

Distribution of adenosine deaminase complexing protein in normal and neoplastic cells

Citation for published version (APA):

Dinjens, W. N. M. (1988). *Distribution of adenosine deaminase complexing protein in normal and neoplastic cells*. Rijksuniversiteit Limburg.

Document status and date:

Published: 01/01/1988

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

This thesis focusses on the distribution of the adenosine deaminase complexing protein (ADCP) in normal and neoplastic cells. In CHAPTER 1 the properties of the protein and its possible behavior during malignant transformation are discussed. Some of the reviewed data indicate that the expression of ADCP might be specifically altered during malignant transformation. It has been suggested that ADCP can be used as a marker in studies on cellular differentiation and tumor classification. Studies to this end require the availability of specific antibodies which would allow the qualitative determination of ADCP in tissue sections by immunohistochemistry and the quantitative determination of ADCP in tissue homogenates by radioimmunoassay (RIA). These methods require the availability of highly specific anti-ADCP antibodies.

In CHAPTER 2 a method is described for the generation of antibodies against minute amounts of ADCP. The method is based on the adsorption of ADCP to a solid phase (nitrocellulose membrane) and the subsequent implantation of this protein-coated membrane in a mouse. This procedure resulted in high serum antibody titers against native ADCP. In some experiments we used a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. In order to generate antibodies which would allow the detection of ADCP in routinely fixed and processed tissues, PVDF membranes carrying ADCP were fixed and processed according to routine tissue processing protocols before implantation. This procedure resulted in the generation of antisera which allowed the detection of ADCP in routinely processed tissues. For the generation of monoclonal antibodies the immunized mice received booster injections with higher quantities of impure ADCP preparations, unfixed or after fixation and processing. With this procedure a panel of ADCP reactive monoclonal antibodies was obtained.

It has been suggested that mouse and rat lack ADCP because in these species exclusively the small molecular weight form of adenosine deaminase (ADA-S) is found. This suggestion is based on the assumption that the ADA binding capacity is an inherent functional characteristic of ADCP. CHAPTER 3 reports on the presence of ADCP immunoreactivity in mouse and rat determined with a species cross-reactive polyclonal anti-ADCP serum. In the mouse the tissue and subcellular distribution and the electrophoretic mobility in starch and polyacrylamide gels of the protein correspond with those of ADCP but it does not bind ADA-S. It is suggested that the function of ADCP is not ADA-related.

In CHAPTER 4 studies concerning the distribution of ADCP in the human body are described. This was investigated quantitatively by ADCP specific RIA of soluble and plasma membrane fractions and qualitatively by immunohistochemistry. In these studies a specific rabbit anti-human ADCP antiserum was used. In 18 investigated tissues ADCP was found in the soluble as well as in the membrane fractions. In all tissues the membrane fractions contained more ADCP than the soluble frac-

tions. ADCP immunoreactivity was found predominantly in exocrine glands and absorptive epithelia especially at the secretory or absorptive apex of the cell. This led to the suggestion that the function of ADCP is related to the secretory and absorptive processes.

Because of the important role of ADA in human T-lymphoid differentiation the presence of ADA and ADCP on human T-lymphoid cells was studied, as described in CHAPTER 5. Of all investigated T-lymphoid cells about 18% expressed membrane ADA. Membrane ADCP expression was demonstrated on 47% and 14% of the peripheral blood T-lymphocytes (PBL-T) and thymocytes (anti-CD5 positive) respectively. The T-helper/inducer (anti-CD4 positive) and T-cytotoxic/suppressor (anti-CD8 positive) subpopulations contained 55% and 28% membrane ADCP positive cells respectively. When the PBL-T were incubated with a lysate of human erythrocytes (as source of ADA-S) about 50% of the cells was found to display ADA at the membrane. It is likely, that ADA-S binds to membrane associated ADCP.

In CHAPTER 6 the ADCP expression in various normal and neoplastic human tissues is described. In these studies a polyclonal anti-ADCP antiserum and 2 ADCP reactive monoclonal antibodies (1071 and 1072) were used. The reactivity patterns of the 2 monoclonal antibodies did not completely match the patterns observed with the polyclonal antiserum. This finding might imply more molecular heterogeneity of ADCP than hitherto known. The patterns of expression of ADCP in renal cell carcinomas were found to correlate with the stage of the tumor. The patterns of staining in various other carcinomas suggested that ADCP might be an additional parameter in the assessment of the histogenesis and degree of differentiation of neoplastic cells but with limited significance.

A more detailed study of ADCP expression in human prostatic adenocarcinomas is described in CHAPTER 7. The anti-ADCP antiserum showed 4 distinct staining patterns: diffuse cytoplasmic, membranous, both cytoplasmic and membranous and no ADCP expression. When a membranous staining pattern was observed no metastases were found, whereas metastases occurred only in cases with no or only cytoplasmic ADCP staining. This suggests that immunohistochemical detection of ADCP might predict the biological behavior of prostatic cancer. However, the occurrence of membrane ADCP staining in the xenograft of a cell line derived from a prostatic carcinoma metastasis indicates that this is not an absolute fact.

The results of studies concerning the relationship between ADCP expression and intestinal epithelial cell differentiation are reported in CHAPTER 8. Because in the digestive tract ADCP expression occurs only in absorptive enterocytes its pattern of expression was compared with those of villin and sucrase-isomaltase, two highly specific markers for enterocytic differentiation. As model system 4 human colorectal carcinoma derived cell lines were used, grown *in vivo* and *in vitro* under differentiation modulating conditions. Villin expression was almost always found in combination with membranous ADCP expression whereas ADCP expression also occurred without villin expression. Sucrase-isomaltase expression was also found in

combination with villin. The strongest membrane ADCP reactivity was observed in well differentiated cells, but usually in combination with cytoplasmic reactivity. Because cytoplasmic ADCP reactivity was not observed in normal enterocytes this cytoplasmic ADCP reactivity is probably a hallmark of incomplete enterocytic differentiation. It is suggested that expression patterns of villin, sucrase-isomaltase and ADCP might represent different levels of enterocytic differentiation. Finally, in CHAPTER 9 the possible physiological function of ADCP and its role in understanding the process of neoplastic transformation are discussed. Considerations on future perspectives for ADCP research conclude this chapter.

Samenvatting

In dit proefschrift zijn de resultaten van onderzoek naar het vóórkomen van het adenosine deaminase complexerend proteïne (ADCP) in normale en neoplastische cellen beschreven.

In HOOFDSTUK 1 wordt een overzicht gegeven van de relevante literatuur betreffende ADCP. Uit dit overzicht blijkt dat het expressie patroon van ADCP in cellen mogelijk verandert tijdens maligne ontaarding. In de literatuur wordt tevens gesuggereerd dat de expressie van ADCP gebruikt kan worden als een merker voor cellulaire differentiatie en tumor classificatie. Dit zou onderzocht kunnen worden met behulp van antilichamen die ADCP specifiek kunnen aantonen. Met deze antilichamen kan ADCP zichtbaar worden gemaakt in weefselcoupes met behulp van immunohistochemische technieken. Tevens kan ADCP kwantitatief worden bepaald in weefsel homogenaten door middel van radioimmunoassay (RIA).

In HOOFDSTUK 2 wordt een procedure beschreven waarmee polyclonale en monoclonale antilichamen kunnen worden verkregen wanneer slechts zeer kleine (nanogram) hoeveelheden ADCP beschikbaar zijn. Deze methode is gebaseerd op de binding van ADCP aan een vaste drager (nitrocellulose membraan) waarna deze drager wordt geïmplanteerd in een muis. Na immunisatie van muizen met nanogram hoeveelheden (natief) ADCP gebonden aan een nitrocellulose membraan werden antisera verkregen die reageren met natief ADCP. In een aantal experimenten werd als vaste drager een polyvinylideen difluoride (PVDF) membraan gebruikt. Na binding van ADCP en vóór implantatie werd het PVDF membraan behandeld overeenkomstig de procedure die weefsel routinematig ondergaat vóór toepassing van de immunohistochemische techniek (dat wil zeggen fixatie met formaline, insluiten in paraffine, ontparaffineren en remmen van de endogene peroxidase activiteit). Na toepassing van deze procedure werden antisera verkregen waarmee ADCP aange-toond kan worden in routinematig behandelde weefselstukjes afkomstig van nier, prostaat en dunne darm. Ter verkrijging van monoclonale antilichamen kregen de geïmmuniseerde muizen extra injecties met homogenaten van weefsel dat ADCP bevat. Deze procedure leverde een aantal monoclonale antilichamen op die met ADCP reageren.

In de literatuur is gesuggereerd dat muizen en ratten geen ADCP bezitten omdat uit biochemische experimenten bleek, dat in deze diersoorten geen vorm met een hoog molecuulgewicht van het enzym adenosine deaminase (ADA-L) aanwezig is. Deze suggestie is gebaseerd op de veronderstelling dat binding van de vorm met een laag molecuulgewicht van adenosine deaminase (ADA-S) door ADCP een functionele en inherente eigenschap van ADCP is. In HOOFDSTUK 3 worden experimentele resultaten beschreven die aantonen dat in muizen en ratten een ADCP immunoreactief eiwit vóórkomt. Zowel de weefsel- en subcellulaire distributie als de electroforetische mobiliteit in zetmeel en polyacrylamide gels van dit eiwit komen nauw overeen met die van ADCP. Echter, dit ADCP immunoreactief eiwit vertoont geen affiniteit

voor ADA. Geponeerd wordt dat deze bevinding een aanwijzing is voor een fysiologische functie van ADCP die niet gerelateerd is aan ADA.

De resultaten van experimenten naar de expressie van ADCP in normale humane weefsels zijn beschreven in HOOFDSTUK 4. Met behulp van een specifiek konijn anti-humaan ADCP antiserum is ADCP kwantitatief aangetoond met een RIA en kwalitatief met de immunoperoxidase techniek. Met de RIA werd ADCP gevonden zowel in de cytosol- als de membraanfracties van de onderzochte weefsels. In elk weefsel werd meer ADCP (per milligram eiwit) gevonden in de membraanfractie dan in de corresponderende cytosolfractie. Dat ADCP voornamelijk membraan geassocieerd voorkomt werd bevestigd door de resultaten van de immunohistochemische studies. De bevinding dat ADCP met name werd gevonden in het secretoir of resorptief gedeelte van de cellen van exocriene klieren en resorptieve epithelen leidde tot de suggestie dat ADCP een secretie of resorptie geassocieerd eiwit is.

Het enzym ADA speelt een belangrijke rol bij de differentiatie van T lymfocyten. Daarom werd het voorkomen van ADA en ADCP op intacte humane T-lymfoïde cellen bestudeerd. De resultaten van deze flowcytometrische studie zijn beschreven in HOOFDSTUK 5. Uit perifere bloed werden de totale T-lymfocyten populatie (anti-CD5 positief) en de T-helper/inducer (anti-CD4 positief) en T-cytotoxische/suppressor (anti-CD8 positief) subpopulaties onderzocht. Tevens werden thymocyten onderzocht. In elke onderzochte subpopulatie bleek ongeveer 18% van de cellen membraan geassocieerd ADA te bezitten. Membraan geassocieerd ADCP werd gevonden in 55% van de T-helper/inducer cellen, in 28% van de T-cytotoxische/suppressor cellen en in 14% van de thymocyten (anti-CD5 positief). In de totale T-lymfocyten populatie van het perifere bloed bleek 47% van de cellen membraan geassocieerd ADCP te bezitten. Na incubatie van deze populatie met een lysaat van humane erythrocyten (als bron van humaan ADA-S) werd op ongeveer 50% van de cellen ADA aangetoond. Deze bevinding leidde tot de veronderstelling dat dit ADA-S gebonden is aan membraan geassocieerd ADCP.

In HOOFDSTUK 6 worden de resultaten beschreven van immunohistochemische ADCP bepalingen in een aantal normale en neoplastische humane weefsels. In deze studies werd gebruik gemaakt van een konijn polyclonaal anti-ADCP antiserum en twee met ADCP reagerende muise monoclonale antilichamen. De reactiviteitspatronen van de twee monoclonale antilichamen komen niet volledig overeen met het reactiviteitspatroon van het polyclonale antiserum. Deze bevinding duidt wellicht op, tot nu toe onbekende, moleculaire heterogeniteit van ADCP. In een kleine serie niertumoren werd gevonden dat de ADCP expressiepatronen correleren met de staging van de tumoren. Gesuggereerd wordt dat dit mogelijk wijst op een relatie tussen de ADCP expressiepatronen en het biologisch gedrag van de niertumoren. Bepaling van de ADCP expressiepatronen in andere tumoren leidde tot de veronderstelling dat deze patronen parameters kunnen zijn voor bepaling van de histogenese en mate van differentiatie van epitheliale tumoren.

In HOOFDSTUK 7 wordt beschreven dat in prostaattumoren een relatie werd gevonden tussen de ADCP expressiepatronen en de aanwezigheid van metastasen.

Geen metastasen werden gevonden wanneer de primaire tumor, zoals normaal prostaatweefsel, membraan geassocieerde ADCP immunoreactiviteit vertoonde. Metastasen werden uitsluitend gevonden in patiënten waarbij in de primaire prostaattumor ADCP diffuus in het cytoplasma of niet werd aangetoond. Uit deze resultaten werd geconcludeerd dat de immunohistochemische ADCP bepaling in prostaattumoren van belang kan zijn voor de voorspelling van het biologisch gedrag van de tumor.

HOOFDSTUK 8 behandelt een onderzoek naar de relatie tussen ADCP expressie en de differentiatie van enterocyten. De expressiepatronen van ADCP werden vergeleken met de expressiepatronen van de eiwitten villine en sucrase-isomaltase, twee merkers voor enterocytair differentiatie. Omdat een aantal colorectale tumorcellijnen geïnduceerd kan worden tot enterocytair differentiatie zijn vier humane colorectale tumorcellijnen (HT-29, Caco-2, 5583-E, 5583-S) als model gebruikt. Deze werden gekweekt *in vivo* als xenotransplantaat en *in vitro* onder een aantal differentiatie modulerende omstandigheden. Op één uitzondering na werd villine steeds in combinatie met membraan gebonden ADCP expressie gevonden, doch ADCP kon tevens worden aangetoond in afwezigheid van villine expressie. Sucrase-isomaltase werd uitsluitend aangetoond in combinatie met villine. De sterkste membraangebonden ADCP immunoreactiviteit werd gevonden in goed gedifferentieerde cellen, echter meestal in combinatie met cytoplasmatische reactiviteit. In normale darmepitheelcellen werd nooit ADCP in het cytoplasma aangetoond. Wellicht wijst deze cytoplasmatische ADCP expressie op niet volledig voltooide enterocytair differentiatie. Gesuggereerd wordt dat expressie patronen van villine, sucrase-isomaltase en ADCP verschillende differentiatie niveau's in de enterocytair differentiatie vertegenwoordigen.

In HOOFDSTUK 9 wordt gespeculeerd over de fysiologische functie van ADCP en over de waarde van de bepaling van ADCP en andere antigenen in het algemeen voor het vergroten van het inzicht in het proces van neoplastische transformatie. Het proefschrift eindigt met een aantal overwegingen voor verder onderzoek aan het eiwit ADCP.