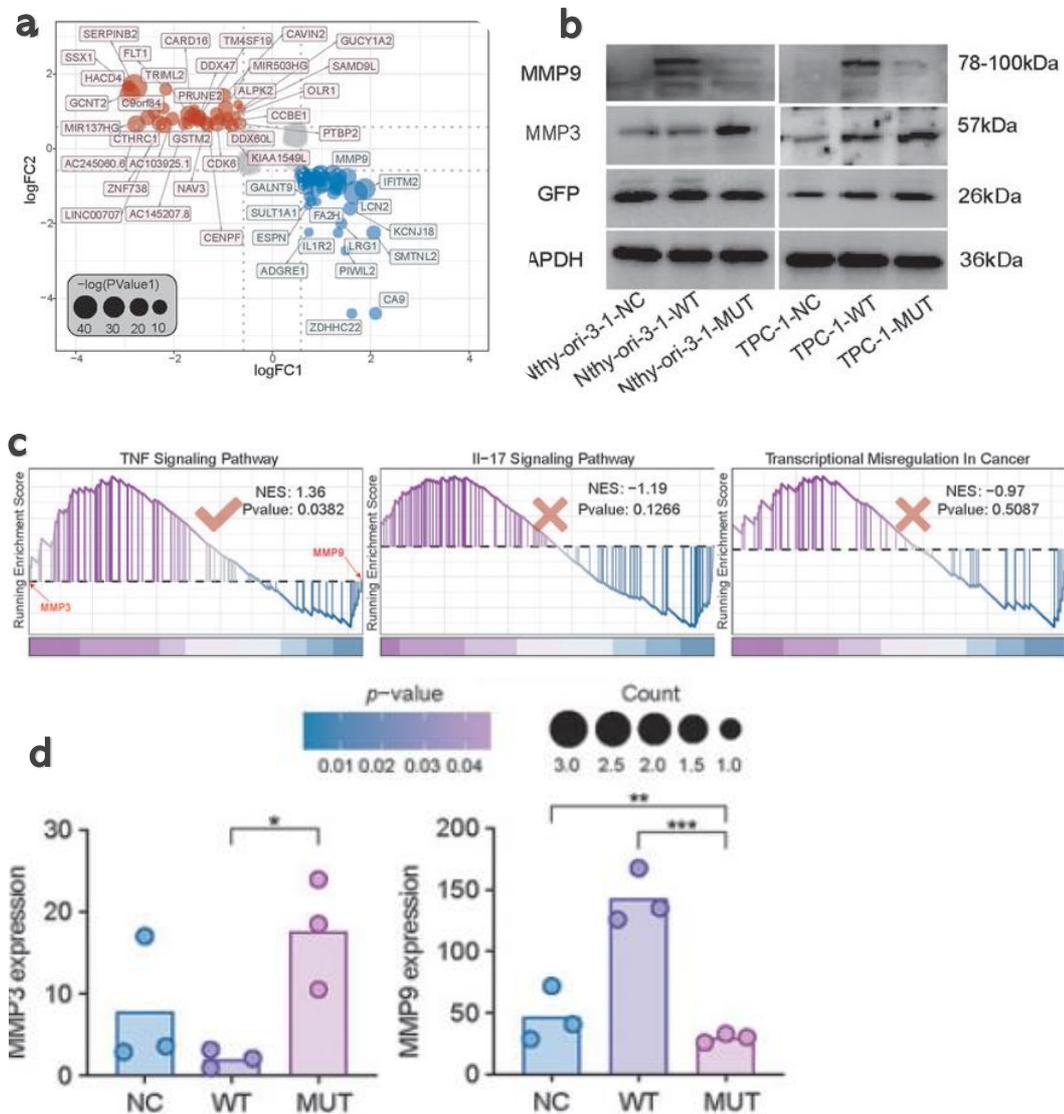


Figura 10 a. Il grafico a dispersione mostra l'analisi dell'espressione genica differenziale, dove ogni punto rappresenta un gene. I punti rossi indicano geni con espressione aumentata, quelli blu con espressione ridotta. La dimensione dei punti riflette la significatività statistica. b. L'analisi dell'espressione di MMP3 e MMP9 nelle linee cellulari TPC1 e Nthy-ori-3-1 mostra che MMP9 è maggiormente espresso nelle condizioni WT, mentre MMP3 è più elevato nelle condizioni MUT. c. L'analisi GSEA rivela che solo il pathway di TNF mostra differenze significative tra i gruppi MUT e WT. d. I grafici a barre indicano che l'espressione di MMP3 è maggiore nelle cellule MUT, mentre l'espressione di MMP9 è più elevata nelle cellule WT. La colorazione delle barre rappresenta la significatività statistica delle differenze osservate.

PAK4 I417T stimola il percorso di segnalazione del TNF aumentando la fosforilazione di PAK4, JNK, NFkB e c-Jun. Entrambi, p-PAK4 I417 e T417, interagiscono direttamente con NFkB, agevolando il trasferimento di gruppi fosfato

(Figura 11). Tuttavia, solo T417 ha la capacità di legarsi direttamente a JNK. Inoltre, p-PAK4 T417 interagisce direttamente sia con MMP3 che con MMP9 nel nucleo, promuovendo simultaneamente la loro espressione, mentre p-PAK4 I417 interagisce direttamente solo con MMP9. Infatti, i livelli di MMP9 erano più alti nel gruppo WT rispetto al gruppo MUT, mentre l'espressione di MMP3 era più bassa nel gruppo WT in quanto la diretta interazione con p-PAK4 è presente solo nella linea MUT. Infine, p-PAK4 MUT può amplificare l'effetto oncogenico attraverso l'interazione con le proteine e la regolazione dell'attività del promotore MMP3, agendo come fattore di trascrizione.

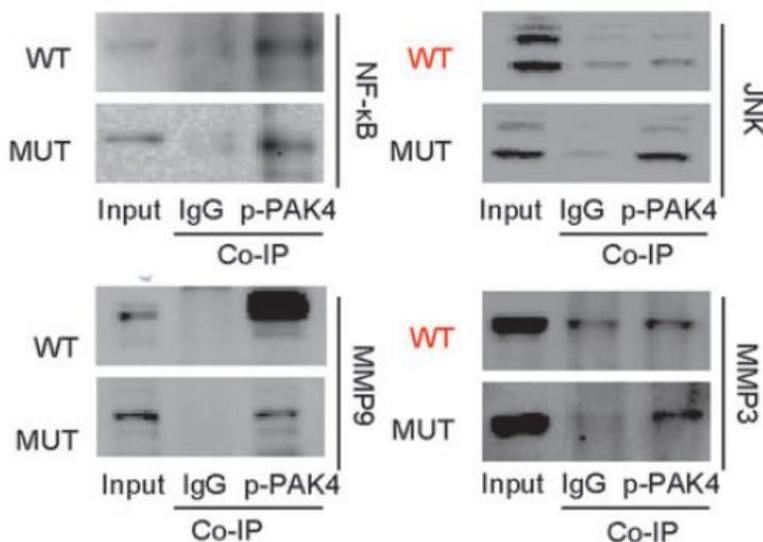


Figura 10 La figura mostra i risultati della co-immunoprecipitazione delle proteine p-PAK4 T417 (MUT) e PAK4 I417 (WT) con quattro proteine del pathway TNF: NFkB, JNK, MMP3, e MMP9. Entrambe le varianti di p-PAK4 interagiscono con NFkB, mentre solo p-PAK4 T417 interagisce con JNK. La variante PAK4 I417 interagisce fortemente con MMP9, mentre l'interazione di p-PAK4 T417 con MMP9 è trascurabile. Entrambe le varianti interagiscono in modo simile con MMP3. La colonna di controllo (IgG) non dovrebbe mostrare bande, ma alcune bande aspecifiche suggeriscono legami non specifici o impurità dei campioni.

CONCLUSIONE

In conclusione, lo studio analizzato in questo elaborato di tesi ha cercato di identificare un nuovo gene candidato per il carcinoma tiroideo non midollare familiare (FNMTTC). Dopo vari filtri nella selezione dei geni candidati, è stato isolato il gene umano PAK4 come possibile gene di suscettibilità al FNMTTC. Quattro dei cinque membri di una famiglia coinvolti nello studio, affetti da

carcinoma tiroideo, presentavano alti livelli di anticorpi anti-tireoglobulina e anti-tireoperossidasi, suggerendo la presenza della malattia di Hashimoto. Tuttavia, l'esame del paziente II5, che aveva la malattia di Hashimoto ma non il cancro, ha escluso una correlazione diretta tra le due condizioni.

Successivi studi hanno rivelato che la variante PAK4: c.T1250C: p.I417T è associata a manifestazioni più aggressive, probabilmente a causa di alterazioni strutturali che compromettono l'attività funzionale della proteina. La proteina PAK4 con la variante I417T mostra un cambiamento aminoacidico, acquisendo una treonina in posizione 417. Come ipotizzato dagli autori, questa treonina induce cambiamenti conformazionali aumentando la fosforilazione complessiva della proteina (introducendo un nuovo sito di fosforilazione) e creando nuovi legami intramolecolari che causano instabilità. Inoltre, tutti i saggi funzionali nelle colture cellulari hanno evidenziato caratteristiche tipiche delle cellule tumorali: elevata proliferazione e formazione di colonie, maggiore migrazione, apoptosi attenuata e aumento della fosforilazione delle proteine coinvolte nella via di segnalazione del TNF.

I geni *MMP3* e *MMP9* sono emersi come arricchiti nell'analisi dei geni differenzialmente espressi. Queste proteine, appartenenti alla matrice extracellulare, sono coinvolte in processi come la degradazione di componenti della ECM, la motilità, l'adesione e il rimodellamento cellulare. In letteratura, sono note per il loro contributo alla progressione del cancro, facilitando l'invasione e la metastasi. Questo studio ha dimostrato, attraverso diversi esperimenti, una loro maggiore espressione in presenza di PAK4 I417T. Grazie all'interazione diretta di p-PAK4 T417 con alcuni fattori del pathway TNF, si osserva un'accelerata e aumentata espressione genica, in particolare di *MMP3*, con cui p-PAK4 T417 interagisce direttamente (Figura 12).

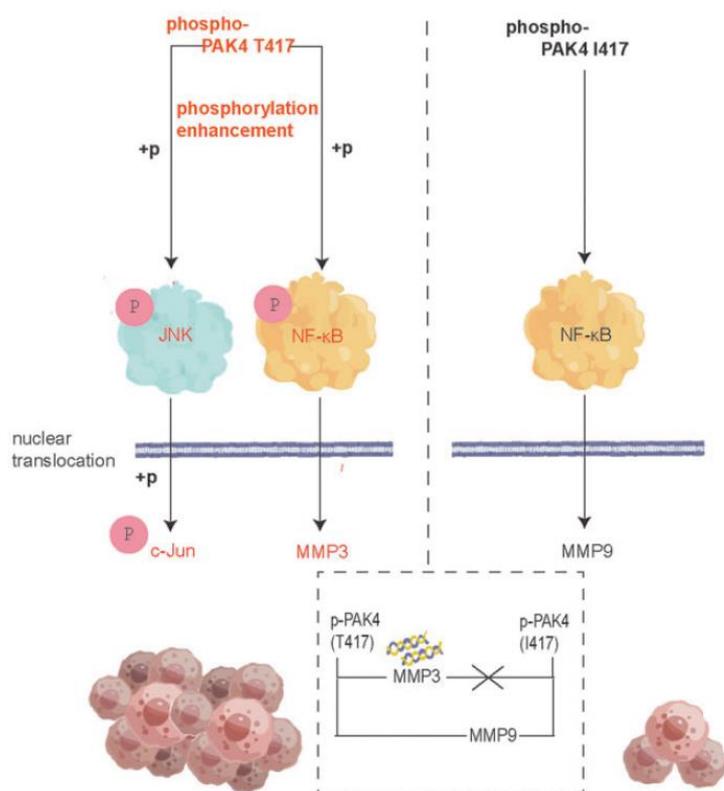


Figura 12 Nella parte sinistra della figura, la proteina p-PAK4 T417 promuove la fosforilazione di JNK e NFκB. Una volta fosforilati e attivati, questi due fattori traslocano nel nucleo. Qui, JNK attiva c-Jun, un componente del fattore di trascrizione AP-1, che a sua volta induce la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare, nella differenziazione, nell'apoptosi e anche dei geni MMP. Parallelamente, NFκB si lega direttamente al promotore di MMP3, stimolandone la sintesi e aumentandone l'attività, con conseguente aumento della proliferazione e divisione cellulare. La parte sinistra della figura mostra anche l'interazione diretta di NFκB con MMP9, che, tuttavia, non induce un significativo accrescimento cellulare.

Attualmente, gli studi hanno dimostrato che PAK4 può influenzare l'espressione di MMP9 in pazienti con adenomiosi, cancro del colon-retto e cancro al seno, ma il suo meccanismo d'azione non è stato spiegato né verificato nel cancro alla tiroide.

Una delle limitazioni evidenziate dagli autori è la mancanza di un'analisi completa delle mutazioni somatiche, avendo testato solo le mutazioni BRAF nel paziente II9. Questa valutazione limitata potrebbe aver tralasciato mutazioni importanti per lo studio della progressione della malattia. Un altro gene che poteva essere testato è RAS. Le mutazioni dei geni RAS (HRAS, KRAS e NRAS) sono state rilevate nei carcinomi papillari e follicolari della tiroide. Queste mutazioni causano una crescita incontrollata e aumentano l'aggressività del tumore. Come per BRAF, anche per RAS la metodica più efficace sarebbe il sequenziamento e la ricerca della variante

mutata del gene, nonostante sia una tecnica costosa e poco utilizzata nella pratica clinica diffusa. Inoltre, l'analisi dell'oncogene RAS sembra migliorare la sensibilità della citologia del cancro, sebbene la possibile presenza di queste mutazioni negli adenomi follicolari ne renda l'uso potenzialmente meno specifico. [8]

Un'altra limitazione è assenza della linea cellulare BRAF^{V600E} del paziente II9, in quanto era solo esso ad essere testato.

Inoltre, una delle limitazioni potrebbe essere utilizzo di certi protocolli piuttosto che altri, come per esempio il whole genome sequencing. La scelta del WES come test del DNA presenta vantaggi e svantaggi; rispetto alla genotipizzazione, il WES fornisce informazioni su tutti i geni e le loro varianti presenti nel genoma, il che è particolarmente utile in quanto non si conoscono esattamente i geni coinvolti nella cancerogenesi della tiroide. Tuttavia, la regolazione genica (upregulation o downregulation) può essere influenzata anche da mutazioni nelle sequenze introniche, che però non vengono studiate nel WES. In questi casi, il WGS (Whole Genome Sequencing) sarebbe più appropriato. Nonostante ciò, il WES, combinato con altri esperimenti visti nello studio, è risultato un'ottima metodica grazie al bilanciamento tra costi e la quantità di informazioni fornite.

In conclusione, il modello genetico del FNMTTC è complesso, con una patogenesi unica che potrebbe essere presente in diverse famiglie colpite. Come visto in questo lavoro, in una famiglia il gene PAK4: c.T1250C: p.I417T potrebbe rappresentare un potenziale gene di suscettibilità per il FNMTTC. Tuttavia, sono necessari più studi su pedigree e studi di replicazione per confermare questo risultato.

BIBLIOGRAFIA

- [1] E. B. Chiara Diquigiovanni, «Genetics of Familial Non-Medullary Thyroid Carcinoma (FNMTC),» *cancers*, p. 15, 2021.
- [2] S. C.-G. I. A.-N. Mari´a Sa´ nchez-Ares, «Susceptibility Genes and Chromosomal Regions Associated With Non-Syndromic Familial Non-Medullary Thyroid Carcinoma: Some Pathogenetic and Diagnostic Keys,» *frontiers in Endocrinology*, vol. 13, p. 14, 2022.
- [3] M. P. S. N. M. P. H. K. P. Shinya Uchino, «Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma Characterized by Multifocality and a High Recurrence Rate in a Large Study Population,» *WORLD Journal of SURGERY*, p. 6, 2002.
- [4] Y. Yuan, «PAK4 in cancer development: Emerging player and therapeutic opportunities,» *ELSEVIER*, vol. Cancer Letters, p. 18, 2022.
- [5] R. J. P. a. S. E. Eleanor G. Seaby, «Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application,» *Oxford*, vol. Briefings in Functional Genomics, p. 11, 2016.
- [6] H. Nakamura, «BALB/c Mouse,» *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, vol. second, p. 292, 2013.
- [7] G. Z. X. L. X. Q. J. O. J. D. a. S. M. Jiangtao Wan, «Matrix Metalloproteinase 3: A Promoting and Destabilizing Factor in the Pathogenesis of Disease and Cell Differentiation,» *frontiers in Physiology*, p. 10, 2021.
- [8] B. C.-D. ., C. O. Frédérique Albarel, «From nodule to differentiated thyroid carcinoma: Contributions of molecular analysis in 2012,» *Elsevier Masson*, p. 10, 2012.

APPENDICE

STAGE

Il progetto a cui ho partecipato mirava a identificare nuovi geni candidati per l'insorgenza del carcinoma papillare della tiroide. In letteratura sono già noti alcuni geni associati a questa malattia. Il gruppo di ricerca ha identificato dei nuovi geni candidati che sta attualmente studiando in vitro impiegando la linea cellulare Nthy-ori 3-1 costituita da cellule tiroidee immortalizzate derivate da una donatrice senza una storia di tumori. Queste cellule sono state sottoposte a gene editing utilizzando la tecnica CRISPR/Cas9 per ottenere il *knockout* del gene di interesse. L'obiettivo era capire se il gene candidato avesse un ruolo di oncogene o oncosoppressore e determinare il suo coinvolgimento nell'insorgenza del carcinoma papillare della tiroide.

I geni analizzati sono stati identificati sulla base della loro associazione in famiglie con una storia di tumore tiroideo, partendo dal presupposto di una predisposizione ereditaria. Un'analisi di Whole-Exome Sequencing (WES) condotta nei pazienti di tali famiglie, ha infatti rivelato diverse mutazioni con un forte impatto funzionale (come stop codon e frameshift) in geni potenzialmente coinvolti nella predisposizione al carcinoma tiroideo.

Le cellule sono state sottoposte a trasfezione con sonde per il silenziamento genico tramite CRISPR/Cas9. Dopo la trasfezione, è stata effettuata una selezione con antibiotici per identificare le cellule effettivamente modificate. Una semina molto diluita ha permesso di ottenere una selezione clonale con cloni singoli, dai quali sono stati derivati gruppi di cellule da testare. Il primo screening, effettuato tramite PCR, ha verificato se il taglio del DNA fosse avvenuto su entrambi gli alleli (omozigote) o su uno solo (eterozigote). Successivamente, è stata eseguita una valutazione con qPCR per verificare il silenziamento del gene a livello di espressione. Inoltre, il gruppo ha condotto un'analisi di Western blot per determinare la presenza o l'assenza della proteina corrispondente. Una volta confermata l'assenza della proteina, si è proceduto con i saggi funzionali in vitro.

Sono stati studiati parametri come la proliferazione cellulare, la formazione di colonie, la capacità di migrazione e l'invasività attraverso saggi funzionali. In questa fase dell'indagine, ho partecipato attivamente e assistito ai saggi di proliferazione e migrazione cellulare, oltre ai cambiamenti di terreno e alla valutazione della capacità invasiva.

Durante la fase iniziale di screening per identificare omozigoti ed eterozigoti, ho contribuito seguendo il protocollo di estrazione del DNA dalle cellule utilizzando la proteinasi K e successivamente eseguendo la PCR. L'obiettivo era verificare la presenza di omozigoti, poiché la maggior parte delle cellule risultava eterozigote. Se si fosse ottenuto almeno un omozigote, sarebbe stato possibile descrivere più dettagliatamente la funzione dei geni testati. Tuttavia, durante il periodo della mia partecipazione, non è stato possibile individuare alcun clone omozigote, suggerendo l'ipotesi che la condizione di omozigosi possa essere letale. Tuttavia, ulteriori studi in diverse condizioni sperimentali sono necessari per confermare o escludere questa ipotesi.



Identification of *P21 (CDKN1A) Activated Kinase 4* as a Susceptibility Gene for Familial Non-Medullary Thyroid Carcinoma

Yu-Jia Jiang,¹ Yun Xia,^{2,3,*} Yi-Xuan Hu,¹ Zhuo-Jun Han,¹ An-Yuan Guo,³ and Tao Huang¹

Background: Familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTc) is a genetically predisposed disease with unclear genetic mechanisms. This makes research on susceptibility genes important for the diagnosis and treatment options.

Methods: This study included a five-member family affected by papillary thyroid carcinoma. The candidate genes were identified through whole-exome sequencing and Sanger sequencing in family members, other FNMTc patients, and sporadic non-medullary thyroid carcinoma patients. The pathogenicity of the mutation was predicted using *in silico* tools. Cell phenotype experiments *in vitro* and models of lung distant metastasis *in vivo* were conducted to confirm the characteristics of the mutation. Transcriptome sequencing and mechanistic validation were employed to compare the disparities between *PAK4* wild-type (WT) and *PAK4* mutant (MUT) cell lines.

Results: This mutation alters the protein structure, potentially increasing instability by affecting hydrophobicity, intra-molecular hydrogen bonding, and phosphorylation sites. It specifically promotes phosphorylated *PAK4* nuclear translocation and expression in thyroid tissue and cell lines. Compared with the WT cells line, *PAK4* I417T demonstrates enhanced proliferation, invasiveness, accelerated cell division, and inhibition of cell apoptosis *in vitro*. In addition, it exhibits a significant propensity for metastasis *in vivo*. It activates tumor necrosis factor signaling through increased phosphorylation of *PAK4*, JNK, NF κ B, and c-Jun, unlike the WT that activates it via the *PAK4*-NF κ -MMP9 axis. In addition, *PAK4* MUT protein interacts with matrix metalloproteinase (MMP)3 and regulates MMP3 promoter activity, which is not observed in the WT.

Conclusions: Our study identified *PAK4*: c.T1250C: p.I417T as a potential susceptibility gene for FNMTc. The study concludes that the mutant form of *PAK4* exhibits oncogenic function, suggesting its potential as a novel diagnostic molecular marker for FNMTc.

Keywords: familial non-medullary thyroid carcinoma, thyroid carcinoma, genetic susceptibility, *PAK4*, molecular diagnosis

Introduction

FAMILIAL NON-MEDULLARY THYROID CARCINOMA (FNMTc) refers to families in which two or more first-degree relatives have thyroid carcinoma of follicular epithelial cell origin, unrelated to specific thyroid pathogenic factors. FNMTc represents ~5% of all non-medullary thyroid carcinoma cases.^{1,2} While non-medullary thyroid car-

cinoma was initially considered sporadic, recent studies have established a genetic predisposition for FNMTc, which results in a more aggressive behavior and worse prognosis compared with sporadic non-medullary thyroid carcinoma (SNMTc).³⁻⁶

Although a small proportion of FNMTc families is classified as syndromic FNMTc, most FNMTc cases are non-syndromic, and the underlying genetic mechanisms remain uncertain.⁷

¹Department of Breast and Thyroid Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College; ²Hubei Bioinformatics and Molecular Imaging Key Laboratory, College of Life Science and Technology; Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China.

³Department of Thyroid Surgery, West China Biomedical Big Data Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, China.

*Co-first author.

Mutations in genes such as *SRGAP1* (12q14),⁸ *FOXE1* (9q22.33),^{9–15} *DUOX2* (15q21.1),¹⁶ *CHEK2* (22q12.1),^{17–19} and *NOP53* (19q13.33)²⁰ have been reported to potentially participate in the occurrence of FNMTC. However, in other known susceptibility genes and chromosomal loci, such as 14q32 locus (*MNG1*),^{21–25} *PTCSC1* (8q24),²⁶ *SRRM2* (16p13.3),²⁷ *MAP2K5* (15q23),^{28–30} *HABP2* (10q25.3),^{31–34} 19q13 locus (*TCO*, *MYO1F*, *GRIM19*, and *TIMM44*),^{21–25,35–39} 2q21 locus (*NMTC1*),^{23,25,35,40,41} 8p23.1-p22 locus (*PTEN*),⁴² 1q21 (*fPTC/PRN*),^{23,25,43,44} *BROX* (1q41),⁴⁵ *POT1* (7q31.33),^{46–48} *WDR77* (1p13.2),⁴⁹ and 6q22 locus,⁴³ most of these variations only exist in specific study families and have not been validated in other families or cannot be replicated in heredity.

Thus, FNMTC may have significant genetic heterogeneity, with each family having its unique pathogenic gene. Our study identified a novel mutation, *PAK4* I417T, for the first time. The mutated form of *PAK4* exhibited oncogenic function and distinct mechanisms, indicating its potential as a new diagnostic molecular marker for FNMTC.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was approved and conducted by the Ethics Committee of Union Hospital Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology (2017-S062). All participants were informed of their rights to consent and signed an informed consent form. Animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology (2021-3247). Our research was carried out in accordance with relevant ethical regulations.

Patients and management

The inclusion criteria for family pedigrees were as follows: (1) Three or more first-degree relatives who have been pathologically diagnosed with non-medullary thyroid cancer; (2) older adult controls: first-degree relatives who were over 50 years old and had no history of tumors; (3) no intermarriage with ethnicities other than Han in the family; (4) no consanguinity between spouses; (5) no clear history of external radiation exposure; and (6) no other genetic diseases.

A five-member affected family was included, with all members undergoing health screening, including ultrasound examination of the thyroid and cervical lymph nodes, as well as serological thyroid function testing. Clinicopathological information was collected during preoperative and postoperative follow-up, with regular reassessment every six months. In addition, peripheral blood leukocyte DNA samples were obtained from validation cohort comprising 31 additional FNMTC patients and 280 sporadic thyroid cancer patients without a family history.

The selection of the validation cohort is described in detail in the Supplementary Methods section of Supplementary Data S1. Please refer to Supplementary Figure S1 and Supplementary Table S1 for the flow diagram, demographic characteristics, and clinical features of the validation cohort.

Peripheral blood whole-exome sequencing

Peripheral blood DNA extraction and whole-exome sequencing (WES) were processed according to the procedures outlined in the Supplementary Methods section of Supplementary Data S1.

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF FAMILY MEMBERS

	II	II2	II3	II5	II7	II9	III1	Reference range
Age, years	79	58	57	56	54	39	45	—
Sex	Male	Female	Male	Female	Female	Female	Male	—
ft3	5.10	4.70	6.49	4.76	5.09	4.69	4.89	3.1–6.8 pmol/L
ft4	15.10	22.50	15.10	18.00	16.00	23.40	21.90	12–22 pmol/L
TSH	4.52	0.12	1.79	3.50	1.40	0.10	0.54	0.27–4.2 mIU/L
ATG	13.40	135.90	<10	<10	<10	324.70	34.70	0–115 IU/mL
ATPO	24.60	128.80	<9	69.70	<9	117.40	68.20	0–34 IU/mL
Ultrasonography ^a	Clinical thyroid cancer	After total thyroid-ectomy	Normal	Normal	Thyroid nodule	After total thyroid-ectomy	After total thyroid-ectomy	—
	III1	III2	III3	III4	III5	III6	III8	Reference range
Age, years	36	32	30	25	32	23	10	—
Sex	Female	Female	Female	Male	Female	Female	Male	—
ft3	3.47	5.64	6.17	5.35	3.96	4.97	4.23	3.1–6.8 pmol/L
ft4	12.10	18.20	19.40	17.10	13.38	21.67	17.29	12–22 pmol/L
TSH	1.08	1.29	2.39	2.61	3.28	0.67	3.86	0.27–4.2 mIU/L
ATG	<10	56.60	<10	<10	<10	123.00	<10	0–115 IU/mL
ATPO	11.10	<9	<9	<9	13.00	89.70	<9	0–34 IU/mL
Ultrasonography ^a	Normal	Thyroid nodule	Normal	Normal	Thyroid nodule	After total thyroid-ectomy	Normal	—

^aUltrasound report results at final follow-up.

ATG, anti-thyroglobulin; ATPO, anti-thyroid peroxidase; ft3, free triiodothyronine; ft4, free thyroxine; TSH, thyrotropin.

TABLE 2. PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS

	II2	II9	III1	III6
Pathology type	Papillary thyroid carcinoma	Papillary thyroid carcinoma	Papillary thyroid microcarcinoma	Papillary thyroid microcarcinoma
Number of tumoral foci	4	2	4	1
Maximum diameter, cm	3	4.5	0.3	0.8
Overall diameter, cm	5.9	6.6	0.8	0.8
Extrathyroidal extension	No	Yes	No	No
Central lymph node metastasis	1/23	2/2	2/12	9/26
Lateral lymph node metastasis	No	7/14	No	5/32
Hashimoto's disease	Yes	Yes	Yes	Yes
Stage (TNM) at diagnosis	T2N1aM0	T3bN1aM0	T1aN1aM0	T1aN1bM0
Number of treatments with radioiodine 131	0	4	1	1
Total follow-up period, months	54	144	84	102
Stage (TNM) after the end of follow-up	T2N1aM0	T4bN1bM1	T1aN1aM0	T1aN1bM0

Polymerase chain reaction amplification and Sanger sequencing

We obtained DNA fragment primers (Supplementary Data S1) of selected candidate genes using the Primer-Blast website.⁵⁰ Purified polymerase chain reaction (PCR) products were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 sequencing kit (Thermo ABI) and analyzed on an ABI3730xl sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Selection of candidate genes

Through WES data analysis, shared mutation sites were identified in the exomes of five thyroid cancer patients (II1, II2, II9, III1, and III6) within this specific family. Subsequently, the older adult normal controls (II3, II5), introns, synonymous mutations, and fully homozygous genes were sequentially excluded. The Exome Aggregation Consortium (ExAC)⁵¹ and Genome Aggregation Database (gnomAD)⁵² were utilized to exclude mutations with allele frequencies >0.001 in Asians. *In silico* predictions, including PolyPhen-2,⁵³ SIFT,⁵⁴ and Mutation Taster⁵⁵ models, were used to screen candidate genes for the identified variants. Emphasis was placed on genes associated with thyroid and cancer function.

Sanger sequencing was utilized within the family to confirm the co-segregation of the gene with the phenotype. It was also employed among different families to determine whether there are shared susceptibility genes, and for verification in sporadic cases. The Cancer Genome Atlas (TCGA) database⁵⁶ was also consulted for additional validation in sporadic cases.

Protein structure model prediction

The domain structure model prediction and gene conservation information were obtained from The Ensembl Genome Browser website.⁵⁷ The three-dimensional structure models were generated using The Swiss-Model Server.⁵⁸ Protein phosphorylation site prediction is per-

formed using NetPhos Server,⁵⁹ whereas DeepSite website⁶⁰ is utilized as a binding pocket predictor.

Immunohistochemistry

Tissue samples from FNMTc and SNMTc were collected and fixed. Immunohistochemistry was performed by incubating the samples with primary antibodies (p-PAK4) specific to the target proteins, followed by incubation with secondary antibodies. Please refer to the Supplementary Methods section for detailed information on the sample processing procedures.

Cell culture

The normal human thyroid cell line Nthy-ori-3-1 and the human thyroid cancer cell line TPC-1 were purchased from European Collection of Authenticated Cell Cultures and American Type Culture Collection, respectively. The cells were maintained in RPMI (Viva Cell) or Dulbecco's modified Eagle's medium (HY CEZMBIO) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Viva Cell) at 37°C and 5% CO₂ in a cell culture incubator.

Construction and transfection of over-expression lentiviral vectors

Using the Oligobio-LV-003 vector, constructs were made to overexpress wild-type (WT) *PAK4*, mutant (MUT) *PAK4*, and control lentiviruses. These constructs were controlled by the PCDH-CMV-MSCEF1-copGFP-T2A-Puro promoter. The transfection efficiency was finally verified by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction and Western blotting. The samples were processed according to the procedures outlined in the Supplementary Methods section.

Phenotypic experiments in vitro

Cell immunofluorescence, cell viability assay, colony formation assay, wound healing assay, transwell assay,

FIG. 1. The identification of candidate genes. (a) Flowchart for the selection of candidate genes. (b) Pedigree: Genotypes and phenotypes of family members. (c) Immunohistochemical experiment validation of p-PAK4 expression in thyroid cancer tissue and adjacent normal tissue in patients with FNMTc, representing the presence of the mutant *PAK4* genotype, and SNMTc representing the WT *PAK4* genotype. FNMTc, familial non-medullary thyroid carcinoma; SNMTc, sporadic non-medullary thyroid carcinoma; WT, wild-type.

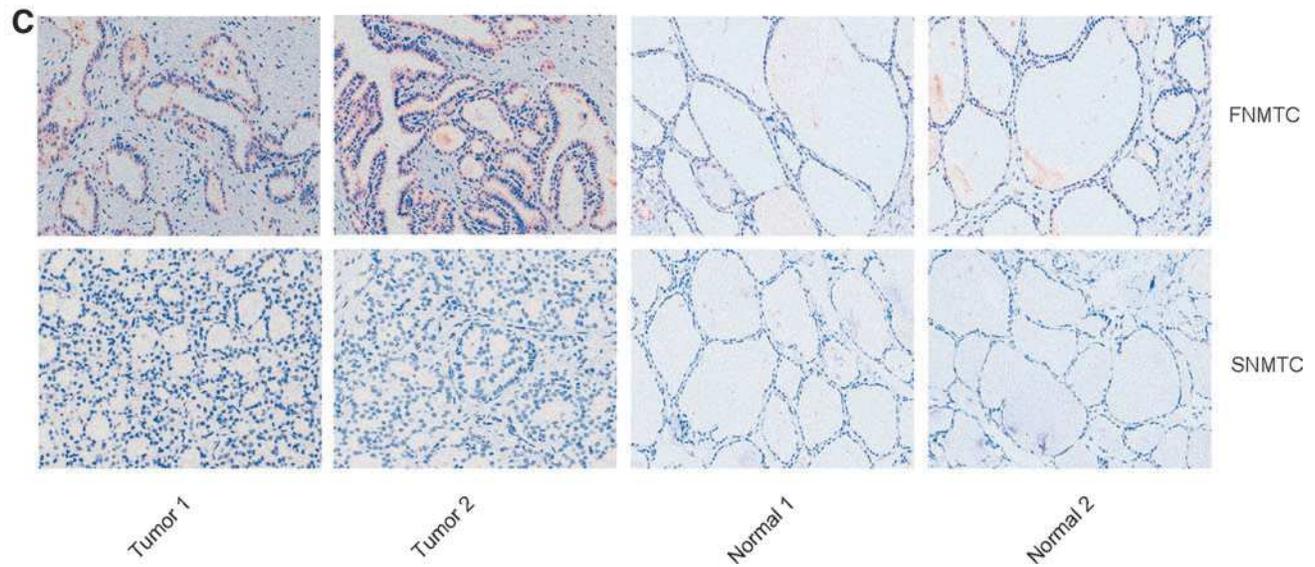
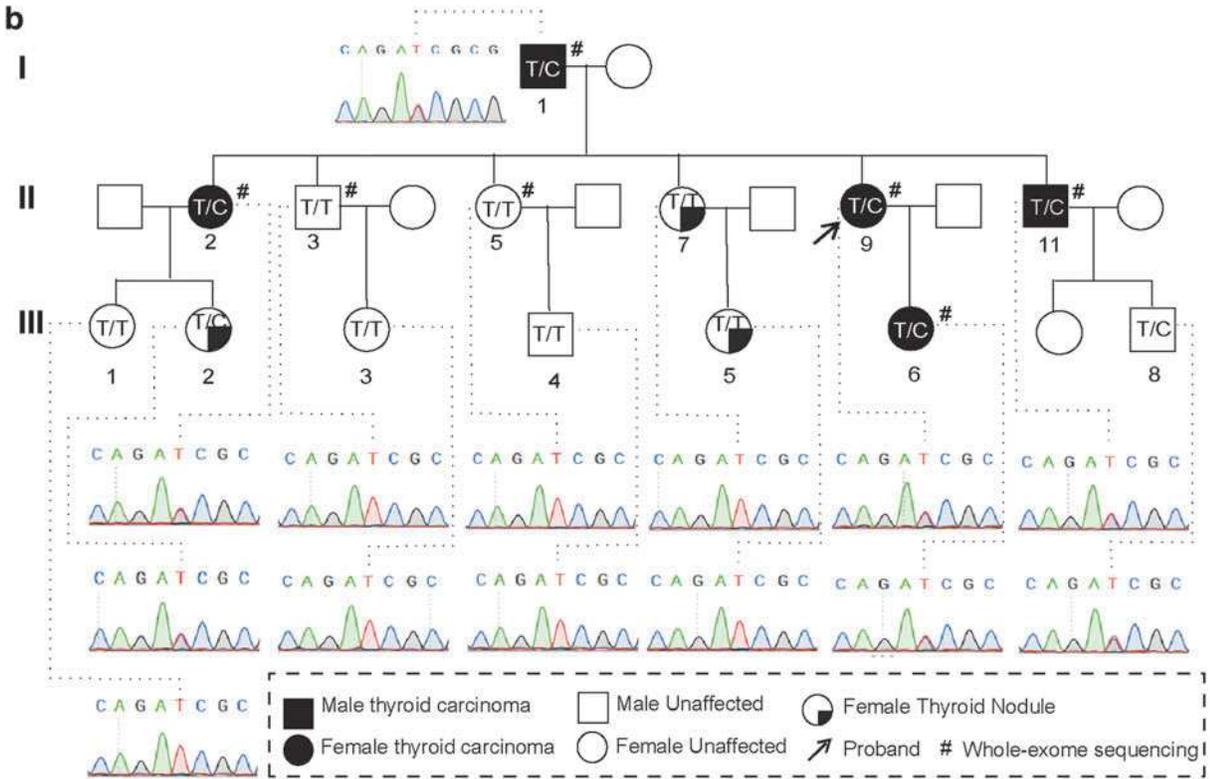
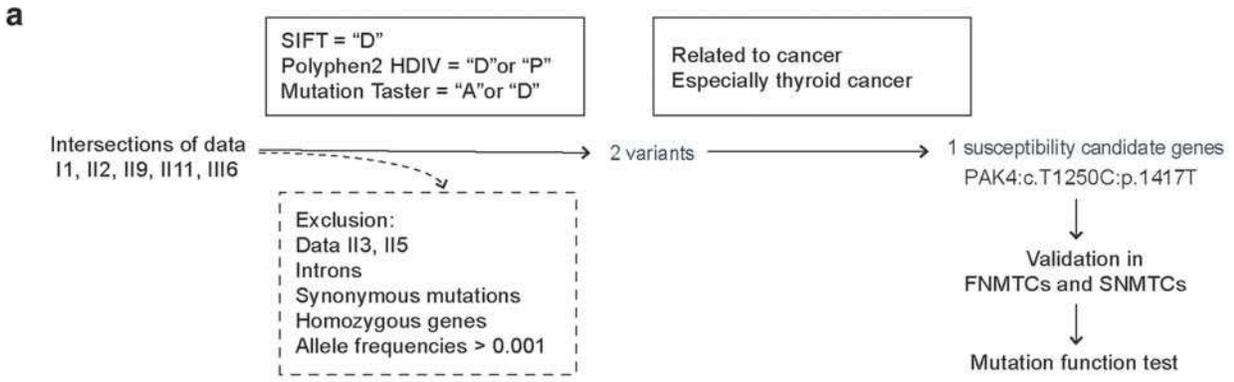


TABLE 3. INFORMATION OF CANDIDATE GENES

Gene	CytoBand	SNP	AA change	ExAC_EAS	gnomAD	In silico tools			Cancer gene	Related to thyroid
						SIFT	Polyphen2	MutationTaster		
PAK4	19q13.2	chr19-39665969-T-C	I417T	0.0003	0.00023	D	D	D	Yes	Yes
CLDN17	21q22.11	chr21-31538643-C-T	G98D	0.0012	0.00145	D	D	D	Yes	—

ExAC, Exome Aggregation Consortium; gnomAD, Genome Aggregation Database.

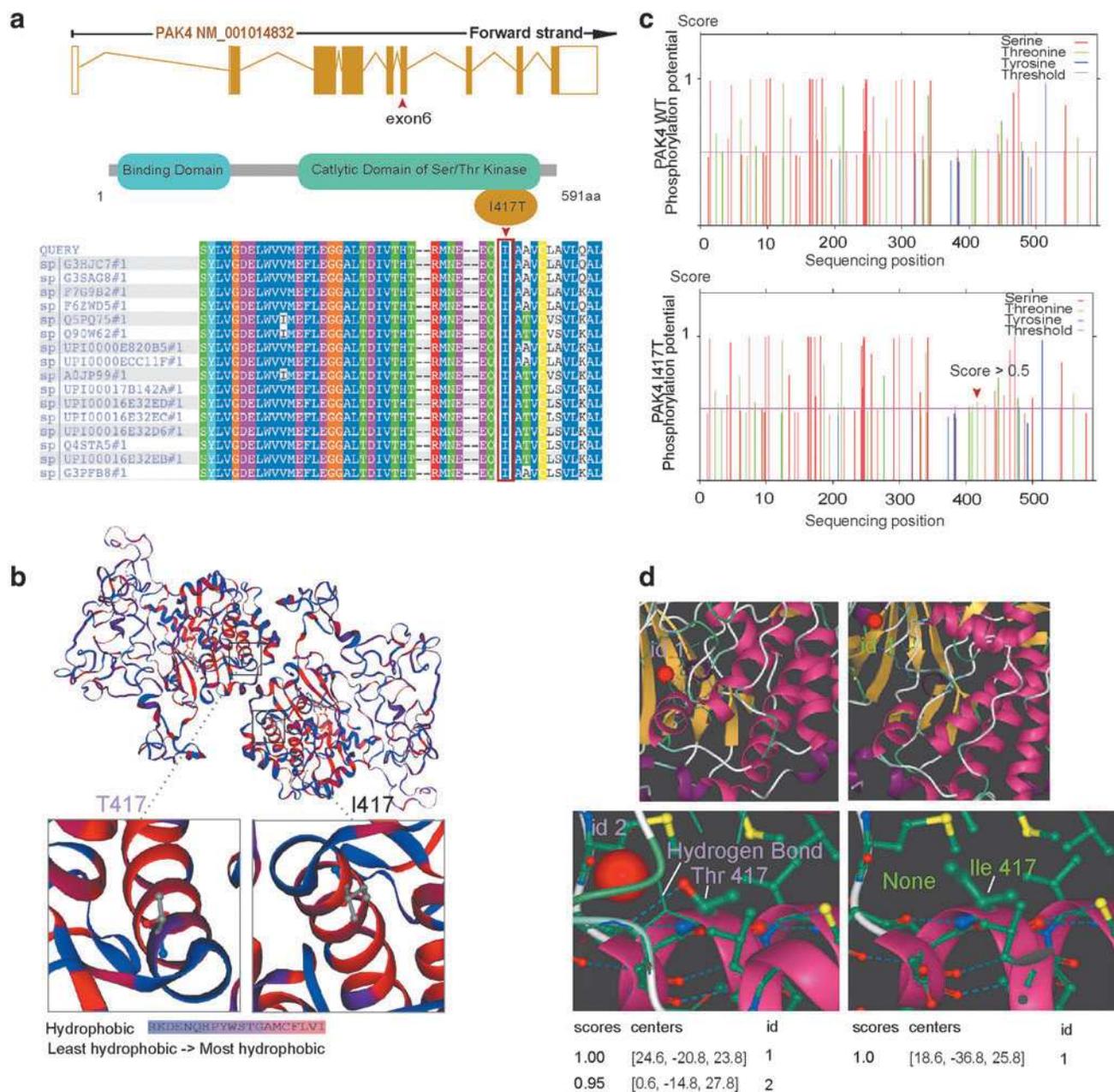


FIG. 2. Protein structure prediction. (a) Protein secondary structure prediction and conservation analysis. (b) Protein tertiary structure prediction and Hydrophobicity analysis. (c) Phosphorylation site prediction. (d) Protein binding site prediction and alteration of intermolecular forces.

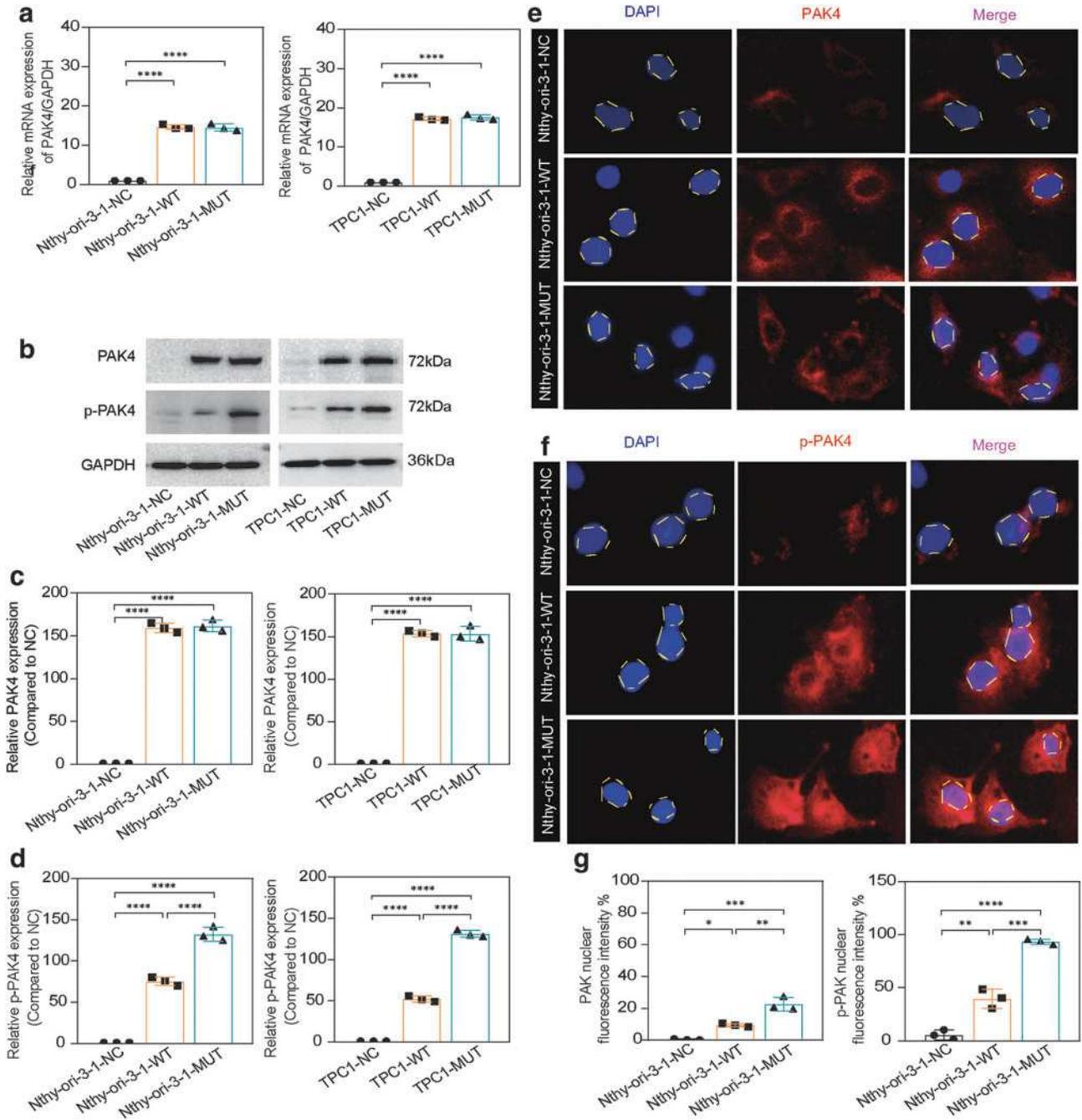
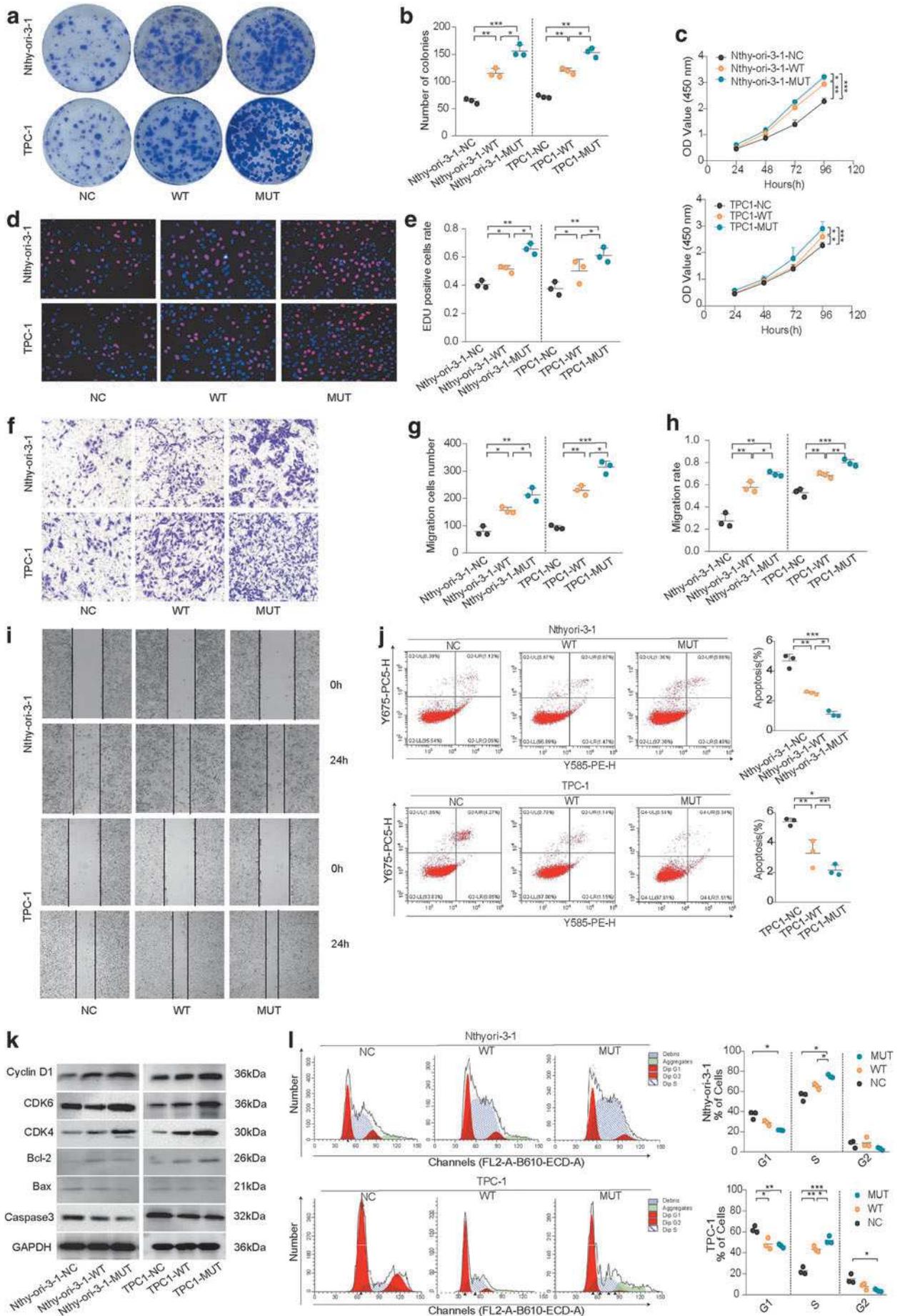


FIG. 3. Changes in protein localization and expression after mutation. **(a, b)** Successful construction of overexpressing WT and mutant cell lines at mRNA and protein expression levels. **(c, d)** The differences in PAK4 and phosphorylated PAK (p-PAK4) expression between the NC, WT, and MUT groups. **(e-g)** Immunofluorescence localization and nuclear fluorescence level of PAK4 and p-PAK4. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$. MUT, mutant.

FIG. 4. Functional validation of WT and mutant *PAK4* *in vitro*. **(a, b)** Number of colonies formed from plate cloning experiment after nine days (mean \pm SD). **(c)** OD value (mean \pm SD) of CCK-8 cell proliferation assay at 24, 48, 72, and 96 hours. **(d, e)** EDU-positive cells rate (mean \pm SD). **(f, g)** Number of migrated cells (mean \pm SD) in the transwell assay. **(h, i)** Scratch healing rate after 24 hours in the wound healing assay. **(j)** Inhibitory effects of mutant and WT on cell apoptosis. **(k)** Changes in the expression of proteins related to cell cycle and apoptosis. **(l)** Changes in cell cycle phases G1, S, and G2 caused by the mutant and WT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.005$. EDU, 5-ethynyl-2-deoxyuridine; OD, optical density; SD, standard deviation.



5-ethynyl-2-deoxyuridine (EDU) incorporation assay, and flow cytometry were conducted following the procedures outlined in the Supplementary Methods section.

Animal preparation *in vivo*

Four-week-old female BALB/c nude mice (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) were housed in the isolation facility of the experimental center. TPC-1-NC, TPC-1-WT, and TPC-1-MUT cells were collected, washed with phosphate-buffered saline, resuspended in serum-free medium, and made into a suspension of 100 μ L per mouse with 1×10^5 cells.

The cell suspension was injected into the tail vein to establish a pulmonary metastasis model. After eight weeks, the mice were sacrificed, the lungs were removed, fixed with 4% paraformaldehyde, and stained with hematoxylin and eosin for histological analysis.

Transcriptome sequencing and analysis

The samples of Nthy-ori-3-1-NC, Nthy-ori-3-1-WT, and Nthy-ori-3-1-MUT cells were used for transcriptome sequencing. The detailed data processing and analysis strategies are described in the Supplementary Methods section.

Immunoprecipitation, chromatin immunoprecipitation, and dual-luciferase reporter assay

TPC-1-WT and TPC-1-MUT cells were used for experiments. The samples were processed following the procedures described in the Supplementary Methods section.

Statistical analysis

SPSS software (version 22.0; IBM Corp., Armonk, NY) was used for statistical analysis. Figures were created by GraphPad Prism software (version 9.1.2; GraphPad Software, La Jolla, CA) and R (4.0.3; R Development Core Team). Following the evaluation of normal distribution and similarity of variances, one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test was conducted. All experiments were independently repeated at least three times. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant for both tests. All tests were two-sided.

Results

PAK4: c.T1250C: p.I417T identified as FNMTc family candidate gene

We studied a family with five members across three generations affected by papillary thyroid carcinoma. Total thyroidectomy with central or lateral neck dissection was carried

out on II2, II9, II11, and III6. Patient I1 declined surgery but underwent fine needle aspiration, which revealed papillary thyroid carcinoma. Our experienced director of thyroid surgery diagnosed the patient with clinically significant thyroid cancer.

During the 79-month follow-up period after diagnosis, distant metastases (lung and brain) were observed in the proband II9. Further, as indicated by the test report, a somatic mutation *BRAF*^{V600E} was also detected using fluorescence quantitative PCR. The clinical and pathological information of these patients is summarized in Tables 1 and 2.

Using the screening process illustrated in Figure 1a, we identified two candidate gene variants based on their allele frequency and *in silico* analysis (Table 3). Finally, *PAK4*: c.T1250C: p.I417T was selected for further study. Its allele frequency was found to be 0.0003 in ExAC_EAS and 0.00023 in gnomAD. Moreover, SIFT, Polyphen2, and MutationTaster analyses all indicated that the variant is potentially damaging.

The pedigree of the FNMTc family is illustrated in Figure 1b. Sanger sequencing results revealed that II7, III1, III3, III4, and III5 were found to be WT, whereas III2 and III8 carried the *PAK4* I417T mutation. Patient III2 has suspicious thyroid nodules detected on a thyroid ultrasound and is currently being closely monitored. Patient III8 is only 10 years old. Hence, further observation is necessary for these two individuals.

The *PAK4*: c.T1250C: p.I417T mutation was not detected in the additional 280 sporadic cases (0/280) or in the TCGA database (0/481). Among the Sanger sequencing data from 31 other FNMTc patients, one patient was found to carry the same mutation (1/31). Regrettably, in the newly identified pedigree, only the son from a three-member affected family was able to participate in the experiment and provide peripheral blood, as the mother has passed away and the other daughter is unable to participate for personal reasons.

IHC (Fig. 1c) results of thyroid cancer tissues and adjacent non-cancerous tissues revealed that p-PAK4 protein was expressed in both the cytoplasm and nucleus in FNMTc (representing the mutant *PAK4* genotype), whereas no significant expression was detected in patients with SNMTc (WT *PAK4* genotype).

Protein functional prediction of *PAK4* I417T

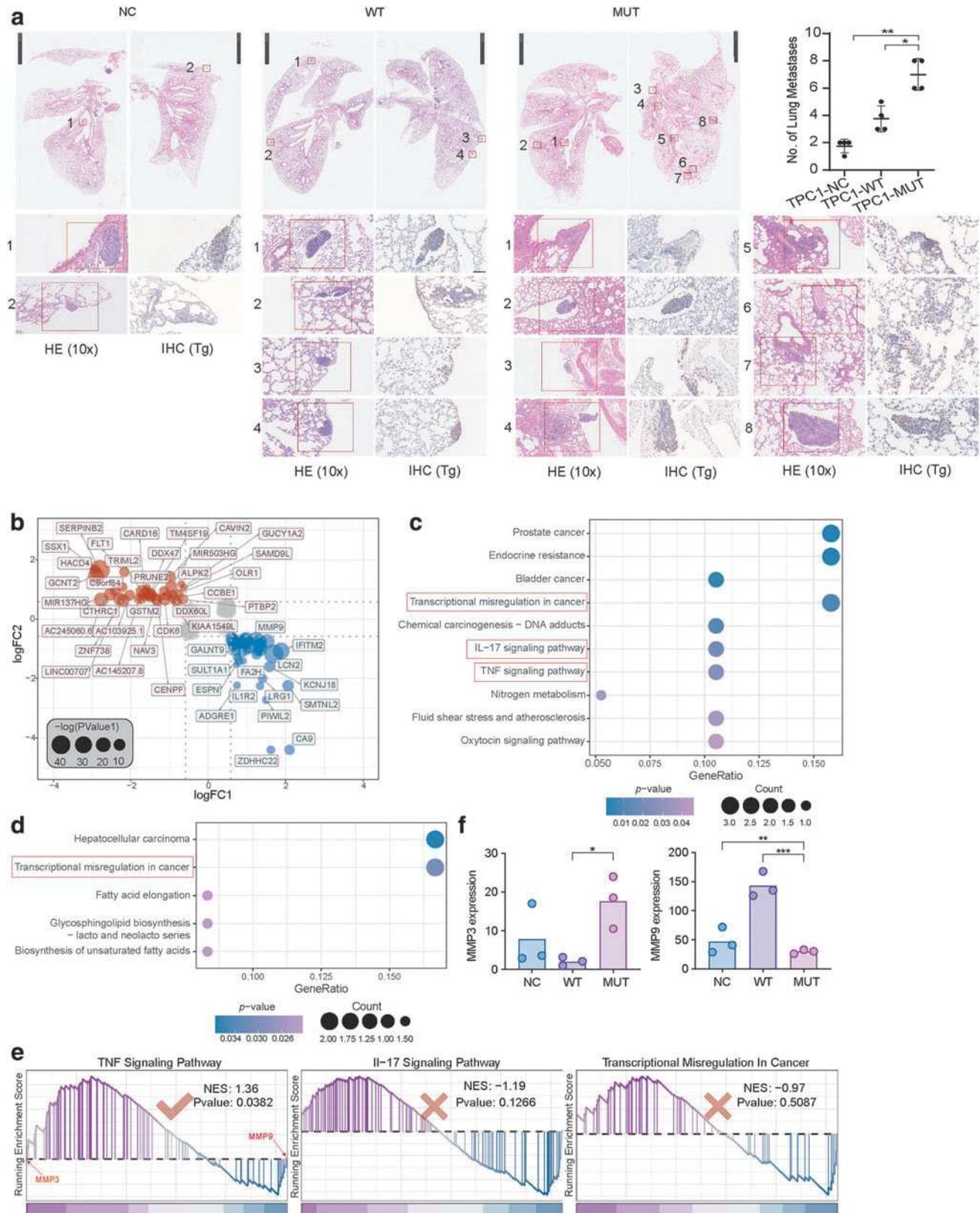
The *PAK4* protein's domain structure consists of a protein-binding domain and a catalytic domain, as shown in Figure 2a. The I417T mutation occurs at the catalytic site in exon 6 and is located in a conserved region of the gene. Three-dimensional structure prediction (Fig. 2b) reveals that the amino acid change caused by this missense mutation is situated on a

FIG. 5. Tumor lung metastasis *in vivo* and transcriptome sequencing identifies differences between WT and mutant *PAK4*. (a) HE staining and IHC image of lung tissue and the number of lung metastatic nodules (scale bars: 2.5 mm). (b) Analysis of differential gene expression. Group1: Screening for Group WT versus Group NC. Group2: Screening for Group MUT versus Group NC. Selection criteria: All DESeq2 ($\log_2|\text{FoldChange}| > \log_2 1.5$ and *p*-value <0.05; $\log_2\text{FoldChange}_1 \times \log_2\text{FoldChange}_2 < 0$; indicating opposite trends: red and blue areas). (c, d) KEGG pathway enrichment analysis of significantly upregulated genes in group 1 (c) and group 2 (d). (e) GSEA analysis of the transcriptional misregulation, IL-17, and TNF signaling pathways identified significant differences between the MUT and WT groups in only the TNF pathway. (f) Boxplots were generated to illustrate the expression of MMP3 and MMP9 in all tested groups. The Y-axis represents the normalized raw count values by TMM normalization method. **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.005. HE, hematoxylin and eosin; IL, interleukin; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; MMP, matrix metalloproteinase; TMM, trimmed mean of M-values; TNF, tumor necrosis factor.

β -helix. The mutation leads to reduced hydrophobicity, which may contribute to increased protein instability.

NetPho prediction (Fig. 2c) indicates that the I417T mutation introduces a phosphorylation site with a SCORE >0.05, indicating potential alterations in protein phosphorylation. In

addition, DeepSite predictions (Fig. 2d) demonstrate that the mutation of amino acid 417T creates a nearby binding site (id2). The presence of the mutated Threonine (Thr) at position 417, forming an intramolecular hydrogen bond with the neighboring Asparagine (Asn) at position 413, leads to



protein structural instability. This implies that the mutated residue may interact with other ligands, potentially affecting the protein's function and stability.

PAK4 I417T promotes phosphorylated PAK4 nuclear translocation and expression

Cell lines overexpressing WT and MUT PAK4 were successfully generated using Nthy-ori-3-1 and TPC-1 cells, as confirmed by mRNA expression, and protein expression analyses (Fig. 3a–d).

Cell immunofluorescence localization revealed continuous expression of PAK4 in the cytoplasm, whereas phosphorylated PAK4 was primarily localized to the cytoplasm and nucleus (Fig. 3e–f). The MUT group displayed higher nuclear fluorescence intensity and protein expression levels of p-PAK compared with the WT group, and these differences were statistically significant (Fig. 3d, g).

PAK4 I417T demonstrates enhanced proliferation, invasiveness, accelerated cell division, and inhibition of cell apoptosis in vitro

Overexpression of PAK4 MUT significantly enhances cell proliferation compared with the WT, as shown by cloning formation (Fig. 4a,4b), CCK-8 proliferation (Fig. 4c), and EDU assays (Fig. 4d, e). In addition, MUT-overexpressing cells exhibit increased invasiveness and migratory abilities compared with the WT group in transwell (Fig. 4f, g) and scratch assays (Fig. 4h, i).

Overexpression of MUT leads to a reduction in the proportion of cells in the G1 phase and an increase in the S phase, resulting in accelerated cell division (Fig. 4j). This effect is likely due to the upregulation of Cyclin D1 and CDK4/6 expression (Fig. 4k). Both the WT and MUT groups exhibit inhibition of cell apoptosis, with MUT showing a stronger and statistically significant effect compared with WT (Fig. 4l). PAK4 overexpression promotes the expression of Bcl-2, while inhibiting the expression of Bax and caspase-3, thereby suppressing cell apoptosis, particularly in the MUT group (Fig. 4k).

PAK4 I417T demonstrates a significant ability for metastasis in vivo

The MUT group demonstrated a higher incidence of lung metastases in comparison to the NC and WT groups (NC:WT:MUT=1.75:3.75:7, mean). The statistical analysis further confirmed the presence of a significant disparity (Fig. 5a).

PAK4 WT and MUT modulate the expression of different matrix metalloproteinase families through tumor necrosis factor signaling pathway

A total of 86 differential expression genes (DEGs) (Fig. 5b) were gained according to the DEGs screening strategy in the method section. The Kyoto Encyclopedia of

Genes and Genomes enrichment analysis results showed that the DEGs that were upregulated in WT versus NC and downregulated in MUT versus NC were enriched in some cancer-related signaling pathways, particularly those related to thyroid cancer, such as transcriptional misregulation, interleukin-17, and tumor necrosis factor (TNF) pathways (Fig. 5c), whereas differentially expressed genes that were downregulated in WT versus NC and upregulated in MUT versus NC were enriched in transcriptional misregulation signaling pathways (Fig. 5d).

GSEA analysis between the WT and MUT groups revealed that only the TNF signaling pathway showed significant enrichment (Fig. 5e). In the TNF signaling pathway, the differentially expressed gene MMP9 (Fig. 5b) is involved, along with other genes in the same family such as MMP3. Further, MMP3 was significantly upregulated in the MUT group compared with the NC group (Fig. 5f). In addition, GSEA analysis showed that MMP3 and MMP9 were respectively at the front and end of the log2FoldChange ranked list, suggesting their significant roles in the MUT and WT groups, respectively (Fig. 5e).

The levels of MMP9 were higher in the WT group compared with the MUT group, whereas the expression of MMP3 was lower in the WT group, consistent with the transcriptome sequencing results (Fig. 6g).

PAK4 I417T activates the signaling pathway of the TNF pathway by promoting phosphorylation levels PAK4, JNK, NFκB, and c-Jun

MUT enhanced the protein phosphorylation levels of PAK4, JNK, and NFκB (Fig. 6a–d). Due to JNK activation, downstream c-Jun was also activated, resulting in a protein kinase cascade reaction (Fig. 6e–f).

The mutant PAK4 can enhance the oncogenic effect by interacting with proteins and regulating MMP3 promoter activity

Both p-PAK4 I417 and T417 were found to directly interact with NFκB, facilitating the transfer of phosphate groups. However, only T417 can directly bind to JNK (Fig. 6h).

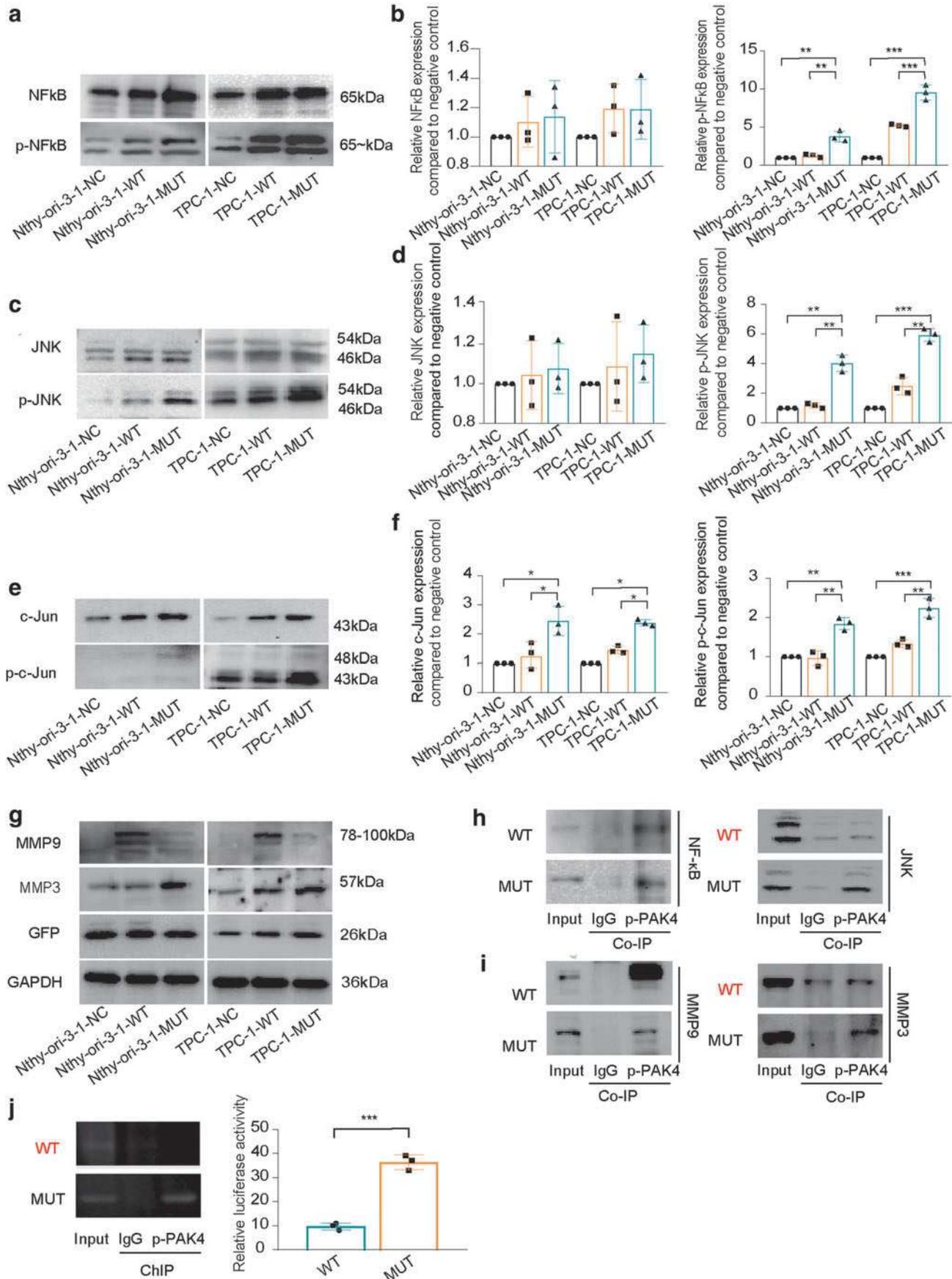
Further, p-PAK4 T417 exhibited direct interactions with both MMP3 and MMP9 in the nucleus, leading to simultaneous promotion of their expression. However, p-PAK4 I417 only displayed direct interaction with MMP9 (Fig. 6i).

The chromatin immunoprecipitation experiments and dual luciferase assays (Fig. 6j) provided further evidence that p-PAK4, acting as a transcription factor, can bind to and increased activity of the MMP3 promoter in the MUT group.

Discussion

This study explores the genetic susceptibility of FNMT3 starting from one family. At the same time, the variant *PAK4*: c.T1250C: p.I417T was not detected in sporadic thyroid

FIG. 6. Changes in the expression of related proteins through the TNF signaling pathway. (a–f) Increased expression of phosphorylated proteins NFκB (a, b), JNK (c, d), and c-Jun (e, f). (g) The expression of MMP9 and MMP3 in WT and mutant *PAK4*. (h, i) The co-IP experiment results. (j) ChIP experiment and Dual luciferase assays provide evidence that the mutant form of *PAK4* can regulate the transcriptional expression of MMP3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.005$. ChIP, chromatin immunoprecipitation; IP, immunoprecipitation.



cancer. This observation suggests that there may be differences in the underlying mechanisms of disease onset between individuals with FNMTc and SNMTC, consistent with the genetic characteristics of FNMTc.

Moreover, the presence of the same mutation in one patient from a different pedigree, combined with the enhanced oncogenic function exhibited by *PAK4*: c.T1250C: p.I417T, indicates its potential as a novel susceptibility gene for FNMTc.

In previous studies, we have observed significant genetic heterogeneity in FNMTc, with many findings specific to individual families. Some identified susceptible genes are related to FNMTc's specific combined diseases. For example, 1q21 (*fPTC/PRN*) is a specific locus for FNMTc combined papillary renal neoplasms (*PRN*)⁴⁴; the 2q21 (*NMTC1*) locus is associated with follicular variant papillary thyroid carcinoma (fvPTC)⁴⁰; *TTF-1* may be a susceptible gene for FNMTc combined multinodular goiter (MNG).⁶¹

In our study, patients II2, II9, II11, and III6 exhibited elevated levels of anti-thyroglobulin or anti-thyroid peroxidase (ATPO), and their pathological results indicated Hashimoto's thyroiditis. However, *PAK4* WT family member II5 also showed elevated levels of ATPO without thyroid cancer. Therefore, the role of mutated *PAK4* in the development of FNMTc associated with Hashimoto's disease remains unclear, but it shows potential as a specific susceptible gene. And further research is needed.

Our research findings indicate that the *PAK4*: c.T1250C: p.I417T mutation is associated with more aggressive malignant characteristics. We analyze the reasons for the enhanced

functionality of the oncogene. First, starting from the fundamental change in protein conformation, it is possible that the mutation of the amino acid at position 417 to Thr results in the formation of an intramolecular hydrogen bond with the nearby Asn at position 413.

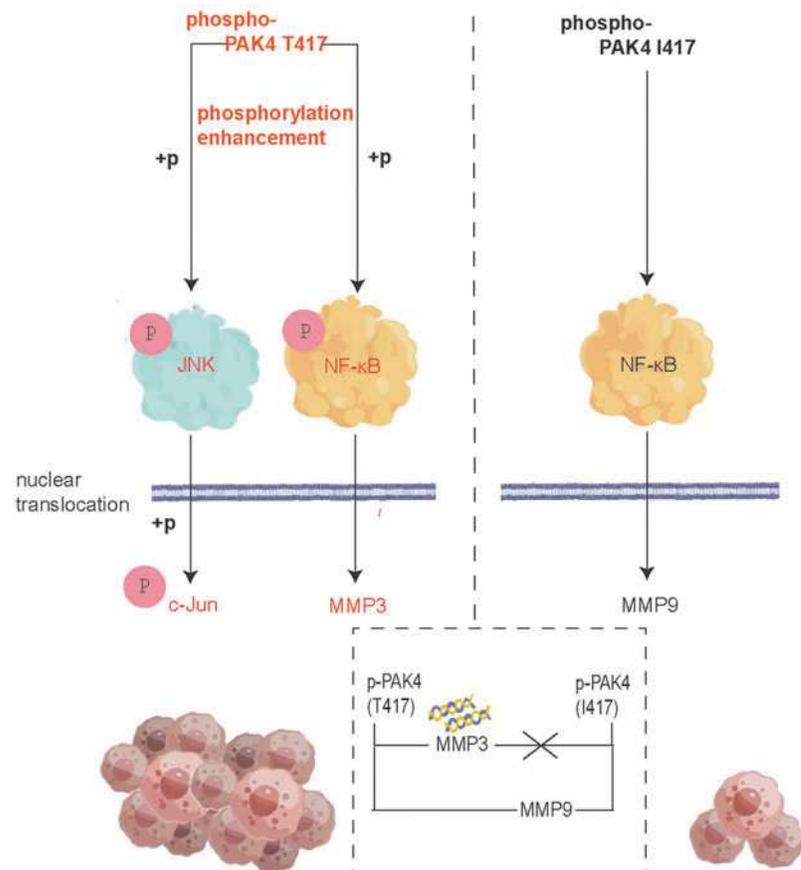
As a result, it leads to structural instability of the protein. This suggests that the mutated residue may form new interactions with other molecules or ligands, thus affecting the function or stability of the protein. In addition, the substitution of Thr at position 417 leads to increased phosphorylation and binding sites in the *PAK4* protein.

Changes in protein structure often affect protein function. Further, combining transcriptomic data, we have discovered that *PAK4* I417T can promote phosphorylated *PAK4* nuclear translocation and expression. It also promotes the phosphorylation levels of JNK, NFκB, and c-Jun, activating the TNF pathway (Fig. 7). This conclusion validates our prediction.

The downstream of the TNF signaling pathway involves the matrix metalloproteinases (MMPs) family. Currently, studies have shown that *PAK4* can affect the expression of MMP9 in patients with adenomyosis, colorectal cancer, and breast cancer,⁶²⁻⁶⁴ but its mechanism of action has not been explained and has not been verified in thyroid cancer. Our study found that both the mutant and WT forms can promote MMP9 expression through direct binding, but this effect is more pronounced in the WT form.

There are also studies showing the association between *MMP3* gene and the occurrence of thyroid cancer,^{65,66} but there is currently no study exploring the association between

FIG. 7. Changes in the mechanism of mutant *PAK4* in the TNF signaling pathway. The diagram mechanisms of WT and mutant *PAK4* in the TNF signaling pathway (by Figdraw).



PAK4 and *MMP3*. In our verification experiment, *PAK4* I417T not only has the ability to directly bind to the promoter region of *MMP3* but also exerts an influence on its transcription and expression. This functionality has not been observed in the WT *PAK4* (Fig. 7).

The limitations of our study include the lack of comprehensive somatic mutation analysis, as we only tested for *BRAF* mutations in patient II9 and did not screen for other commonly observed mutations such as *TERT* promoter or *TP53*. This limited evaluation may have missed important mutations that contribute to disease progression. Another limitation is the absence of a papillary thyroid carcinoma cell line with the same *BRAF*^{V600E} mutation as patient II9.

This introduces variability in the results and may limit generalizability. Future studies should broaden somatic mutation analyses and utilize cell lines with matched genotypes to gain a comprehensive understanding of the molecular landscape.

Finally, the genetic causal relationship model of FNMTc is complex, with unique pathogenesis likely present in different affected families. In one family, *PAK4*: c.T1250C:p.I417T could represent a potential susceptibility gene for FNMTc. However, more pedigrees and replication studies are needed to confirm this finding.

Availability of Data and Materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' Contributions

Y.-J.J.: Data curation, Conceptualization, Funding acquisition, Writing—original draft, and Formal analysis. Y.X.: Validation, Software, Data curation, and Formal analysis. Y.-X.H.: Writing—original draft, Validation, and Data curation. Z.-J.H.: Visualization, Resources, and Data curation. A.-Y.G.: Data curation, Resources, and Writing—review and editing. T.H.: Methodology, Investigation, Data curation, Conceptualization, Writing—review and editing, and Funding acquisition.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This work was supported by “the Fundamental Research Funds for the Central Universities” and “Key Program of Natural Science Foundation of Hubei Province” (Grant Nos. [No. 2020JYCXJJ008] and [No. 2021BCA142]).

Supplementary Material

Supplementary Data S1

References

1. Khan A, Smellie J, Nutting C, et al. Familial nonmedullary thyroid cancer: A review of the genetics. *Thyroid* 2010; 20(7):795–801; doi: 10.1089/thy.2009.0216
2. Vriens MR, Suh I, Moses W, et al. Clinical features and genetic predisposition to hereditary nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19(12):1343–1349; doi: 10.1089/thy.2009.1607
3. Uchino S, Noguchi S, Kawamoto H, et al. Familial non-medullary thyroid carcinoma characterized by multifocality and a high recurrence rate in a large study population. *World J Surg* 2002;26(8):897–902; doi: 10.1007/s00268-002-6615-y
4. Lee YM, Yoon JH, Yi O, et al. Familial history of non-medullary thyroid cancer is an independent prognostic factor for tumor recurrence in younger patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* 2014; 109(2):168–173; doi: 10.1002/jso.23447
5. Jiwang L, Zhendong L, Shuchun L, et al. Clinicopathologic characteristics of familial versus sporadic papillary thyroid carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2015;35(4):234–242.
6. Mosso L, Velasco S, Salazar I, et al. Clinical features of 17 patients with familial non medullary thyroid carcinoma [in Spanish]. *Rev Med Chil* 2007;135(6):718–724; doi: 10.4067/s0034-98872007000600005
7. Sanchez-Ares M, Cameselle-Garcia S, Abdulkader-Nallib I, et al. Susceptibility genes and chromosomal regions associated with non-syndromic familial non-medullary thyroid carcinoma: Some pathogenetic and diagnostic keys. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13: 829103; doi: 10.3389/fendo.2022.829103
8. He HL, Bronisz A, Liyanarachchi S, et al. SRGAP1 is a candidate gene for papillary thyroid carcinoma susceptibility. *J Clin Endocr Metab* 2013;98(5):E973–E980; doi: 10.1210/jc.2012-3823
9. Bonora E, Rizzato C, Diquigiovanni C, et al. The FOXE1 locus is a major genetic determinant for familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 2014;134(9):2098–2107; doi: 10.1002/ijc.28543
10. Takahashi M, Saenko VA, Rogounovitch TI, et al. The FOXE1 locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum Mol Genet* 2010;19(12):2516–2523; doi: 10.1093/hmg/ddq123
11. Tomaz RA, Sousa I, Silva JG, et al. FOXE1 polymorphisms are associated with familial and sporadic nonmedullary thyroid cancer susceptibility. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77(6):926–933; doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.04505
12. He H, Li W, Liyanarachchi S, et al. Genetic predisposition to papillary thyroid carcinoma: involvement of FOXE1, TSHR, and a novel lincRNA gene, PTCSC2. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(1):E164–E172; doi: 10.1210/jc.2014-2147
13. Pereira JS, Da SJ, Tomaz RA, et al. Identification of a novel germline FOXE1 variant in patients with familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTc). *Endocrine* 2015; 49(1):204–214; doi: 10.1007/s12020-014-0470-0
14. Wang Y, He H, Li W, et al. MYH9 binds to lincRNA gene PTCSC2 and regulates FOXE1 in the 9q22 thyroid cancer risk locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114(3):474–479; doi: 10.1073/pnas.1619917114
15. Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, et al. The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet* 2009;5(9):e1000637; doi: 10.1371/journal.pgen.1000637
16. Bann DV, Jin Q, Sheldon KE, et al. Genetic variants implicate dual oxidase-2 in familial and sporadic nonmedullary

- thyroid cancer. *Cancer Res* 2019;79(21):5490–5499; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0721
17. Siolek M, Cybulski C, Gasior-Perczak D, et al. CHEK2 mutations and the risk of papillary thyroid cancer. *Int J Cancer* 2015;137(3):548–552; doi: 10.1002/ijc.29426
 18. Zhao Y, Yu T, Chen L, et al. A germline CHEK2 mutation in a family with papillary thyroid cancer. *Thyroid* 2020; 30(6):924–930; doi: 10.1089/thy.2019.0774
 19. Wojcicka A, Czetwertynska M, Swierniak M, et al. Variants in the ATM-CHEK2-BRCA1 axis determine genetic predisposition and clinical presentation of papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2014;53(6):516–523; doi: 10.1002/gcc.22162
 20. Orois A, Gara SK, Mora M, et al. NOP53 as a candidate modifier locus for familial non-medullary thyroid cancer. *Genes (Basel)* 2019;10(11):899; doi: 10.3390/genes10110899
 21. McKay JD, Williamson J, Lesueur F, et al. At least three genes account for familial papillary thyroid carcinoma: TCO and MNG1 excluded as susceptibility loci from a large Tasmanian family. *Eur J Endocrinol* 1999;141(2): 122–125; doi: 10.1530/eje.0.1410122
 22. Bevan S, Pal T, Greenberg CR, et al. A comprehensive analysis of MNG1, TCO1, fPTC, PTEN, TSHR, and TRKA in familial nonmedullary thyroid cancer: confirmation of linkage to TCO1. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(8): 3701–3704; doi: 10.1210/jcem.86.8.7725
 23. Cavaco BM, Batista PF, Martins C, et al. Familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTC): Analysis of fPTC/PRN, NMTC1, MNG1 and TCO susceptibility loci and identification of somatic BRAF and RAS mutations. *Endocr Relat Cancer* 2008;15(1):207–215; doi: 10.1677/erc-07-0214
 24. Lesueur F, Stark M, Tocco T, et al. Genetic heterogeneity in familial nonmedullary thyroid carcinoma: Exclusion of linkage to RET, MNG1, and TCO in 56 families. NMTC Consortium. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(6):2157–2162; doi: 10.1210/jcem.84.6.5798
 25. Tsilchorozidou T, Vafiadou E, Yovos JG, et al. A Greek family with a follicular variant of familial papillary thyroid carcinoma: TCO, MNG1, fPTC/PRN, and NMTC1 excluded as susceptibility loci. *Thyroid* 2005;15(12):1349–1354; doi: 10.1089/thy.2005.15.1349
 26. He H, Nagy R, Liyanarachchi S, et al. A susceptibility locus for papillary thyroid carcinoma on chromosome 8q24. *Cancer Res* 2009;69(2):625–631; doi: 10.1158/0008-5472.Can-08-1071
 27. Tomsic J, He H, Akagi K, et al. A germline mutation in SRRM2, a splicing factor gene, is implicated in papillary thyroid carcinoma predisposition. *Sci Rep* 2015;5:10566; doi: 10.1038/srep10566
 28. Cirello V, Colombo C, Persani L, et al. Absence of the MAP2K5 germline variants c.G961A and c.T1100C in a wide series of familial nonmedullary thyroid carcinoma Italian families. *Int J Cancer* 2019;145(2):600; doi: 10.1002/ijc.32244
 29. Ye F, Gao H, Xiao L, et al. Authors' reply to: Absence of the MAP2K5 germline variants c.G961A and c.T1100C in a wide series of familial non-medullary thyroid carcinoma Italian families. *Int J Cancer* 2019;145(2):601–602; doi: 10.1002/ijc.32243
 30. Ye F, Gao H, Xiao L, et al. Whole exome and target sequencing identifies MAP2K5 as novel susceptibility gene for familial non-medullary thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 2019;144(6):1321–1330; doi: 10.1002/ijc.31825
 31. Gara SK, Jia L, Merino MJ, et al. Germline HAP2 mutation causing familial nonmedullary thyroid cancer. *N Engl J Med* 2015;373(5):448–455; doi: 10.1056/NEJMoa1502449
 32. Weeks AL, Wilson SG, Ward L, et al. HAP2 germline variants are uncommon in familial nonmedullary thyroid cancer. *BMC Med Genet* 2016;17(1):60; doi: 10.1186/s12881-016-0323-1
 33. Colombo C, Fugazzola L, Muzza M, et al. Letter regarding the article: “Multiple HAP2 variants in familial papillary thyroid carcinoma: Contribution of a group of “thyroid-checked” controls” by Kern et al. *Eur J Med Genet* 2018; 61(2):104–105; doi: 10.1016/j.ejmg.2017.07.012
 34. Kern B, Coppin L, Romanet P, et al. Multiple HAP2 variants in familial papillary thyroid carcinoma: Contribution of a group of “thyroid-checked” controls. *Eur J Med Genet* 2017;60(3):178–184; doi: 10.1016/j.ejmg.2017.01.001
 35. McKay JD, Thompson D, Lesueur F, et al. Evidence for interaction between the TCO and NMTC1 loci in familial non-medullary thyroid cancer. *J Med Genet* 2004;41(6): 407–412; doi: 10.1136/jmg.2003.017350
 36. Canzian F, Amati P, Harach HR, et al. A gene predisposing to familial thyroid tumors with cell oxyphilia maps to chromosome 19p13.2. *Am J Hum Genet* 1998;63(6):1743–1748; doi: 10.1086/302164
 37. Maximo V, Botelho T, Capela J, et al. Somatic and germline mutation in GRIM-19, a dual function gene involved in mitochondrial metabolism and cell death, is linked to mitochondrion-rich (Hurthle cell) tumours of the thyroid. *Br J Cancer* 2005;92(10):1892–1898; doi: 10.1038/sj.bjc.6602547
 38. Diquigiovanni C, Bergamini C, Evangelisti C, et al. Mutant MYO1F alters the mitochondrial network and induces tumor proliferation in thyroid cancer. *Int J Cancer* 2018; 143(7):1706–1719; doi: 10.1002/ijc.31548
 39. Bonora E, Evangelisti C, Bonichon F, et al. Novel germline variants identified in the inner mitochondrial membrane transporter TIMM44 and their role in predisposition to oncocytic thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 2006;95(11): 1529–1536; doi: 10.1038/sj.bjc.6603455
 40. McKay JD, Lesueur F, Jonard L, et al. Localization of a susceptibility gene for familial nonmedullary thyroid carcinoma to chromosome 2q21. *Am J Hum Genet* 2001; 69(2):440–446; doi: 10.1086/321979
 41. Prazeres HJ, Rodrigues F, Soares P, et al. Loss of heterozygosity at 19p13.2 and 2q21 in tumours from familial clusters of non-medullary thyroid carcinoma. *Fam Cancer* 2008;7(2):141–149; doi: 10.1007/s10689-007-9160-x
 42. Cavaco BM, Batista PF, Sobrinho LG, et al. Mapping a new familial thyroid epithelial neoplasia susceptibility locus to chromosome 8p23.1-p22 by high-density single-nucleotide polymorphism genome-wide linkage analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(11):4426–4430; doi: 10.1210/jc.2008-0449
 43. Suh I, Filetti S, Vriens MR, et al. Distinct loci on chromosome 1q21 and 6q22 predispose to familial non-medullary thyroid cancer: a SNP array-based linkage analysis of 38 families. *Surgery* 2009;146(6):1073–1080; doi: 10.1016/j.surg.2009.09.012
 44. Malchoff CD, Sarfarazi M, Tendler B, et al. Papillary thyroid carcinoma associated with papillary renal neoplasia: Genetic linkage analysis of a distinct heritable tumor syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(5):1758–1764; doi: 10.1210/jcem.85.5.6557

45. Pasquali D, Torella A, Accardo G, et al. BROX haploinsufficiency in familial nonmedullary thyroid cancer. *J Endocrinol Invest* 2021;44(1):165–171; doi: 10.1007/s40618-020-01286-6
46. Srivastava A, Miao BP, Skopelitou D, et al. A germline mutation in the *POT1* gene is a candidate for familial non-medullary thyroid cancer. *Cancers (Basel)* 2020;12(6):1441; doi:10.3390/cancers12061441
47. Orois A, Badenas C, Reverter JL, et al. Lack of mutations in *POT1* gene in selected families with familial non-medullary thyroid cancer. *Horm Cancer* 2020;11(2):111–116; doi: 10.1007/s12672-020-00383-5
48. Potrony M, Puig-Butille JA, Ribera-Sola M, et al. *POT1* germline mutations but not *TERT* promoter mutations are implicated in melanoma susceptibility in a large cohort of Spanish melanoma families. *Br J Dermatol* 2019;181(1):105–113; doi: 10.1111/bjd.17443
49. Zhao YY, Yu T, Sun J, et al. Germ-line mutations in *WDR77* predispose to familial papillary thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021;118(31):e2026327118; doi: 10.1073/pnas.2026327118
50. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, et al. Primer-Blast webs. 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> [Last accessed: May 4, 2022].
51. Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, et al. The Exome Aggregation Consortium. 2016. Available from: <http://exac.broadinstitute.org> [Last accessed: February 1, 2022].
52. Laurent F, Daniel MA. The Genome Aggregation Database. 2019. Available from: <https://omictools.com/gnomad-tool> [Last accessed: February 1, 2022].
53. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7(4):248–249; doi: 10.1038/nmeth0410-248
54. Sim NL, Kumar P, Hu J, et al. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res* 2012;40(Web Server Issue):W452–W457; doi: 10.1093/nar/gks539
55. Steinhaus R, Proft S, Schuelke M, et al. Mutation-Taster2021. *Nucleic Acids Res* 2021;49(W1):W446–W451; doi: 10.1093/nar/gkab266
56. The Cancer Genome Atlas Database. 2006. Available from: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga> [Last accessed: February 1, 2022].
57. Stalker J, Gibbins B, Meidl P, et al. The Ensembl Genome Browser webs. 2004. Available from: <https://www.ensembl.org/index.html> [Last accessed: March 5, 2022].
58. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. The Swiss-Model Server. 2018. Available from: <http://swissmodel.expasy.org> [Last accessed: March 5, 2022].
59. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. NetPhos Server. 1999. Available from: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/> [Last accessed: September 1, 2023].
60. Jiménez J, Doerr S, Martínez-Rosell G, et al. DeepSite. 1999. Available from: <https://playmolecule.com/deepsite/> [Last accessed: September 1, 2023].
61. Ngan ES, Lang BH, Liu T, et al. A germline mutation (A339V) in thyroid transcription factor-1 (*TTF-1/NKX2.1*) in patients with multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(3):162–175; doi: 10.1093/jnci/djn471
62. Yi KW, Kim SH, Ihm HJ, et al. Increased expression of p21-activated kinase 4 in adenomyosis and its regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in endometrial cells. *Fertil Steril* 2015;103(4):1089–1097.e2; doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.12.124
63. Peltonen R, Hagstrom J, Tervahartiala T, et al. High expression of MMP-9 in primary tumors and high preoperative MPO in serum predict improved prognosis in colorectal cancer with operable liver metastases. *Oncology* 2021;99(3):144–160; doi: 10.1159/000510609
64. Jiang HF, Li HP. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2021;21(1):149; doi: 10.1186/s12885-021-07860-2
65. Ma Y, Cang S, Li G, et al. Integrated analysis of transcriptome data revealed MMP3 and MMP13 as critical genes in anaplastic thyroid cancer progression. *J Cell Physiol* 2019;234(12):22260–22271; doi: 10.1002/jcp.28793
66. Wang G, Le Y, Wei LP, et al. CREB3 Transactivates lncRNA ZFAS1 to promote papillary thyroid carcinoma metastasis by modulating miR-373-3p/MMP3 regulatory axis. *Int J Endocrinol* 2021;9981683; doi: 10.1155/2021/9981683

Address correspondence to

Tao Huang, MD

Department of Breast and Thyroid Surgery

Union Hospital

Tongji Medical College

Huazhong University of Science and Technology

Wuhan 430022

China

E-mail: huangtaowh@hust.edu.cn

An-Yuan Guo, PhD

Department of Thyroid Surgery

West China Biomedical Big Data Center

West China Hospital

Sichuan University

Chengdu 610041

China

E-mail: guoanyuan@wchscu.cn