



## **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI**

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE  
XXIV CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MORFOLOGICHE

### **Isolamento e caratterizzazione biologico- molecolare di cellule tumorali simil-staminali da una linea cellulare derivata da un carcinoma papillare tiroideo**

**Tesi di dottorato di  
Paola Caria**

**Relatori:**  
**Prof.ssa Valeria Sogos**  
**Prof.ssa Roberta Vanni**

**Coordinatore:**  
**Prof.ssa Valeria Sogos**

**ESAME FINALE ANNO ACCADEMICO  
2010 - 2011**

# INDICE

## **INTRODUZIONE**

1. Cellule staminali tumorali pag.1

1.1 Origine delle cellule staminali tumorali pag.5

1.2 Divisioni delle cellule staminali pag.8

2. Cellule staminali tumorali tiroidee pag.9

**SCOPO DELLO STUDIO** pag.17

## **MATERIALI E METODI**

1. Colture cellulari pag.18

2. Formazione delle tirosfere pag.19

3. Saggi di autorinnovamento pag.20

4. Efficienza di formazione delle sfere pag.21

5. Analisi al Fluorescence Activated Cell Sorter pag.21

6. Estrazione dell'RNA totale pag.22

7. Analisi molecolare: Reverse Transcription-PCR pag.23

8. Analisi statistica pag.26

## **RISULTATI**

1. Formazione delle tirosfere pag.27

2. Autorinnovamento pag.29

3. Efficienza di formazione delle sfere pag.29

4. Caratterizzazione molecolare delle cellule parentali  
e delle generazioni di tirosfere pag.33

5. Isolamento delle tre frazioni cellulari al FACS pag.36

6. Caratterizzazione molecolare delle popolazioni isolate pag.37

**DISCUSSIONE** pag.40

**BIBLIOGRAFIA** pag.50

**PUBBLICAZIONI** pag.62

Ringraziamenti pag.63

# **INTRODUZIONE**

## **1. CELLULE STAMINALI TUMORALI**

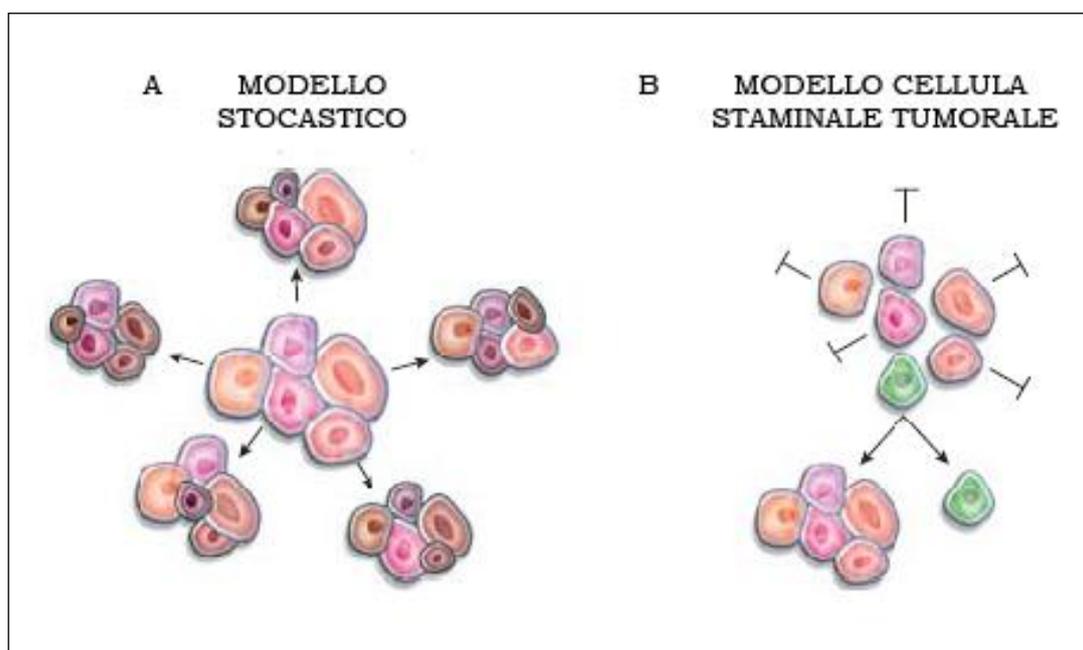
Meccanismi cellulari che intervengono nel mantenimento dell'integrità del genoma, sia a livello di controllo del danno del DNA, sia a livello del controllo della distribuzione dei cromosomi durante la mitosi, contrastano costantemente il processo neoplastico. Il tumore si origina quindi, quando eventi genetici ed epigenetici determinano la perdita dei sistemi di controllo del ciclo cellulare interferendo con il suo corretto svolgimento e determinando il passaggio dallo stato d'integrità allo stato d'instabilità del genoma. Questa condizione è basilare per la trasformazione cellulare poiché favorisce l'acquisizione progressiva di nuove mutazioni.

Per gran parte del ventesimo secolo, l'iniziazione e la progressione dei tumori è stata spiegata attraverso il modello stocastico, secondo il quale una cellula, o un gruppo di cellule, diventano tumorigeniche dopo aver acquisito una prima mutazione somatica e, successivamente, un accumulo di variazioni genomiche causa della proliferazione e della sopravvivenza di cloni cellulari selezionati. I cloni predominanti mantengono il tumore e conservano la capacità di iniziare la tumorigenesi se impiantati in topi immunodepressi. Secondo questo modello, il tumore è composto da uno o più cloni con uguale grado di crescita e, quindi, tutte le cellule hanno la stessa probabilità di iniziare e propagare la neoplasia (Fig. 1A).

Il modello presenta due rimarchevoli limitazioni: da un lato non considera che i tumori sono morfologicamente e funzionalmente eterogenei, dall'altro non considera che per riformare un nuovo tumore è necessario un numero abbondante di cellule. Questa

osservazione è in contrasto con l'ipotesi che ogni cellula della massa tumorale può causare il tumore (Sengupta et al., 2010).

Negli ultimi anni è stato proposto un altro modello che, al contrario di quello stocastico, stabilisce che il tumore ha origine da una popolazione rara di cellule, ovvero le cellule staminali del cancro (cancer stem cells, CSCs) o le cellule iniziatrici del tumore. Questa popolazione cellulare è reperibile all'interno della massa tumorale e possiede la capacità di auto-rinnovamento (self-renewal), che garantisce l'eterogeneità gerarchica di alcuni tumori e gioca un ruolo cruciale nello sviluppo, nella progressione e nel mantenimento della neoplasia (Fig. 1B). Inoltre, le cellule staminali tumorali non sarebbero responsabili solo dello sviluppo tumorale ma anche dell'aumento dell'aggressività, della recidività e delle metastasi (Monteiro et al., 2010).

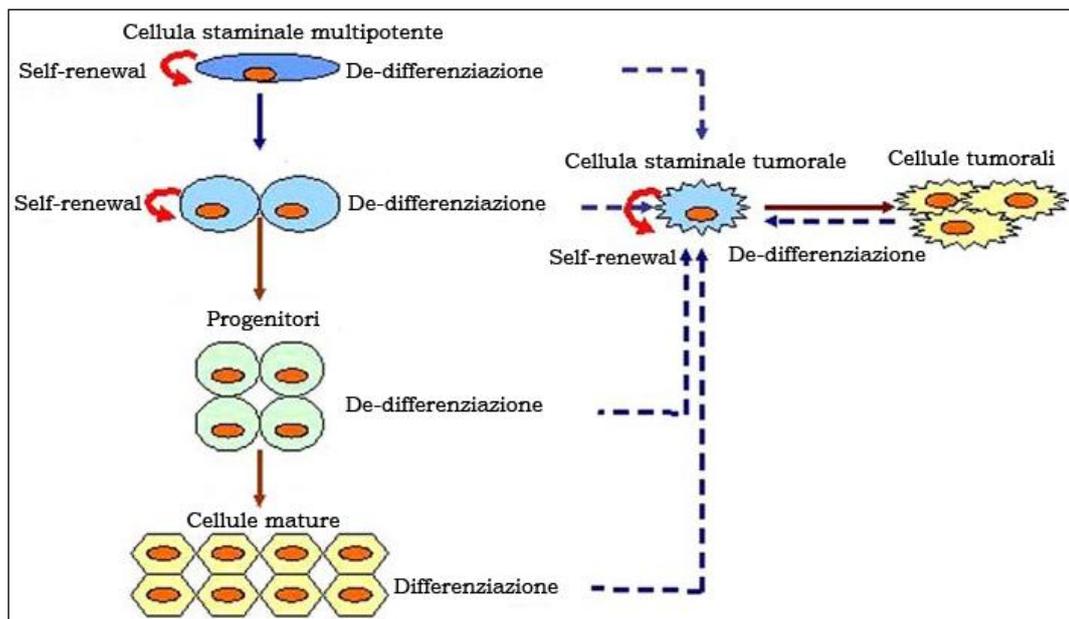


**Figura 1.** Modello stocastico *versus* modello cellula staminale tumorale.

### 1.1 Origine delle cellule staminali tumorali

L'origine e la relazione delle CSCs con le cellule staminali adulte rimane a tutt'oggi elusiva (Wu et al., 2008) (Fig. 2). Alcuni autori hanno postulato che le CSCs derivano da cellule staminali adulte mutate (Reya et al., 2001) sostenendo che, tali cellule, possono causare tumorigenesi alterando i pathways che regolano l'auto-rinnovamento. Esse infatti impiegano, nel processo ontogenetico, i medesimi pathways coinvolti nel self-renewal delle cellule staminali adulte tissutali, le quali sono normalmente presenti nei tessuti e sono responsabili del loro regolare rinnovamento.

Sebbene questo sia il caso più probabile, non tutte le cellule tumorali che derivano da cellule staminali adulte mutate sono inevitabilmente cellule staminali tumorali. Al contrario, è stato speculato che le CSCs possono derivare da trasformazioni oncogeniche di *transit amplifying cells* (Clarke et al., 2006), da cellule progenitrici (Krivtsov et al., 2006; Jamieson et al., 2004) oppure, da cellule differenziate (Sun et al., 2005). E' stato suggerito, infatti, che cellule somatiche differenziate possono riacquisire proprietà stem-like per riattivazione di pathways che promuovono l'auto-rinnovamento associato alla trasformazione neoplastica (Welte et al., 2010).



**Figura 2.** Origine delle cellule staminali tumorali (modificata da Wu, 2008).

Come le cellule staminali adulte, anche le CSCs sono state per la prima volta identificate nel sistema ematopoietico. Le prime evidenze sulla loro esistenza sono state ottenute negli anni '90, grazie a studi sulla leucemia mieloide acuta (AML). Lapidot e i suoi collaboratori dimostrarono che solo una piccola popolazione di cellule tumorali leucemiche, con fenotipo CD34+/CD38-, aveva la capacità di formare il tumore una volta inoculata in un topo NOD/SCID (*non-obese diabetic, severe combined immunodeficient*) (Lapidot et al., 1994). Il fenotipo di queste cellule era simile a quello delle cellule staminali normali ematopoietiche e suggeriva, quindi, che esse potevano derivare da cellule staminali adulte mutate (Bonnet et al., 1997).

L'identificazione di cellule staminali leucemiche ha alimentato nuove ricerche su altri tipi di tumore portando alla dimostrazione dell'esistenza di CSCs anche nei tumori solidi. Al-Hajj e collaboratori (2007) furono i primi a identificare e isolare una subpopolazione di cellule dal tumore al seno. Tali cellule avevano la capacità, *in vivo*, di

formare il tumore in topi immunodepressi mentre la restante popolazione cellulare del tumore aveva questa capacità solo quando iniettata in alta dose. La popolazione di cellule tumorigeniche è stata identificata sulla base dell'espressione di due marcatori di superficie. Iniettando circa 100 cellule CD44+CD24-/low si formava il tumore mentre la popolazione con fenotipo diverso non era in grado di formarlo.

Risultati simili sono stati ottenuti nei tumori cerebrali. In questo caso, le cellule staminali tumorali erano positive per il marcatore CD133 (Singh et al., 2003). Molto più recentemente simili risultati sono stati raggiunti con altri tipi di tumori, tra i quali il tumore polmonare (Kim et al., 2005), il tumore del colon (O'Brien et al., 2007), dell'ovaio (Zhang et al., 2008), del pancreas (Li et al., 2007), della prostata (Lang et al., 2009) e della tiroide (Malaguarnera et al., 2010). L'insieme di tutti questi risultati ha quindi portato a favorire il modello delle cellule staminali tumorali rispetto al modello stocastico. Mentre, il modello stocastico prevede che tutte le cellule del tumore siano capaci, teoricamente, di dare origine e promuovere la crescita tumorale, il modello della CSCs propone, invece, che solo una rara popolazione di cellule ne sia capace. Tuttavia, va sottolineato che i due modelli non sono necessariamente mutualmente esclusivi e caratteristiche del modello stocastico possono entrare in gioco all'interno della subpopolazione delle cellule staminali tumorali (Chang et al., 2008). Il modello mantiene quindi, delle basi sperimentali solide e le differenze sulla frequenza delle CSCs osservate tra i diversi tumori riflette il diverso tipo di neoplasia ed organismo ospite utilizzato nella sperimentazione (Gupta et al., 2009). Data l'ampia diversità delle caratteristiche attribuite alle cellule staminali tumorali, l'Associazione Americana per la Ricerca sul Cancro (AACR), nel 2006, ha pensato di uniformare il concetto definendo la cellula staminale tumorale come "una cellula all'interno

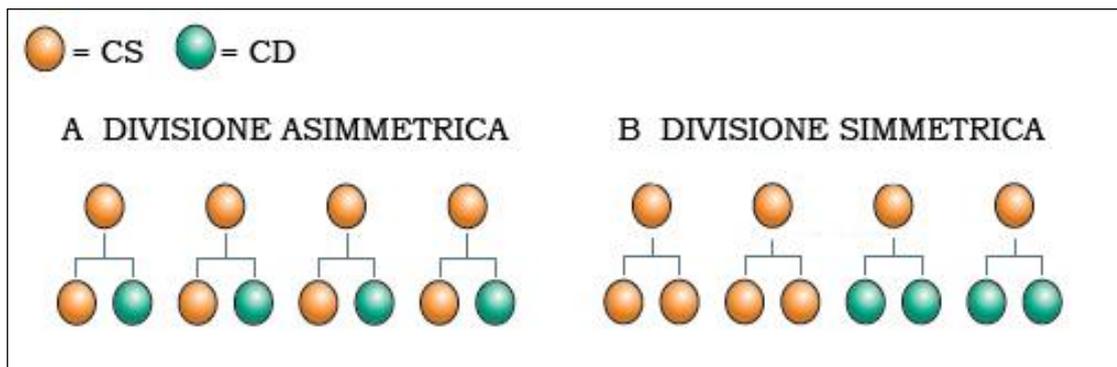
del tumore che possiede la capacità di self-renewal e causa l'eterogeneità delle cellule all'interno della massa tumorale" (Clarke et al., 2006).

E' stato inoltre dimostrato che le cellule con fenotipo simil-staminale sono capaci di resistere alla chemioterapia convenzionale, causando la ricomparsa del tumore dopo che questo è stato asportato (Baguley et al., 2006). La conoscenza dei meccanismi che portano allo sviluppo del tumore e la comprensione di quelli implicati nella farmacoresistenza aprono nuovi orizzonti per lo sviluppo di farmaci mirati innovativi.

### *1.2 Divisioni delle cellule staminali*

Le cellule staminali (CSs) somatiche hanno la capacità di rimanere quiescenti o possono dividersi dando origine a due cellule figlie, una staminale e l'altra che invece procede verso la differenziazione per mantenere l'omeostasi del tessuto. Questo tipo di divisione viene detta asimmetrica (Fig. 3A). Tale strategia permette, con un'unica divisione, di gestire sia il comparto staminale che quello delle cellule differenziate; tuttavia, in situazioni particolari, quali un danno tissutale, le cellule staminali vanno incontro a divisione simmetrica (Fig. 3B) per permettere la variazione del numero di cellule nei due comparti (Morrison et al., 2006). In questo caso una cellula staminale darà origine a due cellule figlie uguali che saranno entrambi staminali oppure andranno incontro a differenziazione, perdendo di conseguenza le caratteristiche di staminalità e diventando cellule differenziate (CD). I meccanismi che mantengono l'equilibrio tra queste due strategie o che permettono la scelta di una rispetto all'altra sono stati fin ora poco indagati. Uno studio recente (Kahn, 2011) sostiene che l'andare incontro ad una divisione simmetrica

piuttosto che ad una asimmetrica sia un punto critico e fondamentale nella differenza tra una CS e una CSC. Sembra che la decisione sia regolata da coattivatori della catenina, dalla proteina CBP (CREB-binding protein) e dalla p300. Un incremento di trascrizione di CBP/catenina a discapito della trascrizione di p300/catenina incrementa il numero delle divisioni simmetriche e questa strategia sembra favorita dalle CSCs rispetto alle CS adulte.



**FIGURA 3.** Divisioni cellule staminali

## **2. CELLULE STAMINALI TUMORALI TIROIDEE**

La ghiandola tiroidea è un organo endocrino complesso da cui originano un eterogeneo gruppo di tumori con distinte caratteristiche cliniche e patologiche.

I carcinomi tiroidei sono i più comuni tumori maligni del sistema endocrino e, complessivamente, rappresentano l'1% di tutte le neoplasie maligne nell'adulto. Essi possono originare dalle cellule follicolari (95% circa) o dalle cellule C (5% circa) (DeLellis, 2006).

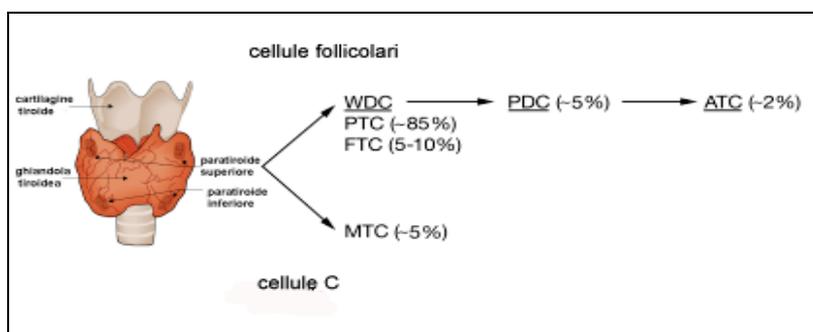
I tumori tiroidei in generale, rappresentano dal punto di vista della ricerca e della clinica, un argomento sempre più stimolante in quanto l'incidenza della patologia nodulare va aumentando più del 5% ogni anno. Anche se relativamente rara, la patologia pone il problema della diagnosi differenziale. Il confronto multidisciplinare di ricercatori e clinici ha aumentato in modo esponenziale le conoscenze sull'intera problematica e, grazie all'integrazione degli studi epidemiologici, clinici e molecolari, in particolare quelli sui tumori maligni a seguito della contaminazione da incidenti nucleari, sta portando allo sviluppo ed all'applicazione di nuovi approcci per la diagnosi, la prognosi e la terapia (Bombardieri et al., 2007).

I carcinomi derivanti dalle cellule follicolari sono suddivisi in:

- carcinomi ben differenziati (Well differentiated carcinoma, WDC) che includono i carcinomi tiroidei papillari (Papillary thyroid carcinoma, PTC, 85% dei casi) e i follicolari (Follicular thyroid carcinoma, FTC, 5-10% dei casi);
- carcinomi scarsamente differenziati (Poorly differentiated carcinoma, PDC, 5% dei casi);
- carcinomi indifferenziati (anaplastici) (Anaplastic thyroid carcinoma, ATC, 2% dei casi).

I carcinomi derivanti dalle cellule C costituiscono una unica classe istologica:

- carcinomi medullari (Medullary thyroid carcinoma, MTC, 5%), (Fig. 4)



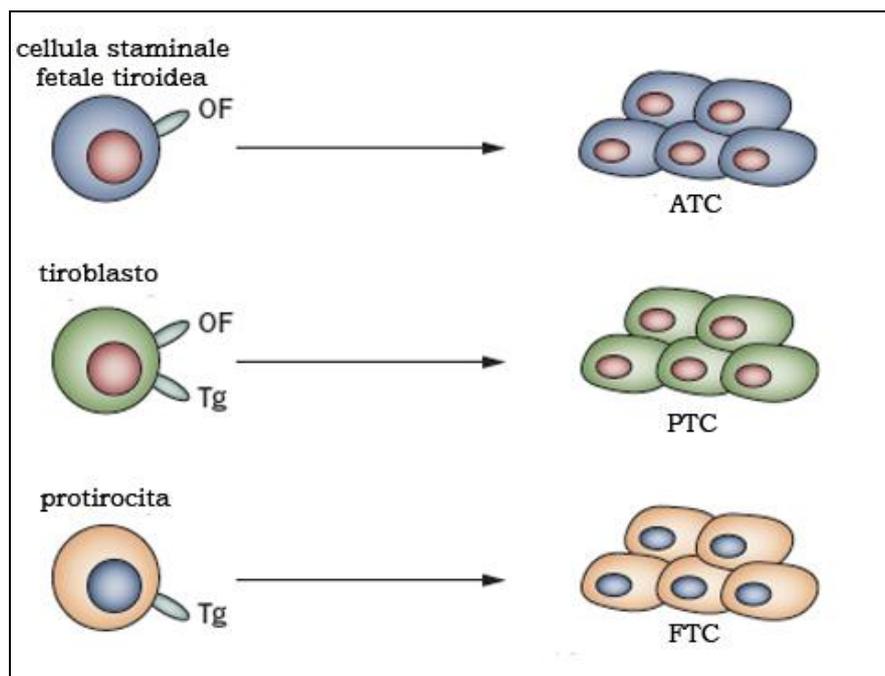
**Figura 4.** Origine dei tumori tiroidei (modificata da (DeLellis 2006))

Nelle lesioni tiroidee differenziate, geni critici sono frequentemente mutati attraverso due distinti meccanismi molecolari: mutazioni puntiformi e riarrangiamenti cromosomici. Le alterazioni prevalentemente riscontrate nei PTC sono l'attivazione del gene *BRAF*, secondaria a mutazioni geniche (meno frequentemente a fusioni geniche) nel 40-45% dei casi, e l'attivazione dell'oncogene *RET/PTC*, in seguito a riarrangiamenti cromosomici nel 10-20% dei casi. Altre alterazioni geniche, invece, riguardano una minore percentuale di casi (Nikiforov et al., 2011). Generalmente le anomalie di *BRAF* e di *RET* sono eventi oncogenici mutuamente esclusivi, come confermato anche in diverse linee cellulari isolate da PTC (Meireles et al., 2007). I FTC, diversamente, sono caratterizzati da mutazioni *RAS* nel 40-50% dei casi e dalla fusione genica *PAX8/PPAR $\gamma$*  conseguente a traslocazione cromosomica nel 30-35% dei casi (Nikiforov et al., 2011). Raramente queste due mutazioni si sovrappongono nella stessa lesione suggerendo che esse rappresentano differenti pathways

patogenetici nello sviluppo del carcinoma follicolare (Nikiforova et al., 2003).

Sia i PTC che i FTC possono essere caratterizzati da cariotipi anormali, sottogruppi-specifici, con i PTC che mostrano una stabilità cromosomica molto maggiore rispetto ai FTC (Caria e Vanni, 2011).

Se negli ultimi dieci anni si sono rese disponibili numerose conoscenze sugli eventi molecolari implicati nella tumorigenesi della ghiandola tiroidea, poche informazioni sono invece ad oggi disponibili riguardo la biologia cellulare di questo processo. In quest'ambito, di recente, l'interesse della ricerca si è rivolto allo studio delle CSCs per provarne l'esistenza anche in questo tipo di neoplasie. Sull'origine delle CSCs tiroidee sono state postulate varie teorie. Alcuni autori ipotizzano che esse possano derivare da de-differenziazione di tirociti maturi (Mitsutake et al., 2007; Gibelli et al., 2009) altri da cellule normali staminali o da precursori, secondo il modello di carcinogenesi fetale (Takano et al., 2007). Nello specifico, questa ipotesi sostiene che in base ai differenti livelli di espressione genica, le cellule staminali tumorali tiroidee potrebbero derivare da tre tipi di cellule tiroidee fetali preesistenti nella ghiandola: dalle cellule staminali fetali tiroidee, che esprimono fibronectina fetale (OF), ma nessuno dei marker di differenziazione dei tireociti maturi, deriverebbero gli ATC; dai tiroblasti che invece esprimono sia OF che tiroglobulina (Tg), deriverebbero i PTC; infine dai protireociti (tipi cellulari più differenziati rispetto alle cellule fetali e ai tiroblasti) che esprimono solo Tg, deriverebbero i FTC (Fig.5).



**Figura 5.** Modello di carcinogenesi fetale (modificata da Lin,2011).

Un'altra ipotesi considera che esse possano originarsi da un'anormale de-differenziazione delle cellule neoplastiche caratterizzate da *epithelial-mesenchymal transitions* (EMT) in un stadio tardivo nella malattia (Lin et al, 2011).

Al di là della loro origine, numerose evidenze sperimentali, basate su vari tipi di strategie, sia *in vivo* che *in vitro*, hanno dimostrato la presenza di CSCs nei tumori tiroidei.

Le prime ipotesi sull'esistenza di cellule staminali somatiche nella ghiandola tiroidea sono state postulate tra gli anni '80 e '90 in seguito all'osservazione che un numero minimo di cellule era necessario per ripopolare la tiroide nel topo in seguito il trapianto (Watanabe et al., 1983; Dumont et al., 1992). Nel 1995 Cameselle-Teijeiro e collaboratori hanno supposto un legame teorico tra l'oncogenesi del carcinoma papillare e l'esistenza di una popolazione

simil-staminale all'interno della ghiandola tiroidea. Tale ipotesi è stata successivamente supportata nel 2004 dal gruppo di Burstein, il quale ha dimostrato che cellule di origine embrionale rimanenti nella tiroide matura (solid cell nest, SCN) e cellule di PTC mostravano espressione per la proteina p63, implicata nella regolazione di cellule epiteliali staminali.

Negli ultimi anni, l'esistenza di CS adulte nella tiroide è stata rafforzata dal loro isolamento da campioni chirurgici di tiroide umana. Tali cellule esprimevano marcatori di staminalità come Oct4 (octamer binding transcription factor 4, tab. 1), di cellule endodermali come GATA-4 (GATA binding protein 4) e di differenziamento tiroideo PAX8 (paired box gene 8, tab. 2) (Thomas et al., 2006).

Sempre nello stesso anno è stata isolata una rara popolazione (side population, SP) con caratteristiche di staminalità e una popolazione non-SP da linee cellulari tumorali tiroidee (Mitsutake et al., 2007). La popolazione SP è risultata più clonogenica della non-SP ed esperimenti di microarray hanno identificato un profilo di espressione genica differente tra le due popolazioni (Tab. 1). Utilizzando il CD133 come marker di staminalità, altri gruppi hanno identificato in linee di ATC una popolazione di cellule positive per CD133 (Tab. 1) in grado di indurre tumori *in vivo* quando iniettata in topi immunodepressi (Zito et al., 2008; Frideman et al., 2009).

Recentemente, sono state isolate come sfere fluttuanti, dette tirosfere, cellule con proprietà *stem/progenitor-like* da tumori primari tiroidei (Malaguarnera et al., 2010; Todaro et al., 2010). Esse sono state coltivate in un terreno capace di arricchire la percentuale di cellule staminali utilizzando una combinazione di fattori di crescita EGF (epidermal growth factor) e bFGF (basic fibroblast growth factor) in terreno privo di siero (serum-free medium, SFM) (Lan et al., 2007).

Le tirosfere ottenute erano positive per alcuni marcatori di cellule staminali (Tab. 1) e mostravano una bassa o nessuna espressione di marcatori di differenziazione tiroidei (Tab. 2).

**Tabella 1.** Marcatori di progenitrici e/o cellule staminali di differenti carcinomi tiroidei o linee cellulari tumorali

<b>Marcatori di progenitori/cellule e staminali</b>	<b>PTC</b>	<b>FTC</b>	<b>ATC</b>	<b>UTC</b>	<b>Bibliografia</b>
<b>MYC, JUN, FZD5, HES1, JAG1</b>			POS		Mitsutake et al, 2007;
<b>CD133</b>	POS NEG	NEG	POS POS	NEG	Zito et al, 2008; Frideman et al, 2009; Malaguarnera et al 2010 Todaro et al, 2010
<b>OCT-4</b>	POS POS	POS	POS POS	POS	Zito et al, 2008; Friedman et al, 2009; Malaguarnera et al 2010 Todaro et al, 2010
<b>SOX-2</b>	POS				Malaguarnera et al 2010
<b>CD44</b>	POS NEG	NEG		NEG	Malaguarnera et al 2010 Todaro et al, 2010
<b>NANOG</b>	POS POS	POS		POS	Malaguarnera et al 2010 Todaro et al, 2010
<b>ALDH</b>	POS	POS		POS	Todaro et al 2010
<b>ABCG2</b>		POS	POS		Mitsutake et al, 2007 Malaguarnera et al 2010
<b>NESTINA</b>	POS	POS		NEG	Todaro et al, 2010
<b>P63</b>	POS	NEG			Burstein et al, 2004

JAG1: jagged1; SOX-2: sex determining region Y box protein 2; ALDH: aldeide deidrogenasi; NEG: negativo; POS: positivo;

**Tabella 2.** Marcatori di cellule tiroidee progenitrici differenziate.

<b>Marcatori</b>	<b>PTC</b>	<b>FTC</b>	<b>ATC</b>	<b>UTC</b>	<b>Bibliografia</b>
<b>Tg</b>	POS	POS		NEG	Todaro et al,2010; Zito et al, 2008
<b>TPO</b>	LIEV.POS		NEG		Zito et al, 2008; Malaguarnera et al, 2010
<b>TTF-1</b>	POS	POS	POS	NEG LIEV.POS	Todaro et al,2010; Malaguarnera et al, 2010; Zito et al, 2008
<b>TSH-R</b>	LIEV.POS				Malaguarnera et al, 2010
<b>PAX-8</b>	LIEV.POS		POS		Frideman et al, 2009; Malaguarnera et al, 2010;

TPO: tireoperossidasi; TSH-R: thyroid stimulating hormone receptor; TTF-1: thyroid transcription factor 1; NEG: negativo; POS: positivo.

## **SCOPO DELLO STUDIO**

In letteratura sono presenti convincenti evidenze (Setoguchi et al., 2004) che indicano che, nonostante linee cellulari stabilizzate da tumori siano mantenute in coltura per lunghissimo tempo, da esse sia possibile identificare fisicamente e isolare CSCs.

In questi ultimi anni la ricerca sulla possibile esistenza di CSCs nei tumori tiroidei si è rivolta soprattutto ai tumori anaplastici e preferenzialmente effettuata su linee cellulari (Mitsutake et al., 2007; Zito et al., 2008; Friedman et al., 2009). Al contrario, esistono poche evidenze dell'esistenza di cellule simil-staminali per quanto riguarda i tumori ben differenziati, PTC e FTC.

Per contribuire con nuove informazioni a questo riguardo e per caratterizzare un modello *in vitro* utilizzabile per futuri studi sulla carcinogenesi tiroidea, con questo studio, abbiamo identificato e caratterizzato, dal punto di vista morfo-funzionale e molecolare, cellule con proprietà simil-staminali da una linea cellulare derivata da un PTC e stabilizzata spontaneamente.

## MATERIALI E METODI

### 1. Colture cellulari

Le due linee cellulari utilizzate in questo studio sono la B-CPAP derivata da un carcinoma papillare tiroideo (gentile dono del Prof. Fusco, Università Federico II di Napoli) e la linea N-Thy-ori-3, derivata da cellule follicolari per transfezione con il virus SV-40, disponibile in commercio (Health Protection Agency Culture Collections).

La B-CPAP è una linea cellulare molto utilizzata per gli studi sui meccanismi della tumorigenesi tiroidea ed è tra le poche che non presentano cross-contaminazione con altre linee cellulari (Schweppe et al., 2008). Essa è stata ben caratterizzata dal punto di vista sia del profilo citogenetico-molecolare (Corso et al., 2002; Dettori et al., 2004) che molecolare (Pilli et al., 2009). Le cellule B-CPAP mostrano cariotipo aneuploide con un clone principale contenente diverse aneuploidie; nove marcatori clonali, invece, sono caratterizzate da mutazione *BRAF<sup>V600E</sup>* in omozigosi, da mutazione *TP53* e da assenza di mutazioni *RAS*, riarrangiamento *RET/PTC*, e amplificazione *c-MYC* (Meireles et al., 2007). Sono state descritte come immunoreattive per S-100, enolasi neuron-specifica e tireoglobulina (Fabien et al., 1994). La linea N-Thy-ori-3 deriva da cellule follicolari normali e mantiene caratteristiche morfologiche e fisiologiche dei tirociti senza evidenza di trasformazione maligna (Lemoine et al., 1989). Essa è stata ottenuta per transfezione con il virus SV-40 e, per questo motivo, presenta un cariotipo non stabile senza tuttavia mostrare alcuna anomalia specifica associata con i carcinomi tiroidei. Poiché, come è noto, le cellule normali *in vitro* vanno incontro a poche divisioni, le linee derivate da cellule normali transfettate rappresentano l'unica alternativa come controllo.

Entrambe le linee sono state coltivate in adesione a 37°C e in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>, utilizzando terreno DMEM/F12 (Gibco-BRL, Life Technologies, Milano, Italia) con 5% di siero bovino fetale (FBS), L-glutammina (2mM), streptomina (100µg/ml) e penicillina (100 U/ml) (Gibco-BRL).

## **2. Formazione delle tirosfere**

Allo scopo di identificare le condizioni ottimali di formazione, mantenimento e vitalità delle tirosfere sono state allestite colture cellulari in sospensione a diverse concentrazioni di semina. All'uopo, cellule in monostrato alla sub-confluenza dell' 80% di entrambe le linee (da qui in poi chiamate cellule parentali) sono state dissociate enzimaticamente (Accutase™ solution, Sigma-Aldrich, Milano) e meccanicamente ed il tasso di vitalità è stato determinato utilizzando il colorante vitale Trypan blue.

Il test di vitalità con Trypan Blue Solution (Sigma-Aldrich) si basa sulla esclusione del colorante da parte delle cellule vitali dotate di membrana cellulare integra. Il colorante penetra nelle cellule morte, con membrana danneggiata, colorandole di blu intenso. La sospensione cellulare è stata diluita (1:1) con il colorante e le cellule sono state esposte al colorante per 2 minuti. La conta è stata effettuata con l'utilizzo di una camera emocitometrica (Burker) e le cellule sono state contate, secondo le regole corrispondenti, al microscopio invertito. Stabilita la percentuale di cellule vitali, esse sono state seminate alle densità di  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$  e  $1 \times 10^4$  cellule/ml, in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> (Corning) in terreno permissivo, ovvero DMEM/F12 contenente 10ng/ml di EGF (Epidermal Growth Factor, Milteny Biotech), 20 ng/ml di bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor, Milteny Biotech), 2% di B27 (Invitrogen Life Technologies), L-

glutammina (2mM), streptomina (100µg/ml), penicillina (100 U/ml) (Gibco-BRL) e privo di siero (serum-free medium, SFM). Un'aliquota di SFM pari ad 1/4 del volume totale è stata aggiunta a giorni alterni. Per entrambe le linee cellulari, la comparsa delle prime sfere è stata osservata a partire dal 3° giorno fino al 14° giorno. Per determinare quale delle concentrazioni di semina fosse la più efficiente e determinante per la formazione di tirosfere con maggiore vitalità e numero di cellule, le tirosfere sono state dissociate a partire dal 5° giorno dalla semina e sottoposte al test di vitalità ed alla conta.

### **3. Saggi di autorinnovamento**

Come descritto nei risultati, le tirosfere della prima generazione (F1) hanno mostrato la crescita più efficiente al 7° giorno di coltura a partire dalla semina di  $2 \times 10^4$  cellule/ml. Per allestire i saggi di autorinnovamento, tali sfere F1 sono state raccolte per centrifugazione e dissociate sia enzimaticamente che meccanicamente fino ad ottenere una sospensione di singole cellule. Esse sono state utilizzate per la formazione della generazione F2, dopo il test di vitalità e la determinazione della concentrazione delle cellule come descritto nel precedente paragrafo.

Questo procedimento è stato ripetuto per diverse generazioni, non solo per valutare l'autorinnovamento, ma anche per stabilire per quante generazioni questa capacità fosse mantenuta. Le cellule ottenute dalla dissociazione delle tirosfere alle diverse generazioni sono state inoltre raccolte per la caratterizzazione molecolare.

#### **4. Efficienza di formazione delle sfere**

L'efficienza di formazione delle sfere (sphere forming efficiency, FSE) si valuta considerando il numero di cellule in grado di originare sfere (Bortolomai et al., 2010). La FSE per le due linee è stata calcolata sia a partire dalle cellule parentali che nelle diverse generazioni F. Le cellule sono state dissociate e seminate a densità clonale ( $5 \times 10^2$  cellule/ml) in piastre da 24 pozzetti (Corning) in SFM e mantenute in coltura per 15 giorni. La conta delle tirosfere ottenute è stata determinata con osservazione al microscopio ottico invertito a contrasto di fase (Olympus IMT-2) con obiettivo 10x.

La FSE è stata determinata usando la seguente formula: (numero delle sfere ottenute/numero delle cellule seminate)  $\times 100$ . Questo procedimento è stato ripetuto per tutte le generazioni successive ottenute.

#### **5. Analisi al Fluorescence Activated Cell Sorter**

Per individuare la popolazione di cellule simil-staminali (rappresentate dalle cellule quiescenti) le cellule isolate dalle tirosfere sono state sottoposte a separazione al Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) (FACSARIA II BD, Bioscience). All'uopo è stato utilizzato il saggio basato sul mantenimento del colorante fluorescente vitale PKH26 (Sigma-Aldric, St. Louis, MO) nel doppio strato lipidico della membrana plasmatica. Le cellule quiescenti mantengono il colorante fluorescente inserito nella membrana, mentre le cellule progenitrici dividendosi perdono la fluorescenza di membrana di generazione in generazione; ciò consente la separazione mediante FACS.

La colorazione con PKH26 è stata eseguita secondo il protocollo della casa produttrice. In breve, le cellule distaccate dal supporto e filtrate attraverso setacci cellulari di 40  $\mu\text{m}$  sono state marcate con PKH26 ( $10^{-7}\text{M}$ ) per 3 min. La marcatura è stata bloccata aggiungendo DMEM-F12 con siero al 5% seguita da tre lavaggi con terreno senza siero. Le cellule marcate sono state seminate come descritto al paragrafo 2. Come da protocollo stabilito precedentemente, dopo 7 giorni le tirosfere sono state raccolte e dissociate sia enzimaticamente che meccanicamente e la sospensione di cellule singole è stata analizzata al FACS. In accordo con l'intensità di fluorescenza del PKH26 sono state selezionate 2 popolazioni cellulari: la PKH26 High (H) con un'alta intensità di colorante (popolazione quiescente) e la popolazione PKH26 Low (L) con un'intensità bassa di colorante (cellule in divisione).

Le due popolazioni isolate sono state quindi in parte risospese in terreno permissivo per analizzare la capacità di formare nuove sfere e, in parte, raccolte per studi di biologia molecolare.

## **6. Estrazione dell'RNA totale**

L'estrazione dell'RNA totale è stata eseguita utilizzando differenti protocolli in base al numero di cellule di partenza. In particolare, l'RNA isolato dalle cellule coltivate in adesione e dalle tirosfere è stato estratto utilizzando il sistema RNeasy isolation Minikit (Qiagen), mentre per l'estrazione dell'RNA dalle popolazioni cellulari isolate al FACS è stato utilizzato il sistema RNeasy isolation Microkit (Qiagen).

La tecnologia si basa sulle proprietà di legame dell'RNA ad una membrana di silice mediante la tecnologia della microcentrifugazione. Il metodo consente di legare alla membrana frammenti di RNA lunghi 200 nucleotidi. In breve, il protocollo

d'estrazione prevede: la lisi e l'omogeneizzazione del campione in un buffer fortemente denaturante contenente guanidina tiocianato per l'immediata inattivazione delle RNasi; l'aggiunta di etanolo 70%, per creare le condizioni ottimali a promuovere il legame selettivo dell'RNA alla membrana di silice della colonna; il passaggio della soluzione nella colonna per il legame dell'RNA ed i lavaggi (tre) per l'eliminazione delle altre macromolecole. L'RNA è eluito dalla colonna con H<sub>2</sub>O-RNasi free e conservato a -80°C fino all'utilizzo.

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata misurando l'assorbanza del campione a 260 nm : 0,5µl del campione, diluito 1:3 in H<sub>2</sub>O-RNasi free, è stato utilizzato per la lettura allo spettrofotometro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technology).

## **7. Analisi molecolare: Reverse Transcription-PCR**

Per analizzare l'espressione dei geni di staminalità embrionale Oct4, Nanog e ABCG2, di staminalità tumorali P63, di differenziazione PAX8, TTF-1, Tg, e di controllo GAPDH, è stata utilizzata la tecnica della Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) che prevede la trascrizione dell'mRNA in cDNA, l'amplificazione del trascritto e l'analisi dell'amplificato.

Per la trascrizione dell'mRNA in cDNA è stata preparata una miscela (volume finale 20ul) contenente: 100 ng di RNA totale, 1 µl di primer Oligo-d- T<sub>15</sub> (500µg/ml), 1U/µl di DTT 0.1M, 4 µl di RNASI OUT, 1 µl di dNTP mix 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2ul di First-Strand Buffer (250mM TRIS-HCl PH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl di trascrittasi inversa (M-MLV Reverse transcriptase 2.5U/µl) (Invitrogen life technologies, Milano). Ciascun campione è stato incubato a 65°C per 5 min., la reazione è stata bloccata in ghiaccio, quindi il campione è stato centrifugato e successivamente trascritto

utilizzando un ciclo di 52 min. a 37°C, 15 min. a 72°C e mantenuto poi a 4°C.

Per l'amplificazione di ciascun trascritto, 2 µl di cDNA sono stati addizionati a 48 µl di una miscela costituita da 37,75 µl di H<sub>2</sub>O-Rnasi-free, 5 µl di Buffer Tris-HCl 10X (200 mM - pH 8.4), 500 mM KCl, 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µl di dNTP 10mM, 0.25 µl di Taq DNA Polimerasi (InVitrogen life technologies) e 1,25 µl dei rispettivi primers senso e antisenso 0.2mM per i cicli richiesti (Tab.3).

Ciascun campione amplificato è stato sottoposto ad analisi elettroforetica utilizzando un gel d'agarosio al 2% preparato in Tris-acetato 40 mM ed EDTA 1 mM (TAE 1x). In ciascun pozzetto del gel sono stati seminati 10 µl di ogni campione miscelati con 2 µl di Gel loading solution concentrato 6x (SIGMA). Come riferimento si è utilizzato un DNA ladder 100bp (5 µl miscelati con 2µl del gel loading solution) (Trackit 100bp DNA ladder, Sigma-Aldrich). Per individuare le bande, il gel è stato colorato con 2,5 µl di Bromuro di etidio (20.000X, Sigma-Aldrich) sciolto in 50 ml di TAE 1X. Il gel immerso nel tampone veniva mantenuto in agitazione per 45-60 min a temperatura ambiente. La marcatura è stata verificata al transilluminatore a raggi ultravioletti e immagini digitali sono state acquisite tramite fotocamera incorporata e l'intensità di ciascuna banda misurata utilizzando il Software Quantity-One (Biora).

La quantità di RNA messaggero di ciascun gene è stata normalizzata sul livello del messaggero del gene GAPDH.

**Tabella 3.** Primer senso e antisenso utilizzati durante l'amplificazione del trascritto

<b>Gene</b>	<b>Sequenze dei Primer</b>	<b>Cicli</b>
<b>Nanog (163 bp)</b>	senso 5' GCTGAGATGCCTCACACGGAG 3' antisenso 5' TCTGTTTCTTGACTGGGACCTTGTC 3'	<b>35 cicli</b> 30 sec, 96°C 30 sec, 62°C 30 sec, 72°C
<b>Oct4 (228 bp)</b>	senso 5' AGCCTGAGGGCGAAGCAGGGA 3' antisenso 5' TGAGCCACATCGGCCTGT 3'	<b>35 cicli</b> 30 sec, 96°C 30 sec, 58°C 60 sec, 72°C
<b>ABCG2 (378 bp)</b>	senso 5' AGTTCCATGGCACTGGCCATA 3' antisenso 5' TCAGGTAGGCAATTGTGAGG 3'	<b>30 cicli</b> 30 sec, 95°C 30 sec, 53°C 60 sec, 72°C
<b>PAX8 (303 bp)</b>	senso 5' CGGACCCCGAAAGCACCTTCG 3' antisenso 5' CTAGAACTGGACACCTCGGGGGTT 3'	<b>30 cicli</b> 30 sec, 95°C 60 sec, 60°C 60 sec, 72°C
<b>TTF-1 (351 bp)</b>	senso 5' GCCTCTGGCCCCGGATGGTA 3' antisenso 5' CCGCCTTGTCTTGGCCTGG 3'	<b>30 cicli</b> 30 sec, 95°C 60 sec, 60°C 60 sec, 72°C
<b>Tg (762 bp)</b>	senso 5' CTTGAGTACCAGGTGGATGCC 3' antisenso 5' GGTGGTTTCAGTGAAGGTGGAA 3'	<b>35 cicli</b> 30 sec, 96°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C
<b>p63 (476 bp)</b>	senso 5' GCAGTCGAGCACCGCCAAGT 3' antisenso 5' TCAAAGCAGCGTCGGCCCAG 3'	<b>35 cicli</b> 30 sec, 96°C 30 sec, 62°C 30 sec, 72°C
<b>GAPDH (347 bp)</b>	senso 5'GCCAAAAGGGTCATCATCTCTG3' antisenso 5'CATGCCAGTGAGCTTCCCCT3'	<b>25 cicli</b> 30 sec, 96°C 60 sec, 58°C 30 sec, 72°C

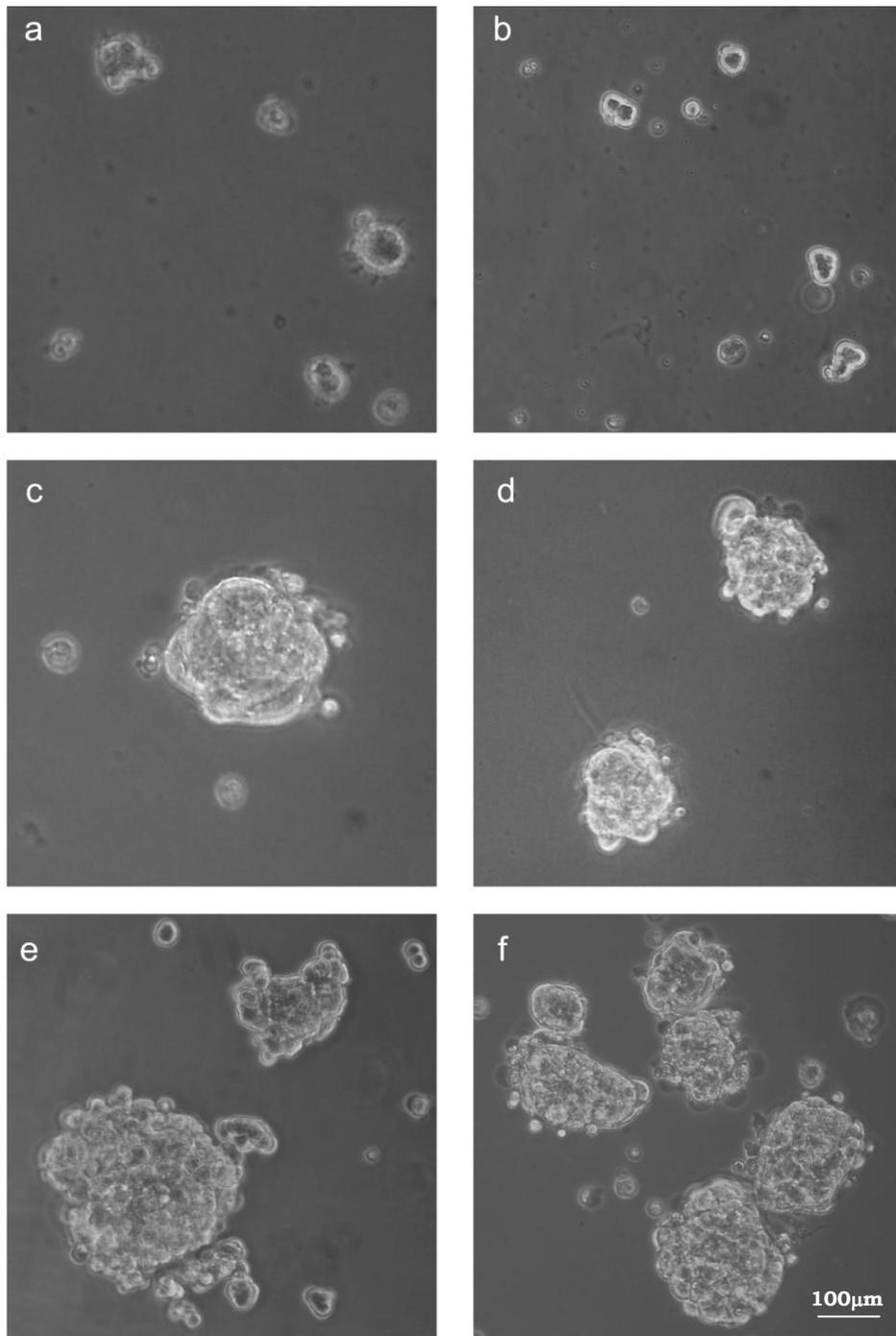
## **Analisi statistica**

I risultati sono espressi come valori medi  $\pm$  deviazione standard. Per valutare la significatività dei valori, è stato utilizzato il test-t di Student, a due code, considerando significativi valori di  $p < 0.05$ .

## **RISULTATI**

### **1. Formazione delle tirosfere**

L'analisi delle condizioni ottimali di formazione, mantenimento e vitalità delle tirosfere a partire da colture in adesione della linee B-CPAP e N-Thy-ori-3 ha indicato per entrambe una densità iniziale di semina di  $20 \times 10^4$  cellule/ml, con una vitalità del 95%-97%. In queste condizioni ottimali, l'inizio della formazione delle sfere era osservabile al microscopio invertito come organizzazione di piccoli gruppi di poche cellule (Fig. 6a,b) a partire dal 3° giorno. La classica forma rotondeggiante, indice di un'attiva proliferazione, era osservata al 5° giorno (Fig. 6c,d) e risultava massima al 7° (Fig. 6e,f). A partire dall'8° fino al 14° giorno la vitalità delle sfere diminuiva, come dimostrato dalla presenza di più del 50% di cellule morte. Questo comportamento era comune alle cellule delle due linee che, tuttavia differivano per le dimensioni raggiunte al 7° giorno di coltura. Le tirosfere della linea B-CPAP raggiungevano un diametro medio di 250  $\mu\text{m}$ , mentre e quelle della linea N-Thy-ori-3 avevano un diametro medio di 200  $\mu\text{m}$ .



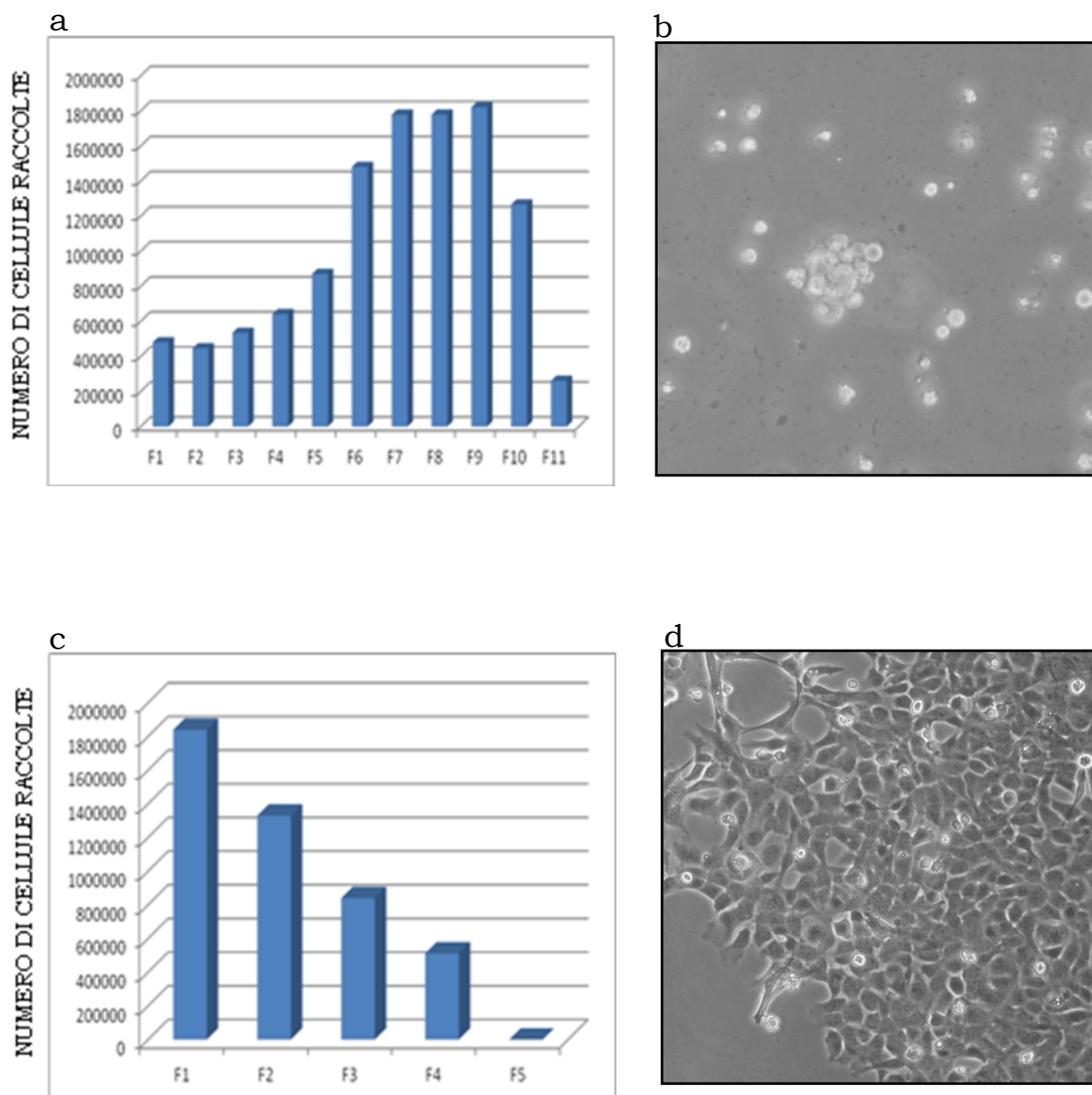
**Figura 6. Formazione di tirosfere ottenute dalla linea tumorale B-CPAP e dalla linea di controllo N-Thy-ori-3.** Tirosfere al 3° giorno di coltura: B-CPAP (a) e N-Thy-ori-3 (b); tirosfere al 5° giorno di coltura: B-CPAP (c) e N-Thy-ori-3 (d); tirosfere al 7° giorno di coltura B-CPAP (e) e N-Thy-ori-3 (f). Ingrandimento 150x.

## **2. Autorinnovamento**

Le tirosfere tumorali e di controllo della prima generazione (F1) sono state raccolte e riseminate alla stessa densità per diverse generazioni per valutare la capacità di autorinnovamento.

Le tirosfere derivate dalla linea tumorale B-CPAP avevano la capacità di autorinnovarsi per 10 generazioni. A partire dalla generazione F3 è stato osservato un notevole incremento del numero di cellule, che raggiungeva la massima espansione alla generazione F7, si manteneva costante nella F8 e F9, e diminuiva alla F10. Alla F11 le cellule perdevano totalmente la capacità di formare sfere non consentendo generazioni successive (Fig.7a). Dalla F10 si cominciava ad osservare una minore vitalità delle cellule che diveniva massima alle F11 e risultava nell'accumulo in sospensione di cellule singole o aggregati cellulari irregolari e non sferici morfologicamente differenti dalle tirosfere (Fig.7b).

Le tirosfere derivate dalla linea N-Thy-ori-3 si autorinnovavano per 4 generazioni. Al contrario delle tirosfere della linea derivata da tumore, le cellule N-Thy-ori-3 aumentavano di numero alla generazione F1, ma diminuivano progressivamente già a partire dalla F2, arrivando fino alla generazione F4 (Fig.7c). Alla generazione F5 le cellule non avevano più la capacità di formare sfere e, diversamente dalla linea B-CPAP, si osservava la loro adesione al supporto di coltura, con morfologia di cellule in crescita in adesione, nonostante il loro permanere nel terreno permissivo (Fig.7d).

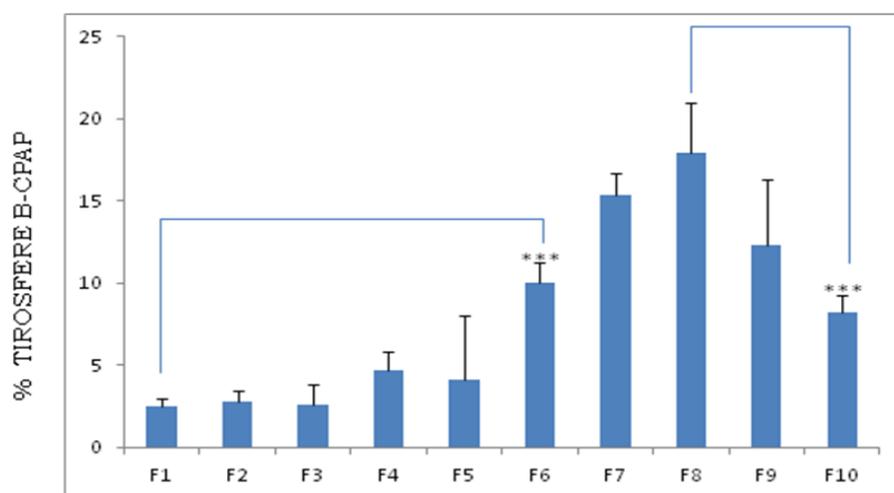


**Figura 7. Propagazione delle tirosfere nelle generazioni successive alla F1.** a: istogramma che indica la capacità di autorinnovarsi fino alla generazione F11 delle tirosfere ottenute dalla linea tumorale B-CPAP; b: cellule della linea B-CPAP alla F11: scomparsa delle tirosfere e comparsa di singole cellule o aggregati cellulari; c: istogramma che indica la capacità di autorinnovarsi fino alla generazione F4 delle tirosfere ottenute dalla linea N-Thy-ori-3; d: cellule della linea N-Thy-ori-3 alla F5: adesione al supporto, crescita in monostrato e assenza di sfere. In ordinate il numero delle cellule raccolte ad ogni generazione, in ascisse le diverse generazioni.

### 3. Efficienza di formazione delle sfere

A densità clonale (500 cellule/ml) le cellule parentali seminate in piastre da 24 pozzetti in SFM formavano al 7° giorno sfere che raggiungevano la massima dimensione al 15° giorno.

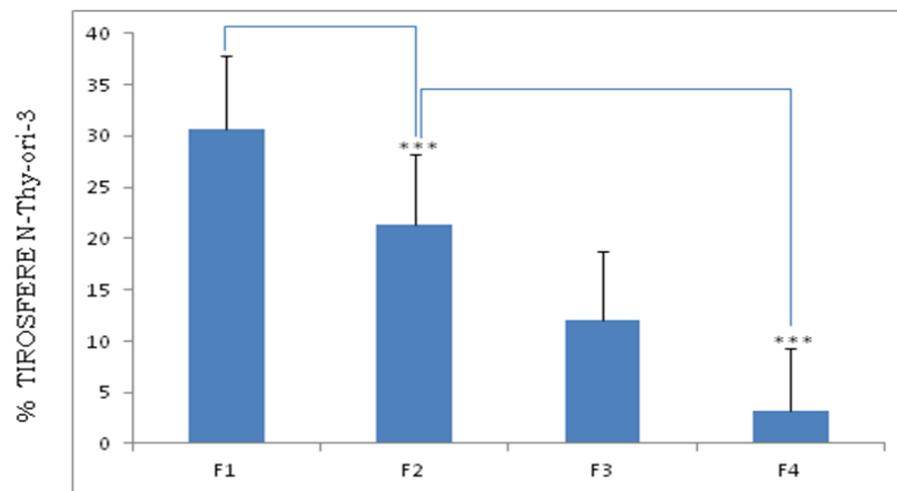
La percentuale del numero di tirosfere ottenute dalla linea tumorale aumentava in modo significativo dalla generazione F1 (2,8%) delle cellule seminate) alla F6 (10%) raggiungendo il massimo (17%) alla F8. Alla generazione F10 la capacità delle cellule seminate di formare sfere diminuiva con valore statisticamente significativo (8%) rispetto alla F8 (Fig.8).



**Figura 8. Capacità della linea tumorale B-CPAP di formare sfere secondarie:**

L'istogramma mostra l'andamento del numero delle tirosfere ad ogni generazione con il raggiungimento del numero massimo alla generazione F8 e il minimo alla F10. I risultati sono presentati come media  $\pm$  Dev St (\*\*\*:  $p < 0,001$ ). In ordinate la percentuale di sfere osservate in rapporto alle cellule seminate (500 cellule/ml), in ascisse le diverse generazioni.

La capacità della linea N-Thy-ori-3 di formare sfere era massima già alla generazione F1 (30%) e diminuiva in modo significativo alla F2 (22%) fino a raggiungere il minimo alla F4 (3,4%) (Fig.9).



**Figura 9. Capacità di formare sfere secondarie della linea Thy-ori-3 :** istogramma che mostra l'andamento della capacità di formare tirosfere ad ogni generazione, con diminuzione dalla F1 alla F4. I risultati sono presentati come media  $\pm$  Dev St (\*\*\*:  $p < 0,001$ ). In ordinate la percentuale di sfere osservate in rapporto alle cellule seminate (500cellule/ml), in ascisse le diverse generazioni.

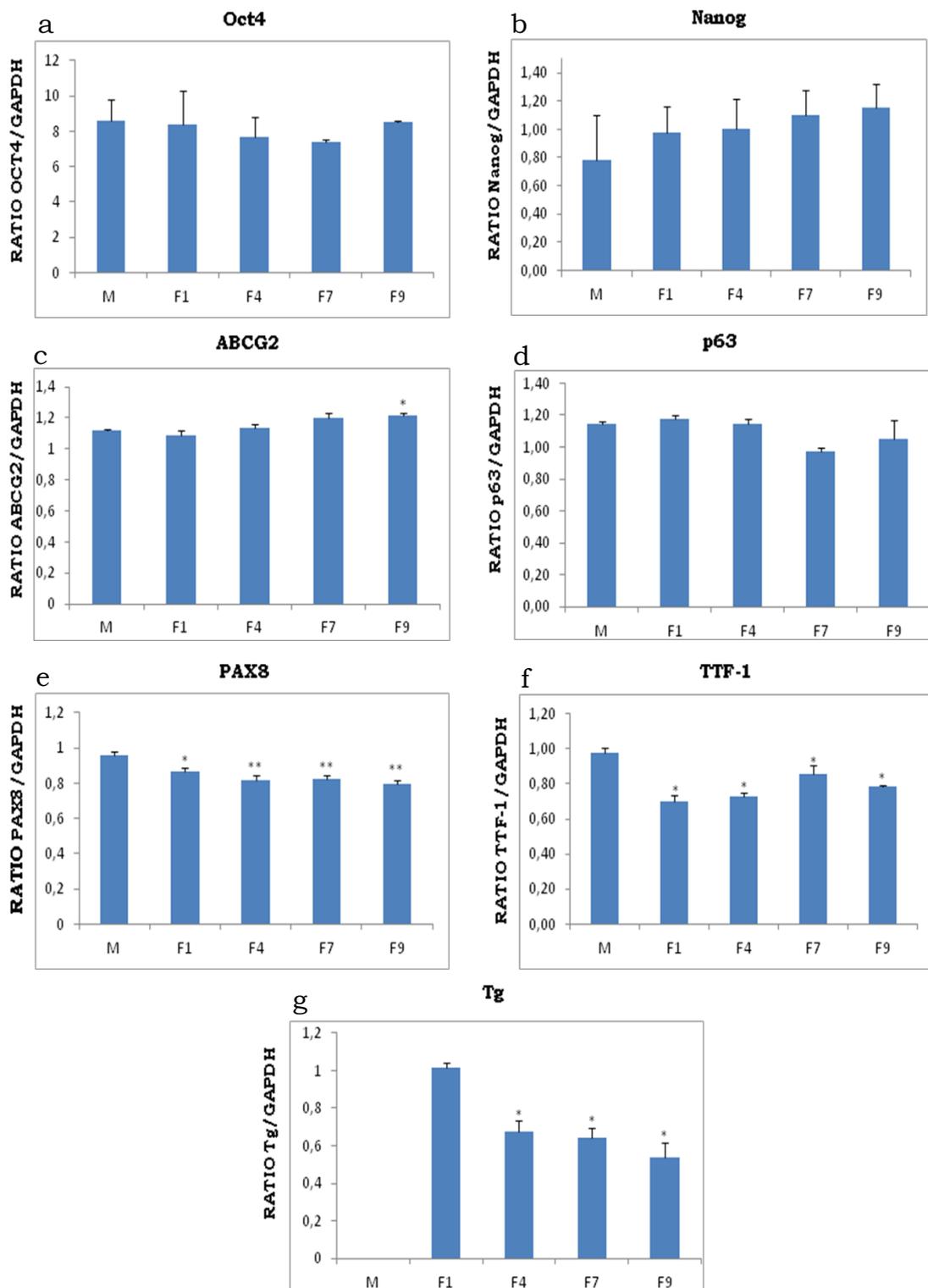
#### **4. Caratterizzazione molecolare delle cellule parentali e delle generazioni di tirosfere.**

L'espressione di marcatori di staminalità e di differenziamento è stata studiata sia nelle cellule parentali che nelle tirosfere ottenute nelle diverse generazioni allo scopo di verificare se le tirosfere tumorali e di controllo potessero essere arricchite di cellule simil-staminali.

*Linea cellulare tumorale B-CPAP:* i geni di staminalità Oct4 e Nanog erano espressi sia nelle cellule cresciute in adesione che nelle tirosfere F1 e la loro espressione, in particolare il Nanog aumentava nelle generazioni successive F4, F7 e F9 sebbene non in maniera significativa (Fig.10a,b). Il gene ABCG2 era espresso sia nelle cellule in adesione che nelle tirosfere con un aumento statisticamente significativo alla generazione F9 (Fig.10c). Il marker di staminalità tumorale p63, invece, manteneva costante la sua espressione in tutte le generazioni studiate non mostrando differenze significative tra le cellule in adesione e le diverse generazioni di sfere (Fig.10d).

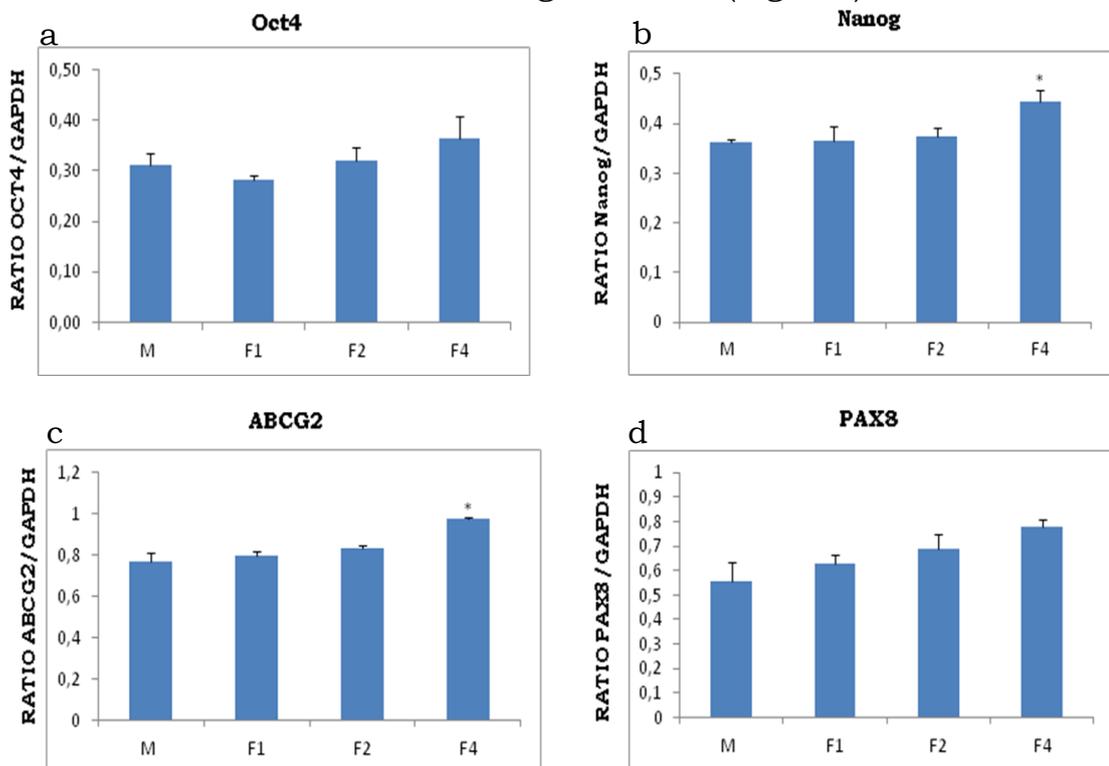
Al contrario, i marker di differenziamento PAX8 e TTF-1 mostravano una marcata espressione nelle cellule cresciute in monostrato e una diminuzione statisticamente significativa nelle tirosfere ottenute alle diverse generazioni (Fig.10e,f).

Il Tg è risultato non espresso nelle cellule cresciute in adesione, mentre è era marcatamente espresso nelle tirosfere della generazione F1. Tuttavia l'espressione diminuiva progressivamente ed in modo significativo nelle generazioni successive (Fig.10g).



**FIGURA 10. Analisi di espressione di marker staminali e di differenziamento nella linea tumorale B-CPAP nelle cellule parentali (M) e nelle tirosfere alla prima (F1), alla quarta (F4), alla settima (F7) e alla nona generazione (F9). I risultati sono presentati come media  $\pm$  Dev St (\*:  $p < 0,05$  ; \*\*:  $p < 0,01$  ). In ordinate i livelli d'espressione misurati in rapporto al GAPDH, in ascisse le diverse generazioni.**

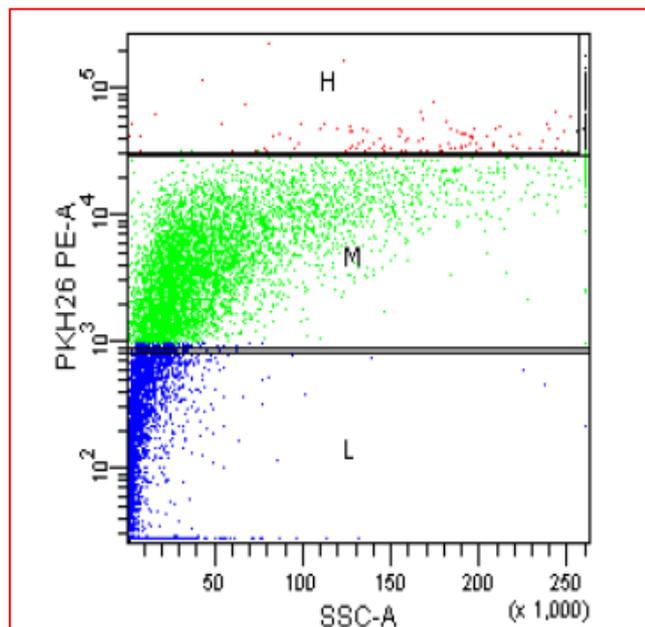
*Linea cellulare N-Thy-ori-3*: i geni Oct4, Nanog e ABCG2 erano espressi sia nelle cellule parentali cresciute in adesione sia nelle tirosfere delle diverse generazioni. In particolare, confrontando l'espressione di Oct4 tra le cellule coltivate in adesione e le tirosfere alle diverse generazioni è stato osservato un suo aumento anche se non significativo, con il procedere delle generazioni (Fig.11a). Per i geni Nanog e ABCG2 è stato osservato un aumento d'espressione a partire dalla generazione F2, aumento che diveniva significativo alla generazione F4 (Fig.11b,c). Sia le cellule parentali che le tirosfere sono risultate negative per i marker di differenziamento Tg, TTF-1 e per il gene p63. Al contrario è stata osservata una marcata positività per PAX8 senza nessuna differenza significativa tra le cellule parentale e le tirosfere alle diverse generazioni (Fig.11d).



**FIGURA 11. Analisi di espressione di marker staminali e di differenziamento nella linea normale N-Thy-ori-3 cellule parentali (M) e nelle tirosfere alla prima (F1), alla seconda (F2), alla quarta generazione (F4).** I risultati sono presentati come media  $\pm$  Dev St (\*  $p < 0.05$ ). In ordinata i livelli d'espressione misurati il rapporto al GAPDH, in ascissa le diverse generazioni.

## 5. Isolamento delle tre frazioni cellulari al FACS

I risultati dell'analisi al FACS delle cellule colorate con PKH26, la cui intensità di fluorescenza è inversamente proporzionale al numero di divisioni cellulari (Lanzkron et al., 1999), ha mostrato una distribuzione d'intensità di fluorescenza in un ampio spettro (in scala logaritmica da  $0$  a  $10^5$ ). E' stato possibile raccogliere due popolazioni cellulari: la PKH26 high (H) con un'alta intensità di colorante e la PKH26 Low (L) con intensità con intensità bassa (Fig. 12). Le cellule con intensità di fluorescenza intermedia non sono state considerate, poiché potevano costituire una popolazione eterogenea.



**FIGURA 12. Esempio di un profilo FACS delle cellule marcate con il colorante PKH26.** In ordinate l'intensità di colorante espressa in scala logaritmica e in ascisse la dimensione cellulare (side scatter o SSC).

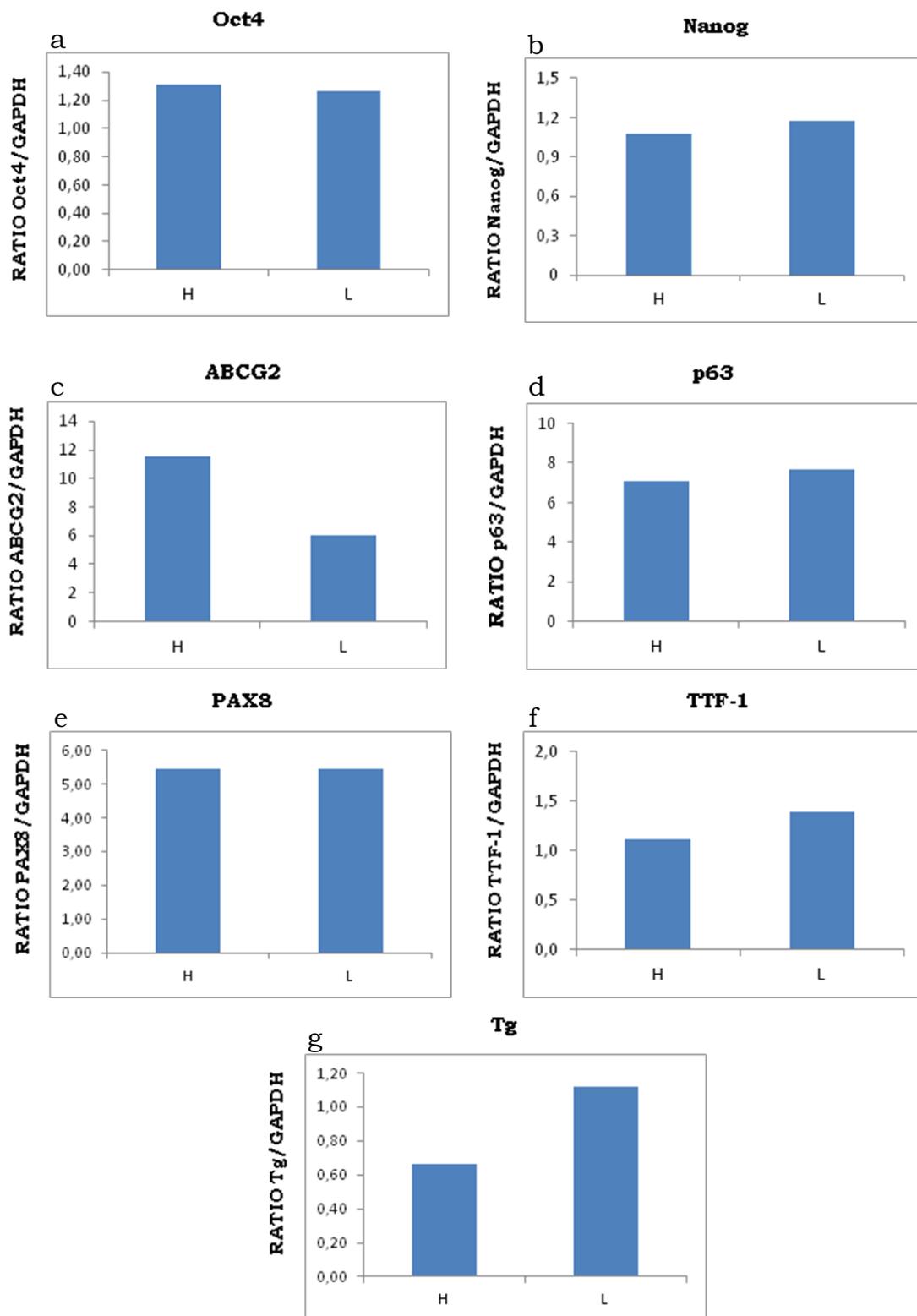
In dettaglio, dalle tirosfere derivate dalla linea B-CPAP sono state isolate le due popolazioni H e L che rappresentavano rispettivamente il 7% e il 20% delle cellule totali. Le tirosfere isolate dalla linea tiroidea di controllo costituivano per il 6,6% la popolazione H e per il 13% la PKH26 low.

Le due popolazioni isolate dalla linea B-CPAP mostravano tutte capacità di formare sfere primarie, sebbene con efficienza diversa (2% delle cellule della popolazione H, e 0,3% della popolazione PKH26 L) e minore di quella delle popolazioni PKH26 H e L ottenute dalla linea di controllo (3,3%, 1,2%, rispettivamente). Solo la popolazione H di entrambe le linee aveva capacità di formare sfere secondarie.

## **6. Caratterizzazione molecolare delle popolazioni isolate**

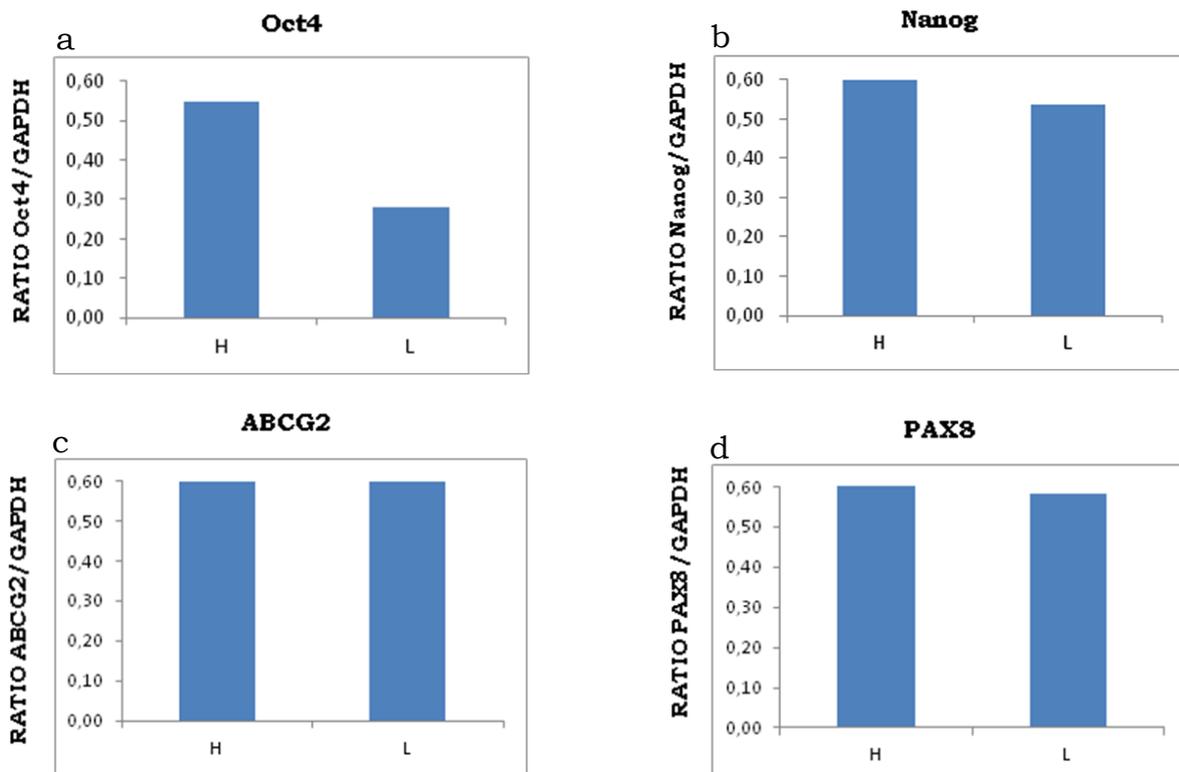
*Popolazioni isolate dalle tirosfere tumorali derivate dalla linea B-CPAP:* gli esperimenti di RT-PCR hanno dimostrato che le due popolazioni cellulari isolate esprimevano mRNA per tutti i geni analizzati.

L'espressione dei geni di staminalità Oct4 e Nanog risultava sovrapponibile nelle popolazioni H e L. ABCG2 era più espresso nella popolazione H rispetto alla L (Fig.13a-c). Il gene di staminalità tumorale p63 era espresso a livelli sovrapponibili in tutte e due le popolazioni PKH26 (Fig.13d). Il marker di differenziazione Pax8 mostrava la stessa espressione nelle popolazioni cellulari H e L (Fig.13e). I geni TTF-1 e Tg erano espressi nelle due popolazioni con livelli d'espressione più elevati nella popolazione L rispetto alla H (Fig.13f,g).



**FIGURA 13. Analisi di espressione di marker staminali e di differenziamento nelle popolazioni PKH26 H e L ottenute dalle tirofere della linea B-CPAP.** In ordinate i livelli d'espressione misurati il rapporto al GAPDH, in ascisse le popolazioni isolate.

Popolazioni isolate dalle tirofere derivate dalla linea N-Thy-ori-3: Le popolazioni cellulari isolate dalla linea tiroidea N-Thy-ori-3 mostravano positività per i geni Oct4, Nanog, ABCG2 e PAX8 mentre risultavano negative per i geni TTF-1, TG e p63. Oct4 era espresso a livelli molto maggiori nella popolazione H rispetto alla popolazione L, mentre l'espressione di Nanog e ABCG2 non mostrava differenze consistenti (Fig.14a-c). Il gene PAX8 risultava espresso in egual modo in tutte e due le popolazioni (Fig.14d).



**FIGURA 14. Analisi di espressione di marker staminali e di differenziamento nelle popolazioni PKH26 H e L ottenute dalle tirofere della linea N-thy-ori-3.** In ordinata i livelli d'espressione misurati il rapporto al GAPDH, in ascissa le popolazioni isolate.

## **DISCUSSIONE**

Le linee cellulari tumorali, anche se mantenute in coltura per lunghi periodi, rappresentano un buon modello per studiare l'eterogeneità cellulare dei tumori. Numerose evidenze, indicano infatti che, in particolari condizioni sperimentali, da esse possono essere isolate e propagate cellule simil-staminali, presenti in basso numero all'interno delle linee (Setoguchi et al., 2004; Ponti et al., 2005; Kondo et al., 2004). E' noto infatti che le cellule simil-staminali e progenitrici tumorali sono in grado di moltiplicarsi in assenza di siero in terreni addizionati di EGF e bFGF producendo sferoidi con proprietà di auto rinnovamento (Lee et al., 2006).

Nel presente studio è stata utilizzata la linea cellulare B-CPAP, derivata da un tumore tiroideo papillare, al fine di isolare e caratterizzare a livello morfo-funzionale e molecolare popolazioni di cellule simil-staminali. Al fine di confrontare i parametri in studio è stata utilizzata la linea N-Thy-ori-3 derivata da cellule follicolari e stabilizzata con l'uso del virus SV-40.

I nostri risultati dimostrano per la prima volta che entrambe le linee hanno la capacità di formare sfere (tirosfere) quando coltivate in terreno selettivo e permissivo, privo di siero e arricchito con specifici fattori di crescita.

Le tirosfere ottenute dalla linea tumorale possono essere propagate in coltura per 10 generazioni, con progressivo incremento della popolazione cellulare totale dalla generazione F1 alla F9 e con decremento nelle successive generazioni. I nostri esperimenti mostrano inoltre che, seminando le cellule a densità clonale, l'efficienza di formazione delle sfere lungo le generazioni segue lo stesso andamento dell'incremento della popolazione cellulare. Questo è in netto contrasto con quanto osservato nella linea cellulare non tumorale N-Thy-ori-3, dove le cellule non solo possono formare sfere

per sole quattro generazioni, ma progressivamente perdono capacità ed efficienza nel formare nuove tirosfere.

Questi risultati dimostrano che all'interno delle sfere ottenute dalla linea B-CPAP vi sia una popolazione simil-staminale tumorale che si autorinnova generando cellule figlie che proliferano attivamente e aumentano la popolazione cellulare totale. Questo è in accordo con la presenza della mutazione *TP53* in questa linea. Infatti Cicalese e collaboratori (Cicalese et al., 2009) hanno di recente dimostrato che questa mutazione favorisce la divisione simmetrica di cellule staminali tumorali nei tumori mammari, come già suggerito da diversi gruppi per altri tumori, (Ogawa, 1993; Morrison et al., 2006; Al-Hajj and Clarke 2004; Deleryolle et al., 2011).

Le tirosfere ottenute dalla linea N-Thy-ori-3 invece non solo si mantengono per poche generazioni, ma diminuiscono da una generazione all'altra. Questo potrebbe essere spiegato ipotizzando che le cellule che formano tirosfere in questa linea non tumorale si dividano principalmente per divisione asimmetrica. Questa ipotesi, spiegherebbe la limitata capacità di mantenere l'efficienza nella formazione delle tirosfere. Ciò in accordo con il permanere inalterato della capacità di compiere una scelta tra divisione asimmetrica e simmetrica, prediligendo la prima, con la formazione di una nuova cellula staminale ed una progenitrice, che con le successive divisioni forma la tirosfera. Le progenitrici non avrebbero quindi la capacità proliferativa delle progenitrici tumorali, proprio per le loro caratteristiche di staminalità non tumorale. In questo senso, sarebbero paragonabili alle cellule progenitrici ematopoietiche che possono dare origine a cellule differenziate limitatamente nel tempo (Morrison and Weissman, 1994).

Analizzando i risultati di RT-PCR ottenuti nella linea B-CPAP si osserva che l'andamento dell'espressione del marcatore di staminalità

ABCG2 aumenta con il progredire delle generazioni, dapprima in maniera molto modesta per raggiungere un'espressione statisticamente significativa tra le cellule parentali e la generazione F9. Tale andamento non è riscontrato per i fattori di trascrizione di staminalità Oct4, Nanog e per il marker tumorale p63, che sono espressi a livelli costanti in tutte le generazioni. I marker di differenziazione TTF-1 e PAX8, anch'essi espressi sia nelle cellule parentali che nelle tirosfere, mostrano livelli di espressione che diminuiscono in modo significativo da una generazione all'altra. Questo quadro è in accordo con i dati presenti in letteratura che sostengono che coltivare cellule tumorali come sfere in sospensione promuova un aumento di cellule simil-staminali (Setoguchi et al, 2004). Il mantenimento dell'espressione dei fattori di trascrizione, seppure con un andamento decrescente, è in accordo con quanto dimostrato per le mammosfere, che risultano composte per la maggior parte da cellule a vari stadi di differenziamento oltrechè da cellule con caratteristiche di staminalità (Dontu et al, 2003).

TTF-1 e PAX8 sono indispensabili per l'espressione genica tessuto-specifica e per lo sviluppo della ghiandola tiroidea (Damante et al., 2001). Il TTF-1 è espresso nel tessuto normale tiroideo e la sua espressione è correlata con il grado di differenziazione dei tumori tiroidei (Zhang et al., 2006). Il PAX8 ha un ruolo cruciale nell'organogenesi tiroidea (Plachov et al., 1990) ed è espresso in diversi tumori tiroidei, sebbene la correlazione tra i livelli d'espressione e il grado di differenziamento non è chiara. Infatti se alcuni ritengono che la sua espressione sia correlata al grado di differenziamento (Zhang et al., 2006), altri sostengono che esso sia un marker dei tumori tiroidei anaplastici (Nonaka et al., 2008). In accordo con il suo ruolo nella organogenesi della tiroide, l'espressione di PAX8 è stata dimostrata in cellule staminali tiroidee adulte (Thomas et al., 2006). Tutte queste osservazioni sono in linea con

l'espressione di PAX8 nelle cellule della linea B-CPAP e nelle tirosfere e rafforzano l'ipotesi della presenza di cellule con caratteristiche staminali in questa linea.

L'interazione dei fattori di trascrizione TTF-1 e PAX8, regola la trascrizione della tireoglobulina (Tg), precursore degli ormoni tiroidei (Di Palma et al., 2003). Nelle nostre condizioni sperimentali essa era presente nelle tirosfere B-CPAP con andamento decrescente proporzionale alla progressione delle generazioni. Essa era invece assente nelle cellule parentali. Quest'ultimo risultato è in accordo con dati della letteratura (van Staveren et al., 2007) che suggeriscono che l'assenza d'espressione del Tg possa essere dovuta ad una diminuita, anche se non assente, espressione dei suoi fattori di regolazione (TTF-1 e PAX8). Ciò giustifica la perdita di differenziazione e la non completa perdita della loro determinazione tissutale. Questo dato è rafforzato anche dal fatto che le cellule della linea B-CPAP non esprimono il Tg anche se coltivate in presenza dell'ormone tireotropo (TSH), dal momento che non esprimono il recettore per questo ormone (TSHR) (van Staveren et al., 2007). In questo studio l'espressione del Tg era presente nelle tirosfere ed assente nelle cellule parentali. Un'interpretazione di questo fenomeno potrebbe essere data dalle condizioni permissive di coltura utilizzate per la formazione delle sfere. La combinazione dei fattori di crescita EGF/bFGF e l'assenza di siero potrebbero aver creato un ambiente favorevole alla trascrizione della Tg.

In letteratura non sono riportati studi su linee cellulari derivate da tumori tiroidei papillari che abbiano considerato i marcatori analizzati in questo studio. Tuttavia, osservazioni recenti di Malaguarnera e collaboratori (2010) e Todaro e collaboratori (2010) su tirosfere di prima generazione ottenute da carcinomi tiroidei primari indicano l'espressione, nelle loro condizioni sperimentali, di bassi livelli dei marker di differenziamento tiroideo e positività per i

marker di staminalità Oct4, Nanog e ABCG2. L'espressione dei geni di staminalità è stata dimostrata anche nelle cellule staminali di altri tumori (Hombach-Klonisch et al., 2008). Possiamo quindi ipotizzare che la loro presenza nelle linee tumorali stabilizzate sia dovuta ad una rara popolazione con caratteristiche staminali all'interno del tumori e di conseguenza nelle linee cellulari da essi derivate. La limitatezza dei dati presenti in letteratura per i carcinomi tiroidei differenziati non consente qui un vero e proprio paragone tra i risultati ottenuti sulla nostra linea e su tumori primari, sebbene sembra che essi concordino.

Come già sottolineato, tra i marker di staminalità espressi in B-CPAP, ABCG2 è quello maggiormente espresso sia nelle cellule parentali che nelle diverse generazioni di tirosfere. ABCG2 fa parte della famiglia degli ATP binding transporter, ed è espresso anche nei tessuti normali, probabilmente come protezione all'ingresso di xenobiotici (Fetsch et al., 2006; Maliepaard et al., 2001). In alcuni tipi di tumori solidi la sua espressione è responsabile della resistenza ai farmaci chemioterapici ed è associata a prognosi infausta (Tsunoda et al., 2006; Yoh et al., 2004). Recentemente, è stato anche dimostrato il suo coinvolgimento nei processi biologici implicati nella capacità di escludere il colorante Hoechst dalle cellule staminali adulte e tumorali (Seigel et al., 2005; Ho et al., 2007; Shi et al., 2008; Wang et al., 2009). Inoltre, numerose evidenze indicano che ABCG2 gioca un ruolo importante nella protezione delle cellule staminali promuovendo l'aumento della loro capacità di sopravvivenza e di proliferazione (Xi-wei et al., 2010). Il mantenimento dell'espressione di ABCG2 nelle cellule B-CPAP in diverse condizioni sperimentali concorda dunque con la presenza di cellule simil-staminali.

La linea B-CPAP esprime il gene p63 in modo costante sia nelle cellule parentali che nelle tirosfere. Questo in accordo con l'origine

tumorale della linea. Il gene p63 è membro della famiglia di oncorepressori p53, insieme con p73 con cui condivide la struttura di tre domini funzionali (Lohrum e Vousden, 2000). Il gene p63 codifica per sei isoforme che possono funzionalmente mimare, ma anche antagonizzare, l'attività di p53. In particolare è stato dimostrato che la proteina p63 è implicata nel processo di differenziamento delle cellule epiteliali (Yang et al., 1998; Reis-Filho et al., 2003) e vari tipi di tumori epiteliali mostrano alti livelli d'espressione di questo gene (Hibi et al., 2000; Marin e Kaelin 2000; Massion et al., 2003; Moll e Slade, 2004). Nei tumori tiroidei il coinvolgimento della p63 nella trasformazione neoplastica potrebbe avere un ruolo oncogenico piuttosto che funzionare come oncosoppressore (Malaguarnara et al., 2005). In questo senso l'espressione di p63 sarebbe correlata con l'origine del tumore. Infatti un sottogruppo di PTC può originare da cellule embrionali pluripotenti positive per p63, che sono più sensibili rispetto ai tireociti maturi ad acquisire cambiamenti oncogenici portando allo sviluppo dei carcinomi papillari tiroidei (Burstein et al., 2004). Poiché nei carcinomi tiroidei possono essere presenti contemporaneamente mutazioni di p53 ed anormale espressione di p63, non è possibile dare con certezza alla p63 in ruolo oncogenico (Malaguarnara et al., 2005). D'altra parte però nella linea tumorale B-CPAP entrambi i geni sono espressi.

Analizzando i risultati di RT-PCR ottenuti nella linea non tumorale N-thy-ori-3 si osserva che i livelli d'espressione di Nanog e ABCG2 hanno un incremento statisticamente significativo nelle tirosfere della generazione F4 rispetto alla linea cellulare parentale. L'espressione di Oct4 invece, pur mantenendo lo stesso trend, non aumenta in modo significativo. N-Thy-ori-3 deriva da cellule follicolari non tumorali e quindi ci si aspetta che da essa siano isolate cellule staminali adulte non tumorigeniche, con propensione a produrre

cellule che differenziano. In effetti, il comportamento riguardo la formazione delle tirosfere delle cellule di questa linea, si discosta notevolmente da quello delle cellule derivate da tumore per tre caratteristiche: l'autorinnovamento (che si blocca alla F4), l'efficienza nella formazione delle sfere (che diminuisce progressivamente a partire dalla F1), e la capacità di aderire al supporto di crescita anche in terreno permissivo. Questo comportamento quindi sembrerebbe apparentemente indipendente dall'espressione dei marcatori di staminalità, il cui andamento è sovrapponibile a quello delle cellule B-CPAP. In questa linea non tumorale quindi il numero di cellule con caratteristiche staminali rimarrebbe costante nonostante la diminuzione della capacità di formare tirosfere, e la tendenza a crescere in adesione. In altre parole, il numero di tirosfere diminuisce in rapporto al numero totale di cellule perché molte aderiscono al supporto.

Il marker di differenziamento PAX 8 è risultato espresso, sia a livello della linea parentale che nelle tirosfere delle diverse generazioni, diversamente da TTF-1 e Tg che sono risultati negativi, come anche il marker di tumorigenicità p63. L'espressione di PAX8 suggerisce la presenza di cellule staminali adulte in questa linea, mentre resta di difficile interpretazione l'assenza di TTF-1 e di Tg. Inoltre, l'assenza di espressione del p63 nella linea normale e nelle tirosfere ottenute da essa è in accordo con le caratteristiche non tumorigeniche della linea stessa (Lemoine et al., 1989).

L'insieme dei risultati ottenuti supporta l'esistenza di cellule con caratteristiche simil-staminali nelle due linee oggetto di questo studio. In particolare mostrano la capacità di rispondere con una crescita di tipo sferoide e la capacità di autorinnovamento in opportune condizioni colturali, l'espressione di marker di staminalità embrionale nella linea N-thy-ori-3 e di cellule con caratteristiche

simil-staminali tumorali nella linea B-CPAP. L'assetto molecolare delle tirosfere non chiarisce se esse sono costituite da una popolazione eterogenea, ma certamente indica forti caratteristiche di staminalità per la loro capacità di auto rinnovamento. D'altra parte, sulla base del profilo molecolare, sarebbe attraente pensare che nelle tirosfere della linea tumorale possano essere presenti popolazioni cellulari a vari stadi di differenziamento: una popolazione con proprietà simil-staminali tumorale (OCT4+/NANOG+/ABCG2+/p63+), una popolazione in via di differenziamento (PAX8+) e una popolazione differenziata (TTF-1+/Tg+).

Per poter isolare una popolazione arricchita in cellule staminali, abbiamo dissociato le tirosfere della generazione F1 colorandole con il PKH26. Questo fluorocromo si lega al doppio strato lipidico della membrana cellulare rendendola fortemente fluorescente. Dopo ogni divisione cellulare esso si distribuisce equamente tra le due cellule figlie che risultano avere una diminuzione dell'intensità di fluorescenza della membrana (Horan et al., 1990; Boutonnat et al., 2000). Questo approccio è quindi molto utile per separare cellule quiescenti da cellule in attiva divisione. E' quindi uno dei metodi di elezione per isolare, tramite FACS, cellule staminali poiché sfrutta la loro natura quiescente (Cicalese et al., 2009; Pece et al., 2010; Kusumbe e Bapat 2009).

In accordo con l'intensità di fluorescenza del PKH26 sono raccolte due frazioni cellulari, le popolazioni H, e L, che rappresentano cellule in quiescenza (le putative simil-staminali) e cellule in attiva divisione (le putative cellule del "bulk" tumorale). Le due frazioni cellulari raccolte da B-CPAP e N-thy-ori-3 sono costituite rispettivamente dal 7% e 6,6% di cellule quiescenti, e dal 20% e 13% di cellule in attiva divisione, e indicano che le tirosfere di entrambe le linee sono

costituite da una piccola popolazione, di simile dimensione, di cellule quiescenti.

La capacità di formare sfere è mantenuta a lungo termine solo dalle due popolazioni H di entrambe le linee. Infatti, la capacità di formare sfere secondarie è persa dalle popolazioni L già alla prima generazione.

L'espressione dei geni di staminalità nella linea B-CPAP è presente nelle due frazioni cellulari isolate. Mentre l'espressione di ABCG2 è notevolmente inferiore nella frazione L rispetto alla H, l'espressione di Oct4 e Nanog appare agli stessi livelli, in accordo con i risultati di questi marcatori analizzati nel saggio di autorinnovamento. L'espressione dei geni PAX8 e p63 è sovrapponibile nelle due frazioni, mentre i geni di differenziamento sono notevolmente più espressi nella frazione L, in accordo con la presenza di cellule del "bulk" tumorale.

L'espressione dei geni di staminalità nella linea N-thy-ori-3 risulta diverso per Oct4, Nanog e ABCG2. Il primo è più espresso nelle H rispetto alle L, mentre gli altri due mantengono simile espressione nelle due frazioni. Questo quadro è nettamente diverso da quello delle cellule della linea tumorale. Infatti mentre si osserva che l'andamento d'espressione di Nanog è simile nelle due frazioni senza evidente differenza tra le due linee, l'andamento dell'espressione di Oct4 e di ABCG2 sono invertiti nelle due linee: nella B-CPAP Oct4 ha valori simili in H e L e ABCG2 ha una maggiore espressione nella H, mentre in N-thy-ori-3 Oct4 ha una maggiore espressione nella H e ABCG2 non mostra differenze tra H e L. Anche se i dati necessitano di ulteriori approfondimenti allo stato dei risultati sembra che l'andamento dell'espressione di ABCG2 e di Oct4 meriti di essere ulteriormente indagato per valutare se possa essere discriminante tra la linea tumorale e quella non tumorale.

Nel nostro studio viene per la prima volta evidenziata la presenza di cellule simil-staminali in linee cellulari derivate da tumore papillare tiroideo. In letteratura sono presenti rari studi sui tumori primari ed in uno solo (Todaro et al., 2010) sono state isolate cellule simil-staminali con metodica FACS. Tali cellule, rappresentate da una piccola popolazione (circa 5%) non sono state tuttavia caratterizzate per i marcatori da noi studiati. Nel complesso comunque i nostri dati sostengono l'ipotesi dell'esistenza di cellule simil-staminali tumorali nei carcinomi papillari della tiroide e sollecitano nuovi approfondimenti.

In conclusione i nostri risultati rafforzano l'idea che le cellule simil-staminali siano la forza trainante della formazione e progressione del tumore. Il loro isolamento e la loro caratterizzazione a livello molecolare ha come obiettivo a lungo termine non solo la comprensione del processo carcinogenetico ma anche la possibilità di fornire informazioni utili allo sviluppo di nuove ed alternative terapie.

## **BIBLIOGRAFIA**

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983-3988.

Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004 ;23:7274-7282.

Baguley BC. Tumor stem cell niches: a new functional framework for the action of anticancer drugs. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006;1:121-127.

Bombardieri E, Pacini F, Silvestrini R. Basi scientifiche per la definizione di linee-guida in ambito clinico per i Tumori della Tiroide dell'Epitelio Follicolare, CNR 2006 (<http://news.urp.cnr.it/pubblicazioni/oncologia>). *Cytogenet Genome Res* 2007;118:229-236.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-737.

Boutonnat J, Barbier M, Ronot X, Seigneurin DNucleus labeling or membrane labeling for studying the proliferation of drug treated cells? *Morphologie* 2000;84:11-15.

Burstein DE, Nagi C, Wang BY, Unger P. Immunohistochemical detection of p53 homolog p63 in solid cell nests, papillary thyroid carcinoma, and hashimoto's thyroiditis: A stem cell hypothesis of papillary carcinoma oncogenesis. *Hum Pathol* 2004;35:465-473.

Cameselle-Teijeiro J, Febles-Pérez C, Sobrinho-Simões M. Papillary and mucoepidermoid carcinoma of the thyroid with anaplastic

transformation: a case report with histologic and immunohistochemical findings that support a provocative histogenetic hypothesis. *Pathol Res Pract* 1995;191:1214-1221.

Caria P, Vanni R. Cytogenetic and molecular events in adenoma and well-differentiated thyroid follicular-cell neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;203:21-29.

Chang HH, Hemberg M, Barahona M, Ingber DE, Huang S. Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* 2008;453:544–547.

Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, Faretta M, Ronzoni S, Giulini B, Brisken C, Minucci S, Di Fiore PP, Pelicci PG. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 2009;138:1083-1095.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006;66:9339–9344.

Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 2006;124:1111–1115.

Corso C, Ulucan H, Parry EM, Parry JM. Comparative analysis of two thyroid tumor cell lines by fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;137:108-118.

Damante G, Tell G. and Di Lauro R. A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 2001; 66:307-356.

DeLellis RA. Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* 2006;94:662-669.

Deleyrolle LP, Ericksson G, Morrison BJ, Lopez JA, Burrage K, Burrage P, Vescovi A, Rietze RL, Reynolds BA. Determination of somatic and cancer stem cell self-renewing symmetric division rate using sphere assays. *PLoS One* 2011; 6(1):e15844.

Dettori T, Frau DV, Garcia JL, Pierantoni G, Lee C, Hernandez JM, Fusco A, Morton CC, Vanni R. Comprehensive conventional and molecular cytogenetic characterization of B-CPAP, a human papillary thyroid carcinoma-derived cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;151:171-177.

Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini MJ. The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *Biol Chem* 2003; 278:3395-3402.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003;17:1253-1270.

Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev* 1992;72:667-697.

Fabien N, Fusco A, Santoro M, Barbier Y, Dubois PM, Paulin C. Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers. *Cancer* 1994;73:2206-2212.

Fetsch PA, Abati A, Litman T, Morisaki K, Honjo Y, Mittal K, Bates SE. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett* 2006;235:84-92.

Friedman S, Lu M, Schultz A, Thomas D, Lin RY. CD133+ anaplastic thyroid cancer cells initiate tumors in immunodeficient mice and are regulated by thyrotropin. *PLoS One* 2009;4:e5395.

Gibelli B, El-Fattah A, Giugliano G, Proh M, Grosso E. Thyroid stem cells--danger or resource? *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2009;29:290-295.

Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Nat med 2009 Cancer stem cells: mirage or reality?. *Nat Med* 2009; 5:1010-1012.

Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, Ratovitski EA, Jen J, Sidransky D. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5462-5467.

Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:4827-4833.

Hombach-Klonisch S, Paranjothy T, Wiechec E, Pocar P, Mustafa T, Seifert A, Zahl C, Gerlach KL, Biermann K, Steger K, Hoang-Vu C, Schulze-Osthoff K, Los M. Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008;56:165-180.

Horan PK, Melnicoff MJ, Jensen BD, Slezak SE. Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods Cell Biol* 1990;33:469-490.

Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004;351:657–667.

Kahn M. Symmetric division versus asymmetric division: a tale of two coactivators. *Future Med Chem* 2011; 3:1745-1763.

Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005;121:823-835.

Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 2006;442:818–822.

Kusumbe AP, Bapat SA. Cancer stem cells and aneuploid populations within developing tumors are the major determinants of tumor dormancy. *Cancer Res* 2009;69:9245-9253.

Lan L, Cui D, Nowka K, Derwahl M. Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3681-3688.

Lang SH, Frame F, Collins A. Prostate cancer stem cells. *J Pathol* 2009; 217:299-306.

Lanzkron SM, Collector MI, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cell tracking in vivo: a comparison of short-term and long-term repopulating cells. *Blood* 1999 ;93:1916-1921.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Cortes JC, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA & Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645–648.

Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bfgf and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 2006; 9:391-403.

Lemoine NR, Mayall ES, Jones T, Sheer D, McDermid S, Kendall-Taylor P, Wynford-Thomas D. Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection. *Br J Cancer* 1989;60:897-903.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030-1037.

Lin RY. Thyroid cancer stem cells *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7:609–616.

Lohrum MA, Vousden KH. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol* 2000;10:197-202.

Malaguarnera R, Mandarino A, Mazzon E, Vella V, Gangemi P, Vancheri C, Vigneri P, Aloisi A, Vigneri R, Frasca F. The p53-homologue p63 may promote thyroid cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:953-971.

Malaguarnera R, Frasca F, Garozzo A, Giani F, Pandini G, Vella V, Vigneri R, Belfiore A. Insulin receptor isoforms and insulin-like

growth factor receptor in human follicular cell precursors from papillary thyroid cancer and normal thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 96:766-774.

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*. 2001 Apr 15;61(8):3458-3464.

Marin MC, Kaelin WG Jr. p63 and p73: old members of a new family. *Biochim Biophys Acta* 2000 ;1470:M93-M100.

Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM, Yildiz P, Shyr Y, Edgerton ME, Westfall MD, Roberts JR, Pietenpol JA, Carbone DP, Gonzalez AL. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res* 2003;63:7113-7121.

Meireles AM, Preto A, Rocha AS, Rebocho AP, Máximo V, Pereira-Castro I, Moreira S, Feijão T, Botelho T, Marques R, Trovisco V, Cirnes L, Alves C, Velho S, Soares P, Sobrinho-Simões M: Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines. *Thyroid* 2007,17: 707-715.

Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, Namba H, Ohtsuru A, Saenko V, Yamashita S. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* 2007;148:1797-1803.

Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004;2:371-386.

Monteiro J, Fodde R. Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives. *Eur J Cancer*. 2010;46:1198-1203.

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006 ;441:1068-1074.

Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994; 1:661-673.

Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7:569-580.

Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2318-2326.

Nonaka D, Tang Y, Chiriboga L, Rivera M, Ghossein R. Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Mod Pathol* 2008;21:192-200.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-110.

Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993 ;81:2844-2853.

Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, Mazzarol G, Vecchi M, Ronzoni S, Bernard L, Viale G, Pelicci PG, Di Fiore PP. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* 2010;140:62-73.

Pilli T, Prasad KV, Jayarama S, Pacini F, Prabhakar BS. Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1333-1342.

Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P. Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* 1990;110:643-651.

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005 ;65:5506-5511.

Reis-Filho JS, Preto A, Soares P, Ricardo S, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M. p63 expression in solid cell nests of the thyroid: further evidence for a stem cell origin. *Mod Pathol* 2003;16:43-48.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105–111.

Scweppe RE, Kloppper JP, Korch C, Pugazhenthii U, Benezra M, Knauf JA, Fagin JA, Marlow LA, Copland JA, Smallridge RC, Haugen BR. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals crosscontamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4331-4341.

Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis* 2005;11:729-737.

Sengupta A, Cancelas JA. Cancer stem cells: a stride towards cancer cure? *J Cell Physiol.* 2010;225:7-14.

Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle* 2004; 3:414-415.

Shi GM, Xu Y, Fan J, Zhou J, Yang XR, Qiu SJ, Liao Y, Wu WZ, Ji Y, Ke AW, Ding ZB, He YZ, Wu B, Yang GH, Qin WZ, Zhang W, Zhu J, Min ZH, Wu ZQ. Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:1155-1563.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63:5821-5828.

Sun B, Chen M, Hawks CL, Pereira-Smith OM, Hornsby PJ. The minimal set of genetic alterations required for conversion of primary human fibroblasts to cancer cells in the subrenal capsule assay. *Neoplasia* 2005;7: 585-593.

Takano T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: theory and practice. *Semin Cancer Biol* 2007;17:233-240.

Thomas T, Nowka K, Lan L, Derwahl M. Expression of endoderm stem cell markers: evidence for the presence of adult stem cells in human thyroid glands. *Thyroid* 2006;16:537-544.

Todaro M, Iovino F, Eterno V, Cammareri P, Gambarà G, Espina V, Gulotta G, Dieli F, Giordano S, De Maria R, Stassi G. Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Res* 2010;70:8874-8885.

Tsunoda S, Okumura T, Ito T, Kondo K, Ortiz C, Tanaka E, Watanabe G, Itami A, Sakai Y, Shimada Y. ABCG2 expression is an independent unfavorable prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2006;71:251-258.

van Staveren WC, Solís DW, Delys L, Duprez L, Andry G, Franc B, Thomas G, Libert F, Dumont JE, Detours V, Maenhaut C. Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. *Cancer Res* 2007;678:113-120.

Wang YH, Li F, Luo B, Wang XH, Sun HC, Liu S, Cui YQ, Xu XX. A side population of cells from a human pancreatic carcinoma cell line harbors cancer stem cell characteristics. *Neoplasia* 2009;56:371-378.

Watanabe H, Gould MN, Mahler PA, Mulcahy RT, Clifton KH. The influence of donor and recipient age and sex on the quantitative transplantation of monodispersed rat thyroid cells. *Endocrinology* 1983;112:172-177.

Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive?. *Cell Commun Signal* 2010;8:6.

Wu XZ. Origin of Cancer Stem Cells: The Role of Self-Renewal and Differentiation. *Ann Surg Oncol*. 2008;15:407-414.

Xi-wei Ding, Jun-hua Wu , Chun-ping Jiang. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cells and cancer therapy. *Life Sci* 2010;86:631-637.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998;2:305-311.

Yoh K, Ishii G, Yokose T, Minegishi Y, Tsuta K, Goto K, Nishiwaki Y, Kodama T, Suga M, Ochiai A. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for

advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:1691-1697.

Zhang P, Zuo H, Nakamura Y, Nakamura M, Wakasa T, Kakudo K. Immunohistochemical analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid tumors. *Pathol Int* 2006 ;56:240-245.

Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008; 68:4311-4320.

Zito G, Richiusa P, Bommarito A, Carissimi E, Russo L, Coppola A, Zerilli M, Rodolico V, Criscimanna A, Amato M, Pizzolanti G, Galluzzo A, Giordano C. In vitro identification and characterization of CD133(pos) cancer stem-like cells in anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *PLoS One* 2008;3:e3544.

## **PUBBLICAZIONI**

Caria P, Vanni R. Cytogenetic and molecular events in adenoma and well-differentiated thyroid follicular-cell neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;203:21-9. Review.

Maric I, Viaggi S, Caria P, Frau DV, Degan P, Vanni R. Centrosomal and mitotic abnormalities in cell lines derived from papillary thyroid cancer harboring specific gene alterations. *Mol Cytogenet.* 2011 Nov 16;4:26.

## RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare la Prof.ssa Valeria Sogos e la Prof.ssa Roberta Vanni per l'indispensabile aiuto fornito nella realizzazione di questa lavoro, per il supporto che mi è stato costantemente offerto e per la fiducia dimostrata nei miei confronti.

Ringrazio le mie colleghe di laboratorio, le Dott.sse Rita Pillai, Francesca Saba e il mio collega Dott. Stefano Cabras, che hanno collaborato nello svolgimento di questo lavoro e per avermi supportato e sopportato in questi anni.

Ringrazio le colleghe del laboratorio di Patogenomica dei Tumori Solidi le Dott.sse Betti Dettori e Daniela Frau soprattutto per avermi sostenuto.

Ringrazio inoltre il Prof. Giorgio La Nasa e la Dott.ssa Marcella Arras e i colleghi del laboratorio di Citofluorimetria, presso il Centro Trapianti di Midollo Osseo afferente all'ospedale Binaghi.

Review

## Cytogenetic and molecular events in adenoma and well-differentiated thyroid follicular-cell neoplasia

Paola Caria, Roberta Vanni\*

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Cagliari, Cittadella Universitaria, SS554, 09042 Monserrato (CA), Italy*

Received 17 August 2010; accepted 28 August 2010

### Abstract

In spite of its simple organization, the thyroid gland can give rise to a wide spectrum of neoplasms, ranging from innocuous to highly malignant lesions. Approximately 94% of the malignancies is represented by well-differentiated thyroid carcinoma originating from follicular cells. These neoplasms are divided into two main categories, papillary thyroid carcinoma and follicular thyroid carcinoma. Despite their origin from the same type of cells, the two neoplasias show different biological behavior and a different set of genetic features, including specific cytogenetic patterns. Thyroid adenoma is the benign counterpart of follicular carcinoma. No benign counterpart of papillary carcinoma has yet been identified. The chromosomes of thyroid nodules have been investigated since 1965, and different cytogenetic subgroups have been recognized, some of which show structural chromosomal rearrangements. These structural changes lead to the formation of fusion genes *RET-PTC*, *TRK(-T)*, and *BRAF-AKAP9*, which originate as a result of intrachromosomal or inter-chromosomal rearrangements and are found in papillary thyroid carcinoma. Fusion genes involving *PPAR $\gamma$*  are caused mainly by translocations and are characteristic of follicular neoplastic tissue. Radiation exposure and the particular architectural arrangement of chromatin regions in which the affected genes lie during interphase are thought to favor the formation of fusion genes in papillary thyroid carcinoma and possibly also in follicular thyroid carcinoma. © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The thyroid is the largest endocrine gland in humans. It contains two distinct hormone-producing cell types, the follicular cells (which line the colloid follicles, take up iodine, and synthesize thyroid hormone) and C cells (parafollicular cells responsible for the production and secretion of calcitonin). Although thyroid malignancy occurs relatively rarely in the United States and in Europe (3–9 per 100,000 population, accounting for approximately 1% of all newly diagnosed cancer cases), benign thyroid neoplasm is common. In fact, at simple palpation, approximately 4–7% of the population shows a thyroid nodule, but the percentage increases to 65% if autoptic findings are considered [1]. The malignancies consist of well-differentiated (94%) and anaplastic (1%) neoplasms derived from follicular cells, as well as medullary (5%) cancer derived from C cells. Follicular-cell-derived neoplasms comprise both

benign (adenoma) and malignant (carcinoma) lesions, the latter being divided according to the World Health Organization classification [2] into well-differentiated, poorly differentiated, and undifferentiated (anaplastic) carcinoma (Fig. 1). In turn, well-differentiated thyroid tumors are divided into two categories, papillary thyroid carcinoma (PTC) and follicular thyroid carcinoma (FTC), on the basis of their propensity to invade and on the cytological features of the neoplastic cell nuclei [2,3]. PTC is by far the most common—more than 80% of all malignant thyroid tumors [4]—and it apparently does not have a benign counterpart. FTC, which accounts for approximately 10% of thyroid cancer, morphologically overlaps the benign follicular thyroid adenoma (FTA), from which it is distinguished by its invasive features such as full penetration of the tumor capsule or invasion of blood vessels. Radiation exposure, especially in children, significantly increases the risk of thyroid malignancies, particularly PTC. Patients with follicular-cell thyroid cancer generally have a more favorable prognosis than patients with other cancers.

PTC has long been believed to be an exception in the panorama of solid tumor cytogenetics in that it was the first,

\* Corresponding author. Tel.: 39-070-675-4123; fax: 39-070-675-4100.

E-mail address: vanni@unica.it (R. Vanni).

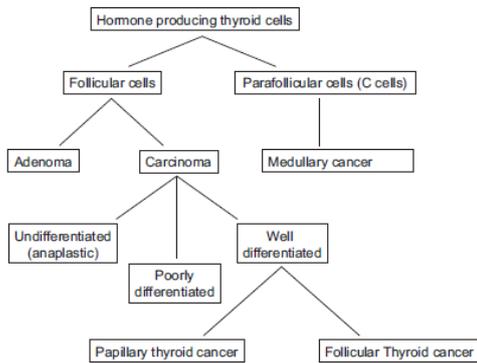


Fig. 1. Tumors originating from thyroid hormone-producing cells.

and for a long time the only, epithelial tumor in which an acquired chromosomal rearrangement had generated a transforming fusion gene [5]. In fact, it is now clear that fusion genes formed by chromosomal alterations are a common tumorigenic mechanism shared by most solid tumors (including those of mesenchymal and neuroectodermal origin) [6]. The previously reported association of fusion genes with predominantly mesenchymal tumors was due to bias in reporting [7].

Instability at the chromosomal and/or DNA level is responsible for the different cytogenetic patterns found in benign and malignant well-differentiated thyroid nodules. This review will focus on the chromosomal patterns and on the role of chromosomal aberrations in these neoplasms, highlighting the importance of cytogenetic studies in detecting genes associated with thyroid tumorigenesis.

## 2. Genomic instability in well-differentiated thyroid neoplasms

Genomic instability plays a critical role in the development of sporadic cancer as well as in the onset, maintenance, and progression of cancer-prone syndromes [8]. Genomic instability is driven by small alterations at the nucleotide level, especially in the area of microsatellites (microsatellite instability), as well as by an increased rate of imbalances in chromosome number or acquired chromosomal rearrangements (chromosomal instability, CIN). In many cancers CIN contributes to maintaining high levels of aneuploidy in cells exhibiting high rates of chromosome missegregation (i.e., gain or loss of whole chromosomes) at each cell cycle. The upregulation of a set of 70 genes, known as the chromosomal instability 70 (CIN70) cluster, is associated with aneuploidy and predicts the clinical outcome in several cancers [9]. The role of genomic instability in both benign and malignant differentiated thyroid lesions has not yet been fully investigated. However, CIN leading to the generation of numerical and structural

changes is a feature of preneoplastic and neoplastic thyroid lesions. Studies on loss of heterozygosity have revealed major CIN differences between FTC and PTC [10].

Aneuploidy, a mirror of CIN, has been observed in both FTA [11] and FTC [12,13], including a subset of FTC that shows oncocyctic features [14]. However, another subset of FTC is characterized by near-diploid karyotypes and structural chromosomal rearrangements [15]. These observations lead to the hypothesis that two different major patterns of unbalanced genome may exist in FTA and FTC: one with mainly aneuploidy and numerous chromosome gains, and the other with limited aneuploidy and predominantly chromosome losses and/or structural changes [13]. By contrast, PTC does not show large scale CIN, although complex karyotypes have been observed in advanced clinicopathological stages [16,17]. This feature is in keeping with low loss of heterozygosity [10] and with microsatellite instability [18] that has been described in tumors with papillary architecture.

These two patterns of CIN lie at the basis of the different types of chromosomal changes (for references, see the Mitelman database) [19] observed in well-differentiated thyroid lesions and suggest that different molecular pathways are involved in the two types of thyroid carcinoma.

## 3. Cytogenetics

### 3.1. Benign neoplasm

Benign proliferation of follicular cells in the thyroid can give rise to a variety of lesions, ranging from noneoplastic disorder and benign hyperplastic nodules to adenoma. Several studies have reported that chromosomal changes are present along the whole histologically benign spectrum and that there are at least four main cytogenetic subgroups. These subgroups, which account for approximately 46% of benign lesions with clonal chromosomal changes, are characterized by the presence of trisomy 7 (with or without additional polysomies), translocations involving 19q13, translocation t(2;3)(q13;p25), and translocations involving 2p21. Of these, trisomy 7, first reported in 1965 in a benign thyroid nodule [20], is found in more than 30% of FTA. By itself or with other polysomies, trisomy 7 has been found also in noneoplastic thyroid proliferations [11,21,22], but it has never been seen in normal thyroid follicular cells [23]. It has, however, been observed in nodules from patients with Hashimoto thyroiditis [20,24]. The role of trisomy 7 in thyroid benign neoplasm has not yet been clarified. Because cases with chromosome counts of more than 47 only exceptionally lack trisomy or tetrasomy 7 [25], it has been proposed that polysomies accumulate according to an evolutionary scheme, starting with chromosome 7 [11] and gaining mainly chromosomes 5, 12, 17, 19, 20, and X [19].

Moreover, their increase parallels the hypothetical transitions from hyperplastic nodules to adenomatous

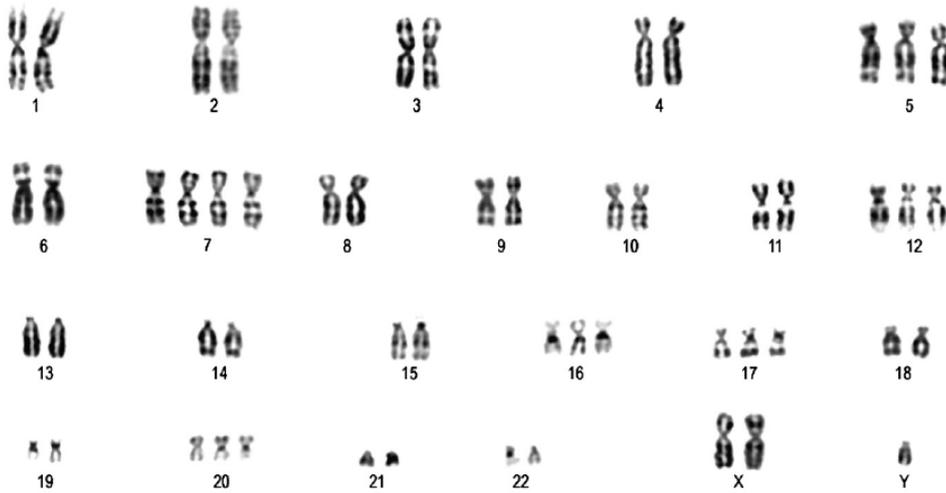


Fig. 2. Common cytogenetic numerical changes in adenoma. A representative G-banded karyotype with 54 chromosomes is shown.

hyperplasia and adenoma [19]. It is only for a subgroup of lesions, namely oncocytic lesions, characterized by cells with a diffuse accumulation of mitochondria, that the acquired hypertriploid chromosome count has been associated with possible progression toward malignancy [14]. In benign lesions, the range of chromosome counts is usually 47 to 55 (Fig. 2), occasionally reaching 70 [11]. Much new knowledge on molecular mechanisms of thyroid pathogenesis has been acquired in the past few years. Several genetic alterations have been associated with both benign and malignant lesions. Among these, *RAS* mutations are thought to be early events in the evolution of several cancers. Both *RAS* mutations and aneuploidy were studied in 34 cases of FTA, and it was shown that the two events are mutually exclusive [26].

Translocations involving 19q13 are the second most common cytogenetic abnormality found in benign thyroid neoplasm and are distributed throughout the whole spectrum of benign proliferations. They have been observed in 11% of adenomas and in 15.5% of nonencapsulated nodules. So far, chromosomes 1, 5, 10, 16, 17, and X have been identified as translocation partners [19], with a slight excess of chromosome 5 (Fig. 3). The breakpoints at 19q13 lie in a segment of approximately 150 Kb [27], and the resultant rearrangement targets and activates two stem cell micro-RNA gene clusters [28]. The translocation is almost invariably reciprocal in adenoma and is often observed as the only karyotypic change. In contrast, 19q13 is rarely involved in carcinoma, is usually present as a derivative chromosome, and is accompanied by other chromosomal changes [15,29,30].

The translocation  $t(2;3)(q12-13;p24-25)$  is found in approximately 5% of FTA [19]. Approximately the same breakpoints in chromosomes 2 and 3 were first reported in a four-way translocation  $t(2;3;6;15)$  by Bondeson and colleagues in 1989 [31]. Since then, nonrandom involvement of  $t(2;3)(q13;p25)$  has been reported by other groups [25,30,32]. Because the same breakpoint on the short arm of chromosome 3 is also involved in changes in FTC, it has been speculated that this anomaly could represent an early step in thyroid carcinogenesis [32].

Translocations involving 2p21 are observed in a minority of nodules and account for approximately 3% of adenoma [19]. The breakpoint disrupts *THADA* (thyroid adenoma associated) gene [33]. Different translocation partners have been reported [19].

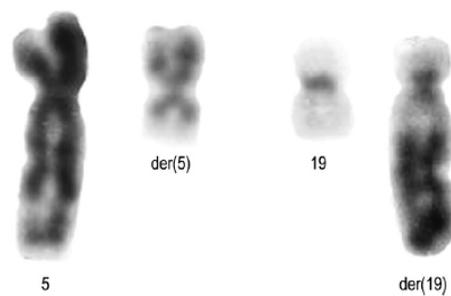


Fig. 3. Common cytogenetic structural changes in benign thyroid proliferation. A partial karyotype showing a  $t(5;19)(q13;q13)$  is shown.

### 3.2. Malignant neoplasm

Malignant thyroid cancer of differentiated follicular cells includes FTC and PTC. Specific histological features distinguish the two categories, although overlapping lineaments may characterize different histological variants. Most of the karyotypically analyzed malignant thyroid neoplasms [19] belong to these two different histotypes.

A certain degree of CIN, a feature of FTC, is reflected in the cytogenetic subgroup characterized by numerical chromosomal changes. The chromosomes of this subgroup have been studied via different approaches, such as flow cytometry [34], fluorescence in situ hybridization (FISH) [35], and comparative genomic hybridization (CGH) [36]. The chromosome pattern is similar to that found in FTA, namely the involvement of chromosome 7 and additional polysomies. Chromosome gains and losses are often partial, with 7p11–12, 7q11.3–21, and 7q31 being the most overrepresented regions [12]. A second cytogenetic subgroup, with diploid or near-diploid karyotypes, carries the same t(2;3)(q13;p25) seen in FTA, suggesting that thyroid cells with this translocation may be precursors of malignant cells. Kroll et al. [37] discovered that the translocation results in an in-frame fusion between most of the coding sequences of the thyroid transcription factor *PAX8* (located at 2q13) and the peroxisome proliferator-activated receptor *PPAR $\gamma$*  (located at 3p25). Thus, the two main chromosomal patterns observed in FTC are shared with FTA. This is in keeping with the hypothesis that some adenoma may give rise to FTC through additional mutational events. This hypothesis is apparently supported by the results of recent molecular studies [38].

PTC, in contrast to FTC, has a more stable chromosome profile resulting in karyotypes in the diploid range, with simple changes. Nevertheless, complex karyotypes have been found, mainly in cases with mixed or multidivergent differentiation. In fact, CGH and array CGH of PTC have shown a higher frequency of aberrations than was previously described by G banding [39,40], with significant correlation between the presence of chromosomal aberrations and invasion [41]. Simple karyotypes found in PTC are characterized by structural changes predominantly affecting bands 10q11 and 10q21. In fact, the involvement of band 10q11 in translocations and paracentric inversions, which is visible in approximately 17% of PTC [19], has been reported since 1990 [42]. Subsequently, it was demonstrated that these structural changes, often submicroscopic, lead to the juxtaposition of *RET* gene (located at 10q11.21) to different DNA partner sequences. This creates the oncogenic sequence *RET-PTC* [5,43], a frequent molecular event in PTC.

Other chromosomal changes in PTC are represented by gains of chromosome 2 or 2q, mainly acquired in the so-called tall cells variant [16]. Moreover, other breakpoint cluster regions observed in PTC are 1p32–36, 1p11–13, 3p25–26, and 7q32–36 [16]. The *BRAF* gene, located in

the 7q34 band, is usually activated by point mutations [44], which do not occur in tumors with the *RET-PTC* rearrangement. Nevertheless, *BRAF* can be activated via chromosome damage, as was demonstrated in a case with inv(7)(q21–22q34) [45].

Isolated clonal trisomy 17 has been reported in the PTC follicular variant (PTC-FV) [46]. Although this is a tumor subtype with scanty or absent papillae, it still maintains the nuclear features and the clinicopathological behavior of PTC [47], which means it is rarely aggressive. Intriguingly, karyotypes of this variant often overlap those found in FTA and FTC. Indeed, chromosome gains and losses similar to those found in FTA and FTC have been demonstrated by CGH in PTC-FV [48]. Moreover, the t(2;3)(q13;p25) has been reported in a minority of cases [16]. These findings not only suggest a stronger biological relationship between the PTC-FV and FTA/FTC than was previously evaluated, but also indicate the intrinsic value of considering chromosome patterns as an adjunct diagnostic tool in the current classification of well-differentiated thyroid tumors [48].

### 4. Molecular mechanisms

In the past few years, it has been recognized that chromosomal aberrations lead to the formation of fusion genes in an increasing number of epithelial malignancies, including thyroid cancer. The new knowledge has led to a significant progress in the understanding of the molecular basis of thyroid carcinogenesis, as well as of the molecular pathways that are activated in these neoplasms [49].

Fusion genes in epithelial tumors were first demonstrated in PTC by transfection experiments. These showed that the transforming genes resulted from the fusion of the 3' tyrosine kinase portion of either *RET* or *NTRK1* to the 5' end of heterologous genes [50]. The chimeric genes are generically named *RET-PTC* and *TRK (and TRK-T)* respectively. Interchromosomal (translocations), but more frequently intrachromosomal (inversions) rearrangements lead to the formation of different *RET-PTC* oncogene variants (Table 1). The chimeric oncogene induces constitutive activation of *RET* under the control of the newly acquired promoters, belonging to unrelated genes that are normally expressed in follicular thyroid cells. This is in contrast to the wild-type *RET* gene, which is not activated in these cells. The constitutive activation and ectopic expression of *RET* is found in approximately 20% of PTC [51]. Prevalence of *RET-PTC* differs considerably among reports, depending on different methods of detection and on the genetic heterogeneity of the tumor [52]. The most common chimeric *RET* oncogene, *RET-PTC1*, which results from inv(10)(q11.2q21.2) and leads to the *CCDC6(H4)-RET* fusion (Fig. 4a), is present in approximately 60–70% of the cases. The *RET-PTC3* variant, resulting from an inversion of the 10q11.2 band and leading to the *NCOA4(ELE1)-RET* fusion, is present in 20–30% of PTC. Other variants result

Table 1  
Chromosome aberrations identified (or predicted) to result in *RET-PTC* oncogene formation

Chromosome abnormality	Fusion gene variant	<i>RET-PTC</i>	Association with radiation	Reference
inv(10)(q11.2q21.2)	<i>CCDC6-RET</i>	<i>RET-PTC1</i>	Rarely	[63]
t(10;17)(q11.2;q23)	<i>PRKARIA-RET</i>	<i>RET-PTC2</i>	Rarely	[64]
inv(10)(q11.2q11.2) <sup>a</sup>	<i>NCOA4-RET</i>	<i>RET-PTC3/4</i>	Yes	[65,66]
t(10;14)(q11.2;q?)	<i>GOLGA5-RET</i>	<i>RE-PTC5</i>	Yes	[67]
t(7;10)(q32;q11.2)	<i>TRIM24-RET</i>	<i>RET-PTC6</i>	Yes	[68]
t(1;10)(p13;q11.2)	<i>TRIM33-RET</i>	<i>RET-PTC7</i>	Yes	[68]
t(10;14)(q11.2;q22.1)	<i>KTN1-RET</i>	<i>RET-PTC8</i>	Yes	[69]
t(10;18)(q11.2;q21–22)	<i>FRG9-RET</i>	<i>RET-PTC9</i>	Yes	[70]
t(10;12)(q11.2;p13)	<i>ELKS-RET</i>	<i>RET-ELKS</i>	No	[71]
t(8;10)(p21–22;q11.2)	<i>PCMI-RET</i>	<i>RET-PCMI</i>	Yes	[72]
t(6;10)(p21.3;q11.2)	<i>TRIM27-RET</i>	<i>RET-RFP</i>	Yes	[73]
t(8;10)(p11.2;q11.2)	<i>HOOK-RET</i>	<i>RET-HOOK3</i>	No	[74]
t(5;10)(p15.3;q11)	—	—	—	[42]
t(1;10)(p13;q11.2)	—	—	—	[16]
t(10;13)(q11;p11)	—	—	—	[16]

<sup>a</sup> Submicroscopic.

from chromosome translocations and are rare, with the exception of the *RET-PTC2* variant, which is found in approximately 5–9% of PTC. It occurs secondary to t(10;17)(q11.2;q23) and leads to the *PRKARIA-RET* fusion (Fig. 4b).

The formation of *RET-PTC* has been correlated with accidental (as in the case of the Chernobyl accident) [53] as well as therapeutic [54] exposure to ionizing radiation.

It has been suggested that there is an association between the *RET-PTC* variants and the different morphological PTC subgroups. In particular, *RET-PTC1* seems to be prevalent in the classical papillary variant, whereas *RET-PTC3* is associated with the tall-cell and the solid variants. A lower frequency of *RET* activation is found in PTC-FV, which has a molecular profile very close to the follicular adenomas/carcinomas (i.e., a high rate of *RAS* point

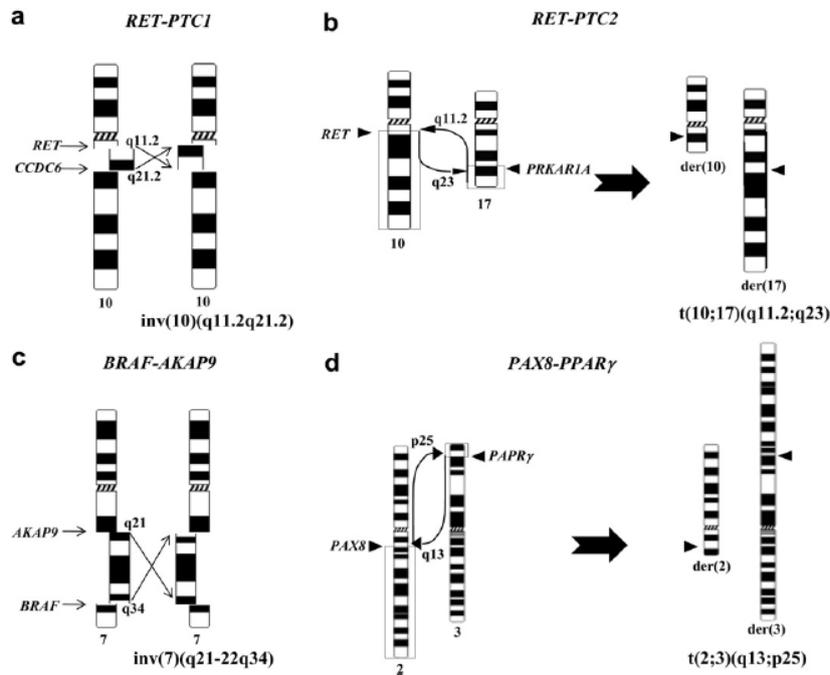


Fig. 4. Schematic representation of chromosome abnormalities leading to fusion genes in papillary thyroid carcinoma (a–c), adenoma, and follicular carcinoma (d).



Fig. 5. Schematic representation of bacterial artificial chromosome clones flanking *RET* (a, left) and *PPAR $\gamma$*  (b, left) used to reveal gene disruption via the fluorescence in situ hybridization break-apart probe strategy (a and b, right). Arrows point to the break-apart signals.

mutations, the presence of *PAX8-PPAR $\gamma$* , and absence of *BRAF* mutations) [55,56]. The intrachromosomal rearrangements leading to *RET-PTC* formation are often submicroscopic, but they can be reliably revealed by interphase FISH by means of a dual-color break-apart strategy that allows visualization of the break in the *RET* gene (Fig. 5a). Although this strategy has been successfully applied to archival material [57], studies in large cohorts are needed before a routine application to preoperative material can be recommended.

The other tyrosine kinase receptor gene involved in gene fusion in PTC is *NTRK1*. It encodes a receptor for a nerve growth factor and is located at 1q22. *NTRK1* is involved in fusions in approximately 12% of PTC. Although there is no cytogenetic evidence for fusion of *TMP3* and *TPR* (located at 1q) or *TGF* (located at 3q) with *NTRK1*, molecular studies have demonstrated that the rearrangements are nearly balanced [58], presumably because they have arisen from paracentric inversions and translocations.

It has been suggested that the spatial proximity of *RET* [59] and *NTRK1* [60] with their partner loci in interphase cells plays an important role in favoring the generation of gene fusions as a consequence of repair defects after double-strand DNA breaks caused by radiation exposure.

Activation of *BRAF* by fusion gene *AKAP9-BRAF* (Fig. 4c) has been found in 11% of radiation-induced PTC, presumably as a result of paracentric inv(7)(q21–22q34). It results in an in-frame fusion between exons 1–8 of the *AKAP9* gene and exons 9–18 of *BRAF*. The fusion protein has increased kinase activity [45].

Since the first report [37] on the formation of the fusion gene *PAX8-PPAR $\gamma$*  (Fig. 4d), secondary to t(2;3)(q13;p25), in FTC, the molecular abnormality has been detected in 30–35% of FTC and in approximately 8% of FTA [61]. The translocation fuses *PAX8*, which plays a key role in normal thyroid differentiation, with *PPAR $\gamma$* , resulting in the expression of a *PAX8-PPAR $\gamma$*  fusion protein. This may be an initial event in the pathogenesis of FTC [49]. The translocation is also frequently detected in PTC-FV [57]. Recently, another partner gene (*CREB3L2*, located at 7q34) has been found to fuse with *PPAR $\gamma$*  in a FTC carrying a t(3;7)(p25;q34) [62], confirming 3p25 as a hot spot for chromosome breakage, as is already known from G-banded karyotype studies [19]. The *CREB3L2-PPAR $\gamma$*  fusion gene is present in less than 3% of studied FTC. The break in the *PPAR $\gamma$*  gene may be reliably revealed by interphase FISH using the dual-color break-apart strategy (Fig. 5b). The diagnostic value of preoperative testing for *PPAR $\gamma$*  fusion is still being debated because of its ubiquitous presence in both benign and malignant lesions. However, because there is recent evidence for the oncogenic potential of protein products of *PAX8-PPAR $\gamma$*  and *CREB3L2-PPAR $\gamma$*  [62], it is plausible that benign nodules with the translocation have the potential to progress.

## 5. Conclusions

Thyroid carcinoma was the first epithelial tumor in which a recurrent chromosomal rearrangement was

discovered. It followed the finding that specific reciprocal translocations, found in leukemia as well as in mesenchymal tumors, were responsible for the formation of fusion genes. This discovery demonstrated the essential role played by structural chromosomal rearrangements in the pathogenesis of cancer, irrespective of its cellular origin. In follicular thyroid cells, intrachromosomal or interchromosomal changes lead to the formation of rearranged genes that code for proteins with a potential for oncogenesis and the ability to disrupt fundamental biological pathways and drive the neoplastic process.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Acknowledgments

The authors are very grateful to Daniela V. Frau for setting up the break-apart probes and for the FISH experiments. This work is supported in part by Fondo per gli Investimenti della Ricerca di Base (FIRB) project RBIP0695BB and Fondazione Banco di Sardegna.

### References

- [1] Dean DS, Gharib E. Epidemiology of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:901–11.
- [2] Lellis De, Lloyd R, Heitz PU, Eng C, editors. Classification of tumors: pathology and genetics of tumours of endocrine organs. World Health Organization of Tumors. Lyon: IARC Press, 2004.
- [3] Eszlinger M, Krohn K, Hauptmann S, Dralle H, Giordano TJ, Paschke R. Perspectives for improved and more accurate classification of thyroid epithelial tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3286–94.
- [4] LiVolsi V, Baloch Z. Follicular neoplasms of the thyroid. View, biases and experiences. *Adv Anat Pathol* 2004;11:279–87.
- [5] Pierotti MA, Santoro M, Jenkins RB, Sozzi G, Bongarzone I, Grieco M, et al. Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogenic sequence RET/PTC. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1616–20.
- [6] Edwards PA. Fusion genes and chromosome translocations in the common epithelial cancers. *J Pathol* 2010;220:244–54.
- [7] Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat Genet* 2004;36:331–4.
- [8] Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:221–8.
- [9] Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, Harris LN, Szallasi Z. A signature of chromosome instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 2006;38:1043–8.
- [10] Ward LS, Brenta G, Medvedovic M, Fagin JA. Studies of allelic loss in thyroid tumors reveal major differences in chromosomal instability between papillary and follicular carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:525–30.
- [11] Belge G, Roque L, Soares J, Bruckmann S, Thode B, Fonseca E, et al. Cytogenetic investigations of 340 thyroid hyperplasias and adenomas revealing correlations between cytogenetic findings and histology. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;101:42–8.
- [12] Roque L, Rodrigues R, Pinto A, Moura-Nunes V, Soares J. Chromosome imbalances in thyroid follicular neoplasms: a comparison between follicular adenomas and carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:292–302.
- [13] Castro P, Eknaes M, Teixeira MR, Danielsen HE, Soares P, Lothe RA, et al. Adenomas and follicular carcinomas of the thyroid display two major patterns of chromosomal changes. *J Pathol* 2005;206:305–11.
- [14] Dettori T, Frau DV, Lai ML, Mariotti S, Uccheddu A, Daniele GM, et al. Aneuploidy in oncogenic lesions of the thyroid gland: diffuse accumulation of mitochondria within the cell is associated with trisomy 7 and progressive numerical chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:22–31.
- [15] Roque L, Clode A, Belge G, Pinto A, Bartnitzke S, Santos JR, et al. Follicular thyroid carcinoma: chromosome analysis of 19 cases. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21:250–5.
- [16] Roque L, Nunes VM, Ribeiro C, Martins C, Soares J. Karyotypic characterization of papillary thyroid carcinomas. *Cancer* 2001;92:2529–38.
- [17] Rodrigues R, Roque L, Espadilha C, Pinto A, Domingues R, Dinis J, et al. Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas. *Oncol Rep* 2007;18:917–26.
- [18] Lazzereschi D, Palmirotta R, Ranieri A, Ottini L, Veri MC, Cama A, et al. Microsatellite instability in thyroid tumours and tumour-like lesions. *Br J Cancer* 1999;79:340–5.
- [19] Mitelman F, Johansson B, Mertens F, editors. Mitelman database of chromosome aberrations in cancer. Available at: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> accessed on August 2, 2010.
- [20] Atkin NB, Baker MC. Chromosome abnormalities, neoplasia, and autoimmune disease. *Lancet* 1965;1:820–1.
- [21] Gama NB, Gama R, Thomé JA, Tajara EH. Cytogenetic analysis of a multinodular thyroid goiter. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;55:73–7.
- [22] Iliszko M, Kuźniacka A, Lachiński A, Babińska M, Kobierska-Gulida G, Limon J. Karyotypic characterization of 64 nonmalignant thyroid goiters. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;161:178–80.
- [23] Barril N, Carvalho-Sales AB, Tajara EH. Interphase cytogenetic analysis of normal tissue of thyroid gland by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;114:162–4.
- [24] Vanni R, Marras-Virdis S, Gerosa C, Lai ML, Tallini G. Cytogenetics of thyroid nodules in Hashimoto thyroiditis. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;120:87–8.
- [25] Teyssier JR, Liautaud-Roger F, Ferre D, Patey M, Dufer J. Chromosomal changes in thyroid tumors. Relation with DNA content, karyotypic features, and clinical data. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;50:249–63.
- [26] Banito A, Pinto AE, Espadilha C, Marques AR, Leite V. Aneuploidy and RAS mutations are mutually exclusive events in the development of well-differentiated thyroid follicular tumours. *Clin Endocrinol* 2007;67:706–11.
- [27] Belge G, Rippe V, Meiboom M, Drieschner N, Garcia E, Bullerdiek J. Delineation of a 150-kb breakpoint cluster in benign thyroid tumors with 19q13.4 aberrations. *Cytogenet Cell Genet* 2001;93:48–51.
- [28] Rippe V, Dittberner L, Lorenz VN, Drieschner N, Nimzyk R, Sendt W, et al. The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas. *PLoS One* 2010;5:e9485.
- [29] Herrmann MA, Hay ID, Bartelt DH Jr, Ritland SR, Dahl RJ, Grant CS, et al. Cytogenetic and molecular genetic studies of follicular and papillary thyroid cancers. *J Clin Invest* 1991;88:1596–604.
- [30] Roque L, Castedo S, Gomes P, Soares J, Clode A, Soares J. Cytogenetic findings in 18 follicular thyroid adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;67:1–6.

- [31] Bondeson L, Bengtsson A, Bondeson AG, Dahlfors R, Grimelius L, Wedell B, et al. Chromosome studies in thyroid neoplasia. *Cancer* 1989;64:680–5.
- [32] Sozzi G, Miozzo M, Cariani TC, Bongarzone I, Pilotti S, Pierotti MA, et al. A t(2;3)(q12–13;p24–25) in follicular thyroid adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;64:38–41.
- [33] Rippe V, Drieschner N, Meiboom M, Murua Escobar H, Bonk U, Belge G, et al. Identification of a gene rearranged by 2p21 aberrations in thyroid adenomas. *Oncogene* 2003;22:6111–4.
- [34] Hostetter AL, Hrafinkelsson J, Wingren SO, Enestrom S, Nordenskjöld B. A comparative study of DNA cytometry methods for benign and malignant thyroid tissue. *Am J Clin Pathol* 1988;89:760–3.
- [35] Barril N, Carvalho-Sales AB, Tajara EH. Detection of numerical chromosome anomalies in interphase cells of benign and malignant thyroid lesions using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;117:50–6.
- [36] Hemmer S, Wasenius VM, Knuutila S, Joensuu H, Franssila K. Comparison of benign and malignant follicular thyroid tumours by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 1998;78:1012–7.
- [37] Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. PAX8-PPARGgamma fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 2000;289:1357–60.
- [38] Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho L, et al. Expression of PAX8-PPARGgamma rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3947–52.
- [39] Chen X, Knauf JA, Gonsky R, Wang M, Lai EH, Chisoe S. From amplification to gene in thyroid cancer: a high resolution mapped bacterial-artificial chromosome resource for cancer chromosome aberrations guides gene discovery after comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 1998;63:625–37.
- [40] Singh B, Lim D, Cigudosa JC, Ghossein R, Shaha AR, Poluri A, et al. Screening for genetic aberrations in papillary thyroid cancer by using comparative genomic hybridization. *Surgery* 2000;128:888–93.
- [41] Bauer AJ, Cavalli LR, Rone JD, Francis GL, Burch HB, Tuttle RM, et al. Evaluation of adult papillary thyroid carcinomas by comparative genomic hybridisation and microsatellite instability analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;135:182–6.
- [42] Jenkins RB, Hay ID, Herath JF, Schultz CG, Spurbeck JL, Grant CS, et al. Frequent occurrence of cytogenetic abnormalities in sporadic nonmedullary thyroid carcinoma. *Cancer* 1990;66:1213–20.
- [43] Ciampi R, Nikiforov YE. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007;148:936–41.
- [44] Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007;28:742–62.
- [45] Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 2005;115:94–101.
- [46] Frau DV, Lai ML, Caria P, Dettori T, Coni P, Faa G, et al. Trisomy 17 as a marker for a subset of noninvasive thyroid nodules with focal features of papillary carcinoma: cytogenetic and molecular analysis of 62 cases and correlation with histological findings. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:177–81.
- [47] Rosai J, Zampi G, Carcangiu ML. Papillary carcinoma of the thyroid: a discussion of its several morphologic expressions with particular emphasis on the follicular variant. *Am J Surg Pathol* 1983;7:809–17.
- [48] Wreesmann VB, Ghossein RA, Hezel M, Banerjee D, Shaha AR, Tuttle RM, et al. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: genome-wide appraisal of a controversial entity. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:355–64.
- [49] Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006;6:292–306.
- [50] Pierotti MA, Bongarzone I, Borello MG, Greco A, Pilotti S, Sozzi G. thyroid epithelial follicular cells. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16:1–14.
- [51] Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8:83–95.
- [52] Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3603–10.
- [53] Rabes HM, Demidchik EP, Sidorov JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2000;6:1093–103.
- [54] Bounacer A, Wicker R, Caillou B, Cailleux AF, Sarasin A, Schlumberger M, et al. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* 1997;15:1263–73.
- [55] Rivera M, Ricarte-Filho J, Knauf J, Shaha A, Tuttle M, Fagin JA, et al. Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns. *Mod Pathol* 2010;23:1191–200.
- [56] Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, et al. PAX8-PPARGgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:213–20.
- [57] Unger K, Zurnadzhy L, Walch A, Mall M, Bogdanova T, Braselmann H, et al. RET rearrangements in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas with a short latency analysed by interphase FISH. *Br J Cancer* 2006;94:1472–7.
- [58] Greco A, Miranda C, Pagliardini S, Fusetti L, Bongarzone I, Pierotti MA. Chromosome 1 rearrangements involving the genes TPR and NTRK1 produce structurally different thyroid-specific TRK oncogenes. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:112–23.
- [59] Gandhi M, Medvedovic M, Stringer JR, Nikiforov YE. Interphase nuclei folding determines spatial proximity of genes participating in carcinogenic RET/PTC rearrangements. *Oncogene* 2006;25:2360–6.
- [60] Roccato E, Bressan P, Sabatella G, Rumio C, Vizzotto L, Pierotti MA, et al. Proximity of TPR and NTRK1 rearranging loci in human thyrocytes. *Cancer Res* 2005;65:2572–6.
- [61] Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, et al. Detection of the PAX8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:354–7.
- [62] Lui WO, Zeng L, Rehrmann V, Deshpande S, Tretiakova M, Kaplan EL, et al. CREB3L2-PPARGgamma fusion mutation identifies a thyroid signaling pathway regulated by intramembrane proteolysis. *Cancer Res* 2008;68:7156–64.
- [63] Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990;60:557–63.
- [64] Sozzi G, Bongarzone I, Miozzo M, Borrello MG, Blutti MG, Pilotti S, et al. A t(10;17) translocation creates the RET/PTC2 chimeric transforming sequence in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9:244–50.
- [65] Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M, et al. Molecular characterization of RET/PTC3: a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 1994;9:509–16.
- [66] Motomura T, Nikiforov Y, Namba H, Ashizawa K, Nagataki S, Yamashita S, et al. RET rearrangements in Japanese pediatric and adult papillary thyroid cancers. *Thyroid* 1998;8:485–9.
- [67] Klugbauer S, Demidchik E, Lengfelder E, Rabes HM. Detection of a novel type of ret rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after

- Chernobyl and analysis of the involved ret fused gene (RFG5). *Cancer Res* 1998;58:198–203.
- [68] Klugbauer S, Rabes H. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1999;18:4388–93.
- [69] Salassidis K, Bruch J, Zitzelsberger H, Lengfelder E, Kellerer AM, Baehlinger M, et al. Translocation t(10;14)(q11.2;q22.1) fusing the kinetin to the ret gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the ret protooncogene in radiation induced childhood papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:2786–9.
- [70] Klugbauer S, Jauch A, Lengfelder E, Rabes HM. A novel type of ret rearrangement (PTC8) in childhood papillary thyroid carcinomas and characterization of the involved gene (RFG8). *Cancer Res* 2000;60:7028–32.
- [71] Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, et al. Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:97–103.
- [72] Corvi R, Berger N, Balczon R, Romeo G. RET/PCM-1: a novel fusion gene in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 2000;19:4236–42.
- [73] Saenko V, Rogounovitch T, Shimizu-Yoshida Y, Abrosimov A, Lushnikov E, Roumiantsev P, et al. Novel tumorigenic rearrangement, Delta rfp/ret, in a papillary thyroid carcinoma from externally irradiated patient. *Mutat Res* 2003;527:81–90.
- [74] Ciampi R, Giordano TJ, Wikenheiser-Brokamp K, Koenig RJ, Nikiforov YE. HOOK3-RET: a novel type of RET/PTC rearrangement in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:445–52.

RESEARCH

Open Access

# Centrosomal and mitotic abnormalities in cell lines derived from papillary thyroid cancer harboring specific gene alterations

Irena Maric<sup>1,2†</sup>, Silvia Viaggi<sup>1,2†</sup>, Paola Caria<sup>3</sup>, Daniela V Frau<sup>3</sup>, Paolo Degan<sup>2</sup> and Roberta Vanni<sup>3\*</sup>

## Abstract

**Background:** Differentiated thyroid carcinoma offers a good model to investigate the possible correlation between specific gene mutations and chromosome instability. Papillary thyroid neoplasms are characterized by different mutually exclusive genetic alterations, some of which are associated with aneuploidy and aggressive phenotype.

**Results:** We investigated the centrosome status and mitotic abnormalities in three thyroid carcinoma-derived cell lines, each maintaining the specific, biologically relevant gene alteration harbored by the parental tumors: *RET/PTC1* rearrangement in TPC1; heterozygous and homozygous *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation in K1 and in B-CPAP, respectively. B-CPAP cells showed a statistically significant ( $P < 0.01$ ) higher frequency of abnormal mitotic figures compared to TPC1 and K1 cells.

**Conclusions:** Our data indicate that *RET/PTC1* oncogenic activity is not related to mitotic chromosome impairment and missegregation whereas, based on the consistent difference in types/frequencies of centrosome and spindle abnormalities observed between K1 and B-CPAP cells, the hetero/homozygous allelic status of *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation seems to be not irrelevant in respect to chromosomal instability development.

**Keywords:** thyroid carcinoma, centrosome, mitotic spindle, *RET/PTC*, *BRAF*

## Background

Chromosomal instability (CIN), a genetic condition that promotes a high rate of chromosome missegregation during mitosis, is a shared feature of most cancers. Aneuploidy is a distinctive trait of most human cancers and has been linked to high tumour grade, advanced stage, and poor prognosis; however, its role in neoplastic transformation and the relationship with CIN are somewhat unclear [1]. A variety of alterations have been proposed as being responsible for CIN, including defects in the spindle checkpoint, defective sister-chromatid cohesion, kinetochore assembly, upregulation of cyclins, erosion of telomeres and centrosome abnormalities [2]. The normal function and numeral integrity of centrosomes can be affected directly by the mutated products of certain proto-oncogenes and tumour-suppressor genes

[3,4]. In particular, centrosome amplification (the presence in the cell of more than two centrosomes) seems to be an early event in tumourigenesis [5], and it may affect CIN in different ways, depending on the capacity to maintain a correct bipolar chromosome segregation in the presence of multipolar spindles. In addition to amplification, structural and functional defects of centrosomes may influence CIN [4].

Papillary thyroid carcinoma (PTC), accounting for approximately 80% of differentiated thyroid carcinoma (DTC), has a number of variants with specific histological characteristics. The classical form of PTC may show activation of the *BRAF* gene or *RET/PTC* variants, in 40-45% and 10-20% of cases, respectively [6]. The two alterations are usually mutually exclusive. In different PTC-derived cell lines, the alternative presence of either *BRAF* mutation or *RET/PTC* rearrangement has been confirmed [7], reinforcing the hypothesis that *RET* and *BRAF* changes are alternative oncogenic events. The majority of papillary thyroid carcinoma shows stable

\* Correspondence: vanni@unicait

† Contributed equally

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Cagliari, 09042, Italy

Full list of author information is available at the end of the article



karyotypes, including the cases in which aneuploid karyotypes have been described [8], being chromosomal instability only observed in the more advanced clinicopathological stages [9]. Intriguingly, however, it has been demonstrated that conditional *BRAF*<sup>V600E</sup> expression induces chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells [10], suggesting a possible key role of the gene in determining CIN. Moreover, the contribution of centrosome in the morphogenetic process of PTC nuclear changes has been recently suggested [11]. Nevertheless, little is known about the relationship among PTC molecular events, aneuploidy and genomic instability of these tumours.

TPC1, K1 and B-CPAP PTC-derived cell lines are characterized by the specific genetic alterations of the parental tumours from which they have been derived, namely *RET/PTC1* rearrangement in TPC1 [12], *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation in K1 and in B-CPAP [7]. To investigate the possible relationship between the relevant specific gene alterations and mitotic behavior of thyroid cancer cells, we studied centrosome abnormalities and mitotic spindle aberrations of these three human PTC-derived cell lines and of NTHY-ORI3.1 cells derived from human follicular epithelial cells.

## Results

### Fluorescence in situ hybridization

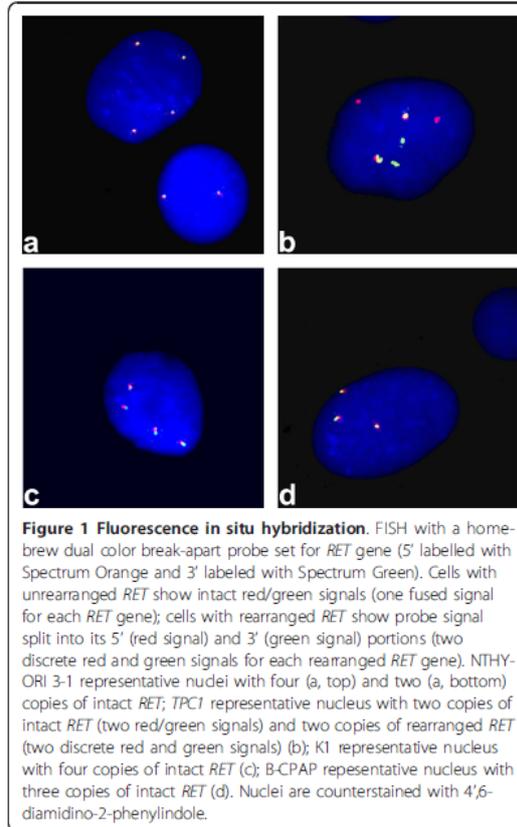
***RET* FISH pattern interpretation.** Diploid cells that have the chromosomal rearrangement involving the *RET* gene will show a discrete red signal distanced from a discrete green signal, indicating the breakage of one *RET* allele, while the second allele will show a red/green fused signal. Depending on chromosome 10 polysomy, this pattern will change accordingly.

#### NTHY-ORI-3.1 cell line

Nuclei of the NTHY-ORI-3.1 cell line showed two, three or four red/green intact signals, indicating no *RET* rearrangement and the presence of tri-tetraploid clones, in addition to the diploid one (Figure 1a).

#### PTC-derived cell lines

Most nuclei of the TPC1 cell line showed two intact red/green signals and two red and two green discrete signals, indicating the presence of *RET* breakage in the tetraploid clone (Figure 1b). A minor diploid clone showed one intact red/green signal and one red and one green discrete signals. Nuclei of the K1 cell line showed four intact red/green fluorescent signals, as expected for tetrasomy 10 (Figure 1c) in a tetraploid cell line. Nuclei of the B-CPAP cell line showed red/green intact signals. According to the presence of a major clone with trisomy 10, most of the nuclei showed three intact red/green signals (Figure 1d).



**Figure 1 Fluorescence in situ hybridization.** FISH with a home-brew dual color break-apart probe set for *RET* gene (5' labeled with Spectrum Orange and 3' labeled with Spectrum Green). Cells with unrearranged *RET* show intact red/green signals (one fused signal for each *RET* gene); cells with rearranged *RET* show probe signal split into its 5' (red signal) and 3' (green signal) portions (two discrete red and green signals for each rearranged *RET* gene). NTHY-ORI 3-1 representative nuclei with four (a, top) and two (a, bottom) copies of intact *RET*; TPC1 representative nucleus with two copies of intact *RET* (two red/green signals) and two copies of rearranged *RET* (two discrete red and green signals) (b); K1 representative nucleus with four copies of intact *RET* (c); B-CPAP representative nucleus with three copies of intact *RET* (d). Nuclei are counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole.

These results indicated that only TPC1 cells had *RET* rearrangement.

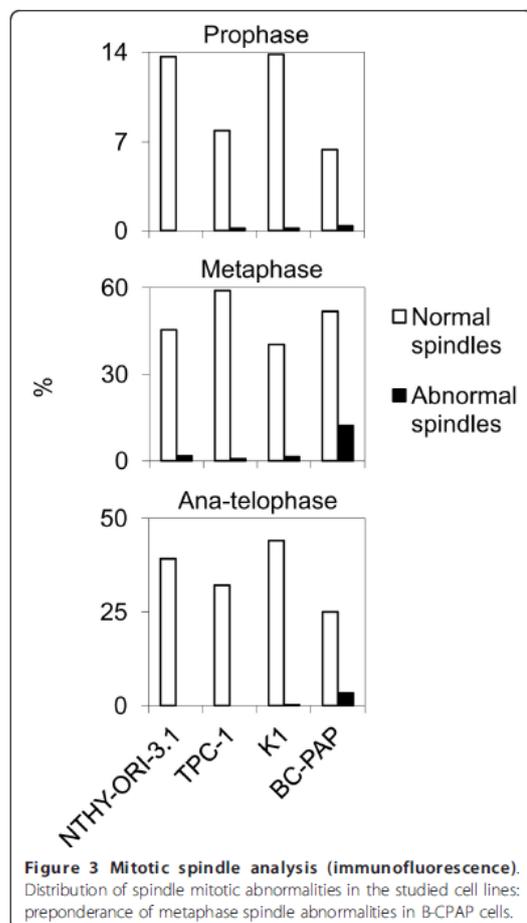
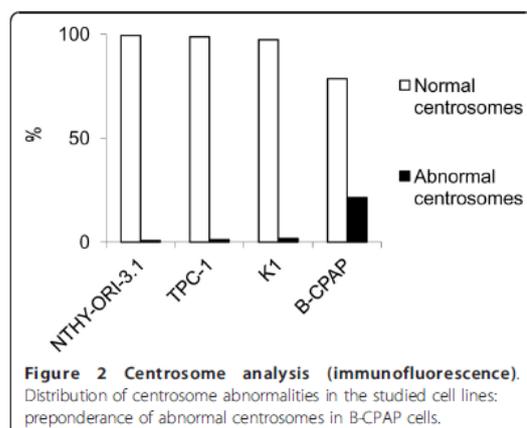
### Immunofluorescence results

#### NTHY-ORI-3.1 cell line

A very low frequency of centrosome amplification (0,7%) and spindle abnormalities (1,7%) were observed in the control SV-40-immortalized cell line NTHY-ORI-3, as an effect of SV40 immortalization (Figures 2 and 3).

#### PTC-derived cell lines

B-CPAP cells displayed a significantly higher ( $P < 0.01$ ) frequency of centrosome amplification (21,4%), when compared to normal thyroid tissue derived NTHY-ORI-3.1 cell line (0,7%) and the papillary thyroid tumour derived TPC1 (1,1%) and K1 (1,8%) cell lines (Figure 2). In detail, NTHY-ORI-3.1 cells showed normal centrosomes (Figure 4a) as well as TPC1 (Figure 4b) and K1 (Figure 4c) cells, whereas in B-CPAP cells centrosome amplification was observed (Figure 4d). The



immunofluorescence with anti-centrin 2 antibody showed one or two centriolar pairs in NTHY-ORI-3.1 (Figure 4e), TPC1 (Figure 4f), and K1 (Figure 4g), and amplification (centriolar pairs > 2) in B-CPAP (Figure 4h, i).

Among the four analyzed cell lines (Figure 3, Figure 4j-p), only B-CPAP cells showed a statistically significant ( $P < 0.01$ ) higher frequency of abnormal mitotic figures (15.9%) (Figure 4m, n, o) compared to both follicular cells derived NTHY-ORI-3.1 (1.7%) and tumour derived TPC1 (0.9%) and K1 (1.8%) cell lines. A small fraction of B-CPAP cells showed acentrosomal spindle poles (Figure 4p).

#### Giemsa-staining results

##### NTHY-ORI-3.1 cell line

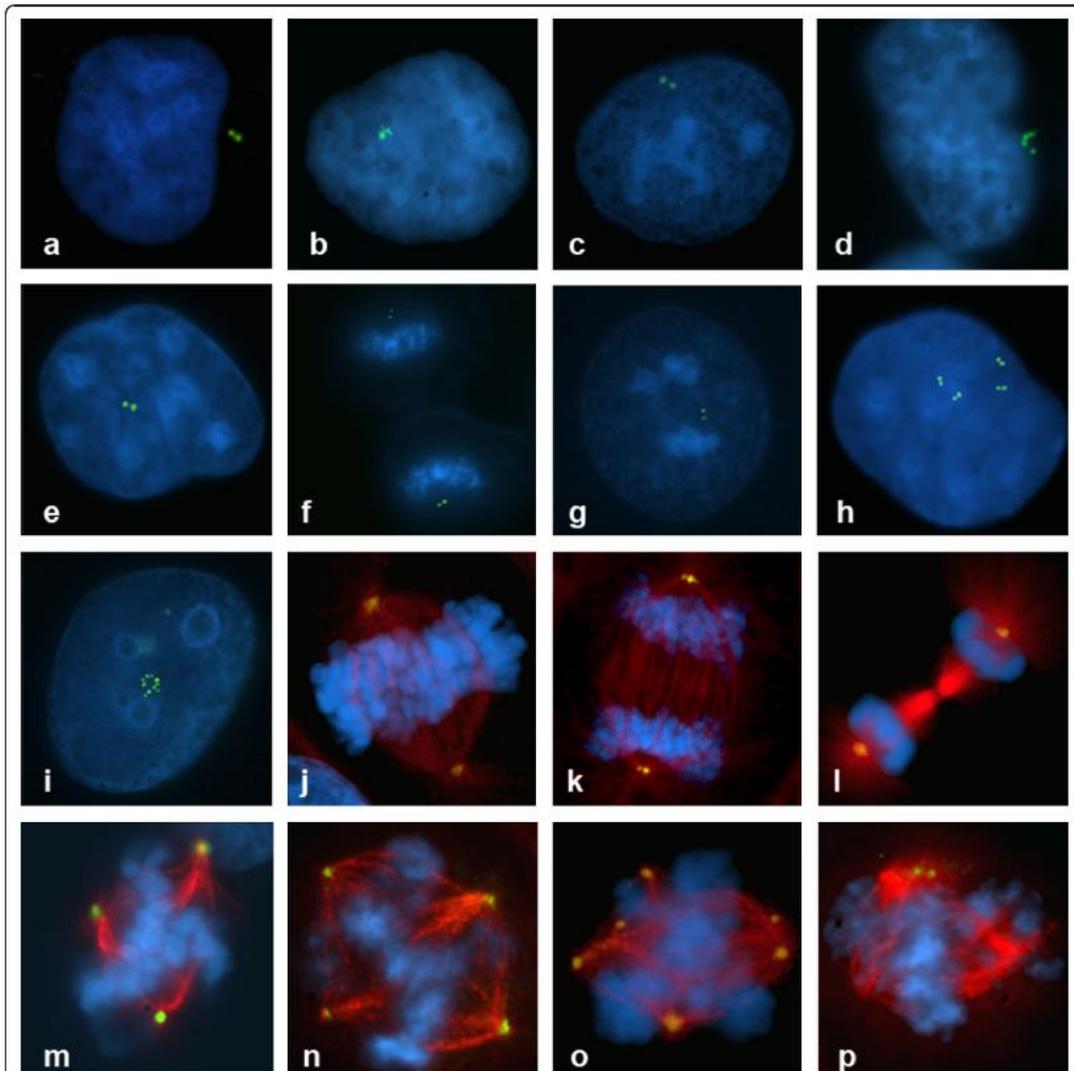
NTHY-ORI-3.1 cells showed a total of 9.2% aberrant mitotic figures, mainly consisting of metaphases with misaligned chromosomes (2.8%) and anaphases with chromosome laggings (5.6%). A very low percentage of mitosis (0.6%) showed multipolar spindles (Figures 5 and 6).

##### PTC-derived cell lines

Among the three thyroid cancer derived cell lines, both TPC1 and K1 cells showed approximately 7% aberrant mitotic figures (Figures 5 and 6). Most of the TPC1 abnormal mitosis were metaphases with misaligned chromosomes (Figure 7a) (5.7%) and a minority involved chromosome laggings (0.5%) and multipolar mitoses (0.9%). The K1 cells showed metaphases with misaligned chromosomes (3.8%) or chromosome laggings (2.3%), and few multipolar mitosis (0.8%). Comparing the abnormal mitotic figures of these cell lines with those of Giemsa-stained B-CPAP cells, a statistically significant ( $P < 0.01$ ) higher frequency of abnormal mitotic figures was found in B-CPAP cells (28.3%) (Figures 4 and 5), including misaligned chromosomes (10.7%) (Figure 7b), ana-telophase lagging chromosomes (2.0%) (Figure 7c), multipolar figures (6.8%) (Figure 7d), c-metaphases (3.8%) (Figure 7e), and other alterations (5%), such as highly polyploid figures, pulverized metaphases and others that were difficult to classify (Figure 7f).

#### Discussion

A number of gene alterations, such as point mutations in *RAS* and *BRAF* genes, point mutations or amplification of *PIK3CA*, and fusion genes involving *RET*, *NTRK1* and *PPAR $\gamma$*  are known to frequently occur in differentiated thyroid carcinoma [6,13], and are correlated to different morphological subtypes. Moreover, they are characterized by different chromosome patterns, defining specific cytogenetic subgroups which are



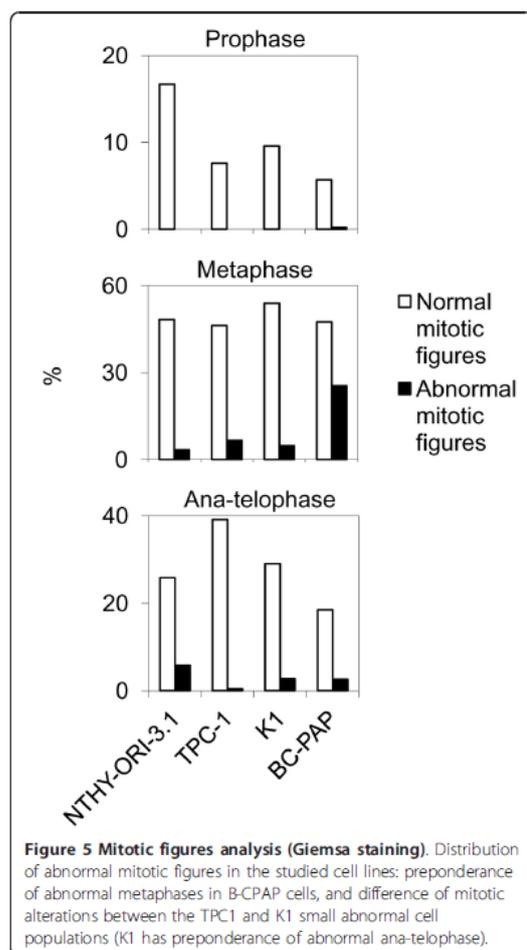
**Figure 4 Centrosome and mitotic spindle immunofluorescence, representative images.** Centrosome  $\gamma$ -tubulin immunostaining (green signal): normal centrosome in NTHY-ORI 3-1 (a), TPC-1 (b) and K1 (c) cell lines; amplified centrosome in B-CPAP cell line (d). Centriole centrin 2 immunostaining (green signal): one pair of centrioles in NTHY-ORI 3-1 (e), TPC-1 (f) and K1 (g) cell lines; amplification in B-CPAP cell line: four pairs (h) and five pairs (i) of centrioles. Gamma- and  $\beta$ -tubulin immunostaining highlighting centrosomes (green signal) and mitotic spindle microtubules (red signal): normal mitotic figures in NTHY-ORI 3-1 (j), TPC-1 (k), and K1 (l) cell lines; abnormal mitotic figures in B-CPAP cell line: a tripolar metaphase (m), a quadripolar metaphase (n), a multipolar metaphase (o), and a tripolar metaphase with two acentrosomal spindle poles (p).

often correlated with different histopathological features [14].

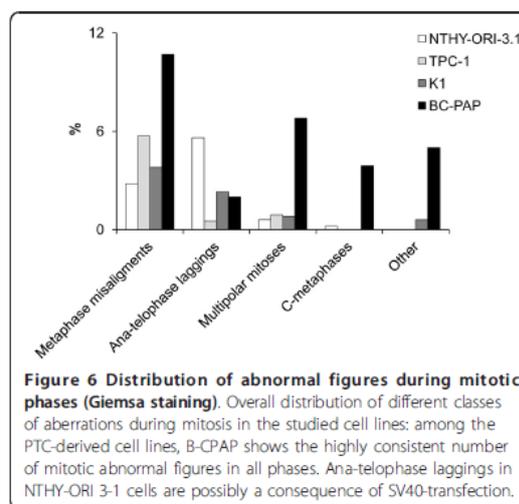
Common mutations found in the papillary histologic subtype are point mutations of the *BRAF* and *RAS* genes as well as *RET/PTC* rearrangements, which are

considered molecular markers of diagnostic and prognostic significance.

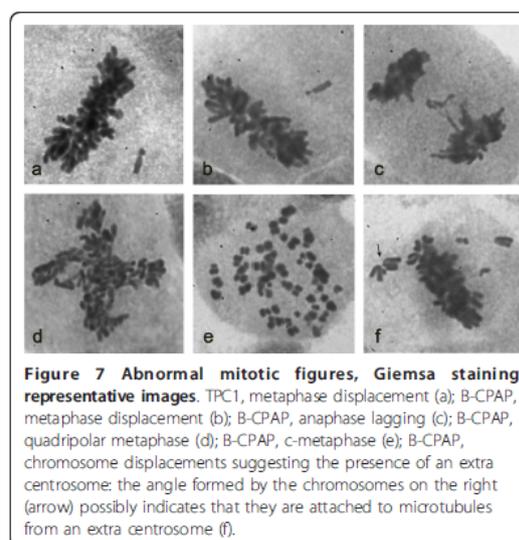
TPC1, K1, and B-CPAP are among the most frequently used papillary thyroid carcinoma-derived cell lines for *in vitro* investigations of thyroid oncogenesis.



Although tumour derived cell lines are considered to be the outcome of adaptation and *in vitro* evolution leading to a common undifferentiated phenotype [15], all these cell lines maintained the biologically relevant oncogenic events specific to the different subtypes of their parental PTCs. TPC1 and K1 cell lines, bearing *RET/PTC1* and heterozygous *BRAF<sup>V600E</sup>* mutation respectively, had an extremely low number of aberrant cells. No statistically significant differences were found in centrosome and spindle alterations, as well as multipolar mitoses, compared to follicular thyroid cell-derived NTHY-ORI-3.1 cell line, which indeed is a SV-40 immortalized cell line and a population of abnormal mitotic cells can be expected. In contrast, the B-CPAP cell line, bearing a homozygous *BRAF<sup>V600E</sup>* mutation, showed remarkable alterations: several mitotic abnormalities such as



metaphase chromosome misalignments, multipolar figures, and c-metaphases were observed. Intriguingly, these types of alterations were barely observed in the K1 cell line harbouring heterozygous *BRAF<sup>V600E</sup>* mutation. The consistent difference in types/frequencies of centrosome and spindle abnormalities observed between K1 and B-CPAP cells might suggest that the allelic status of *BRAF<sup>V600E</sup>* mutation is not irrelevant in respect to CIN development, and that the hetero/homozygous mutational status of the gene may influence at different rate the onset of aneuploidy in PTC cells. B-CPAP cells show a mitotic machinery deeply impaired, with



centrosome amplification, acentrosomal spindle poles and chromosome misalignment, giving rise to an increased mitotic instability, whereas *BRAF*<sup>V600E</sup> heterozygous K1 cells maintain correct centrosome features and spindle polarity in the majority of cells. In fact, B-CPAP cell line has a less stable karyotype compared to K1. Moreover, as expected, because of centrosome amplification, B-CPAP showed a significantly higher frequency of multipolar mitoses compared to K1. A small proportion of these mitoses showed acentrosomal spindle poles, which are reminiscent of spindle formation involving nucleation through a chromatin-dependent spindle assembly pathway [16]. Very recently, a link between the *BRAF*<sup>V600E</sup> oncogene and chromosome instability in melanoma has been suggested [17]. More than 65% of cutaneous melanoma [18] and approximately 45% of PTC [6] share the same *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation, however, differently from melanoma in which aneuploid karyotypes are frequent [8] and homozygous *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation is described [19], PTC usually has heterozygous mutation [20]. To the best of our knowledge, *in vivo* homozygous *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation in thyroid tumours has not been yet described, and it is likely that homozygous cell lines have acquired the second mutation during their establishment. Nevertheless, as B-CPAP is the only of the three PTC-derived cell lines harboring a mutation in *TP53*, which has been closely related to centrosome duplication and genomic integrity maintenance [4,21], the possibility that *TP53* mutation could be involved in the observed enhanced instability, can not be ruled out.

Chromosome number in K1 and TPC1 cell lines is maintained rather stable in culture. However, K1 cells karyotype is characterized by both structural and numerical chromosome changes, whereas TPC1 karyotype is characterized by structural changes [15]. Indeed, the small population of K1 cells bearing mitotic abnormalities shows mainly ana-telophase laggings, compared to the small population of mitotic abnormal TPC1 cells ( $P < 0.05$ ). As lagging chromosomes at anaphase represent a potential source of aneuploidy, the presence of this small abnormal ana-telophase population may explain the presence of clonal chromosome numerical changes in K1 karyotype. Intriguingly, *BRAF*<sup>V600E</sup> positive PTC may harbour aneuploidy [9], whereas *RET/PTC* positive carcinoma very rarely shows numerical chromosome changes - and indeed *RET/PTC* rearrangements have been reported in non-malignant thyrocytes [22]. A direct ascertainment of the mitotic behavior and centrosome status of PTC with *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation in primary PTCs might favourably confirm this view.

### Conclusions

Our data suggest that difference in spindle abnormalities and possibly in centrosome amplification may depend

on the *BRAF*<sup>V600E</sup> heterozygous/homozygous mutational status. Whether the proneness to accumulate numerical chromosome changes only in the more rare advanced forms of PTC might depend on the gain of a second *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation, and/or accumulation of other gene alterations, remains to be clarified.

The degree and type of genetic instability in cancer is emerging as an important feature, also considered as a possible ancillary and integrative parameter in tumour classification. Besides the prognostic relevance of chromosomal instability, CIN could also contribute to the ability of cancer cells to acquire chemoresistance, generating occasionally cells with the capacity to grow more efficiently in adverse environments. In this view, investigation of the correlation between neoplasia gene-specific mutational status and chromosomal instability could provide better targets for gene-specific therapies.

### Methods

#### Cell lines

The PTC-derived TPC1 and B-CPAP cell lines were kindly provided by Dr. Fusco (Medical School, University Federico II of Naples, Naples, Italy), the PTC-derived K1 cell line was purchased from Health Protection Agency Culture Collections [23]. TPC1, K1 and B-CPAP cell lines were chosen according to their reported molecular and cytogenetic features: the TPC1 cell line originally showed a near-diploid karyotype and contains a *RET/PTC1* rearrangement [7], the B-CPAP cell line has an aneuploid karyotype (chromosome mode 72) [24] and *BRAF*<sup>V600E</sup> homozygous mutation [7], the K1 cell line had a near tetraploid karyotype [25] and *BRAF*<sup>V600E</sup> heterozygous mutation [7]. We confirmed by FISH that the *RET* rearrangement was present only in TPC1 cells. TaqMan Real-Time polymerase chain reaction assay confirmed the presence of the *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation in B-CPAP and K1 cells. Karyotyping revealed tetraploidization of TPC1 (a phenomenon already reported in this cell line) [25] and maintenance of the described B-CPAP [23] and K1 [25] chromosome patterns. K1 cells are also characterized by *PIK3CA* amplification [26], which is absent in TPC1, B-CPAP, and NTHY-ORI 3-1 cell lines. For comparison, a commercially available [23] NTHY-ORI 3-1 cell line was used [27]. This SV40-transfected cell line, obtained from human normal thyrocytes, bears wild-type *RET* and *BRAF* genes and retains some morphologic and physiological characteristics of normal thyrocytes, without evidence of malignant transformation [27]. *TP53* mutation was present in B-CPAP [7] cells. All cell lines lack *RAS* mutations [7]. The cell lines were maintained in DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) [except NTHY-ORI 3-1 that was grown in RPMI 1640 (Gibco-BRL, Life Technologies, Milan, Italy)] supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL), at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub>.

#### Fluorescence in situ hybridization

To investigate the presence of *RET/PTC* rearrangement, double target dual color FISH (i.e. the simultaneous hybridization of two probe sets labelled with different fluorophores) was performed using two 3' and two 5' bacterial artificial chromosome (BAC) clones flanking the common *RET* breakpoint. 5' BAC clone RP11-686A03 and RP11-290I03 (CHORI, Oakland, CA, U.S.A.) were directly labelled with Spectrum Orange fluorophore-conjugated dUTP (Abbott Molecular/Vysis, Downers Grove, IL) and 3' BAC clones RP11-818P01 and RP11-696N03 (CHORI), were labelled with Spectrum Green (Abbott Molecular/Vysis). 20 ng/μl of each probe set were simultaneously hybridized on nuclei: denaturation 5 minutes at 75°C, hybridization 16 h at 37°C in Hybrite™ (Abbott Molecular/Vysis). Slides were counterstained with antifading solution (200 ng/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI) (Sigma-Aldrich). Hybridization signals were evaluated by scoring 200 interphase nuclei for each cell line, using a digital image analysis system based on an epifluorescence Olympus BX41 microscope and charge-coupled device camera (Cohu), interfaced with the CytoVysion system (software 3.93.2 Applied Imaging, Pittsburg, PA, USA). The Spectrum Orange, Spectrum Green, and DAPI images were acquired with selective single-bandpass filters at 1000× optical magnification.

#### Immunofluorescence staining

Cells for immunofluorescence were cultured directly on flaskette glass slides (NUNC A/S, Roskilde, Denmark). The cells were fixed with methanol:acetone (1:1) for 10 min at -20°C, followed by 10 min methanol at -20°C. Centrosomes and mitotic spindle were labeled with a rabbit polyclonal anti-γ-tubulin antibody (Sigma-Aldrich) and with a mouse anti-β-tubulin antibody (Sigma-Aldrich), respectively. After 1 h incubation with the antibodies diluted 1:200 in PBS/1% BSA at 37°C and 3 × 5 min washing in PBS, the slides were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled anti-rabbit secondary antibody (Sigma-Aldrich) and TRITC-conjugated anti-mouse secondary antibody (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C. After 3 × 5 min washing in PBS, the cells were counterstained with DAPI. Centrosome structural abnormalities were considered to be present when a diameter of at least twice that of normal centrosomes in lymphocytes and in NTHY-ORI 3-1 cells was observed; amplification was recorded when there were more than two centrosomes per cell [28]. At least 200 consecutive cells per sample were examined. Centrioles were labeled with a rabbit anti-centrin 2 antibody (dilution 1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (CA), USA), applying the same procedure described above. Preparations were observed using an epifluorescence

microscope (Provis AX70, Olympus, Milan, Italy), and images were acquired with a digital CCD camera (C4742 Orca II, Hamamatsu, Japan) driven by CytoVysion (Applied Imaging Corp., Santa Clara, CA, USA). The DAPI, FITC and TRITC images were acquired with selective single-bandpass filters at 1000× optical magnification.

#### Giemsa staining

The cells grown on slides were washed twice with PBS, fixed with methanol:acetic acid (3:1) for 30 min at 4°C, and stained in 4% buffered Giemsa stain (pH 7.2) for 25 min. At least 200 consecutive mitotic figures per sample were examined by light microscopy, and images were acquired with a CCD camera at 1000× optical magnification.

#### Statistics

Frequency distributions of all variables were calculated, and chi-square analyses were used for categorical comparisons. A p-value < 0.01 was considered statistically significant.

#### List of abbreviations

(BAC): Bacterial artificial chromosome; (CIN): Chromosomal instability; (DAPI): 4',6-Diamidino-2-phenylindole; (DTC): Differentiated thyroid carcinoma; (FISH): Fluorescence in situ hybridization; (PTC): Papillary thyroid carcinoma.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Cappai for the *BRAF* mutation analysis. This work was supported in part by Regione Autonoma Sardegna (RAS) by L.R. 7/2007 (Fondo ricerca fondamentale), Fondazione Banco di Sardegna, and A.S. I. grant n.1/014/06/0 (MoMa-ERMEIS).

#### Author details

<sup>1</sup>Dipartimento per lo Studio del Territorio e delle sue Risorse, Università degli Studi di Cagliari, Genova, 16132, Italy. <sup>2</sup>IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino - IST - Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, 16132, Italy. <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Cagliari, 09042, Italy.

#### Authors' contributions

IM and PD carried out the immunofluorescence studies, PC and DVF carried out the conventional and molecular cytogenetic studies and performed the statistical analysis. SV and RV are the project coordinators and designed the study. IM participated in the study design. All authors participated to the first draft of the manuscript and read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 11 September 2011 Accepted: 16 November 2011  
Published: 16 November 2011

#### References

1. Rieke RM, van Ree JH, van Deursen JM: **Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship.** *Trends Genet* 2008, **24**:457-466.
2. King RW: **When 2+2 = 5: the origins and fates of aneuploid and tetraploid cells.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1786**:4-14.
3. McPherson JP, Hande MP, Poonepalli A, Lemmers B, Zablocki E, Migon E, Shehabeldin A, Porras A, Karaskova J, Vukovic B, Squire J, Hakem R: **A role for Brca1 in chromosome end maintenance.** *Hum Mol Genet* 2006, **15**:831-838.

4. Fukasawa K: **Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:911-924.
5. Brinkley BR: **Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**:18-21.
6. Nikiforov YE, Nikiforova MN: **Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer.** *Nat Rev Endocrinol* 2011, **7**:569-80.
7. Meireles AM, Preto A, Rocha AS, Rebocho AP, Máximo V, Pereira-Castro I, Moreira S, Feijão T, Botelho T, Marques R, Trovisco V, Alves C, Velho S, Soares P, Sobrinho-Simões M: **Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines.** *Thyroid* 2007, **17**:707-715.
8. Mitelman F, Johansson B, Mertens F, (Eds): **Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer.** 2011 [http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman], accession 15 October 2011.
9. Rodrigues R, Roque L, Espadinha C, Pinto A, Domingues R, Dinis J, Catarino A, Pereira T, Leite V: **Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinoma.** *Oncol Rep* 2007, **18**:917-26.
10. Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C Jr, Zhang L, Fagin JA: **Conditional BRAF<sup>V600E</sup> expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells.** *Cancer Res* 2005, **65**:2465-73.
11. Niu D, Murata S, Kondo T, Nakazawa T, Kawasaki T, Ma D, Yamane T, Nakamura N, Katoh R: **Involvement of centrosomes in nuclear irregularity of thyroid carcinoma cells.** *Virchows Arch* 2009, **455**:149-157.
12. Ishizaka Y, Ushijima T, Sugimura T, Nagao M: **cDNA cloning and characterization of ret activated in a human papillary thyroid carcinoma cell line.** *Biochem Biophys Res Commun* 1990, **168**:402-408.
13. Lui WO, Zeng L, Rehrmann V, Deshpande S, Tretiakova M, Kaplan EL, Leibiger I, Leibiger B, Enberg U, Höög A, Larsson C, Kroll TG: **CREB3L2-PPARgamma fusion mutation identifies a thyroid signaling pathway regulated by intramembrane proteolysis.** *Cancer Res* 2008, **68**:7156-7164.
14. Caria P, Vanni R: **Cytogenetic and molecular events in adenoma and well-differentiated thyroid follicular-cell neoplasia.** *Cancer Genet Cytogenet* 2010, **203**:21-29.
15. van Staveren WC, Solís DY, Hébrant A, Detours V, Dumont JE, Maenhaut C: **Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells?** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1795**:92-103.
16. Mahoney NM, Goshima G, Douglass AD, Vale RD: **Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes.** *Curr Biol* 2006, **16**:564-569.
17. Cui Y, Bonysova MK, Johnson JO, Guadagno TM: **Oncogenic B-Raf(V600E) induces spindle abnormalities, supernumerary centrosomes, and aneuploidy in human melanocytic cells.** *Cancer Res* 2010, **15**:675-684.
18. Davies H, Bignell G R, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, et al: **Mutations of the BRAF gene in human cancer.** *Nature* 2002, **417**:949-954.
19. Rubinstein JC, Szol M, Pavlick AC, Ariyan S, Cheng E, Bacchiocchi A, Kluger HM, Narayan D, Halaban R: **Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032.** *J Transl Med* 2010, **14**(8):67.
20. Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, Faviana P, Mannavola D, Moretti S, Rossi S, Sculli M, Bottici V, Beck-Peccoz P, Pacini F, Pinchera A, Santeusano F, Elisei R: **Correlation between B-RafV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature.** *Endocr Relat Cancer* 2006, **13**:455-64.
21. Shinmura K, Bennett RA, Tarapore P, Fukasawa K: **Direct evidence for the role of centrosomally localized p53 in the regulation of centrosome duplication.** *Oncogene* 2007, **26**:2939-44.
22. Rhoden KJ, Unger K, Salvatore G, Yilmaz Y, Vovk V, Chiappetta G, Qumsiyeh MB, Rothstein JL, Fusco A, Santoro M, Zitzelsberger H, Tallini G: **RET/Papillary Thyroid Cancer Rearrangement in Nonneoplastic Thyrocytes: Follicular Cells of Hashimoto's Thyroiditis Share Low-Level Recombination Events with a Subset of Papillary Carcinoma.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**:2414-2423.
23. Health Protection Agency Culture Collections. [http://www.hpa.org.uk].
24. Dettori T, Frau DV, García JL, Pierantoni G, Lee C, Hernandez JM, Fusco A, Morton CC, Vanni R: **Comprehensive conventional and molecular cytogenetic characterization of BCPAP, a human papillary thyroid carcinoma-derived cell line.** *Cancer Genet Cytogenet* 2004, **151**:171-177.
25. Ribeiro FR, Meireles AM, Rocha AS, Teixeira MR: **Conventional and molecular cytogenetics of human non-medullary thyroid carcinoma: characterization of eight cell line models and review of the literature on clinical samples.** *BMC Cancer* 2008, **16**:371.
26. Liu R, Liu D, Trink E, Bojdani E, Ning G, Xing M: **The Akt-specific inhibitor MK2206 selectively inhibits thyroid cancer cells harboring mutations that can activate the PI3K/Akt pathway.** *J Clin Endocrinol Metab* 2011, **96**:E577-85.
27. Lemoine NR, Mayall ES, Jones T, Sheer D, McDermid S, Kendall-Taylor P, Wynford-Thomas D: **Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection.** *Br J Cancer* 1989, **60**:897-903.
28. Krämer A, Schweizer S, Neben K, Giesecke C, Kalla J, Katzenberger T, Ho AD, Ott G: **Centrosome aberrations as a possible mechanism for chromosomal instability in non-Hodgkin's lymphoma.** *Leukemia* 2003, **17**:2207-2213.

doi:10.1186/1755-8166-4-26

**Cite this article as:** Maric et al: Centrosomal and mitotic abnormalities in cell lines derived from papillary thyroid cancer harboring specific gene alterations. *Molecular Cytogenetics* 2011 **4**:26.

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

