

Tumor cell-extracellular matrix interactions : studies with antibodies to basement membrane components

Citation for published version (APA):

Havenith, M. G. (1988). *Tumor cell-extracellular matrix interactions : studies with antibodies to basement membrane components*. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19880624mh>

Document status and date:

Published: 01/01/1988

DOI:

[10.26481/dis.19880624mh](https://doi.org/10.26481/dis.19880624mh)

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

In this thesis some aspects of the interaction between tumor cells and the extra cellular matrix, as reflected in the basement membrane (BM) are studied.

Chapter 1 introduces the problem. The structure and composition of the BM is reviewed. It is emphasized that, although the biochemistry and molecular biology of the major components common to all BM, type IV collagen and laminin, have been clarified, many questions have remained unanswered. The dynamics of BM, for example, and the nature and function of cell or organ specific BM components are largely unknown.

In this chapter furthermore the role of BM in neoplasia is reviewed. Originally BM were regarded as static structures which were destroyed by the invading malignant tumor cells. It is now clear that tumor cells not only degrade BM components, but also deposit BM. Consequently, the patterns of BM deposition in neoplasms are the result of a dynamic balance between deposition and BM degradation. Which factors regulate this balance in neoplastic cells to date remains largely unknown.

In diagnostic histopathology immunohistochemical staining for BM components has been used to distinguish invasive from non invasive neoplasms, for the classification of soft tissue tumors, and as a prognostic indicator. In the final part of this chapter the aim of the studies described in this thesis is outlined.

Chapter 2 describes two new monoclonal antibodies reactive with human type IV collagen in frozen as well as routinely fixed and processed tissue sections. The antibodies (1042 and 1043) were raised against human placental type IV collagen and were shown by immunoblotting and ELISA tests to react exclusively with type IV collagen determinants. Extensive immunohistochemical survey studies on panels of tissues from various species, using unfixed cryostat sections, demonstrated that antibody 1043 reacted only with human type IV collagen whereas antibody 1042 in addition reacted with rabbit type IV collagen. All tissues showed homogeneous staining of the basement membrane, indicating that the detected epitopes did not show organ-specific distribution. Tissue processing protocols for using these monoclonal antibodies on routinely processed paraffin embedded tissues were developed. It was found that whereas polyclonal anti-type IV collagen antisera required pepsin digestion, our monoclonal antibodies required pronase or papain digestion to restore type IV collagen immunoreactivity in paraffin sections. It is concluded that these monoclonal anti-type IV collagen antibodies detect species specific epitopes which can be detected in routinely processed paraffin embedded tissues after appropriate enzyme pretreatment.

In chapter 3 the origin of BM at the tumor-stromal interface was studied in nude

mouse and rat xenografts of human tumor cell-lines. Polyclonal cross-species reactive anti type IV collagen antibodies and two monoclonal human specific type IV collagen antibodies, as described in chapter 2, were used. The xenografts were derived from a colonic adenocarcinoma (5583-S), transformed human amnionic epithelium (WISH), and a human oral epidermoid carcinoma (KB). With the cross-species reactive anti type IV collagen antibodies, BM were identified, in the original colonic adenocarcinoma and in all xenografts, at the tumor cell stromal border as well in the tumor vasculature BM. The human specific antibodies visualized the same pattern of type IV collagen deposition in the original colonic adenocarcinoma and in xenografts of normal human colonic mucosa, whereas in xenografts of 5583-S neither at the tumor/stromal border nor in the vasculature BM immunostaining was obtained. In vitro 5583-S cells did not produce any type IV collagen. Xenografts of WISH and KB cells showed discontinuous BM immunoreactivity at the tumor-stromal border with cross-species reactive as well as human specific antibodies. Vascular BM, however, failed to show immunoreactivity with human specific antibodies to type IV collagen. In vitro in these cells production of type IV collagen, including the specific human epitope, could be demonstrated. These observations strongly suggest that BM at the tumor/stroma interface in xenografts of 5583-S cells are of murine origin. In contrast, the BM in xenografts of WISH and KB cells is at least partly of human origin. Therefore, mesenchymal stromal elements appeared to be involved in the production and extracellular deposition of BM components in epithelial neoplasms.

In chapter 4 BM deposition at the tumor-stromal border was studied in 163 cases of colorectal carcinomas. Type IV collagen immunoreactivity was scored semiquantitatively as moderate/extensive versus limited and these scores were correlated with Dukes' stages and survival data. Cases with limited BM deposition showed a significantly shorter overall survival. Stratification of the cases for limited versus moderate/extensive BM deposition and Dukes' stages A/B versus C/D, showed that in Dukes' stages C/D, cases with moderate/extensive BM deposition showed a significantly better survival than cases with limited BM deposition. Our results suggest that immunostaining of BM of cases in Dukes C differentiates tumors with relatively high invasive and metastatic capacity from tumors with low invasive and metastatic capacity.

In chapter 5 BM deposition at the interface of tumor cells and stroma was studied in 27 bronchogenic squamous cell carcinomas. From peripheral and central parts of the tumors, specimens were collected and frozen as well as formalin fixed and paraffin embedded. Also specimens for electron microscopy were collected. Using antibodies to type IV collagen and laminin, the BM was visualized in light microscopy, by an indirect immunoperoxidase technique. Light microscopic findings were compared to ultrastructural observations. The peripheral parts of the tumors showed continuous BM in a recognizable preexisting alveolar pattern, without evidence of invasive growth into the alveolar septa. In contrast, central parts showed

highly variable BM deposition, ranging from continuous to almost completely absent. Alveolar patterns were not observed in the tumor center. The stromal compartment of the tumor center contained many spindle cells with irregular pericellular BM, which could ultrastructurally be identified as myofibroblasts. Electron microscopy and immunohistochemistry yielded comparable results. It is concluded that the periphery of bronchogenic squamous cell carcinomas show expansive growth. Invasive growth appears to be restricted to the tumor center.

Patterns of BM deposition were furthermore investigated in benign and malignant nevo-melanocytic lesions by BM immunostaining as described in chapter 6. To restore the immunoreactivity with antibodies to BM components, paraffin sections from stored tissue blocks required pretreatment with 6 M guanidine-HCl in addition to pepsin preincubation. BM deposition was found around clusters as well as individual nevo-melanocytic cells in contact with dermal stroma. However, between keratinocytes and completely intra-epidermally located nevo-melanocytic cells, BM immunostaining could not be detected. Tumor cell-stromal interaction apparently is a prerequisite for BM deposition in nevo-melanocytic lesions. BM discontinuities in the absence of inflammatory infiltrate appeared to be evidence in favor of malignant melanoma in doubtful cases. The general pattern of BM deposition in benign and malignant lesions was found to be identical and therefore of no help in differential diagnosis. Identification of hyaline bodies, which show immunoreactivity with antibodies to BM components, may be helpful to distinguish between juvenile and malignant melanomas. Detection of angioinvasion, a prognostic indicator in malignant melanoma, is facilitated by BM immunostaining. Pericellular BM deposition in cell clusters in metastasis of a poorly differentiated tumor of unknown origin argues in favor of the possibility of malignant melanoma.

In chapter 7, the results of the studies are discussed against the background of general aspects of BM in relation to tumor invasion. Finally, the significance of BM immunostaining for diagnostic histopathology is reviewed.

SAMENVATTING

In dit proefschrift zijn enkele gezichtspunten van de wisselwerking tussen tumor cellen en extracellulaire matrix, zoals weerspiegeld in basale membranen (BM), het onderwerp van studie.

In hoofdstuk 1 wordt een overzicht van de structuur en samenstelling van de BM gegeven. Ondanks de opheldering van vele biochemische en moleculair biologische aspecten van belangrijke BM componenten zoals collageen type IV en laminine, blijven nog vele vragen onbeantwoord. Over de aanmaak en afbraak van BM is, evenals over de aard en functie van cel- en orgaan specifieke bestanddelen van de BM, weinig bekend.

Verder wordt in dit hoofdstuk een overzicht gegeven van de rol die BM spelen in neoplastische lesies. Aanvankelijk werden BM beschouwd als statische structuren die worden doorbroken door invasief groeiende maligne tumor cellen. Momenteel is duidelijk geworden dat tumor cellen niet alleen BM componenten afbreken, maar ook in staat zijn tot het afzetten van BM. Hieruit kan worden afgeleid dat de patronen waarin BM in neoplastische aandoeningen voorkomen, de resultante zijn van aanmaak en afbraak. Over de manier waarop deze evenwichts-situatie in tumoren in stand wordt gehouden is op dit moment nog weinig bekend.

In de diagnostische histopathologie wordt de immunohistochemische aankleuring van BM toegepast om invasieve van niet invasieve tumoren te onderscheiden. Verder is deze techniek van belang voor de differentiële diagnostiek van weke delen tumoren en heeft de mate van BM depositie prognostische betekenis. In het laatste gedeelte van hoofdstuk 1 wordt de vraagstelling van dit proefschrift geschetst.

Hoofdstuk 2 beschrijft twee monoclonale antilichamen gericht tegen humaan collageen type IV, die zowel toepasbaar zijn op ingevroren als op paraffine ingebed weefsel. De antilichamen (1042 en 1043) werden opgewekt tegen uit humane placenta geïsoleerd collageen type IV, de specificiteit werd aangetoond door middel van immunoblotting en ELISA. Door gebruik te maken van een weefselpanel samengesteld uit weefsels van verschillende zoogdier species kon op coupes van ingevroren niet gefixeerde weefselstukjes worden aangetoond dat de antilichamen alleen met humane weefsels reageren. Alle humane weefsels vertoonden aankleuring van BM, waardoor orgaan specificiteit van deze antilichamen uitgesloten kon worden. Voor het verkrijgen van immunoreactiviteit in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde weefsels was een preincubatie met enzymen noodzakelijk. Voor het polyclonale antiserum was een pepsine digestie vereist, voor de monoclonale antilichamen pronase. Met deze monoclonale antilichamen kunnen in routinematig gefixeerde en ingebedde weefsels na enzym behandeling specifieke humane epitopen worden aangetoond.

In hoofdstuk 3 wordt de origine van BM op het grensvlak van tumor epitheel en stroma onderzocht in xenotransplantaten van humane tumor cel lijnen in immuun-gecompromiteerde muizen en ratten. Hiervoor werd gebruik gemaakt van polyclonale kruisreagerende anti collageen type IV antilichamen en de twee humaan specifieke anti collageen type IV antilichamen, die beschreven werden in hoofdstuk 2. De xenotransplantaten waren afkomstig van een adenocarcinoma van het colon (5583-S), getransformeerd humaan amnion epitheel (WISH), en een humaan plaveiselcel carcinoma (KB). Met de kruisreagerende polyclonale antilichamen tegen collageen type IV werden BM aangetoond op het grensvlak van tumor epitheel en stroma en in de vaatstructuren, zowel in het primaire adenocarcinoma van het colon als in alle xenotransplantaten. De humaan specifieke antilichamen lieten het zelfde patroon zien van BM depositie in het primaire adenocarcinoom van het colon en in de xenotransplantaten van normale colon mucosa. Xenotransplantaten van 5583-S daarentegen vertoonden geen BM op het grensvlak van tumor en stroma, ook vasculaire BM konden niet worden aangetoond. In vitro vertoonden 5583-S cellen evenmin aanwijzingen voor productie collageen type IV. Xenotransplantaten van WISH en KB cellen vertoonden echter discontinue BM immunoreactiviteit op het grensvlak van tumor epitheel en stroma met kruisreagerende en humaan specifieke antilichamen. Vasculaire BM daarentegen lieten geen immunoreactiviteit zien met humaan specifieke antilichamen tegen collageen type IV. In vitro kon in deze cellen productie van collageen type IV worden aangetoond, zelfs de humaan specifieke epitopen werden aangetoond. Uit deze waarnemingen kan worden geconcludeerd dat de BM op het grensvlak van tumor en stroma in de xenotransplantaten van 5583-S van muis of rat origine zijn. BM in xenotransplantaten van WISH en KB cellen, daarentegen zijn zeker gedeeltelijk van humane origine. Stroma cellen lijken op grond van deze bevindingen betrokken te zijn bij de productie en extracellulaire depositie van BM membraan componenten in epitheliale neoplasmata.

In hoofdstuk 4 wordt de depositie van BM op het grensvlak van tumor en stroma in 163 colorectale carcinomen besproken. De immunoreactiviteit werd semiquantitatief gescoord en ingedeeld in matig/sterk versus gering. Deze score werd gecorrigeerd met de Dukes' stadia en overlevings data. De patiënten groep met geringe BM depositie vertoonde een significant kortere overleving. Stratificatie van de patiënten met geringe versus matige/sterke BM depositie en Dukes' stadia A/B versus C/D, liet een significant kortere overleving zien van de groep patiënten in Dukes' stadia C/D met geringe BM depositie in vergelijking met de patiënten in Dukes' stadia C/D met matig/sterke BM depositie. Deze resultaten suggereren dat in de groep patiënten in Dukes' stadium C, tumoren met een relatief sterk invasief en metastaserend vermogen kunnen worden onderscheiden van tumoren met een gering invasief en metastaserend vermogen.

In hoofdstuk 5 wordt de BM depositie op het grensvlak van tumor en stroma in 27 plaveiselcel carcinomen van de long bestudeerd. Weefselstukjes uit het centrum en de periferie van deze tumoren werden ingevroren, in formaline gefixeerd en in paraf-

fine ingebed en er werden stukjes voor electronen microscopie bewerkt. Met antilichamen tegen collageen type IV en laminine werden de BM op licht microscopisch niveau gevisualiseerd met behulp van een indirecte immunoperoxidase techniek. De licht microscopische bevindingen werden vergeleken met de waarnemingen op ultrastructureel niveau. De periferie van de tumoren vertoonde continue BM, in het patroon van de preexistente alveolaire architectuur. Invasieve groei in de alveolaire septa werd in de periferie van de tumoren niet waargenomen. In tegenstelling hiermee, vertoonde het centrum van de tumoren een strek wisselende BM depositie, variërend van continu tot bijna totaal ontbrekend; een alveolair patroon was niet herkenbaar. Het stroma in het centrum van de tumor bevatte spoelvormige cellen met onregelmatige pericellulaire BM, die ultrastructureel als myofibroblast konden worden geïdentificeerd. De licht en electronen microscopische bevindingen stemden grotendeels met elkaar overeen. Uit deze studie kan worden geconcludeerd dat in de periferie van plaveiselcel carcinomen in de long expansieve groei plaats vindt, en invasieve groei beperkt lijkt te blijven tot het centrum van de tumor.

Het patroon van BM depositie werd ook onderzocht in benigne en maligne nevo-melanocyttaire lesies zoals beschreven in hoofdstuk 6. Om immunoreactiviteit te verkrijgen met antilichamen tegen BM componenten in paraffine coupes van archief materiaal was het noodzakelijk om behalve de gebruikelijke pepsine preincubatie de coupes ook met 6 M guanidine-HCl te behandelen. BM depositie werd waargenomen rond individuele- en clusters nevo-melanocyttaire cellen, die in contact zijn met het dermale bindweefsel. Tussen epidermale cellen en geheel intra-epidermaal gelegen nevo-melanocyttaire cellen werd geen immunoreactiviteit tegen BM componenten waargenomen. Interactie van tumor cellen met stromale componenten is klaarblijkelijk vereist voor BM depositie in nevo-melanocyttaire lesies. BM discontinuïteit in de afwezigheid van ontstekings infiltraat wijst in geval van twijfel sterk in de richting van een maligne melanoma. Het algemene patroon van BM depositie is in benigne en maligne nevo-melanocyttaire lesies gelijk en heeft derhalve geen betekenis in de differentiële diagnostiek. Het aantonen van hyaline deposities, die immunoreactiviteit vertonen met antilichamen tegen BM componenten, kan het onderscheid tussen juveniele en maligne melanomen ondersteunen. Het opsporen van angioinvasieve groei, een prognostische factor van betekenis, wordt aanzienlijk verbeterd door immunohistochemische aankleuring van BM. Pericellulaire BM depositie in metastasen van slecht gedifferentieerde tumoren, dient de aandacht te vestigen op de mogelijkheid van een maligne melanoma.

In hoofdstuk 7 worden de resultaten van de studies besproken tegen de achtergrond van algemene aspecten van BM in relatie tot invasieve groei van tumoren. Tot slot wordt een overzicht gegeven van het belang van de immunohistochemische detectie van BM voor de diagnostische histopathologie.