Aus der Medizinischen Klinik des St Hedwig Krankenhauses
Akademisches Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# Detection of adult stem cells in the human thyroid gland by cell and molecular biology techniques

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Theodoros Thomas

aus Athen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Karl - Michael Derwahl

2. Prof. Dr. med. Georg Brabant

3. Prof. Dr. med. Reinhard Finke

**Datum der Promotion: 10.11.2006**

*To my parents*

*Στους γονείς μου*

# CONTENTS

# Abbreviations

| | |
|---|---|
| AFP: | Alpha Fetoprotein |
| ALB: | Albumin |
| APC: | Allophycocyanin |
| Bcl-2: | B-cell leukemia/lymphoma 2 (cell proliferation marker) |
| BSA: | Bovine Serum Albumin |
| cDNA: | comlementary Desoxyribonucleic Acid |
| °C: | Degree Celsius |
| DMEM: | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA: | Desoxyribonucleic Acid |
| dNTPs | Deoxynucleotide Triphosphates |
| EDTA: | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| EG: | Embryonic Germ cell |
| ERK-1 | Extracellular signal Regulated Kinase 1 |
| ES: | Embryonic Stem cell |
| FACS: | Fluorescence activated cell sorting |
| FCS: | Fetal Calf Serum |
| FISH: | Fluorescent *In Situ* Hybridization |
| FITC: | Fluorescein iso-thiocyanate |
| FRTL5: | Fischer Rat Thyroid Low serum 5 (thyroid cell line) |
| *g | G-Force (unit of measurment of rotation speed of a centrifuge) |
| HBSS: | Hank's Balanced Salt Solution |
| HeLa: | Human cervix carcinoma cell line (initials of Henrietta Laks, the patient from whom the cell line originates) |
| HNF4α. | Hepatocyte Nuclear Factor alpha |
| IMPDH: | Inosine Monophosphate Dehydrogenase |
| KCL: | Potassium Chloride |
| LIF: | Leukemia Inhibitory Factor |
| MCM2 | Minichromosome Maintenance deficient 2 (cell proliferation marker) |
| MEM: | Minimum Essential Aminoacids |
| $MgCl_2$ | Magnesium chloride |
| MgSO4 | Magnesium sulfate |
| MIB-1 | Mindbomb homolog 1 (cell proliferation marker) |

| | |
|---|---|
| µM | Micromol per Liter Solution (unit of concentration) |
| M-MLV-RT | Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase |
| ml: | milliliter |
| MODY: | Maturity Onset Diabetes of Youth |
| mRNA: | messenger Ribonucleic Acid |
| mU/ml: | milliunits per milliliter |
| µg: | Mikrogramm |
| NaOH: | Sodium hydroxide |
| NIS: | Sodium-Iodide Symporter |
| PAX8 | Paired box gene 8 |
| PBS: | Phosphate Buffered Saline |
| PCR: | Polymerase Chair Reaction |
| PE | Phycoerythrin |
| pH: | potentia Hydrogenii (negative decimal logarithm of hydrogen-ion concentration) |
| PI: | Propidium iodide |
| TSH: | Thyroidea-stimulating-hormone |
| Rpm: | Rounds per minute |
| RPMI 1640: | Roswell Park Memorial Institute (Culture Medium) |
| RT: | Reverse Transcription |
| SACK: | Suppresion of Asymmetric Cell Kinetics |
| SCN: | Solid Cell Nest |
| TBE: | Tris-Borate EDTA |
| TBS: | Tris Buffered Saline |
| Tg: | Thyroglobulin |
| TPO: | Thyroid Peroxidase |
| UV: | Ultraviolet |
| Xs: | Xanthosine |

# 5 Summary

Adult stem cells are undifferentiated cells found in differentiated tissues that can renew and (with certain limitations) differentiate to yield all the specialized cell types of the tissue from which they originated (6). They have been proven to exist in several differentiated human tissues but not in the thyroid. In the present work this hypothesis was tested using primary thyroid cell cultures and histology slides obtained from human goitres after thyroidectomy.

A set of stem cell markers was selected which characterise either pluripotent stem cells (Oct4) or multipotent endodermal stem cells (HNF4α, GATA-4, AFP), since the main cells which constitute the thyroid gland, the thyroid follicular cells, are of endodermal origin. Using reverse transcription PCR, immunocytochemistry, immunohistochemistry and flow cytometry, cells were detected within the thyroid, which express three of the above mentioned markers (Oct4, GATA-4 and HNF4α). These cells display two of the basic three stem cell properties: Undifferentiated state (demonstrated by expression of pluripotency markers) and self-renewal capacity (demonstrated by the ability of the cells to survive in culture even after an increased number of passages). The third stem cell property (multilineage differentiation potential) could not be experimentally demonstrated since all attempts to isolate the cells by fluorescence-activated cell sorting and subsequently culture them or to selectively increase their numbers by suppression of asymmetric stem cell kinetics were unsuccessful.

These cells are very rare and cannot be found in differentiated thyroid cell lines such as the FRTL5 cell line or in established thyroid carcinoma cell lines, such as the HTC thyroid follicular carcinoma cell line and the HTh74 thyroid anaplastic carcinoma cell line. In co-culture with thyrocytes, they can be maintained in vitro for several passages. The role of TSH, the main stimulator of thyroid cell growth, in the propagation and differentiation of the cells was analyzed by stimulation experiments, using varying TSH concentrations. High-dose TSH treatment (200 mU/ml) led to a 5-6-fold increase in GATA-4 expression, however no effect on Oct4 or HNF4α expression was observed. This finding suggests that TSH might have a regulatory role regarding the growth and differentiation of the GATA-4-expressing subpopulation of thyroid cell progenitors, however its exact effect on the whole thyroid differentiation process remains unclear.

The main outcome of this work is the identification within the human thyroid gland of a population of thyroid cell progenitors which is clearly distinct from normal, differentiated thyrocytes. These cells originate from the same embryonic layer as thyroid follicular cells and

they are not terminally differentiated. Further experiments are needed to better characterise them and to determine under which conditions they grow, divide, differentiate into thyrocytes and possibly become tumorigenic.

# Zusammenfassung in deutscher Sprache

Erwachsene Stammzellen („adult stem cells“) sind undifferenzierte Zellen, die in differenzierten Geweben vorhanden sind. Sie können propagieren und (unter bestimmten Bedingungen) in den verschiedenen Zellsorten des Ursprunggewebes differenzieren. Die Existenz solcher Zellen ist in verschiedenen differenzierten Geweben bereits nachgewiesen worden, in der Schilddrüse allerdings bisher noch nicht. Bei der vorliegenden Arbeit wurde dieser Hypothese anhand primärer Schilddrüsenzellkulturen und histologischer Schnitte, die aus menschlichen Strumen nach Thyroidektomie stammten, nachgegangen.

Die follikulären Schilddüsenzellen, die den wichtigsten und zahlreichsten Zellbestand der Schilddrüse ausmachen, kommen aus dem Entoderm. Daher wurde eine Kombination von Stammzellmarker gewählt, die entweder pluripotente Stammzellen (Oct4) oder multipotente entodermale Stammzellen (HNF4α, GATA-4, AFP) charakterisieren. Durch den Einsatz von RT-PCR, Immunzytochemie, Immunhistochemie und Durchflusszytometrie wurden Zellen detektiert, die drei der oben genannten Stammzellmarker (Oct4, GATA-4, HNF4α) exprimieren. Diese Zellen stellen zwei der drei elementaren Stammzellmerkmale dar: Undifferenzierte Lage (demonstriert durch Expression von Markern für Pluripotenz) und Eigenvermehrungskapazität (demonstriert durch die Fähigkeit der Zellen mehrere Kulturpassagen zu überleben). Ein weiteres Stammzellmerkmal, das Differenzierungspotenzial in unterschiedlichen Abstammungszelllinien, konnte nicht experimentell nachgewiesen werden. Das lag daran, dass Versuche die Zellen durch FACS zu isolieren und anschließend zu kultivieren oder ihre Zahlen innerhalb der primären Zellkulturen durch Suppression der asymmetrischen Zellkinetik selektiv zu erhöhen, nicht erfolgreich waren.

Diese Zellen sind sehr rar und in differenzierten Schilddrüsenzelllinien, wie die FRTL5 Zellen, oder in etablierte Schilddrüsenkarzinomzelllinien, wie die HTh74 und die HTH Zelllinien, nicht zu finden. In Cokultur mit Thyreozyten sind sie nach mehreren Passagen in vitro nachweisbar. Die Rolle von TSH (der wichtigste Anreger des Schilddrüsenzellwachstums) bei der Vermehrung und Differenzierung der Stammzellen wurde durch Stimulationsexperimente analysiert, wobei unterschiedliche TSH Konzentrationen verwendet wurden. Die Behandlung mit einem erhöhten TSH Konzentration (200 mU/ml) führte zu einer Steigerung der GATA-4 Expression um das 5-6 fache, es war jedoch kein Einfluss auf die Oct-4 oder HNF4α Expression zu sehen. Diese Befunde weisen auf eine regulierende Funktion des TSH beim Wachstum der

GATA-4 positiven Gruppe von Schilddrüsenvorläuferzellen hin. Sein exakter Effekt auf dem gesamten Prozess der Schilddrüsendifferenzierung bleibt jedoch unklar.

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist die Identifizierung einer Gruppe von Schilddrüsenvorläuferzellen in der menschlichen Schilddrüse die eindeutig von den normalen, differenzierten Thyreozyten zu unterscheiden sind. Diese Zellen entstammen aus dem gleichen Keimblatt wie die follikulären Schilddrüsenzellen (Entoderm) sie sind aber nicht endgültig differenziert. Weitere Experimente sind notwendig, um die Zellen besser zu charakterisieren und um festzustellen, unter welchen Bedingungen sie wachsen, differenzieren und ein eventuelles onkogenes Potenzial darstellen.

# Acknowledgments

This work was planned, performed and completed in the laboratory of experimental endocrinology of St Hedwig Hospital in Berlin. I would like to express my sincere gratitude to the following people for their invaluable help:

…Prof. Dr. Karl-Michael Derwahl, "Doktorvater" and supervisor (Betreuer) of this research project. It is thanks to his drive, his ingenious ideas and his constant motivation that this work came to be. By generously offering me a place in his lab and his clinic, Professor Derwahl gave me the chance to delve into the field of clinical and experimental endocrinology, which has always fascinated me. Without his trust and moral support I would never have managed to overcome all the difficulties of being a foreigner working and living in Germany and for this I am truly indebted to him.

…Diana and Tini, for their excellent technical support, for showing me all the lab methods and protocols, for always being there for me and, most importantly, for the great times we had together!

…Kathrin, Ling and Dai for their support, kindness and friendly cooperation. I wish them every success with their own projects and all the best in life in general!

…Prof. Dr Sherley of MIT for his expert advice and support regarding the application of the SACK method, for promptly responding to all my e-mails despite the time difference and for making useful comments on the whole project in general.

…Dr Geipel of the endocrine surgery department for his invaluable cooperation in selecting suitable patients and promptly providing thyroid tissues directly after the operation.

…PD Dr Boewer for allowing me the use of his high-quality microscope and helping me with the interpretation of the results.

…Prof Dr Schaefer (Berlin) for the gift of the HeLa cell line.

… Prof Dr Heldin (Uppsala) for the gift of the HTh74 cell line.

…Prof. Dr Schneider (Berlin) for providing us with sections of human goiter tissue.

…My parents, my brother and Evi, for they are my life.

# Erklärung

„Ich, Theodoros Thomas, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Detection of adult stem cells in the human thyroid gland by cell and molecular biology techniques“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum Unterschrift

# Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.