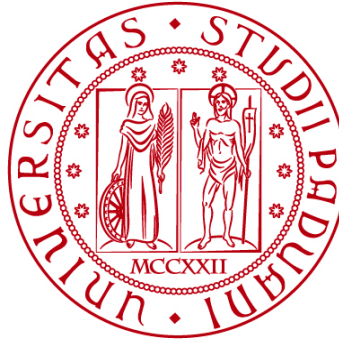


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

Evidenze cliniche e molecolari associate alla sovraespressione di GIPR (Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor) nel tumore midollare della tiroide.

**Tutor: Prof. Gianluca Occhi
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Rebecca Crivellari

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Sommario

1. STATO DELL'ARTE.....	5
1.1 TUMORE MIDOLLARE DELLA TIROIDE	5
1.2 FUNZIONE E LOCALIZZAZIONE DEL RECETTORE GIPR E IL SUO LIGANDO GIP	6
1.3 GIP/GIPR NEL CONTESTO DEI TUMORI ENDOCRINI.....	6
2. APPROCCIO SPERIMENTALE.....	9
2.1 ISOLAMENTO, RETROTRASCRIZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA DI GIPR E CALCITONINA	9
2.2 SECREZIONE DELLA CALCITONINA.....	10
2.3 TRASFEZIONE E SAGGIO DELLA DOPPIA LUCIFERASI.....	11
2.4 DETERMINAZIONE DELLA VITALITÀ DELLE CELLULE.....	12
2.5 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE E IMMUNOBLLOT	12
2.6 MICROSCOPIA CONFOCALE	13
2.7 SAGGIO DEL cAMP.....	13
2.8 IMAGING IN VIVO DEL CALCIO E FRET	13
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	15
3.1 ESPRESSIONE DI GIPR E CORRISPONDENZE CLINICHE.....	15
3.2 GIP/GIPR NELLE LINEE CELLULARI DI MTC	16
3.3 GIP/GIPR IN CELLULE PRIMARIE PROVENIENTI DA UN LINFONODO REGIONALE METASTATICO.....	18
4. CONCLUSIONI	21

ABSTRACT

GIPR (Glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor) è un recettore accoppiato a proteina G che viene attivato in seguito al legame dell'ormone GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide). Alterazioni dell'espressione di questo recettore sono state osservate in tumori endocrini e, nello studio riportato, in particolare, nel tumore midollare della tiroide (MTC): un raro tumore neuroendocrino che si origina in seguito alla crescita anormale delle cellule parafollicolari, o cellule C, della tiroide. Al fine di determinare se le alterazioni dell'espressione di questo recettore hanno un potenziale valore diagnostico e prognostico, sono stati analizzati i livelli di GIPR in MTC a partire da una coorte di 49 pazienti, mediante la quantificazione dei livelli di mRNA presenti nei campioni. Successivamente, sono state utilizzate linee cellulari modello di MTC, come MZ-CRC-1 e TT, per valutare la segnalazione intracellulare provocata dalla stimolazione di GIPR mediante trattamento delle cellule con GIP. Per questo motivo, si è andati ad analizzare, mediante diverse tecniche, le variazioni di concentrazione di cAMP e di calcio intracellulari, determinando una possibile correlazione di queste fluttuazioni ad un aumento di secrezione della calcitonina. Infine, mediante immunoblotting, è stato testato anche l'effetto dell'attivazione di GIPR sulle vie di segnalazione MAPK/ERK e PI3K/AKT.

1. STATO DELL'ARTE

1.1 TUMORE MIDOLLARE DELLA TIROIDE

La tiroide è una ghiandola endocrina costituita da due lobi, è organizzata in follicoli circondati da una parete di cellule follicolari, all'interno dei quali vengono prodotti gli ormoni tiroidei. Tra i follicoli sono poi presenti anche le cellule parafollicolari o cellule C, che portano alla produzione di un altro ormone: la calcitonina.

I tumori che colpiscono la ghiandola tiroidea possono riguardare sia le cellule follicolari, in questo caso si parla di tumori differenziati e indifferenziati, sia le cellule C o cellule parafollicolari, che caratterizzano il tumore midollare della tiroide.

I tumori tiroidei rappresentano la più comune neoplasia riguardante il sistema endocrino, i più frequenti sono i carcinomi differenziati, mentre quelli indifferenziati e il tumore midollare della tiroide sono più rari [1].

Il tumore midollare della tiroide, o MTC, dall'inglese medullary thyroid cancer, può essere suddiviso in sporadico o familiare; il 75-80% dei casi di tumore midollare è di tipo sporadico, mentre solo il 20-25% è di origine familiare ed è considerato come parte delle neoplasie endocrine multiple: MEN2A, MEN2B e il tumore midollare familiare della tiroide (FMTC) [1, 2].

Sia che il carcinoma sia di tipo familiare che sporadico, mutazioni del proto-oncogene *RET* (Rearranged during transfection), che codifica per un recettore tirosin-chinasico, giocano un ruolo importante. Le mutazioni *RET* possono essere presenti nella linea germinale nella forma familiare, conferendo una predisposizione allo sviluppo del tumore, oppure possono essere eventi somatici e, in questo contesto, ci si riferisce al carcinoma midollare della tiroide di tipo sporadico. In una piccola percentuale di casi sporadici, il tumore può originarsi anche in seguito alla mutazione del proto-oncogene *RAS*, più in particolare di *HRAS* e *KRAS*. Infine, l'oncogenesi di alcuni di questi carcinomi è ancora non del tutto chiara.

In generale, le mutazioni che più frequentemente si osservano in questi tumori sono mutazioni puntiformi che possono portare ad effetti differenti a livello dei domini extracellulare e intracellulare del recettore *RET* [1].

Il carcinoma midollare sporadico della tiroide compare principalmente in individui che hanno un'età compresa tra i 50 e i 60 anni e solitamente è unilaterale, mentre i tumori midollari associati alle sindromi MEN2A e MEN2B tendono a verificarsi più precocemente, circa tra i 30 e i 40 anni, e, generalmente, sono multicentrici e bilaterali.

Circa il 70% degli individui in cui si riscontra la neoplasia di tipo sporadico presenta una linfadenopatia cervicale; alcuni manifestano anche sintomi compressivi come disfagia, raucedine o difficoltà respiratorie.

La diffusione metastatica può riguardare organi come fegato, ossa, cervello e polmoni. Infine, livelli elevati di calcitonina, che sono una conseguenza della presenza di questo particolare carcinoma, possono causare diarrea.

I sintomi che si manifestano nei casi di carcinomi ereditari sono gli stessi, la differenza sostanziale riguarda il fatto che la manifestazione di questi avviene spesso in età più precoce.

Il carcinoma midollare della tiroide non risponde generalmente ai trattamenti convenzionali di chemioterapia o allo iodio radioattivo, per questo motivo, generalmente viene effettuata una tiroidectomia totale. Nei casi in cui questo non sia possibile, possono essere somministrati inibitori della tirosin-chinasi, come vandetanib o cabozantinib, che permettono un miglioramento nei casi di tumore in stato avanzato o metastatico [2].

1.2 FUNZIONE E LOCALIZZAZIONE DEL RECETTORE GIPR E IL SUO LIGANDO GIP

L'ormone GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide), come anche GLP-1, è secreto dopo pochi minuti dall'ingestione di nutrienti e facilita la degradazione di questi. Inoltre, controlla l'assunzione di cibo, l'assorbimento di energia e l'assimilazione.

GIP viene anche definita incretina, ovvero un ormone che, quando secreto dal tratto gastrointestinale, aumenta il rilascio di insulina da parte delle cellule β del pancreas endocrino e, quindi, promuove l'accumulo di glucosio, proveniente dai nutrienti assimilati, sottoforma di glicogeno. GIP ha, in realtà, un effetto pleiotropico a livello di molti altri tessuti extrapancreatici e questo è dovuto al fatto che il recettore a cui si lega (GIPR) è presente in moltissimi tessuti. GIP, infatti, esercita funzioni importanti anche a livello del sistema nervoso centrale, del tessuto adiposo e del tessuto osseo.

Il recettore di GIP (GIPR, glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor) è espresso in moltissimi tessuti e organi diversi.

È un recettore a sette domini transmembrana ed è accoppiato a proteina G, perciò, la sua interazione con il ligando, attiva una proteina G stimolatoria, che a sua volta attiva l'enzima adenilato ciclasi che accende il pathway del cAMP/PKA [3, 4].

1.3 GIP/GIPR NEL CONTESTO DEI TUMORI ENDOCRINI

GIP e GIPR hanno un importante ruolo nelle complicazioni metaboliche, soprattutto nelle persone che soffrono di obesità, le quali esprimono GIP in maniera

elevata, al contrario di GIPR, la cui espressione è, invece, ridotta. L'effetto insulino-tropico di GIP e GIPR si è osservato essere anche attenuato nei pazienti che soffrono di diabete mellito di tipo 2. Oltre a questo, sono state osservate alterazioni dell'espressione di GIPR e GIP in alcuni tumori endocrini nell'uomo, le quali potrebbero essere collegate allo sviluppo del tumore, ma, soprattutto, rappresentano un aspetto importante nel contesto di nuovi approcci sia terapeutici che diagnostici. L'espressione aberrante del recettore è stata osservata in neoplasie che coinvolgono, ad esempio, la ghiandola surrenale, dove l'espressione di GIPR in condizioni non patologiche è totalmente assente.

Per quanto riguarda la ghiandola ipofisaria, anche in questo caso, il recettore di GIP non è normalmente presente. È stata riportata la presenza del suo trascritto, anche se a livelli molto bassi, cosa che potrebbe essere dovuta alla presenza di cellule endoteliali che esprimono tipicamente il recettore e che sono presenti in maniera abbondante a livello dell'ipofisi.

Infine, la presenza del recettore è stata osservata anche in diversi tumori neuroendocrini. L'identificazione di questi tumori, nella maggior parte dei casi, è possibile grazie alla presenza di un'elevata espressione di particolari recettori come SSTR e GLP1R. Negli ultimi anni, però, analizzando tumori neuroendocrini che non presentavano un'elevata espressione dei recettori appena citati, è stato osservato un elevato T/N ratio (tumor-to-normal tissue ratio), ovvero il rapporto in termini di espressione di GIPR nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale è alto, quindi questo recettore risulta essere molto espresso in condizioni neoplastiche. Questo è osservabile anche nel tumore midollare della tiroide. Infatti, GIPR è presente nella maggior parte degli MTC, mentre, non è mai stata riportata la sua espressione nelle cellule C nella tiroide normale.

Questo ultimo aspetto che riguarda, nello specifico, il tumore midollare della tiroide è l'argomento centrale della ricerca che verrà approfondita, focalizzandosi sugli aspetti molecolari e clinici della sovraespressione del recettore GIPR [4].

2. APPROCCIO SPERIMENTALE

Il lavoro di ricerca è stato effettuato su una coorte di 49 pazienti affetti da tumore midollare della tiroide, i quali sono stati sottoposti a tiroidectomia totale con dissezione dei linfonodi regionali. Il gruppo era costituito da individui con un'età media di 56 anni al momento dell'intervento chirurgico, 21 di questi era di sesso maschile e 28 di sesso femminile.

Circa tre quarti dei pazienti presentava il carcinoma in forma sporadica, mentre, solo 12 casi erano di tipo familiare. Facendo poi riferimento al metodo di classificazione TNM per la stadiazione dei tumori, 20 di questi si trovavano al primo stadio, 9 al secondo, 6 al terzo e 14 al quarto stadio.

Oltre a questi, sono stati anche considerati campioni di tessuto tiroideo non neoplastico di cinque pazienti affetti da tumore papillare della tiroide, al fine di utilizzarli come controllo.

Infine, è stato anche rimosso chirurgicamente un linfonodo metastatico regionale (LMN) a partire da un ulteriore paziente e coltivato su un terreno di coltura sterile. Successivamente, sono state utilizzate come modello due linee cellulari, ovvero TT e MZ-CRC-1, derivate da carcinomi midollari della tiroide e contenenti una mutazione *RET* eterozigote. In seguito alla verifica della qualità di queste linee mediante STR profiling, sono state coltivate in terreno completo.

2.1 ISOLAMENTO, RETROTRASCRIZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA DI GIPR E CALCITONINA

Lo scopo di calcolare in maniera assoluta la quantità di GIPR e calcitonina nei vari campioni prelevati misurando i livelli di mRNA è quello di paragonare questi livelli nei campioni di tessuto tumorale con quelli di tessuto tiroideo non neoplastico, per avere conferma della presenza di sovraespressione di entrambe le molecole nei contesti tumorali.

A partire dai campioni tumorali e non tumorali prelevati dai pazienti e dalle colture cellulari, è stato estratto l'RNA totale con l'utilizzo del reagente TRIzol e del kit Direct-zol RNA miniprep, di modo che, in seguito alla disgregazione dei tessuti, non siano necessari processi di separazione di fase, precipitazione o post-purificazione; infatti, l'RNA eluito è di alta qualità e adatto alla successiva manipolazione.

Successivamente alla fase di estrazione, è stata valutata la resa con l'utilizzo dello spettrofotometro NanoDrop, mentre la qualità dell'RNA è stata determinata con l'utilizzo dell'Agilent Bioanalyzer 2100, che permette di effettuare un'elettroforesi capillare e, al termine della corsa, restituisce un elettroferogramma per ogni campione, mediante il quale è possibile determinare l'integrità dell'RNA estratto.

Per eliminare eventuali contaminazioni di DNA dai campioni, questi sono stati trattati con il kit Turbo DNA-free-

A partire dai campioni perfettamente purificati, questi sono stati retrotrascritti mediante l'utilizzo di random esameri e di una particolare retrotrascrittasi, la M-MuLV RT [H-].

Ottenuti i frammenti di cDNA, sono stati valutati i livelli di mRNA allo stato stazionario del recettore GIPR e della calcitonina.

L'utilizzo della Droplet Digital PCR ha permesso la quantificazione assoluta di GIPR. Questa tecnica segue lo stesso principio di base della PCR classica, ma il campione viene separato in tante piccole partizioni, dette "droplets", di dimensioni nanometriche, all'interno di ognuna delle quali avviene una singola reazione di PCR. Questa tecnica permette una misurazione della quantità di acido nucleico presente nel campione più affidabile rispetto alla PCR quantitativa; infatti, quando in una droplet è presente la molecola bersaglio, questa viene correttamente amplificata, dando un segnale fluorescente. Il numero di partizioni che risultano positive viene utilizzato per stimare la concentrazione della molecola target servendosi dell'utilizzo della legge di Poisson dei piccoli numeri che permette di approssimare con precisione la distribuzione delle molecole bersaglio all'interno del campione.

La quantità assoluta di calcitonina, invece, è stata misurata mediante RT-qPCR. Questa tecnica consente di monitorare la quantità di amplicone generato, ciclo per ciclo, al fine di misurare la quantità di template presente inizialmente. Questo è permesso grazie al fatto che, durante l'amplificazione, viene inserita una molecola intercalante, come il SYBR Green, di modo che sia possibile identificare quando viene raggiunto il ciclo soglia, ovvero il ciclo di amplificazione al quale si raggiunge una quantità di prodotto rilevabile. Questo dato verrà poi utilizzato per determinare la quantità iniziale di template mediante l'utilizzo del metodo $\Delta\Delta Cq$, utilizzando come gene reference la β -actina.

2.2 SECREZIONE DELLA CALCITONINA

Le cellule sono state coltivate in terreni di coltura condizionati e, successivamente, è stato valutato il livello di secrezione di calcitonina, normalizzandolo con i livelli di RNA totale estratto. La calcitonina è il marker ideale per determinare la presenza del carcinoma midollare della tiroide; infatti, le cellule parafollicolari in condizioni tumorali la secernono in quantità eccessiva.

La quantità di calcitonina secreta è stata valutata mediante l'utilizzo di un saggio immunologico chemiluminescente (CLIA), in particolare, Calcitonin II-Gen, che sfrutta la chemiluminescenza e il canonico legame antigene-anticorpo per

determinare la concentrazione della calcitonina che viene secreta dalle cellule in coltura.

2.3 TRASFEZIONE E SAGGIO DELLA DOPPIA LUCIFERASI

Al fine di quantificare l'espressione genica di GIPR, le linee cellulari TT e MZ-CRC-1 sono state testate con il metodo della doppia luciferasi. Questo saggio consiste nello sfruttare il segnale bioluminescente generato dall'enzima luciferasi, il quale si verifica in seguito al legame all'enzima del substrato luciferina.

Il sistema si basa sull'utilizzo di due geni reporter: la luciferasi di lucciola e la Renilla-luciferasi, in questo modo, si ottiene l'espressione e la misurazione in simultanea di entrambi gli enzimi in un singolo sistema. Questi reporter vengono inseriti all'interno di vettori, i quali verranno co-trasfettati in maniera transiente all'interno delle cellule.

Tipicamente, il reporter sperimentale, ovvero la luciferasi di lucciola, è correlato all'effetto di specifiche condizioni sperimentali, infatti, viene accoppiato ad un promotore regolato, di modo da poter studiare l'espressione di un determinato gene. Il reporter di controllo, invece, è accoppiato ad un promotore costitutivo e funge da controllo interno, permettendo di normalizzare le misurazioni ottenute con l'altro reporter. In questo modo è possibile minimizzare la variabilità sperimentale.

In seguito alla trasfezione delle cellule con i plasmidi contenenti i due reporter, viene effettuata la lisi delle cellule mediante l'utilizzo di un buffer di lisi passiva. Infine, viene misurato il segnale luminescente generato dall'attività della luciferasi di lucciola e dalla Renilla-luciferasi in sequenza, mediante l'utilizzo di un luminometro.

Le cellule della linea cellulare TT e quelle della linea MZ-CRC-1 sono quindi state seminate in piastre per poi trasfettarle con il vettore sperimentale CRE-Luc e, successivamente, con il vettore di controllo pRL-Tk. Il primo contiene: cinque elementi responsivi al cAMP, a valle di questi è presente il promotore per la timidina chinasi (Tk) del virus herpes simplex e il gene reporter per la luciferasi; il secondo contiene il gene per la Renilla luciferasi la cui espressione è sempre regolata dal promotore Tk. Ventiquattro ore dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate con GIP o FSK (forskolina) e successivamente, mediante l'utilizzo di un buffer di lisi passivo, lisate.

Infine, è stato misurata l'attività della luciferasi mediante un luminometro.

Nelle cellule trattate con GIP, questo interagisce con il suo recettore GIPR, che consente l'attivazione della cascata di reazioni portando alla produzione di cAMP. FSK (forskolina), invece, è una molecola che stimola l'attività dell'adenilato ciclasi e, quindi, promuove la produzione di cAMP.

In questo modo, il cAMP è in grado di stimolare gli elementi responsivi presenti nel plasmide, inducendo la trascrizione del gene a valle di questo elemento, ovvero la luciferasi di lucciola e generando un segnale bioluminescente visibile.

2.4 DETERMINAZIONE DELLA VITALITÀ DELLE CELLULE

Mediante l'utilizzo del saggio di proliferazione MTT, è stata valutata la vitalità delle cellule TT, MZ-CRC-1 e delle cellule primarie, in risposta allo stimolo di GIP. Questo è un saggio colorimetrico che si basa sulla riduzione del tetrazolio. Questo processo avviene solo in cellule metabolicamente attive, le quali contengono gli enzimi necessari alla riduzione dell'MTT in formazano che in soluzione appare viola. Viene successivamente quantificata l'assorbanza a 500-600 nm mediante uno spettrofotometro e il valore di densità ottica ottenuto è correlabile alla quantità di cellule vitali presenti nel campione.

In questo particolare contesto, è stato anche utilizzato XL184 come controllo; infatti, questa è una molecola nota per avere un effetto inibitorio sulla crescita delle cellule del tumore midollare della tiroide.

2.5 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE E IMMUNOBLOT

Al fine di valutare l'effetto di GIP/GIPR sull'attivazione delle vie di segnalazione MAPK/ERK e PI3K/AKT le cellule sono state coltivate in terreno completo e addizionato in seguito con vandetanib, ovvero un inibitore dei recettori tirosin-chinasici, o DMSO come controllo.

In seguito alla stimolazione, le cellule sono state lisate mediante RIPA buffer addizionato ad inibitori di proteasi e fosfatasi e, infine, il lisato è stato centrifugato. Sono state poi calcolate le concentrazioni delle proteine estratte mediante BCA e i lisati proteici sono stati analizzati mediante SDS-PAGE.

Il BCA è un metodo che prevede l'utilizzo di acido bicinconinico che porta alla formazione di un composto cromogeno, il quale permette la quantificazione proteica mediante lettura del campione allo spettrofotometro a 560 nm.

L'SDS-PAGE è, invece, una particolare tipologia di gel elettroforesi che avviene in condizioni denaturanti, permettendo la separazione delle proteine in base alla loro dimensione.

Al fine di svolgere un immunoblotting, questi lisati sono stati poi trasferiti su una membrana di nitrocellulosa e marcati con anticorpi primari, i quali, hanno interagito con le proteine per cui sono specifici, ovvero alcuni intermedi delle vie di segnalazione considerate e GIPR. Successivamente questi anticorpi, interagendo con anticorpi secondari coniugati ad HRP, hanno permesso la visualizzazione sulla membrana delle proteine marcate grazie ad un saggio di chemiluminescenza.

L'immunoblotting, o Western Blot, consiste, quindi, nel trasferimento delle proteine separate mediante gel elettroforesi su una membrana di nitrocellulosa, di modo da mantenere la separazione. La membrana viene poi bloccata e incubata in presenza di un anticorpo primario specifico per la proteina, o le proteine, che si vogliono individuare. In seguito, si può utilizzare anche un anticorpo secondario legato ad una molecola fluorescente o chemiluminescente, oppure enzimi in grado di degradare substrati cromogeni, fluorescenti o chemiluminescenti; in questo modo, sulla membrana saranno visibili le proteine specifiche.

2.6 MICROSCOPIA CONFOCALE

Le cellule TT e MZ-CRC-1 sono state fatte crescere e poi fissate in paraformaldeide e permeabilizzate per permettere il trattamento di queste con anticorpi anti-GIPR e anticorpi secondari coniugati ad un fluoroforo che ne ha permesso la visualizzazione mediante microscopia confocale. Le cellule sono state inoltre trattate con un marcatore specifico delle membrane (WGA).

Questa tecnica ha permesso la visualizzazione dell'espressione di GIPR nelle cellule a livello della membrana delle.

2.7 SAGGIO DEL cAMP

Al fine di quantificare la concentrazione cAMP, in seguito all'attivazione di GIPR da parte di GIP, è stato effettuato il saggio del cAMP.

Le cellule primarie e le cellule delle linee TT e MZ-CRC-1 sono state coltivate in terreno completo e successivamente stimulate con GIP o FSK, quest'ultima come controllo positivo.

La stimolazione con il ligando di GIPR permette l'attivazione del recettore, il quale attiva la cascata di reazioni, portando alla produzione di cAMP. Quando la concentrazione di cAMP aumenta, questo va a legarsi alla proteina chinasi A (PKA) attivandola. La PKA è un enzima in grado di fosforilare i suoi substrati e per compiere questo processo necessita di idrolizzare ATP. Mediante un metodo basato sulla luciferasi, viene determinato il livello di ATP rimanente nelle cellule; la luminescenza misurata è inversamente proporzionale alla concentrazione di cAMP.

2.8 IMAGING IN VIVO DEL CALCIO E FRET

Mediante l'utilizzo di un indicatore del calcio fluorescente, Fura-2 AM, sono state osservate le fluttuazioni dei livelli di Ca^{2+} intracellulari nelle linee cellulari in vivo. La FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) è un metodo che consente di determinare l'interazione proteina-proteina. Questa tecnica si basa sul fatto che se l'interazione tra due proteine avviene si ha che la molecola fluorescente legata ad una delle due proteine, in seguito ad eccitazione, è in grado di emettere un segnale

fluorescente sufficiente all'eccitazione del fluoroforo presente sulla seconda proteina; si parla di trasferimento di fluorescenza. In questo contesto si è osservata l'interazione tra GIPR e l'adenilato ciclastasi in cellule che esprimevano il sensore cAMP.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 ESPRESSIONE DI GIPR E CORRISPONDENZE CLINICHE

In seguito alla raccolta di dati di vario tipo in riferimento ai pazienti, questi sono stati correlati con l'espressione di GIPR nei campioni di tessuto. Si è, quindi, osservato che i livelli di mRNA di GIPR, valutati in stato stazionario in tessuti tiroidei non tumorali, sono trascurabili; mentre, nei tessuti tumorali, i livelli sono moderati.

Connessioni significative tra l'espressione di GIPR e caratteristiche nei pazienti, invece, non sono state rilevate.

Come è possibile osservare nella figura 1.A, che mette in evidenza l'espressione genica del gene per GIPR nei tumori esaminati, circa il 78% dei casi presenta livelli di GIPR più elevati (GIPR⁺), mentre il restante circa 20% non mostra livelli di GIPR (GIPR⁻).

Osservando la figura 1.B, invece, si può notare come i risultati dimostrino che i tumori GIPR⁺ risultino essere più comuni tra i pazienti che presentano un tumore di tipo sporadico rispetto a quelli di tipo familiare.

Facendo riferimento alla stadiazione dei vari tumori prelevati dai pazienti, i carcinomi midollari GIPR⁻ sono presenti in prevalenza tra stadi bassi, mentre quelli GIPR⁺ risultano essere ugualmente distribuiti tra stadi bassi (I, II) e stadi avanzati (III, IV). Questi risultati sono osservabili nella figura 1.C.

Si può, quindi, constatare che l'espressione di GIPR in contesti tumorali non sia un indicatore di particolari caratteristiche biologiche del tumore, ma, piuttosto, dello stato di avanzamento del processo maligno. A conferma di questa ipotesi è sufficiente osservare come i tumori GIPR⁺ siano più comuni tra i casi sporadici rispetto ai casi familiari, a causa del fatto che nei casi familiari si è a conoscenza della presenza del gene *RET* mutato e, quindi, vengono effettuati controlli e interventi chirurgici più precocemente, impedendo l'avanzamento del tumore.

Infine, facendo riferimento alle ultime tre immagini (Figura 1.D, 1.E e 1.F), viene messo in evidenza come gli MTC GIPR⁺ mostrino, inoltre, livelli più alti di calcitonina nel siero prima dell'operazione, una dimensione mediana maggiore e un valore di Ki-67 più alto.

Il fatto che il livello di calcitonina nel siero sia maggiore nei tumori GIPR⁺ può essere un dato interessante, ma questo potrebbe essere correlato al fatto che i tumori che sovraesprimono GIPR hanno anche dimensioni maggiori.

In aggiunta, la correlazione positiva tra i livelli di espressione di GIPR e l'indice Ki-67 permette di supportare l'ipotesi del coinvolgimento di GIP/GIPR nell'avanzamento del processo di cancerogenesi. Infatti, il Ki-67 è un antigene la cui presenza è spesso correlata al decorso clinico della malattia neoplastica.

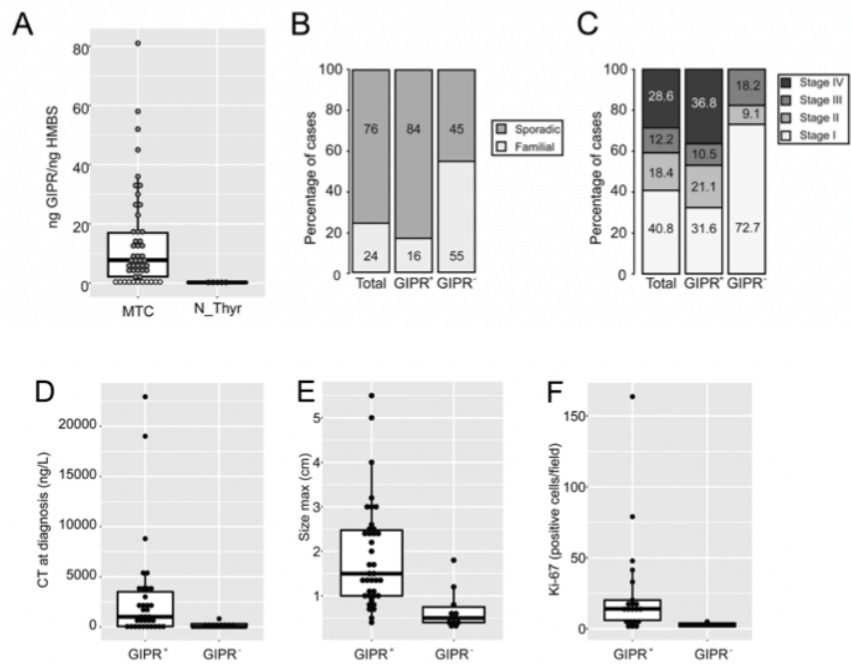


Figura 1

3.2 GIP/GIPR NELLE LINEE CELLULARI DI MTC

Gli effetti dell'attivazione di GIPR da parte di GIP sono stati poi valutati anche a livello delle linee cellulari TT e MZ-CRC-1 di MTC.

Come emerge dalle immagini di microscopia confocale (Figura 2), entrambe le linee cellulari esprimono livelli moderati, ma significativi di GIPR (Figura 3.A) e co-esprimono il recettore con il marcatore di membrana WGA.

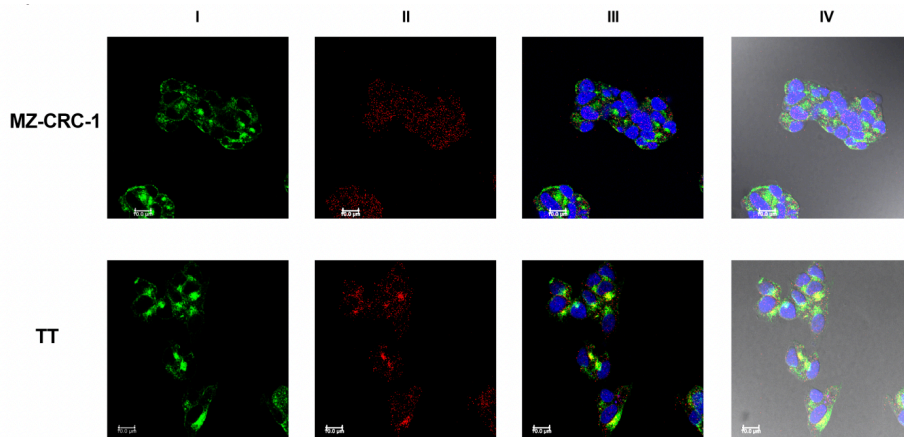


Figura 2

Mediante il saggio della doppia luciferasi è stata poi esaminata la funzionalità del recettore GIPR presente nelle cellule, osservando come la produzione di cAMP in seguito a stimolazione con GIP avvenga in modo dose-dipendente solo nelle cellule della linea MZ-CRC-1 e non in quelle della linea TT; le prime, infatti, hanno dimostrato un aumento della produzione di cAMP di dieci volte già a concentrazioni molto basse.

La stimolazione con FSK, invece, ha permesso la produzione di cAMP in entrambe le linee, anche se in misura diversa (Figura 3.B, 3.C). Questi risultati hanno permesso di determinare che GIPR potrebbe non essere funzionalmente accoppiato agli effettori della cascata che porta alla produzione di cAMP.

Si è successivamente valutato se la stimolazione di GIPR con GIP portasse a fluttuazioni nei livelli di mRNA rispetto allo stato stazionario e nella secrezione di calcitonina. Si è, dunque, osservato che i livelli di mRNA della calcitonina non variano in nessuna delle due linee cellulari, mentre, in entrambe, la secrezione di calcitonina aumenta in funzione della dose di GIP con cui le cellule vengono trattate (Figura 3.D).

In seguito, mediante imaging in vivo, si è andati a valutare la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} nelle due linee cellulari in seguito a stimolazione con dosi crescenti di GIP e si è potuto osservare che nelle cellule della linea TT non si hanno variazioni (Figura 3.E). Considerando le cellule della linea MZ-CRC-1, invece, gli effetti sul Ca^{2+} sono risultati essere più complessi perché, oltre a presentare fluttuazioni spontanee, hanno anche mostrato una risposta alla stimolazione mediante GIP con aumenti del Ca^{2+} in maniera proporzionale alla dose somministrata (Figura 3.F).

Basandosi sull'osservazione che i carcinomi GIPR⁺ osservati avevano dimensioni maggiori, si è valutata la proliferazione nelle cellule MTC, in seguito all'attivazione di GIPR, mediante il saggio MTT. Come mostrato nella figura 3.G, non si sono riscontrati variazioni notevoli nel tasso di sopravvivenza relativa delle cellule in nessuna delle linee cellulari.

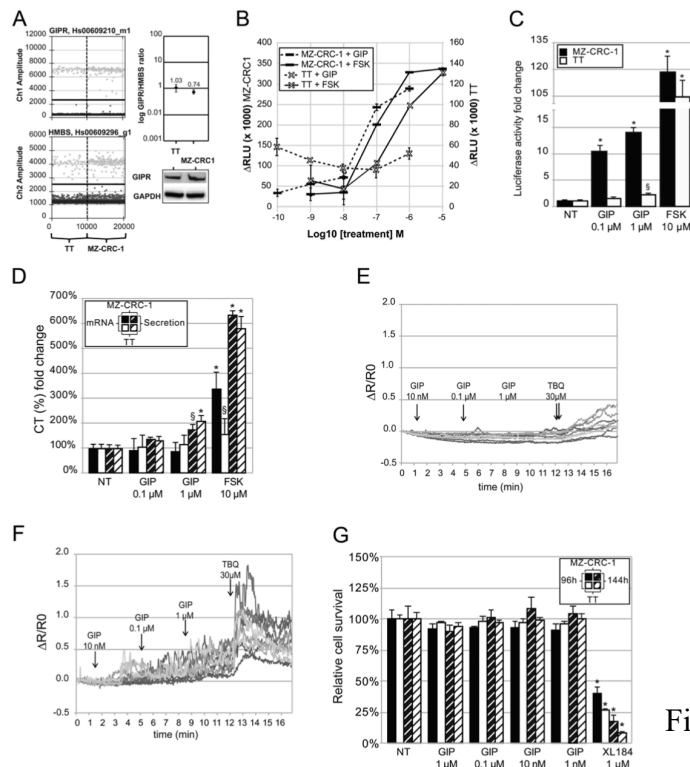


Figura 3

Infine, mediante immunoblotting, si è andati a valutare l'effetto di attivazione di GIPR sulle vie di segnalazione MAPK/ERK e PI3K/AKT in entrambe le tipologie cellulari di MTC. L'esperimento è stato svolto sia in presenza sia in assenza di vandetanib, ovvero un inibitore multichinasico del gene *RET*, in modo da isolare gli effetti della stimolazione dipendente da GIP, già osservata in altri modelli cellulari. Come è visibile nella figura 4.A, la stimolazione con GIP non ha apportato grandi variazioni per quanto riguarda la fosforilazione di ERK1/2 o di Akt. Osservando, però, la figura 4.B, è stato dimostrato che, solamente nella linea MZ-CRC-1, la presenza di GIP ha indotto una variazione significativa nel livello di fosforilazione di diversi bersagli della protein-chinasi A (PKA). Queste ultime osservazioni supportano il fatto che l'attivazione di GIPR agisce fortemente sugli effettori della cascata del cAMP, ma non ha alcun ruolo nelle vie MAPK/ERK o PI3K/AKT.

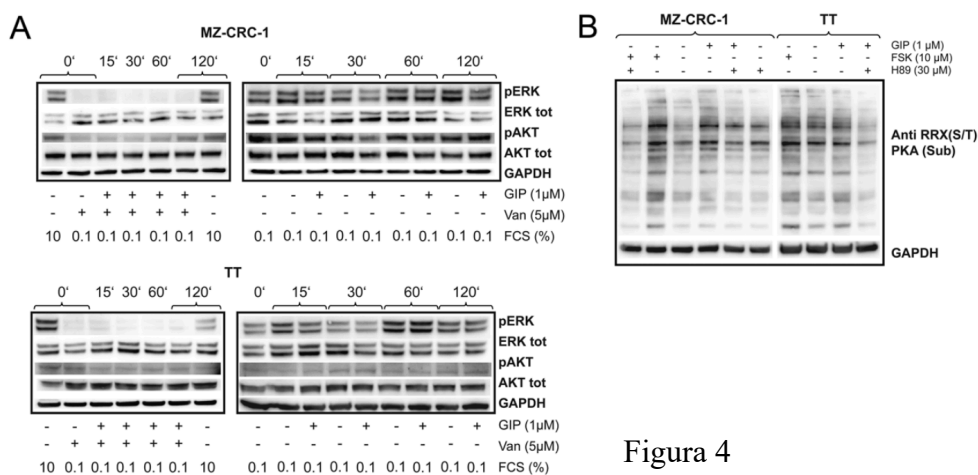


Figura 4

Essendo le vie di segnalazione MAPK/ERK e PI3K/AKT legate alla sopravvivenza e alla proliferazione cellulare, aver dimostrato che non si ha connessione tra l'attivazione di GIPR da parte di GIP e l'attivazione di queste vie di segnalazione implica che GIP/GIPR potrebbero non avere un effetto significativo sulla proliferazione delle cellule C trasformate in senso neoplastico.

3.3 GIP/GIPR IN CELLULE PRIMARIE PROVENIENTI DA UN LINFONODO REGIONALE METASTATICO

L'attivazione di GIPR mediante il legame di GIP è stata infine valutata anche in una coltura di cellule primarie derivante da un linfonodo metastatico regionale. A seguire, le cellule sono state stimulate con aggiunta di GIP che ha indotto un aumento di cAMP, a conferma dell'accoppiamento funzionale tra GIPR e l'adenilato ciclasi, verificato tramite FRET. L'aggiunta di FSK e IBMX per attivare l'adenilato ciclasi e bloccare la fosfodiesterasi ha aumentato il segnale FRET rilevato (Figura 5.A).

Inoltre, si è andati ad osservare le fluttuazioni di concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , i livelli di mRNA di calcitonina e i livelli di secrezione di questa, in seguito a stimolazione di GIPR. In una piccola porzione delle cellule totali della coltura si è osservato un aumento significativo, ma eterogeneo, di Ca^{2+} intracellulare in seguito a trattamento delle cellule con GIP (Figura 5.B).

La stessa stimolazione mediante GIP non ha evidenziato cambiamenti significativi in termini di espressione della calcitonina, ma ha comportato l'aumento della sua secrezione di quasi il doppio (Figura 5.C).

Infine, la vitalità delle cellule in seguito a stimolazione mediante GIP non ha portato risultati significativi, ma questa ha subito variazioni dose-dipendente in seguito a trattamento delle cellule con XL184 (Figura 5.D).

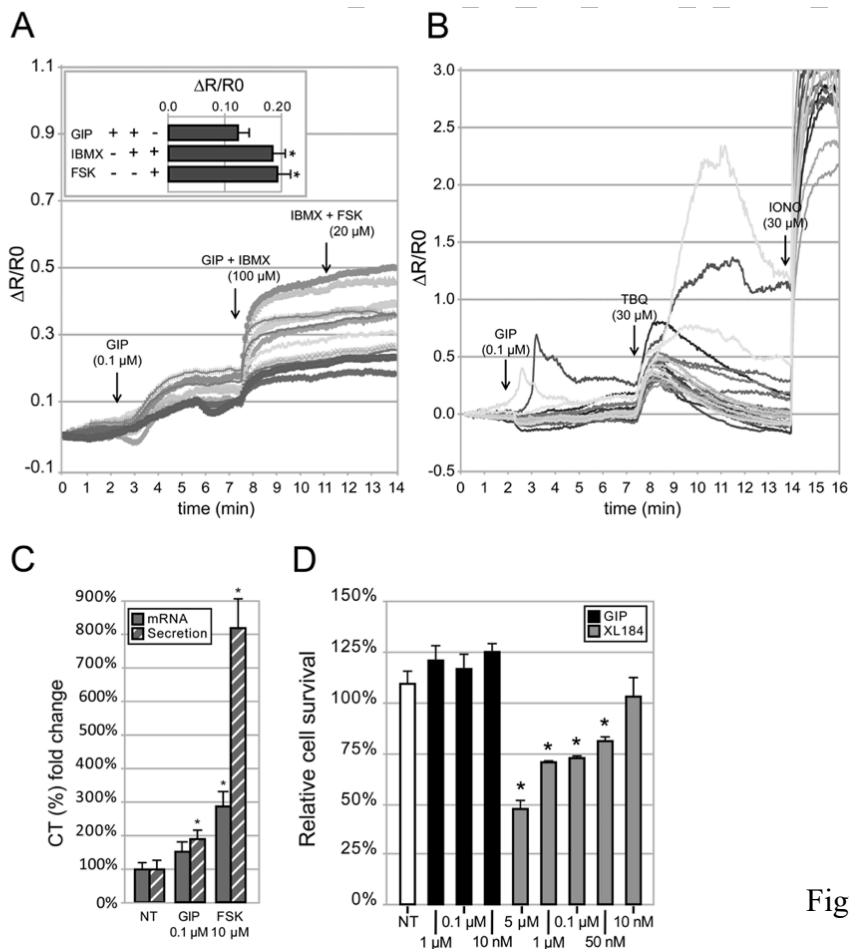


Figura 5

L'attivazione dei GIP/GIPR, però, è stata valutata a partire da un campione prelevato da un singolo linfonodo metastatico regionale; al fine di ottenere risultati statisticamente più significativi, dunque, questa valutazione si sarebbe potuta svolgere a partire da più campioni.

4. CONCLUSIONI

In conclusione, i dati raccolti hanno permesso di determinare che in una grande percentuale di casi di tumore midollare della tiroide è rilevabile una sovraespressione del recettore GIPR, la quale viene soprattutto correlata allo stato di avanzamento del processo di cancerogenesi.

L'attivazione di questo recettore, mediante stimolazione con GIP, è stato visto che non comporta l'attivazione delle vie di segnalazione MAPK/ERK o PI3K/AKT; quindi, non influisce sulla vitalità o la proliferazione delle cellule, ma comporta variazioni nella secrezione di calcitonina, osservata nei vari modelli cellulari trattati, indotta anche dalla via di segnalazione del cAMP, che è risaputo avere un ruolo nella regolazione della secrezione di calcitonina.

Al fine di sfruttare la sovraespressione di questo recettore non solo in senso diagnostico, ma anche terapeutico, si potrebbe valutare la presenza di GIPR nei modelli e campioni utilizzati mediante caratterizzazione farmacologica, come, ad esempio, con l'utilizzo di radioligandi specifici.

Ad esempio, uno studio riporta l'ingegnerizzazione di un polimero a base di radiofarmaci che può essere utilizzato per la cura di tumori che presentano l'espressione di GIPR; questo potrebbe rappresentare un interessante spunto per ulteriori studi nella valutazione del ruolo terapeutico di GIPR [5].

Considerato, inoltre, che spesso gli MTC che sovraesprimono GIPR non presentano o esprimono in quantità minori recettori come SSTR o GLP1R, sarebbe stato interessante andare a valutare innanzitutto l'espressione anche di questi, e, se confermata la loro assenza o la loro espressione in quantità minori, indagare se questo potesse essere dovuto a particolari processi di sviluppo del tumore. Inoltre, individuare l'eventuale co-espressione di questi recettori potrebbe permettere di trattare il tumore mediante un targeting multiplo specifico.

Le cellule C della tiroide possono anche secernere una serie di ormoni o ammine biogene che possono influenzare i sintomi del carcinoma midollare della tiroide. La sintesi e la secrezione di queste possono essere regolate dalle vie di segnalazione cAMP/Ca²⁺, quindi, identificare come GIP/GIPR inducano effetti a livello di tutto il secretoma, potrebbe chiarirne il loro vero ruolo all'interno dell'MTC.

Ulteriori studi sono necessari per chiarire gli eventi molecolari che innescano la sovraespressione di GIPR nel tumore midollare della tiroide; questo meccanismo potrebbe essere alla base di questo evento anche in altri tumori endocrini. Infatti, è stato osservato che, ad esempio, nei tumori neuroendocrini gastrici e duodenali, GIPR è altamente sovraespresso e questo permetterebbe di ottenere un ottimo bersaglio terapeutico per la cura di questi rari tumori. Lo studio più approfondito

anche di questi potrebbe portare a scoprire di più sul meccanismo implicato nella sovraespressione di GIPR [6].

Bibliografia

- [1] Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Mar 13;11:102. doi: 10.3389/fendo.2020.00102. PMID: 32231639; PMCID: PMC7082927.
- [3] Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2131-57. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.054. PMID: 17498508.
- [4] Regazzo D, Barbot M, Scaroni C, Albiger N, Occhi G. The pathogenic role of the GIP/GIPR axis in human endocrine tumors: emerging clinical mechanisms beyond diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020 Mar;21(1):165-183. doi: 10.1007/s11154-019-09536-6. PMID: 31933128.
- [5] Shi X, Li Q, Zhang L, Hanyu M, Xie L, Hu K, Nagatsu K, Zhang C, Wu Z, Wang F, Zhang MR, Yang K, Zhu R. ²¹¹At-Labeled Polymer Nanoparticles for Targeted Radionuclide Therapy of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor (GIPR)-Overexpressed Cancer. *Bioconjug Chem*. 2021 Aug 18;32(8):1763-1772. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00263. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34260853.
- [6] Sherman SK, Maxwell JE, Carr JC, Wang D, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Howe JR. GIPR expression in gastric and duodenal neuroendocrine tumors. *J Surg Res*. 2014 Aug;190(2):587-93. doi: 10.1016/j.jss.2014.01.044. Epub 2014 Jan 29. PMID: 24565507; PMCID: PMC4096580.

Sitografia

- [2] Master SR, Burns B. Medullary Thyroid Cancer. [Updated 2022 May 23]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459354/>

RESEARCH

The GIP/GIPR axis in medullary thyroid cancer: clinical and molecular findings

Daniela Regazzo¹, Loris Bertazza¹, Eva Galletta², Susi Barollo¹, Alberto Mondin¹, Stefania Zovato³, Maurizio Iacobone⁴, Eleonora Zilio², Carla Scaroni¹, Claudia Maria Radu⁵, Giuletta di Benedetto^{6,7}, Caterina Mian¹, Konstantinos Lefkimmiatis^{7,8} and Gianluca Occhi^{1,2}

¹Department of Medicine – Endocrinology Unit, Padova University Hospital, Padova, Italy

²Department of Biology, University of Padova, Padova, Italy

³Hereditary Tumors Unit, Veneto Institute of Oncology-IOV-IRCCS, Padova, Italy

⁴Department of Surgery, Oncology and Gastroenterology – Endocrine Surgery Unit, Padova University Hospital, Padova, Italy

⁵Department of Medicine – General Medicine and Thrombotic and Haemorrhagic Diseases Unit, Padova University Hospital, Padova, Italy

⁶Neuroscience Institute, National Research Council, Padova Section, Padova, Italy

⁷Foundation for Advanced Biomedical Research, Veneto Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padova, Italy

⁸Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy

Correspondence should be addressed to G Occhi: gianluca.occhi@unipd.it

Abstract

The improper expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (GIPR) and the GIP/GIPR axis activation has been increasingly recognized in endocrine tumors, with a potential diagnostic and prognostic value. A high tumor-to-normal tissue ratio (T/N ratio) of GIPR was reported both in humans' and in rats' medullary thyroid cancer (MTC), suggesting a direct link between the neoplastic transformation and the mechanism of receptor overexpression. In this study, we evaluated the potential diagnostic and prognostic significance of GIPR expression in a large cohort of MTC patients by correlating *GIPR* mRNA steady-state levels to clinical phenotypes. The molecular effect of GIP/GIPR axis stimulation in MTC-derived cells was also determined. We detected *GIPR* expression in ~80% of tumor specimens, especially in sporadic, larger, advanced-stage cancers with higher Ki-67 values. GIPR stimulation induced cAMP elevation in MTC-derived cells and a small but significant fluctuation in Ca²⁺, both likely associated with increased calcitonin secretion. On the contrary, the effects on PI3K-Akt and MAPK-ERK1/2 signaling pathways were marginal. To conclude, our data confirm the high T/N GIPR ratio in MTC tumors and suggest that it may represent an index for the degree of advancement of the malignant process. We have also observed a functional coupling between GIP/GIPR axis and calcitonin secretion in MTC models. However, the molecular mechanisms underlying this process and the possible implication of GIP/GIPR axis activation in MTC diagnosis and prognosis need further evaluation.

Key Words

- ▶ medullary thyroid cancer
- ▶ GIP/GIPR axis
- ▶ neuroendocrine tumors
- ▶ cell signaling
- ▶ thyroid

Endocrine-Related Cancer
(2022) **29**, 273–284

Introduction

The glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) is an incretin hormone produced in the digestive tract in response to food ingestion (Baggio & Drucker 2007).

Besides potentiating the glucose-dependent insulin secretion by the pancreatic β -cells (i.e. incretin effect) (Dupre *et al.* 1973), GIP exerts a variety of additional

actions on different systems including neuronal survival and neurogenesis in the brain (Verma *et al.* 2018), lipid uptake, and lipogenesis in the adipose tissue (Wu *et al.* 2016). This broad spectrum of effects depends on the wide tissue distribution of its receptor (GIPR), a class B G-protein coupled receptor (GPCR). Upon ligand binding, GIPR induces adenylyl cyclase activity increasing intracellular cAMP levels (Szecówka *et al.* 1982) and consequently, PKA-CREB-dependent signal transduction. In addition, GIP/GIPR signaling exerts pro-proliferative and antiapoptotic effects through the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K-PKB/Akt (Widenmaier *et al.* 2009, Prabakaran *et al.* 2010, Yabe & Seino 2011) or by reducing caspase 3 activity as well as the expression of the pro-apoptotic *bax* gene through a Foxo1 indirect effect (revised in Seino *et al.* 2010).

While GIPR activity is mainly studied in metabolic disorders, alterations in GIPR expression were found in endocrine tumors, suggesting its diagnostic and prognostic significance in these conditions (Regazzo *et al.* 2020). The ectopic expression of GIPR in patients with overt Cushing's syndrome, primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia, or unilateral cortisol-producing adenoma was associated with the inversed rhythm of cortisol secretion with low fasting morning plasma levels that increases after meals (St-Jean *et al.* 2018). Acromegalic patients with uncommon GH responses to oral glucose tolerance test (OGTT) frequently had a GIPR positive somatotropinoma (Occhi *et al.* 2011, Regazzo *et al.* 2017) and a milder disease phenotype with increased responsiveness to conventional medical therapies (Mukai *et al.* 2019, Scaroni *et al.* 2019). In neuroendocrine tumors (NET), the very high GIPR incidence/density may either increase or decrease progressively with growing proliferative rates (Körner *et al.* 2015) depending on the site of NET origin (Waser *et al.* 2012).

Medullary thyroid cancer (MTC) is a rare NET originating from the malignant growth of thyroid parafollicular C cells, which mainly occur sporadically but can also occur as familial form (Wells *et al.* 2015). Activating germline *RET* mutations are present in more than 95% of familial MTC, while somatic mutations in 25–40% of the sporadic forms (Romei *et al.* 2011, Elisei *et al.* 2019). In MTC, the parafollicular cells primarily secrete calcitonin (CT), which is regarded as the reference tumor marker for this neoplasm (Wells *et al.* 2015). In MTC, a high GIPR tumor-to-normal tissue ratio (T/N ratio) was observed by *in vitro* receptor autoradiography both in humans and in rats (Waser *et al.* 2011). Conversely, in rat C cell hyperplasia, which has been regarded as the precursor lesion for MTC at

least in the inherited forms, GIPR is not expressed, leading to the hypothesis that the neoplastic transformation of C cells alone is sufficient to trigger the mechanism of receptor overexpression (Waser *et al.* 2011). Moreover, given the poor diagnostic and therapeutic options of MTC, a clinical application of GIP analogs in this tumor type has been proposed (Waser *et al.* 2011, Reubi *et al.* 2020).

No data are currently available on GIP/GIPR signaling in parafollicular transformed cells or its clinical relevance in MTC patients. Here, taking advantage of a large series of tumoral specimens, we investigated the potential prognostic significance of GIPR expression in MTC and we used cellular models of MTC to investigate GIP/GIPR signaling.

Materials and methods

MTC patients

The cohort included 49 MTC patients enrolled in our center between 2007 and 2016 (see Supplementary Methods, see section on [supplementary materials](#) given at the end of this article). All patients were treated with total thyroidectomy with dissection of the regional lymph nodes. After surgery, the samples were snap-frozen and stored in liquid nitrogen. Non-neoplastic thyroid tissue samples from the contralateral lobe of five patients affected by papillary thyroid carcinoma were included as controls. All participants signed informed consent. The local ethical committee approved the study (Azienda Ospedaliera di Padova, no 12667), which was conducted according to Helsinki Declaration.

A regional metastatic lymph node (LNM) from an additional patient was surgically removed and immediately transferred to sterile culture medium and processed as reported elsewhere (Bertazza *et al.* 2018).

Cell lines, plasmids, and chemicals

The TT cell line (RRID: CVCL_1774) was obtained from ATCC, while the MZ-CRC-1 cell line (RRID: CVCL_A656) was provided by Dr Alessandro Antonelli (Pisa University, Italy). We validated the authenticity of all cell lines by STR profiling and the presence of heterozygous *RET* mutation in both cell lines (c.1902C>G and c.2753T>C for TT and MZ-CRC-1, respectively) by Sanger sequencing. Both were cultured in complete medium (RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM L-glutamine, and penicillin/streptomycin), as described elsewhere (Bertazza *et al.* 2018). See the Supplementary

Methods for details on the plasmids and chemicals used here.

RNA isolation, reverse transcription, and quantification

Total RNA from frozen tumoral specimens and cell cultures was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen) combined with Direct-zol RNA Microprep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). RNA yields and integrity were determined using the Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), respectively. Before RT, RNA samples were treated with the Turbo DNA-free kit (Ambion) to remove traces of DNA contamination. RNA was reverse-transcribed with M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H- (Invitrogen) with random hexamers following the manufacturer's recommendations.

The *GIPR* absolute quantification and *Calcitonin* mRNA steady-state level were determined by digital PCR and RT-qPCR, respectively. More details can be found in the Supplementary Methods.

Calcitonin secretion

CT secretion was quantified in the cells' conditioned medium using a chemiluminescent immunoassay (LIAISON® Calcitonin_II-Gen, DiaSorin) following the manufacturer's instructions. For each well, CT secretion was normalized to total RNA extracted as reported above.

Transfection and dual luciferase assay

Seventy-two hours before the experiment, the TT (3×10^5 cells/well) and MZ-CRC-1 cells (1×10^6 cells/well) were seeded into 12-well plates. Cells were transiently transfected with CRE-Luc (1.4 μg /well) and pRL-TK (0.1 μg /well) reporters using Lipofectamine 2000 (1.25 μL / μg DNA, Invitrogen) for 6 h following manufacturer's instructions. Twenty-four hours post-transfection, cells were treated for 3.5 h with GIP (0.1 and 1 μM) or FSK (10 μM) after which they were lysed in passive lysis buffer (Promega). The relative luciferase activity (RLU) was measured with the DLR-Assay System on a GloMax 20/20 luminometer (Promega), as previously described (Regazzo *et al.* 2017).

Measurement of cell viability

Cell viability of TT (2×10^4 cells/well), MZ-CRC-1 (4×10^4 cells/well) and primary cells (3×10^4 cells/well) in response

to GIP stimulus was evaluated in 96-well plates by MTT proliferation assay (Sigma-Aldrich) as described elsewhere (Bertazza *et al.* 2018). Given the well-known inhibitory effect of XL184 on MTC cells growth (Bertazza *et al.* 2018), it was used as a control of the proliferation assay.

Protein extraction and immunoblotting

Cells were seeded in six-well plates in complete medium (MZ-CRC-1, 10^6 cells/well; TT 5×10^5 cells/well) and allowed to grow for 48 h after which they were shifted to 0.1% FCS. For assessing the effect of GIP/GIPR axis activation on MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways, after O/N culturing, cells were administered with the receptor tyrosine kinase inhibitor vandetanib (Van) or DMSO as vehicle control and pre-incubated for 1 h before treatment. Cells were treated at the indicated time points as described in Figure legends. After stimulation, cells were lysed in RIPA buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors cocktails (cOMplete, PhosSTOP, Roche) and clarified by centrifugation. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Thermo) following the manufacturer's instructions.

Protein lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, which were probed with primary antibodies. Specific binding was detected via HRP-conjugated secondary antibodies, using a chemiluminescence assay. For more details see the Supplementary Methods section.

Confocal microscopy

TT and MZ-CRC-1 cells were grown for 48 h on poly-d-lysine coated glass. Before incubation with a rabbit anti-GIPR polyclonal antibody (US Biological Life Sciences, Salem, MA, USA; O/N, 4°C, 1:250) and Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (Life Technologies, 1:250), cells were fixed with 2% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS. Plasma membrane and cell nuclei were stained with specific markers.

Images were acquired by the means of a confocal microscope and analyzed with dedicated software (Leica Microsystem). For more details, see the Supplementary Methods section.

Cyclic AMP assay

TT (10^4 cells/well) and MZ-CRC-1 (2×10^4 cells/well) were seeded in 96-well plates in complete medium and allowed

to grow for 48 h. Cells were then stimulated for 10 min at 37°C with the induction buffer (PBS, 0.5 mM IBMX, 0.1 mM Ro 20-1724) containing either GIP stimulus (10^{-6} to 10^{-10} M) or Forskolin (10^{-5} to 10^{-9} M), this latter as a positive control. The cAMP assay was performed using the cAMP-Glo™ Assay Kit (Promega) following the manufacturer's instructions.

Calcium imaging and fluorescence resonance energy transfer (FRET)

Calcium influxes were evaluated in TT, MZ-CRC-1, and primary cells using the cell-permeant probe Fura-2 AM. In primary cells, cAMP fluctuations were evaluated by fluorescence resonance energy transfer (FRET) imaging after adenoviral infection with the cAMP sensor Ad-H187 previously validated and calibrated (Burdyga *et al.* 2018). For more details, see Supplementary Methods.

Statistical analysis

The entire statistical analyses have been performed with the freely available R software (www.r-project.org). For more details, see Supplementary methods.

Results

GIPR expression and clinical correlations

Demographic, clinical, laboratory, and histopathology data were collected (see Supplementary Table 1) and correlated with *GIPR* expression in tissue specimens. *GIPR* mRNA steady-state levels were negligible in non-neoplastic human thyroids. It was instead moderate to elevated in most MTC samples, confirming previous observations (Waser *et al.* 2011). Pairwise correlation and linear regression analysis between *GIPR* expression and patients' characteristics did not reveal any significant associations.

Patients were divided into two groups according to the receptor median expression values (Occhi *et al.* 2011, Regazzo *et al.* 2017) compared with normal thyroids and further analyzed for statistical significance. As shown in Fig. 1A and Table 1, ~78% of cases showed consistently higher *GIPR* levels (*GIPR*⁺, median 10.85, IQR 6.25–25.25) compared to the normal thyroids (median 0.22, IQR 0.0–0.46), while the remaining 20% of cases did not (*GIPR*⁻, median 0.07, IQR 0.03–0.22). According to the chi-squared analysis, *GIPR*⁺ tumors were more common in

sporadic than in familial cases (Fig. 1B, $P = 0.025$). *GIPR*⁻ MTC showed preferentially very low stages, while *GIPR*⁺ cases were equally distributed between low (I/II) and high (III/IV) stages (Fig. 1C, $P = 0.034$). In addition, the latter showed a higher preoperative serum CT level (Fig. 1D, $P = 0.0004$), a larger median size (Fig. 1E, $P = 0.0003$) with higher Ki-67 values (Fig. 1F, $P = 0.017$). The *GIPR* status did not correlate to any other clinicopathological parameters.

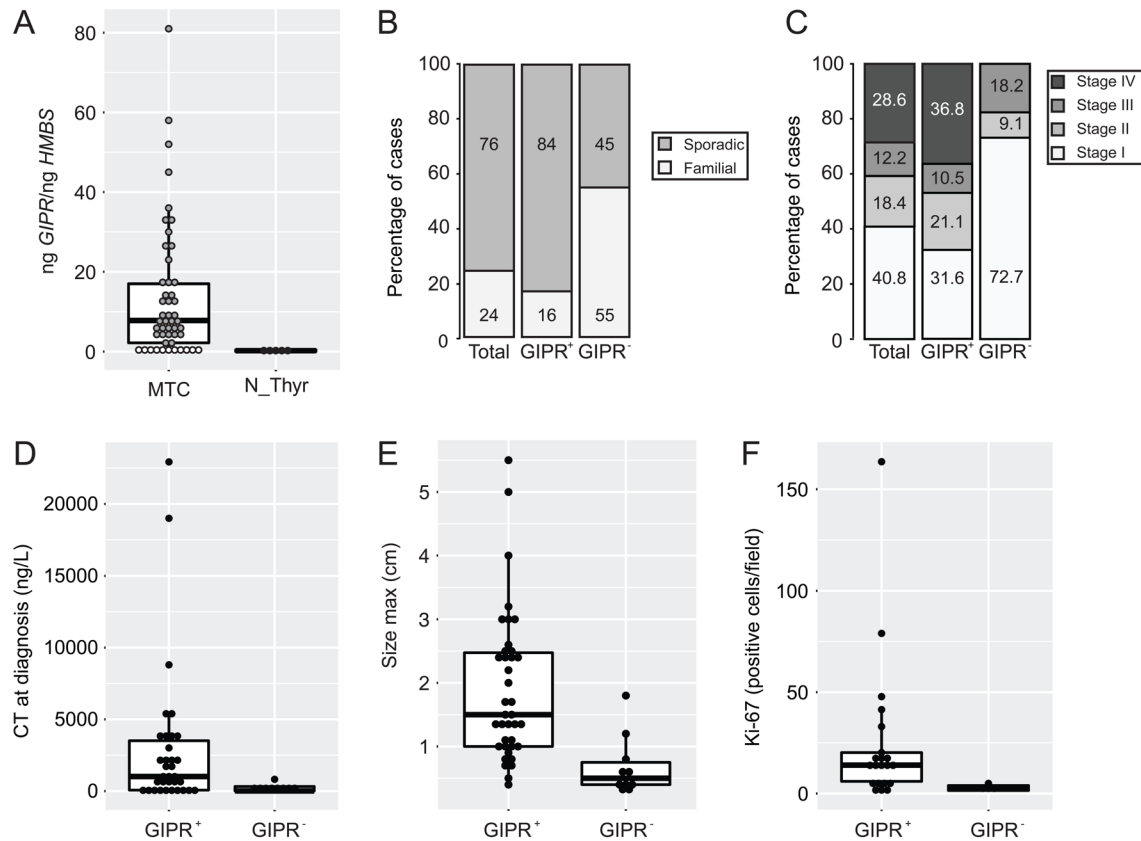
GIP/GIPR axis in MTC cell lines

The effects of GIP/GIPR axis stimulation were then tested in TT and MZ-CRC-1 cells. Indeed, both cell lines express *GIPR* at moderate but significant levels (Fig. 2A) and present a co-expression of the receptor with the plasma membrane marker WGA, as emerged by the analysis of confocal microscopy images (see Supplementary Fig. 1).

The receptor functionality was then tested by measuring cAMP production and consequent CREB activation upon ligand binding. Initial working concentrations of GIP were based on our previous studies (Occhi *et al.* 2011, Regazzo *et al.* 2017). MZ-CRC-1, but not TT cells, produced cAMP in response to GIP in a dose-dependent manner. However, the activator of adenylyl cyclases FSK induced cAMP production in both cell lines, albeit to a different extent (Fig. 2B). In line with these results, CREB activation in response to GIP, detected by a luciferase-based reporter (CRE-Luc) (Fig. 2C), was observed only in MZ-CRC-1 cells, which presented a ten-fold increase already at low GIP concentrations (i.e. 10^{-7} M). These data suggest that, although expressed in TT cells, *GIPR* may not be functionally coupled to the effectors of the cAMP cascade.

Several pieces of evidence indicate that in C cells, CT synthesis and secretion may be triggered by cAMP increases in response to GPCR stimulation, including gastrointestinal hormones (e.g. glucagon, gastrin, CCK) and neurotransmitters (e.g. GHRH) (Raue *et al.* 1993). We thus evaluated whether *GIPR* stimulation could be associated with changes in CT mRNA steady-state and secretion levels. GIP treatment did not affect the CT mRNA levels regardless of the cell line tested (Fig. 2D). While a dose-response increase in CT secretion was observed in both cell lines, peaking at a two-fold increase at the maximum concentration used ($P < 0.01$).

As both cAMP and Ca^{2+} are involved in CT synthesis and secretion (de Bustros *et al.* 1986, Matsuda *et al.* 2006), and CREB activity can be induced also by Ca^{2+} , by live-cell imaging, we evaluated the effects of GIP stimulation on intracellular Ca^{2+} levels. No changes in intracellular calcium

**Figure 1**

Comparison of MTC patients' features according to the presence or absence of GIPR expression. In (A) box-plot of relative GIPR gene expression in all MTC and non-neoplastic thyroid tissue samples (N_Thyr) according to the ddPCR experiments. MTC samples whose GIPR expression was within the same range observed in N_Thyr were classified as GIPR⁻ and represented with white circles. The remaining samples, all with GIPR levels that were at least two-fold higher than the maximum value, detected for the other two groups (13), were classified as GIPR⁺ and depicted with light gray circles. In B, C, D, E and F, only features that differed significantly between GIPR⁺ and GIPR⁻ groups have been reported. Stacked bars were used to represent the categorical variables (B and C), while box plots display continuous variables (D, E and F). Numbers within bars represent the percentage of cases in each group.

influx were observed in TT cells challenged with increasing doses of GIP (Fig. 2E), further supporting the hypothesis of reduced functionality of GIPR in these cells. The effects of GIP on Ca²⁺ in MZ-CRC-1 cells were more complex. As shown in Fig. 2F, indeed, these cells presented spontaneous Ca²⁺ fluctuations but also eventually responded to GIP with increases in Ca²⁺ that were dose-dependent.

Based on our observation that GIPR⁺ tumors were larger, and the documented ability of GIP stimulation to promote cell proliferation in colorectal cancer (CRC) (Prabakaran *et al.* 2010), we tested the proliferative role of GIP/GIPR axis in MTC cells by MTT assay. As shown in Fig. 2G, no significant change in the relative cell survival rate was observed in any of the two cell lines at any concentration or time point.

By employing immunoblotting, we then tested the effect of GIPR activation on the MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways in TT and MZ-CRC-1 cells. The activation of these

pathways in response to GIP has been indeed reported in different cell models (Kubota *et al.* 1997, Prabakaran *et al.* 2010). To isolate the possible contribution of GIP-dependent stimulation, both cell lines were preincubated and GIP-stimulated with and without vandetanib. This multikinase inhibitor, indeed, by inhibiting the oncogene *RET*, which is constitutively active in these cells, prevents masking potential effects of GIP stimulation on both these pathways. As shown in Fig. 3A, however, GIP failed to induce any significant change in neither ERK1/2 nor Akt phosphorylation.

With a similar experimental approach, we demonstrated that only in MZ-CRC-1 cells, GIP treatment induced a significant change in the phosphorylation status of several PKA targets as assessed using a PKA phospho-substrate antibody (Fig. 3B). This latter observation further supports that GIP/GIPR signaling strongly activates several effectors of the cAMP signaling

Table 1 Comparison of clinicopathologic features of GIPR⁺ and GIPR⁻ medullary thyroid carcinoma in 49 patients.

	GIPR ⁺	GIPR ⁻	P
<i>n</i> of patients (%)	38 (78)	11 (22)	–
Median GIPR expression	10.85 (IQR, 6.25–25.25)	0.07 (IQR, 0.03–0.22)	
Gender, male/female (%)	21/17 (55/45)	7/4 (64/36)	0.88
RET genotype, any mutation/WT (%)	19/19 (50/50)	3/5 (37/63)	0.80
Familial/sporadic MTC (%)	6/32 (16/84)	6/5 (55/45)	0.025
Median preoperative CT, basal (ng/L)	1019 (IQR, 68.75–3513.25)	12.3 (IQR, 11–325)	0.0004
Median CT postoperative, basal (ng/L)	9.75 (IQR, 2.0–214.75)	5.0 (IQR, 1.70–19.8)	0.238
Median age at surgery, years	58 (IQR, 46–66)	27 (IQR, 23.5–66)	0.125
Follow-up days	2038 (IQR, 1754–3498)	1800 (IQR, 1355–2109)	0.141
Cured/not cured (%)	17/20 (46/54)	8/3 (73/27)	0.223
Median maximal tumor size, cm	1.5 (IQR, 1.0–2.475)	0.5 (IQR, 0.4–0.75)	0.0003
Multiplicity, Y/N (%)	3/35 (8/92)	3/8 (27/73)	0.228
TNM stage	13	10	0.011
Primary tumor			
T1	6	0	
T2	8	1	
T3	1	0	
T4			
Regional lymphnodes			
N0	20	9	0.166
N1	18	2	
Distant metastasis			
M0	32	11	0.376
M1	6	0	
Stage			
I	12	8	0.034
II	8	1	
III	4	2	
IV	14	0	
Median Ki-67 positive nuclei ^a	14.0 (IQR, 6.0–20.2)	2.55 (IQR, 1.5–3.95)	0.017

Boldface indicates statistically significant results.

^aKi-67 was calculated by quantitatively assessing three non-overlapping fields at ×400 and photographs were taken using Olympus E-330 DSLR (manufacturer: Olympus Corporations of America) camera.

GIPRH, GIPR high expressing MTC; GIPRL, GIPR low expressing MTC; Y, yes; N, no.

pathway without affecting the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways.

GIP/GIPR axis in primary cells from a regional metastatic lymph node

GIP/GIPR axis was then evaluated in a primary culture established from an LNM (SF2) derived from an additional MTC patient (#MTC_54 in Supplementary Table 1) and proven positive for *GIPR* expression and CT secretion. *RET* mutational status was concordant between the primary tumor and LNM (data not shown).

The addition of 0.1 μM GIP induced a substantial cAMP increase in a relevant fraction of cells expressing the FRET-based cAMP sensor EPACS¹⁸⁷(Ad-H187), confirming the functional coupling between GIPR and adenylyl cyclase (AC). The addition of a supramaximal treatment FSK (to activate ACs) together with IBMX (to block

phosphodiesterases) further increased the FRET signal (Fig. 4A). When we evaluated the magnitude of the responses elicited by the different stimuli, we found that GIP induced an average FRET signal change ($\Delta R/R_0$) increase of $17.3 \pm 3.8\%$ ($n = 20$), while treatment with FSK/IBMX produced a FRET change of $27.4 \pm 4.7\%$ ($n = 20$).

We then asked whether GIPR stimulation could influence both intracellular Ca²⁺ levels and CT synthesis/secretion. A robust but heterogeneous intracellular Ca²⁺ increase was observed in a small proportion of cells (11%, Fig. 4B) upon GIP stimulation. The same stimulus, however, could not induce any change in the steady-state levels of CT mRNA but promoted a significant almost two-fold increase in CT secretion ($P < 0.01$, Fig. 4C).

Finally, by evaluating the effect of GIP on cell viability, we observed no changes in the average absorbance with increasing concentration of GIP. A clear dose-dependent effect emerged instead after XL184 treatment (Fig. 4D).

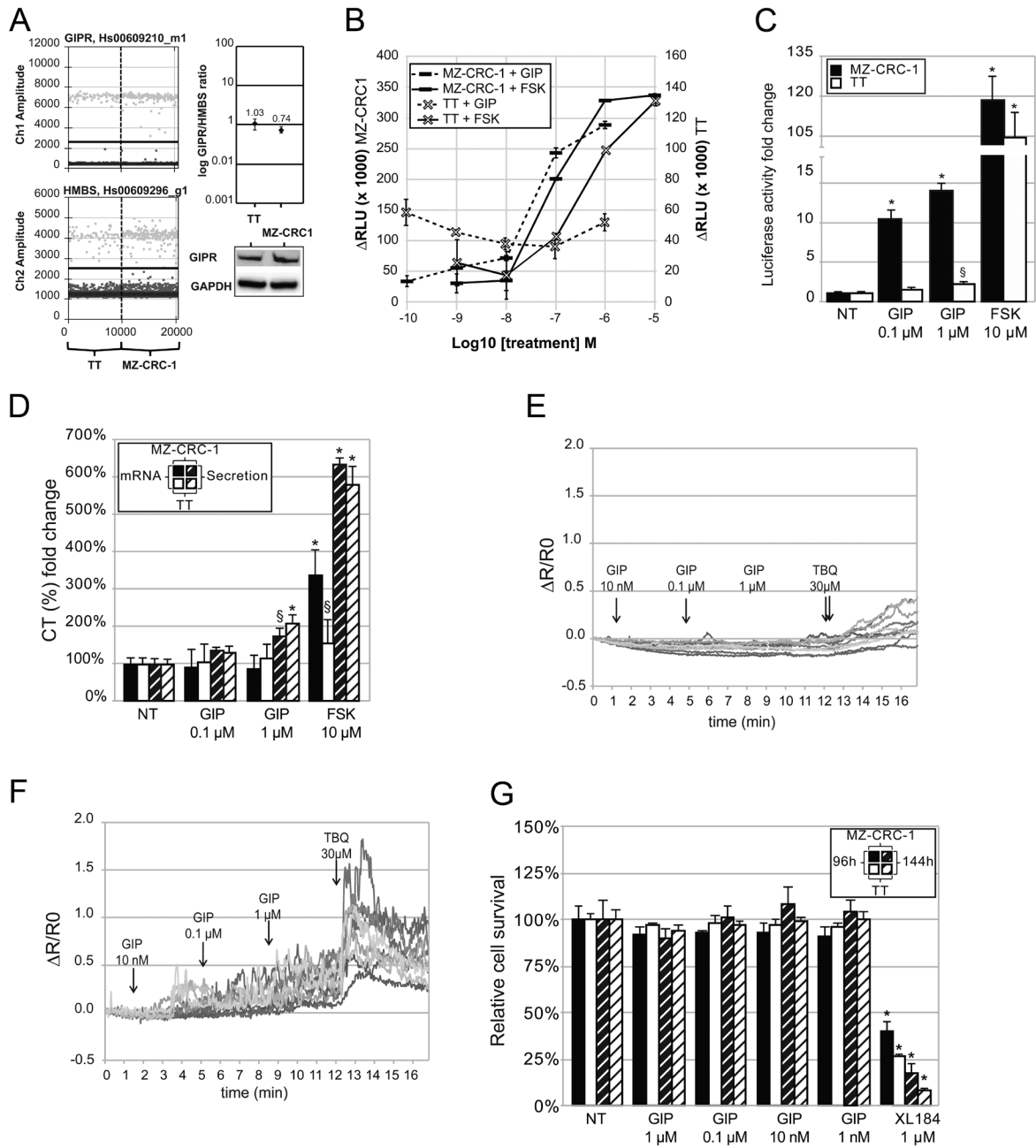


Figure 2

The GIP/GIPR signaling in MZ-CRC-1 and TT cells. In (A), The steady-state level of *GIPR* (upper left panel) and *HMBS* (lower left panel) by ddPCR in the TT and MZ-CRC-1 cell lines. Light grey and black dots indicate each droplet positive or negative for PCR assay, respectively. The normalized ratio of *GIPR* to *HMBS* in the two samples are reported in the upper right panel. The error bars associated with each point represent Poisson's 95% CIs. In the lower right panel, representative immunoblots of GIPR and GAPDH examined in the MZ-CRC-1 and TT are shown. In (B), concentration–response curves of MZ-CRC-1 and TT were measured by cAMP accumulation assay after stimulation with GIP (from 10^{-6} to 10^{-10} M) or FSK (from 10^{-5} to 10^{-9} M). (C) CREB transcriptional activity was evaluated in MZ-CRC-1 and TT cells by evaluating luciferase activity after transient CRE-Luc transfection and treatment with GIP or FSK. The relative activity was adjusted for transfection efficiency using pRL-TK. In (D), the effects of GIP on CT synthesis and secretion are reported. MZ-CRC-1 and TT cells were stimulated for 24 h with GIP, FSK, or vehicle, after which CT mRNA steady-state levels and secretion have been evaluated. In all cases, CT responses were normalized to vehicle-treated cells. In (E) and (F), the exemplificative kinetics of $\Delta R/R0$ recorded to evaluate the effect of GIP on Ca^{2+} influx in TT and MZ-CRC-1 cells, respectively, loaded with fura-2 AM and stimulated, in sequence, with GIP (0.01–1 μ M) and TBQ (30 μ M). Arrows denote the time points of drug administration; traces represent individual cells. In panel (G), the effects of GIP/GIPR signaling on cell viability are reported as dose–response curves, 96 and 144 h after treatment with GIP and XL184 for both MZ-CRC-1 and TT cells. Values and error bars represent the mean of three independent experiments in at least three replicates and the standard deviation of the data, respectively. * $P < 0.01$, $^{\S}P < 0.05$ in treated vs non-treated (NT) cells.

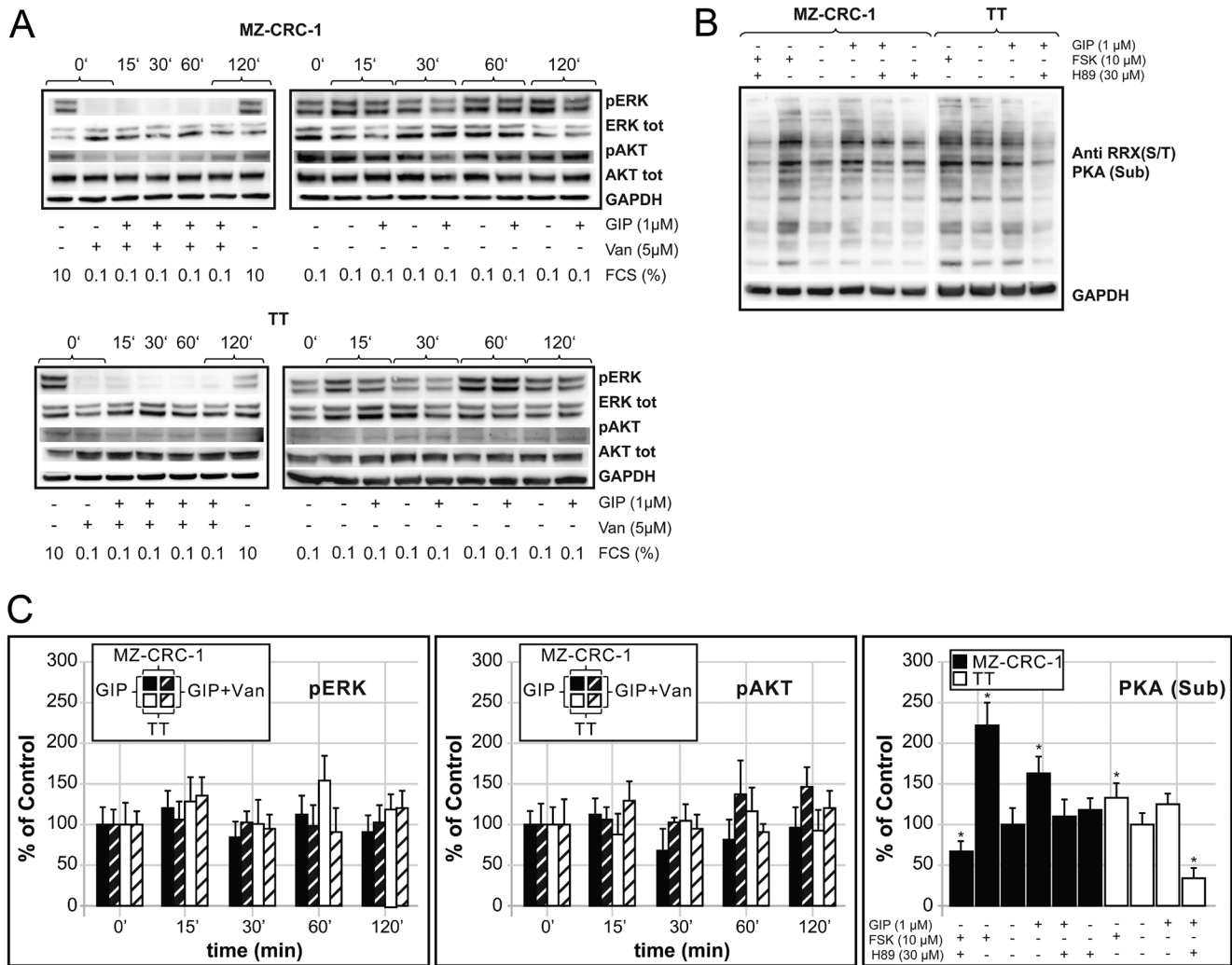


Figure 3

Western blot analysis. (A) Representative Western blot of ERK, phospho-ERK, AKT, phospho-AKT, and GAPDH examined in the MZ-CRC-1 (top) and TT (bottom) cell lines treated with GIP (1 μ M) alone or in combination with vandetanib (Van, 5 μ M) and FSK (10 μ M) for 2 h. (B) Western blotting of phospho bands assessed by a phospho-PKA substrate antibody, RRX(S/T)P of total cell lysates of MZ-CRC-1, and TT treated for 30 mins with GIP (1 μ M) and FSK (10 μ M) alone or in combination with the PKA inhibitor H89 (30 μ M). (C) Histogram of densitometric analysis of protein signals measured in panels A and B. Bands were analyzed and quantified using Image LabTM software (Ver 6.1, BioRad) and the detected band intensities compared to those for the housekeeping protein GAPDH in each lane. For the time points between 15 and 120 mins, we reported intensities for GIP-treated samples only. Data for samples in 10% FBS were omitted. Results of three replicate experiments are shown. The error bars represent mean \pm s.d. Significance: * P < 0.01, § P < 0.05.

Discussion

The vast majority of tumors with neuroendocrine origin are characterized by a high T/N ratio of GIPR (Waser *et al.* 2012, Sherman *et al.* 2014). This high peptide receptor density may be positively or negatively correlated with the proliferative index MIB-1 – depending on the site of origin of NET (Körner *et al.* 2015). These observations, together with the well-recognized stimulatory role of cAMP signaling in regulating CT secretion (de Bustros *et al.* 1986), on which GIPR relies to transduce extracellular signals,

triggered our interest in investigating the GIP/GIPR axis and evaluating its prognostic role in MTC.

In line with observations made in acromegaly (Mukai *et al.* 2019, Scaroni *et al.* 2019), in the present study, we found a significant correlation between GIPR overexpression and some biochemical, histological, and radiological parameters. Larger sporadic tumors with a higher tumor grade express GIPR more often than smaller familial inherited MTCs. Although intriguing, however, some pieces of evidence suggest that unlikely acromegaly, in MTC, the status of GIPR expression probably does not

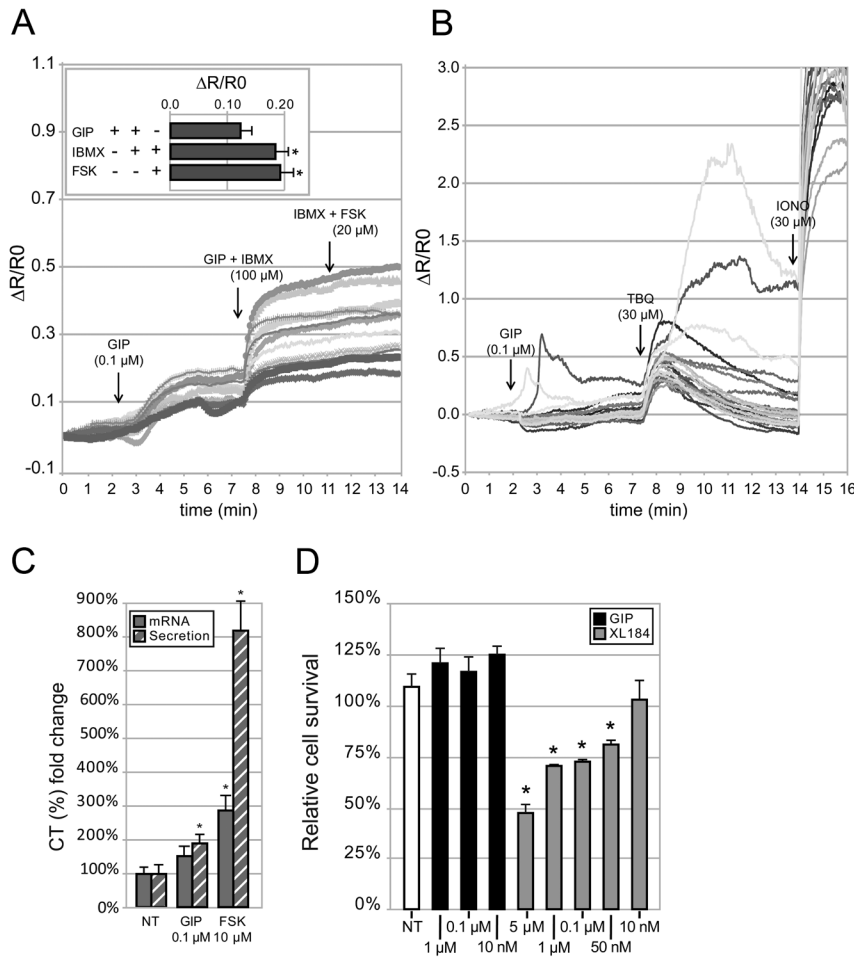


Figure 4

The GIP/GIPR axis in cells from a regional metastatic lymph node surgically resected from patient MTC_54. In panel (A), primary cells expressing H187 did respond to 0.1 μM GIP challenged and maximally to saturating concentrations of FSK (20 μM) and IBMX (100 μM). The box in the upper part of the figure reports the average response of GIP responsive cells to in sequence GIP 0.1 μM; GIP + IBMX 100 μM; IBMX + FSK 20 μM. In panel (B) is reported the exemplificative kinetics of ΔR/R0 recorded in primary lymph node cells loaded with fura-2 AM and stimulated in sequence with GIP (0.1 μM), TBQ (30 μM), and ionomycin (10 μM). Traces represent individual cells, while arrows indicate the time points of drug administration. Panel (C) depicted the effects of a 24-h treatment with 0.1 μM GIP, FSK (10 μM), or vehicle on CT synthesis and secretion. Panel (D) reported the effect of the growing concentration of GIP and XL184 on primary cells viability. Each analysis was performed in five replicates and repeated in two separate experiments. The error bars represent mean ± s.d. Significance: *P < 0.01, [§]P < 0.05.

reflect tumor biological features but rather the degree of advancement of the malignant process. This was first hypothesized in rat C cells, in which in a homogeneous genetic background changes in *GIPR* expression could occur during the transition from hyperplasia to neoplasia (Waser *et al.* 2011). The common expression of *GIPR* among MTCs and its lower prevalence in familial rather than in sporadic cases – the awareness of the *RET* mutational status in familial cases may enable early surgical intervention in these latter – point to this hypothesis.

Naturally, several further issues emerge from our study. First, our data reveal the lack of a functional link between *GIPR* overexpression and the *RET* oncogene. This is something non-unexpected, however, as a thorough analysis of a large MTC dataset revealed a homogeneous expression profile characterizing MTC tumors, regardless of the form in which the disease occurs – that is, familial rather than sporadic – or *RET* mutational status (Oczko-Wojciechowska *et al.* 2017). Nevertheless, the high prevalence of *GIPR*⁺ MTC tumors strongly suggests a strict link between this event and the remodeling processes that

characterize tumoral transformation in medullary thyroid cells. Secondly, looking for the involvement of the GIP/GIPR axis on cell proliferation and tumorigenesis, we found a positive correlation between *GIPR* steady-state levels and the Ki-67 index, confirming previous observations (Körner *et al.* 2015). The limited size of our cohort, however, makes it necessary to consider this finding with caution. It is indeed challenging to determine whether this correlation is genuine or simply reflects the association between higher Ki-67 expression and more aggressive behavior of MTC (more common in the *GIPR*⁺ group), as reported in a recent meta-analysis (Pan *et al.* 2017). On the other side, our *in vitro* proliferation study and immunoblot assays on MAPK and Akt/PI3K signaling pathways – among the most critical molecular pathways involved in MTC carcinogenesis – suggest that, differently from other tumors (Trümper *et al.* 2002, Mazzuco *et al.* 2007, Prabakaran *et al.* 2010), the GIP/GIPR axis may have no significant effect on the proliferation of transformed C cells.

More interestingly, the median CT at diagnosis was significantly higher in *GIPR*⁺ compared to *GIPR*⁻ MTCs.

As many parameters have been recognized to correlate with basal serum CT levels in MTC – for example, primary tumor size and the number of LNs, gender (Yip *et al.* 2011, Park *et al.* 2020) – we cannot exclude that this difference may reflect the higher prevalence of larger tumors in the former group. Although the stimulatory effect we observed *in vitro* in MZ-CRC-1 and primary cells, combined with the well-recognized stimulatory role of cAMP signaling in regulating CT secretion (de Bustros *et al.* 1986), supports the idea that GIP/GIPR signaling, mostly through Gs, may contribute to this outcome. TT cells, which appeared to be refractory to GIP stimuli, present, however, a similar response, that is kept also when the receptor is reduced by ~50% with siRNAs pools targeting *GIPR* (data not shown). This might suggest an alternative receptor-ligand interaction, which is, however, rather unlikely given the high receptor/ligand-binding affinity (Gallwitz *et al.* 1996). Alternatively, this response could be a consequence of the high doses at which this effect occurs as reported in mouse corticotroph pituitary tumor cells AtT20/D16 (Westendorf & Schonbrunn 1985). The *in-vitro* stimulatory effect on ACTH and endorphin exerted by GIP was indeed ruled out evaluating the hypothalamic–pituitary corticotrophic axis in a knock-out mouse model (Bates *et al.* 2012). Further studies on additional MTC cell models – that is, with and without GIPR – will be therefore necessary to clarify this point that, if confirmed, could open the way for evaluating the diagnostic potential of this axis in MTC. In other words, were the GIP effects on CT secretion confirmed, one could evaluate the possibility of avoiding the proarrhythmic risks linked to the i.v. administration of calcium gluconate loads in MTC patients by performing a more safe OGTT.

Finally, it is worth mentioning that besides CT, the C cells of the thyroid may secrete a variety of hormones or biogenic amines (e.g. carcinoembryonic antigen (CEA), ACTH, β -MSH, somatostatin) that may influence MTC symptoms (Wells *et al.* 2015, Cancela-Nieto *et al.* 2020). The synthesis and/or secretion of most of these molecules may be regulated by cAMP/Ca²⁺ signaling pathways. As a consequence, the inducibility of the GIP/GIPR axis in MTC cells as we demonstrated in this study might have important clinical implications in this tumor type. A deeper analysis at the secretome level will be desirable to clarify the real impact of GIP/GIPR signaling in MTC and to understand whether the pharmacological interference with this pathway might in the future represent an option to mitigate MTC symptoms.

In conclusion, our data support previous observations of a high T/N ratio of GIPR in MTC and confirm that aberrant GIPR expression occurs very early during the C cell transformation with a mechanism likely independent

from RET mutations. By dissecting the GIP/GIPR axis, we demonstrated that GIPR is functionally coupled with G α s and that does not induce MAPK/ERK and PI3K/AKT pathway activation. Accordingly, GIP stimulation of MTC cellular models significantly affects CT secretion without any detectable effects on cell viability/proliferation.

Further studies are needed to clarify the molecular events that trigger GIPR aberrant expression in MTC, a general mechanism that might underlie this event also in other endocrine tumors but is still far from being fully understood.

Supplementary materials

This is linked to the online version of the paper at <https://doi.org/10.1530/ERC-21-0258>.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sector.

References

- Baggio LL & Drucker DJ 2007 Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132** 2131–2157. (<https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2007.03.054>)
- Bates HE, Campbell JE, Ussher JR, Baggio LL, Maida A, Seino Y & Drucker DJ 2012 Gipr is essential for adrenocortical steroidogenesis; however, corticosterone deficiency does not mediate the favorable metabolic phenotype of Gipr(-/-) mice. *Diabetes* **61** 40–48. (<https://doi.org/10.2337/db11-1060>)
- Bertazza L, Sensi F, Cavedon E, Watutantrige-Fernando S, Censi S, Manso J, Vianello F, Casal Ide E, Iacobone M, Pezzani R, *et al.* 2018 EF24 (a curcumin analog) and ZSTK474 emphasize the effect of cabozantinib in medullary thyroid cancer. *Endocrinology* **159** 2348–2360. (<https://doi.org/10.1210/en.2018-00124>)
- Burdyga A, Surdo NC, Monterisi S, Di Benedetto G, Grisan F, Penna E, Pellegrini L, Zaccolo M, Bortolozzi M, Swietach P, *et al.* 2018 Phosphatases control PKA-dependent functional microdomains at the outer mitochondrial membrane. *PNAS* **115** E6497–E6506. (<https://doi.org/10.1073/pnas.1806318115>)
- Cancela-Nieto MG, Sánchez-Sobrino P & Velogarcía A 2020 Procalcitonin as a marker of medullary thyroid carcinoma. *Minerva Endocrinologica* **46** 481–482. (<https://doi.org/10.23736/S0391-1977.20.03229-0>)
- de Bustros A, Baylin SB, Levine MA & Nelkin BD 1986 Cyclic AMP and phorbol esters separately induce growth inhibition, calcitonin secretion, and calcitonin gene transcription in cultured human medullary thyroid carcinoma. *Journal of Biological Chemistry* **261** 8036–8041. ([https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)57508-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)57508-1))
- Dupre J, Ross SA, Watson D & Brown JC 1973 Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *Journal of Clinical*

- Endocrinology and Metabolism* **37** 826–828. (<https://doi.org/10.1210/jcem-37-5-826>)
- Elisei R, Tacito A, Ramone T, Ciampi R, Bottici V, Cappagli V, Viola D, Matrone A, Lorusso L, Valerio L, *et al.* 2019 Twenty-five years experience on RET genetic screening on hereditary MTC: an update on the prevalence of germline RET mutations. *Genes* **10** 698. (<https://doi.org/10.3390/genes10090698>)
- Gallwitz B, Witt M, Morys-Wortmann C, Fölsch UR & Schmidt WE 1996 GLP-1/GIP chimeric peptides define the structural requirements for specific ligand-receptor interaction of GLP-1. *Regulatory Peptides* **63** 17–22. ([https://doi.org/10.1016/0167-0115\(96\)00019-5](https://doi.org/10.1016/0167-0115(96)00019-5))
- Körner M, Waser B & Reubi JC 2015 Does somatostatin or gastric inhibitory peptide receptor expression correlate with tumor grade and stage in gut neuroendocrine tumors? *Neuroendocrinology* **101** 45–57. (<https://doi.org/10.1159/000371804>)
- Kubota A, Yamada Y, Yasuda K, Someya Y, Ihara Y, Kagimoto S, Watanabe R, Kuroe A, Ishida H & Seino Y 1997 Gastric inhibitory polypeptide activates MAP kinase through the wortmannin-sensitive and -insensitive pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **235** 171–175. (<https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6743>)
- Matsuda M, Yamamoto TA & Hirata M 2006 Ca²⁺-dependent regulation of calcitonin gene expression by the transcriptional repressor DREAM. *Endocrinology* **147** 4608–4617. (<https://doi.org/10.1210/en.2006-0254>)
- Mazzucco TL, Chabre O, Feige JJ & Thomas M 2007 Aberrant GPCR expression is a sufficient genetic event to trigger adrenocortical tumorigenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **265–266** 23–28. (<https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.034>)
- Mukai K, Otsuki M, Tamada D, Kitamura T, Hayashi R, Saiki A, Goto Y, Arita H, Oshino S, Morii E, *et al.* 2019 Clinical characteristics of acromegalic patients with paradoxical GH response to oral glucose load. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **104** 1637–1644. (<https://doi.org/10.1210/jc.2018-00975>)
- Occhi G, Losa M, Albiger N, Trivellin G, Regazzo D, Scanarini M, Monteserin-Garcia JL, Fröhlich B, Ferasin S, Terreni MR, *et al.* 2011 The glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor is overexpressed amongst GNAS1 mutation-negative somatotropinomas and drives growth hormone (GH)-promoter activity in GH3 cells. *Journal of Neuroendocrinology* **23** 641–649. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02155.x>)
- Oczko-Wojciechowska M, Swierniak M, Krajewska J, Kowalska M, Kowal M, Stokowy T, Wojtas B, Rusinek D, Pawlaczek A, Czarniecka A, *et al.* 2017 Differences in the transcriptome of medullary thyroid cancer regarding the status and type of RET gene mutations. *Scientific Reports* **7** 42074. (<https://doi.org/10.1038/srep42074>)
- Pan DH, Wen DY, Luo YH, Chen G, Yang H, Chen JQ & He Y 2017 The diagnostic and prognostic values of Ki-67/MIB-1 expression in thyroid cancer: a meta-analysis with 6051 cases. *OncoTargets and Therapy* **10** 3261–3276. (<https://doi.org/10.2147/OTT.S135593>)
- Park H, Park J, Choi MS, Kim J, Kim H, Shin JH, Kim JH, Kim JS, Kim SW, Chung JH, *et al.* 2020 Preoperative serum calcitonin and its correlation with extent of lymph node metastasis in medullary thyroid carcinoma. *Cancers* **12** 1–13. (<https://doi.org/10.3390/cancers12102894>)
- Prabakaran D, Wang B, Feuerstein JD, Sinclair JA, Bijpuria P, Jepeal LI & Wolfe MM 2010 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulates the proliferation of colorectal cancer cells. *Regulatory Peptides* **163** 74–80. (<https://doi.org/10.1016/j.REGPEP.2010.04.005>)
- Raue F, Zink A & Scherübl H 1993 Regulation of calcitonin secretion in vitro. *Hormone and Metabolic Research* **25** 473–476. (<https://doi.org/10.1055/s-2007-1002152>)
- Regazzo D, Losa M, Albiger NM, Terreni MR, Vazza G, Ceccato F, Emanuelli E, Denaro L, Scaroni C & Occhi G 2017 The GIP/GIPR axis is functionally linked to GH-secretion increase in a significant proportion of gsp-somatotropinomas. *European Journal of Endocrinology* **176** 543–553. (<https://doi.org/10.1530/EJE-16-0831>)
- Regazzo D, Barbot M, Scaroni C, Albiger N & Occhi G 2020 The pathogenic role of the GIP/GIPR axis in human endocrine tumors: emerging clinical mechanisms beyond diabetes. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **21** 165–183. (<https://doi.org/10.1007/s11154-019-09536-6>)
- Reubi JC, Fourmy D, Cordomi A, Tikhonova IG & Gigoux V 2020 GIP receptor: expression in neuroendocrine tumours, internalization, signalling from endosomes and structure-function relationship studies. *Peptides* **125** 170229. (<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170229>)
- Romei C, Cosci B, Renzini G, Bottici V, Molinaro E, Agate L, Passannanti P, Viola D, Biagini A, Basolo F, *et al.* 2011 RET genetic screening of sporadic medullary thyroid cancer (MTC) allows the preclinical diagnosis of unsuspected gene carriers and the identification of a relevant percentage of hidden familial MTC (FMTC). *Clinical Endocrinology* **74** 241–247. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2010.03900.x>)
- Scaroni C, Albiger N, Daniele A, Dassi F, Romualdi C, Vazza G, Regazzo D, Ferrau F, Barresi V, Maffei V, *et al.* 2019 Paradoxical GH increase during OGTT is associated with first-generation somatostatin analog responsiveness in acromegaly. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **104** 856–862. (<https://doi.org/10.1210/jc.2018-01360>)
- Seino Y, Fukushima M & Yabe D 2010 GIP and GLP-1, the two incretin hormones: similarities and differences. *Journal of Diabetes Investigation* **1** 8–23. (<https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00022.x>)
- Sherman SK, Maxwell JE, Carr JC, Wang D, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM & Howe JR 2014 GIPR expression in gastric and duodenal neuroendocrine tumors. *Journal of Surgical Research* **190** 587–593. (<https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.01.044>)
- St-Jean M, Ghorayeb N El, Bourdeau I & Lacroix A 2018 Aberrant G-protein coupled hormone receptor in adrenal diseases. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism* **32** 165–187. (<https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.01.003>)
- Szeczówka J, Grill V, Sandberg E & Efiendic S 1982 Effect of GIP on the secretion of insulin and somatostatin and the accumulation of cyclic AMP in vitro in the rat. *Acta Endocrinologica* **99** 416–421. (<https://doi.org/10.1530/acta.0.0990416>)
- Trümper A, Trümper K & Hörsch D 2002 Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in β (INS-1)-cells. *Journal of Endocrinology* **174** 233–246. (<https://doi.org/10.1677/joe.0.1740233>)
- Verma MK, Goel R, Krishnadas N & Nemmani KVS 2018 Targeting glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor for neurodegenerative disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **22** 615–628. (<https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1487952>)
- Waser B, Beetschen K, Pellegata NS & Reubi JC 2011 Incretin receptors in non-neoplastic and neoplastic thyroid C cells in rodents and humans: relevance for incretin-based diabetes therapy. *Neuroendocrinology* **94** 291–301. (<https://doi.org/10.1159/000330447>)
- Waser B, Rehmann R, Sanchez C, Fourmy D & Reubi JC 2012 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptors in most gastroenteropancreatic and bronchial neuroendocrine tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97** 482–488. (<https://doi.org/10.1210/jc.2011-2454>)
- Wells SA, Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, Lee N, MacHens A, Moley JF, Pacini F, *et al.* 2015 Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* **25** 567–610. (<https://doi.org/10.1089/thy.2014.0335>)
- Westendorf JM & Schonbrunn A 1985 Peptide specificity for stimulation of corticotropin secretion: activation of overlapping pathways by the vasoactive intestinal peptide family and corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* **116** 2528–2535. (<https://doi.org/10.1210/endo-116-6-2528>)
- Widenmaier SB, Ao Z, Kim SJ, Warnock G & McIntosh CHS 2009 Suppression of p38 MAPK and JNK via Akt-mediated inhibition of

- apoptosis signal-regulating kinase 1 constitutes a core component of the β -cell pro-survival effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Journal of Biological Chemistry* **284** 30372–30382. (<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.060178>)
- Wu T, Rayner CK & Horowitz M 2016 Incretins. *Handbook of Experimental Pharmacology* **233** 137–171. (https://doi.org/10.1007/164_2015_9)
- Yabe D & Seino Y 2011 Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and β cell preservation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **107** 248–256. (<https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2011.07.010>)
- Yip DT, Hassan M, Pazaitou-Panayiotou K, Ruan DT, Gawande AA, Gaz RD, Moore FD, Hodin RA, Stephen AE, Sadow PM, *et al.* 2011 Preoperative basal calcitonin and tumor stage correlate with postoperative calcitonin normalization in patients undergoing initial surgical management of medullary thyroid carcinoma. *Surgery* **150** 1168–1177. (<https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.09.043>)

Received in final form 10 March 2022

Accepted 15 March 2022

Accepted Manuscript published online 17 March 2022

Supplementary Material and Methods

MTC PATIENTS

The cohort included 49 MTC patients (21 males) with a median age at surgery of 56 years (range 4-87) and a median follow-up of 66 months (range 1-181 months). Thirty-seven were sporadic (~36% carried a somatic RET mutation) and twelve were familial cases. Tumors were staged according to the 7th TNM classification: twenty were stage I, nine stage II, six stage III, and fourteen stage IV.

PLASMIDS AND CHEMICALS

The CRE-Luc vector (Clontech Laboratories, USA) contains five cAMP-responsive elements upstream of the herpes simplex virus thymidine kinase (Tk) promoter and the reporter gene luciferase. pRL-Tk, coding for the Renilla luciferase gene under the control of the Tk promoter, was always used as a second reporter control plasmid (Promega, Italy).

GIP, forskolin (FSK), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 2,5-di-tert-butylhydroquinone (TBQ), Ionomycin (Iono), and Vandetanib (Van) were purchased from Sigma-Aldrich, XL184 from Selleck Chemicals, while H-89 dihydrochloride (H89) were from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). The powders were dissolved either in water (GIP, FSK), dimethyl sulfoxide (IBMX, XL184, Van, Iono, H89), or ethanol (TBQ) following the manufacturer's instructions.

TRANSCRIPTS QUANTIFICATION

Unless otherwise specified, all chemicals used in the droplet digital PCR (ddPCR) and RT-qPCR assays were provided by Bio-Rad (Milan, Italy) and Applied Biosystems (Milan, Italy), respectively. A QX200 Droplet Digital PCR system was used to quantify the absolute copy numbers of GIPR in MTCs. The cDNA mixture was divided into 20,000 droplets through a QX200™ Droplet Generator for each sample. Each mixture consisted of 10 µL of 2X ddPCR™ Super Mix for probes, 1 µL of each target (GIPR, Hs00609210_m1) and reference (HMBS, Hs00609296_g1) amplification primer/probe mix, 8 µL of the tumoral specimen's cDNA template (1.25 ng/µL). The amplification cycle comprises of an initial cycle of 95°C for 10", followed by 40 cycles at 94°C for 30" and 60°C for 1', and one final cycle

at 98°C for 10'. All cycling steps utilized a ramp rate of 2°C/sec. Fluorescence was read on the QX200 Droplet Reader using a two-channel setting to detect FAM (*GIPR*) and VIC (*HMBS*) and analyzed by the QuantaSoft™ Software v.1.7.4. The threshold, which defines the separation between positive and negative droplets, was designated based on the no-template control (NTC). The number of positive droplets is used to estimate the target concentration with the application of Poisson correction. In each sample, data are reported in arbitrary units (i.e., ratio of *GIPR* mRNA to that of *HMBS*).

RT-qPCR experiments were performed according to MIQE guidelines. The GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega) and TaqMan Gene Expression Assays for the *Calcitonin* (CT, Hs01100741_m1) were used in an ABI PRISM 7900HT Sequence Detector. All samples were tested in duplicate in a MicroAmp 96-well reaction plate sealed with an optical adhesive film with 12.5 ng of cDNA in 20 µL of the reaction mixture. NTCs were included in each run. The PCR conditions were 95°C for 2', followed by 40 cycles at 95°C for 15" and 60°C for 1'. Data were analyzed with SDS rel.2.4, with an automatically set baseline and fluorescence threshold adjusted for measuring quantification cycle (Cq) values. Validation experiments performed using the standard curve method with five serial dilutions of genomic DNA from control subjects showed identical amplification efficiencies (100% ± 10%) calculated according to the formula $E = 10^{1/\text{slope}} - 1$, for all assays. The amount of each target gene relative to β-actin (ACTB, Hs99999903_m1) for RT-qPCR was ascertained by the ΔΔCq method.

IMMUNOBLOTTING

For each sample, 25 µg were resolved by SDS-PAGE on a 4-12% Bis-Tris NuPAGE gel (Invitrogen) and transferred onto nitrocellulose membrane by Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-Rad). Membranes were blocked for 2h with 5% nonfat dry milk, incubated overnight at 4°C with a primary antibody followed by a 1-hour incubation at room temperature with HRP-conjugated secondary antibodies, and detected with the Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo) with the Uvitec Imaging System (Uvitec Cambridge, UK). Primary antibodies, all but one from Cell Signaling Technology (Danvers, MA), were anti-Erk1/2 (RRID: AB_390779), anti-phospho-Erk1/2 (RRID: AB_2315112), anti-Akt (RRID: AB_329827), anti-phospho-Akt-Ser473 (RRID: AB_2315049), and anti-PKA substrates (RRXS/T) (RRID:

AB_331817). The anti-GIPR (RRID: AB_2904245) were purchased from US Biological (Salem, MA, USA). Besides the anti-PKA substrates (1:2000), all primary antibodies were diluted 1:1000. Expression was corrected for differences in protein loading by probing blots with anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibody (GAPDH, diluted 1:2000; Merck Millipore; RRID: AB_2107445). Band intensities were quantified using Image Lab™ software (Ver 6.1, BioRad).

CONFOCAL MICROSCOPY

TT and MZ-CRC-1 cells (10^4 and 2×10^4 cells/well in 12-well plates, respectively) were seeded on poly-d-lysine coated glass in complete medium and allowed to grow. After 48h, the cells were fixed by incubating in 2% paraformaldehyde for 20 minutes at RT. Afterwards, cells were washed twice in PBS and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 15 minutes at RT, followed by blocking step with 0,1% Tween20 in 1% BSA (Sigma) in PBS for 1h. GIPR expression was visualized with a rabbit polyclonal antibody (RRID: AB_2904245, O/N, 4°C, 1:400) followed by a donkey anti-rabbit IgG secondary antibody Alexa Fluor 594-conjugated (Life Technologies, 1:500, TA).

The primary and secondary antibodies were diluted in PBS containing 0.5% BSA. Secondary antibodies were also used in the absence of primary antibodies to assess non-specific binding. The specific membrane marker wheat germ agglutinin (WGA) conjugated with Oregon Green® 488 was applied to cells at 5 µg/mL in PBS for 10 min at RT to label the plasma membrane. DNA of the nuclei was stained using DRAQ5™ (Abcam, 10µM in PBS).

The glass slides were mounted with Mowiol anti-fade solution (Sigma-Aldrich) and analyzed with the confocal microscope TCS SP8 (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) using a 100×/1.4 oil immersion objective (image size 1024 × 1024 pixel). Images were acquired with a z interval of 3 µm (Z-sections) using a DFC365FX camera and the Leica Application Suite (LAS-AF) 3.1.1 software. (Leica Microsystems).

CALCIUM IMAGING

TT, MZ-CRC-1, and primary cells were loaded with the cell-permeant probe Fura-2 AM (1 μ M) for 30' at 37°C, in HEPES-buffered Ringer-modified saline containing 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₃PO₄, 1 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose, and 20 mM Hepes, pH 7.4. Cells were washed and incubated in saline for another 10' at RT to complete de-esterification, before starting live-cell imaging. Images were acquired every 1s with a 63x, 1.4 NA oil immersion objective (Olympus) using the CellR software and processed using ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Changes in Ca²⁺ concentration were measured as changes in the background-subtracted 510 nm fluorescence emission intensities upon excitation at 340/380 nm and expressed as $\Delta R/R_0$.

CELL INFECTION AND FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET) IMAGING

Primary lymph node cells were seeded onto 15 mm diameter round glass coverslips, coated with polylysine in 12-well plates, and infected for 12h with adenoviral particles bearing the FRET cAMP sensor EPACS¹⁸⁷ (Ad-H187). Imaging experiments were performed 24h from infection. Cells were maintained at RT in HEPES-buffered Ringer-modified saline and imaged with an inverted microscope (Olympus IX81) equipped with a CellR imaging system and a beam-splitter optical device (Multispec Microimager; Optical Insights). Images were acquired and processed as described above, except for the acquisition time (5" instead of 1").

FRET changes were measured as changes in the background-subtracted 480/545 nm fluorescence emission intensities upon excitation at 430 nm and expressed as $\Delta R/R_0$, where R is the ratio at time t and R₀ is the ratio at time = 0 s; $\Delta R = R/R_0$.

STATISTICAL ANALYSIS

In cell culture studies, all experiments were performed at least twice, and the results are presented as the mean \pm SD of at least triplicate determinations. The student's t-test determined statistical significance. To correlate clinical with molecular data, proportions and rates for categorical variables, means and standard deviations, or medians, and interquartile ranges (IQR) for parametric or nonparametric variables were calculated. The Shapiro-Wilks test was performed to test for normality.

The correlation between quantitative variables was analyzed with the Spearman correlation and simple linear regression. Groups were compared with either the χ^2 (categorical variables) or the Wilcoxon Mann-Whitney test (quantitative variables). The significance level was set at $p < 0.05$ for all tests.

1 **ST1:** MTC Patients' clinical features.

#	Gen der	Age at surgery (y)	Family history	RET genotype*	Preoperative CT (ng/L)	Postoperative CT (ng/L)	Cured#	Max tumor size (cm) [§]	Ki-67 [¶]	T	N	M	Stage	GIPR/HMBS ratio
MTC_1	F	59	None	M918T	1840	41.9	No	1.4	17.2	1	1	0	IV	14.30
MTC_2	F	43	None	wt	58.4	1.5	Yes	0.5	NA	3	0	0	II	14.00
MTC_3	M	18	Yes	C609S	12.3	1	Yes	0.35	NA	1	0	0	I	0.02
MTC_4	F	62	None	wt	20.4	2.4	Yes	0.8	3.6	1	1	0	III	0.00
MTC_5	F	28	None	wt	5.5	1	Yes	0.6	NA	1	0	0	I	0.03
MTC_6	F	56	None	wt	4000	1760	No	3.0	NA	2	1	1	IV	8.70
MTC_7	F	64	None	M918T	19000	3688	No	3.0	79	3	1	1	IV	4.90
MTC_8	M	56	None	M918T	3720	96.1	No	2.4	13	2	0	0	II	9.00
MTC_9	F	41	Yes**	C620G	1088	3.5	Yes	2.4; 1.5	NA	2	0	0	II	30.00
MTC_11	M	4	Yes	C634R	11	19.6	Yes	NA	NA	1	0	0	I	0.07
MTC_12	M	42	Yes	V804M	3013	562	No	3.2	NA	3	1	0	IV	6.20
MTC_13	M	52	None	del631E	8800	52700	No	2.5	1.6	4	1	1	IV	6.40
MTC_14	M	66	None	wt	2000	2.1	No	2.6	163.6	3	1	1	IV	23.00
MTC_15	M	60	None	p.D898_E901del	22931	32568	No	4.0	47.8	3	1	1	IV	2.10
MTC_16	F	45	None	C634W	83	60	No	1.0	2.4	1	0	0	I	3.70
MTC_17	M	70	None	wt	5290	4000	No	2.0	18.8	3	1	0	IV	8.00

MTC_18	M	56	None	M918T	3720	96.1	No	2.4	13	2	0	0	II	17.00
MTC_19	M	66	None	M918T	3680	6000	No	2.4	41.4	3	1	1	IV	2.20
MTC_20	F	61	None	p.D898_E901del	2258	1	Yes	3.0	1	2	1	0	III	6.10
MTC_21	F	32	Yes	S891A	63.9	1	Yes	0.8	NA	1	0	0	I	18.00
MTC_22	M	49	None	M918T	5500	19.6	No	1.1	14	3	1	0	III	36.00
MTC_23	F	51	None	wt	60.2	2	Yes	1.0	16	1	0	0	I	58.00
MTC_24	F	68	None	wt	43	5	Yes	0.8	NA	1	0	0	I	8.30
MTC_26	M	54	None	M918T	2000	27	No	5.0	5	3	1	0	IV	7.80
MTC_27	F	58	None	wt	63	1.8	Yes	0.9	NA	1	0	0	I	45.00
MTC_28	F	72	None	wt	44	1	Yes	1.0	NA	1	0	0	I	52.00
MTC_29	F	58	None	wt	59	1	Yes	0.7	NA	1	0	0	I	81.00
MTC_30	F	12	None	wt	64	2	Yes	0.35; 0.4	NA	3	0	0	II	3.90
MTC_31	F	26	Yes	E768D	23	2.2	Yes	0.7	NA	1	0	0	I	12.40
MTC_32	F	28	Yes	NA	9.5	5	Yes	0.4; 0.3	NA	1	0	0	I	0.04
MTC_33	F	24	Yes**	C620G	12	5	Yes	0.3	NA	1	0	0	I	0.42
MTC_34	M	24	Yes	C634R	511	4	Yes	2.5	NA	3	0	0	II	27.00
MTC_35	F	28	Yes	C634R	940	70.4	No	1.5	NA	1	0	0	I	6.60
MTC_36	M	24	Yes	NA	NA	3	Yes	0.4; 0.3; 0.2 ;0.3	1.5	1	0	0	I	0.07
MTC_37	F	25	Yes	NA	NA	1	Yes	0.4; 0.4	1.5	1	0	0	I	0.08

MTC_38	F	67	None	wt	NA	1	Yes	1.3	NA	1	0	0	I	13.10
MTC_39	F	79	None	C634Y	828	7	Yes	1.3	NA	1	0	0	I	33.00
MTC_40	F	76	None	wt	824	20	No	1.8	NA	1	0	0	I	0.82
MTC_41	F	64	None	wt	NA	1	Yes	0.3; 1.0	6	1	0	0	I	26.00
MTC_42	M	80	None	wt	611	1	Yes	2.2	NA	2	0	0	II	7.00
MTC_43	F	71	None	wt	325	25	No	1.2	5	3	0	0	II	0.36
MTC_44	F	61	None	wt	NA	12.5	No	1.7	6	3	0	0	II	16.70
MTC_46	F	74	None	wt	NA	6	NA	1.4	13.0	3	1	0	III	4.10
MTC_47	M	66	None	wt	590	>2000	No	1.7	20.2	3	1	0	III	9.50
MTC_48	M	87	None	wt	390	100	No	0.6	NA	1	1	0	III	0.04
MTC_49	M	41	None	wt	1600	800	No	1.1	33	3	1	0	IV	5.20
MTC_50	M	64	None	wt	950	3	Yes	1.4	14.8	3	1	0	IV	12.20
MTC_51	M	73	None	wt	2310	219	No	5.5	4	3	1	0	IV	3.90
MTC_53	M	51	None	M918T	472	202	No	1.5	NA	3	1	0	IV	33.00
MTC_54	M	41	None	A883F	34300	1400	NA	1.4	NA	1a	1b	X	IV	10.10

2 ^{*}Somatic mutations in MTC patients have been evaluated elsewhere (24).

3 ^{**}MTC_9 and MTC_33 are blood relatives.

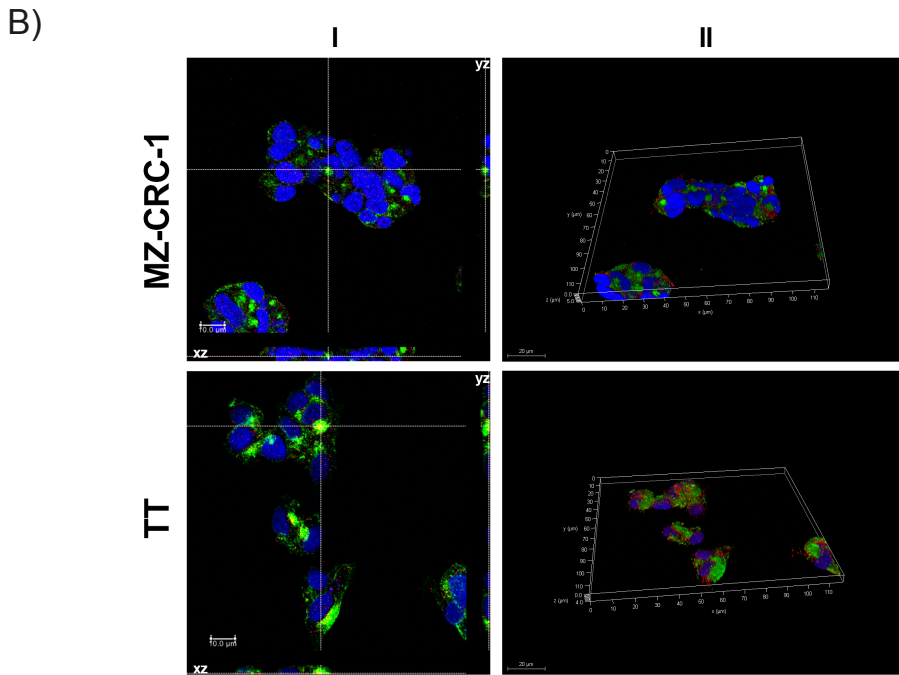
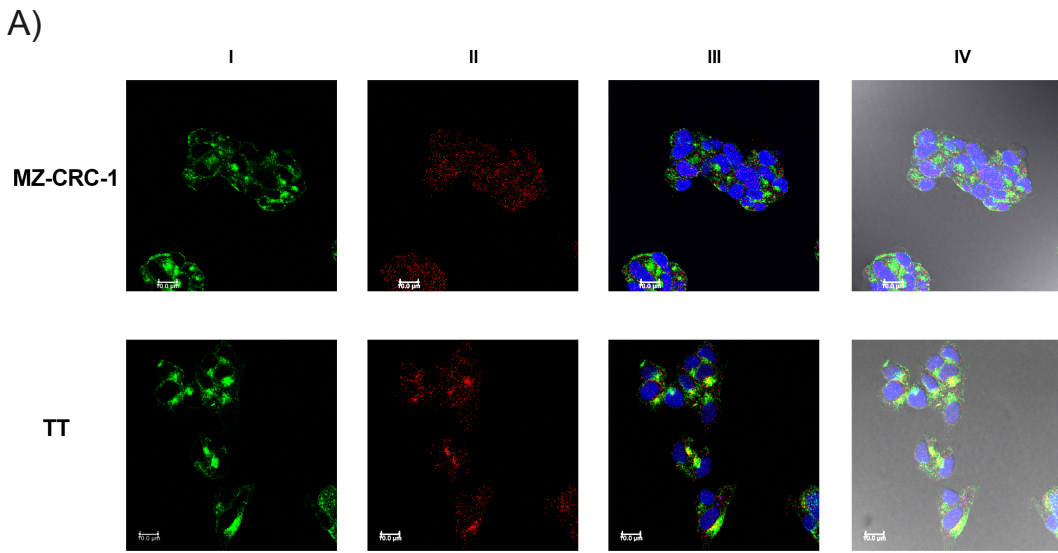
4 [#]Patients biochemically cured after surgery.

5 [§]In case of multiple tumors, the maximal diameter for each mass has been reported.

6 [¶]Ki-67 was calculated by quantitatively assessing three non-overlapping fields at × 400 and photographs were taken using Olympus E-330 DSLR (manufacturer: Olympus Corporations

7 of America) camera.

8 Abbreviations: F, female; M, male; NA, data not available; wt, wild type.



Supplementary Figure 1

A) Confocal images of MZ-CRC-1 and TT cells. Cells were stained with anti-human WGA-iFluor-488 conjugate (Column I, green fluorescence) and with anti-human GIPR antibody (column II, red fluorescence). DNA was labelled with DRAQ5 (blue fluorescence). Morphology of cells were visualized using differential interference contrast (DIC). Merged image of only fluorescence channels (column III). Merged image of DIC and fluorescences (column IV). Images were acquired by confocal microscope; Leica TCS SP8 with z-interval of 1 μm using a 100x/1,4 oil immersion object (image size 1024 x 1024 pixel) and a DFC365FX camera. Scale bar 10 μm . B) Orthogonal projection, x/z and y/z planes, of overlay fluorescence images (column I). The yellow fluorescence is the co-expression of GIPR with WGA. Scale bar 10 μm . 3D images (x,y,z axis) of the fluorescence overlay images demonstrate the expression of GIPR into the phospho lipids bilayer (column II). Scale bar 20 μm .