

Cell differentiation and adhesion in colorectal cancer

Citation for published version (APA):

van der Wurff, A. A. (1998). *Cell differentiation and adhesion in colorectal cancer*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19980515aw>

Document status and date:

Published: 01/01/1998

DOI:

[10.26481/dis.19980515aw](https://doi.org/10.26481/dis.19980515aw)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Chapter 1 comprises a general introduction to the field of study and describes the aims of the study.

In **chapter 2**, which is like a material and method paragraph in this thesis, we describe the selection of specific colon crypt cell subpopulations and some immunization protocols. In order to obtain monoclonal antibodies against immature (stem) cells, we tried to eliminate common crypt cell antigens during or prior to immunization by way of *in vivo* selection of the immune response using cyclophosphamide and by antibody blocking of common crypt cell antigens. The obtained antibodies are described in short.

The aim of the study described in **chapter 3** was to develop monoclonal antibodies that recognize antigens on immature crypt base cells, on the assumption that in a neoplasm undifferentiated but not the terminally differentiated cells will be responsible for tumour progression. We used colon crypt cells which were isolated from human colonic mucosa by EDTA/EGTA incubation. By stepwise harvesting, crypt base cell enriched fractions were obtained, and after incubation with antibodies against dominant antigens, used as immunogen. Of one crypt base cell specific antibody (5E9), the reactive epitope appeared to be a non-terminal carbohydrate in the mucin O-glycans of the colon. The epitope seemed not to be colon specific, but is expressed in a variety of other tissues. In colorectal carcinomas, 5E9 immunoreactivity identified a subgroup of patients with a tendency for worse prognosis. This study shows that we identified a mucin associated maturation epitope in colonic crypt base cells, of which the expression in colorectal carcinoma stage Dukes B3 may be associated with worse prognosis.

L-CAM, also known as E-cadherin, is a cell adhesion molecule, which is expressed at the intercellular borders of most epithelial cells. In carcinoma cell lines L-CAM has been demonstrated to act as an invasion suppressor. In order to determine whether or not L-CAM expression might distinguish between invasive and non-invasive or metastatic and non-metastatic colon neoplasms, in **chapter 4** we studied L-CAM expression in normal colon mucosa, colon adenomas with various degrees of dysplasia and colon carcinomas by immunohistochemistry, using the 6F9 monoclonal anti L-CAM antibody. Normal mucosa showed evenly distributed distinct L-CAM immunoreactivity along intercellular borders. In adenomas as well as carcinomas a similar though weaker expression

was observed. This pattern showed a trend to decrease in parallel with decreasing differentiation. No correlation, however, was found with Dukes stage or area within the tumour. In some carcinomas L-CAM was expressed at the luminal surface of the cells. In others L-CAM expression was not found.

In **chapter 5** we describe L-CAM expression in lymphogenous and haematogenous metastases of large bowel adenocarcinomas, using an indirect immunoperoxidase method with the monoclonal anti-L-CAM antibody 6F9. All studied metastases- lymphogenous as well as haematogenous -demonstrated L-CAM immunoreactivity in a pattern comparable to that of primary tumours. Intratumour heterogeneity in expression was noted, with normal intercellular, apical (non-functional) and focally negative areas in the same tumour.

The data indicate that primary tumours and their metastases do not differ strikingly in their pattern of L-CAM expression. This would be consistent with transient rather than constitutive down regulation of L-CAM in invasive and metastatic cancer cells.

These results of both studies suggest that L-CAM expression is dysregulated or lost as an early event in the development of colon neoplasia and indicate that L-CAM expression does not correlate with invasive or metastatic potential.

Previous *in vitro* and *in vivo* model studies have shown that when E-cadherin expression in carcinoma cells is reduced, invasive behaviour ensues. The situation in human cancer *in vivo*, however, appears to be more complex as immunohistochemically determined E-cadherin expression in various carcinomas, including colorectal cancer, does not always correlate with invasive growth. Loss of cell adhesion during invasion in spite of E-cadherin expression might be associated with a defective cadherin-catenin complex. In **chapter 6** we examined the expression of α - and β -catenin in comparison with E-cadherin in colorectal adenomas and carcinomas and in lymph node and liver metastases.

In normal colon mucosa, α - and β -catenin immunoreactivity occurred along the lateral plasma membrane of the epithelial cells, in a pattern identical to E-cadherin staining. A similar pattern was found in colorectal adenomas and in most malignancies. In general, in neoplastic epithelia, the majority of the cancer cells displayed a normal (matching) pattern of E-cadherin and catenin expression.

We conclude that the patterns of expression of E-cadherin and α - and β -catenin are highly similar in colorectal neoplasms. This observation indicates that invasion in colorectal cancer is not paralleled by consistent loss of expression of the components of the cadherin-catenin complex.

Samenvatting

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding en beschrijft het doel van het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven. In het kankeronderzoek is men op zoek naar manieren om die gezwellen te herkennen die zich al in een vroeg stadium uitzaaïen. Wij hebben ons beziggehouden met kanker van de dikke darm en hebben onderzocht, of het mogelijk is om aan de hand van de aanwezigheid van *ongedifferentieerde cellen* een voorspelling te doen over het gedrag van een tumor (hoofdstuk 3) en of voorspellende waarde kan worden toegekend aan de aanwezigheid van *cadherine* (hoofdstuk 4, 5 en 6).

In **hoofdstuk 2** worden de technieken beschreven die in dit onderzoek gebruikt zijn. De bekleding van de dikke darm - die in plooïen (*crypten*) ligt - bestaat uit verschillende celsoorten. Uit deze celsoorten hebben we geprobeerd de zogenaamde *stamcel* te isoleren, die zich onder in de crypt bevindt. In deze stamcellen vinden alle cellen van de darmbekleding hun oorsprong. Isolatie van stamcellen is ons niet gelukt. Wel zijn we erin geslaagd *cryptbodems* te isoleren, waarin zich de stamcel bevindt naast cellen in een vroeg ontwikkelingsstadium (*ongedifferentieerde cellen*).

95

Tevens beschrijf ik enkele manieren om muizen te gebruiken voor het maken van door ons nader gedefinieerde *antilichamen*. Antilichamen zijn eiwitten, gericht tegen lichaamsvreemde stoffen. Door middel van *kleuring* kunnen antilichamen onder de microscoop de aanwezigheid van dergelijke stoffen zichtbaar maken. Enkele antilichamen die we op die manier hebben verkregen worden in het kort beschreven.

Het doel van het onderzoek dat in **hoofdstuk 3** beschreven wordt, was een antilichaam te ontwikkelen dat ongedifferentieerde cryptcellen herkent. Men neemt namelijk aan, dat in een kankergezwel deze ongedifferentieerde cellen verantwoordelijk zijn voor de groei van de tumor. Dit hoofdstuk beschrijft de kenmerken van zo'n antilichaam (*5E9*). *5E9* bleek een suikergroep te herkennen, die niet alleen op darmcellen voorkomt, maar ook op cellen van andere weefsels. We hebben een groot aantal kwaadaardige dikkedarmgezwellen onderzocht. De resultaten lijken erop te wijzen, dat *5E9* aankleuring geeft van gezwellen van patiënten met een kortere levensverwachting.

Cadherine is een molecule dat zorgt voor de verbinding tussen cellen. In kweken van kwaadaardige cellen is aangetoond dat *cadherine* voorkomt dat kankercellen zich verspreiden. Om erachter te komen of *cadherine* het onderscheid maakt

tussen wel en niet uitzaaiende cellen, hebben we in **hoofdstuk 4** de aanwezigheid van cadherine onderzocht in *normaal slijmvlies, goed- en kwaadaardige gezwellen* van de dikke darm. In normaal slijmvlies hebben we cadherine door middel van kleuring aangetoond, gelijkmatig verdeeld langs de wanden waarmee cellen aan elkaar grenzen. In goed- en kwaadaardige gezwellen was de aankleuring gelijk, maar zwakker. Het aankleuringpatroon leek minder duidelijk, naarmate het gezwel minder ontwikkeld was. In sommige gezwellen bleek cadherine voor te komen langs die celwand die geen contact maakt met buurcellen. Andere cellen toonden helemaal geen cadherine-aankleuring. In **hoofdstuk 5** beschrijf ik cadherine-aankleuring in uitzaaiingen van dikke-darmgezwellen. Al die tumoren toonden eenzelfde aankleuring als die gevonden werd in de oorspronkelijke kanker, hoewel er binnen de tumor gebieden waren die meer of minder sterk aankleurden. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat in kankercellen die zich verspreiden en voor uitzaaiingen zorgen, cadherine niet definitief, maar tijdelijk wordt onderdrukt. De resultaten van beide onderzoeken zoals beschreven in de hoofdstukken 4 en 5 suggereren dat cadherinemoleculen vroeg in de ontwikkeling van dikke-darmkanker in aantal afnemen of verdwijnen. Daarnaast lijkt de aanwezigheid van cadherine niet samen te hangen met een neiging tot uitzaaien. Eerdere studies aan laboratorium-modellen hebben aangetoond dat kankercellen gaan uitzaaien als ze minder cadherine bevatten. De situatie in het menselijk lichaam blijkt echter ingewikkelder. We hebben immers gezien dat cadherine in verschillende kankersoorten, waaronder kanker van de dikke darm, aanwezig blijft ondanks een neiging tot uitzaaien. Dit verlies van celbinding zou te maken kunnen hebben met een verstoord cadherine-*catenine* complex. Catenines verzorgen de verbinding tussen de cadherines en het inwendige van de cel. Men heeft aangetoond dat de cadherines hun rol in de celbinding alleen in combinatie met deze catenines kunnen spelen. In **hoofdstuk 6** hebben wij de aanwezigheid van α - en β -catenine in combinatie met cadherine onderzocht in goed- en kwaadaardige dikke-darmgezwellen en hun uitzaaiingen. In normaal slijmvlies van de dikke darm werd catenine na aankleuren op dezelfde plaats zichtbaar als cadherine. Ditzelfde beeld werd gezien in alle goedaardige en in de meeste kwaadaardige gezwellen. We concluderen dat in het algemeen de kankercellen een overeenkomstige aankleuring van cadherine en catenine vertonen. Dit wijst erop, dat uitzaaiing van kanker van de dikke darm niet vergezeld gaat van een blijvend verlies van cadherines of catenines.