

Genotypic and phenotypic effects of c-Ha-ras oncogene transfection on human colorectal carcinoma cell lines

Citation for published version (APA):

de Vries, J. E. (1993). *Genotypic and phenotypic effects of c-Ha-ras oncogene transfection on human colorectal carcinoma cell lines*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19931210jd>

Document status and date:

Published: 01/01/1993

DOI:

[10.26481/dis.19931210jd](https://doi.org/10.26481/dis.19931210jd)

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

The subject of this thesis has been the biological behavior of human colorectal carcinoma cells in various models and the influence of the c-Ha-ras oncogene on this behavior.

In **Chapter 1** the characteristics of invasive and metastatic cells and their interactions with the microenvironment are reviewed, and a survey is presented of the structure, regulation and putative (dys)function of the c-Ha-ras (onco)protein and its effects on tumor cell lines after transfection.

In **Chapter 2** experiments are described in which nine human colorectal carcinoma cell lines were xenografted in nu/nu mice, either hetero- or orthotopically. Different modes of in vivo behavior, ranging from non-tumorigenic to tumorigenic, invasive and metastatic, were observed, depending on the site of xenografting. Because E-cadherin, urokinase- or tissue type-plasminogen activator, and integrin receptors have a role in intercellular adhesion, extracellular matrix degradation and cell-matrix interactions and are of importance for the invasive and metastatic cascade, the expression of these proteins was analyzed. With the exception of high expression of the $\alpha_2\beta^1$ integrin receptor, expression did not correlate with the in vivo invasive and metastatic behavior of tumor cells. Also, the ability to invade chick heart embryonic tissue, did not correlate with in vivo invasive and metastatic behavior. From these results, it was concluded that local tissue factors, in casu the microenvironment, play a role in the induction of genes responsible for invasion and metastasis.

Based on these results highly differentiated poorly tumorigenic CaCo 2 cells and undifferentiated, tumorigenic but non-invasive SW480 cells were selected to evaluate the genotypic and phenotypic consequences of transfection experiments with the c-Ha-ras oncogene, particularly with regard to genetic instability, chromosomal integration site, tumorigenic and invasive potential, and differentiation.

In **Chapter 3** the use of fluorescence in situ hybridization after chromosomal banding, induced by either hot banding or short trypsin treatment, is described in order to identify chromosomal integration sites of transfected plasmid DNA. Nick translated DNA-probes labeled with digoxigenin-dUTP gave optimal fluorescence in situ hybridization signals in our hands. This method allowed rapid identification of chromosomal integration sites.

In **Chapter 4** a cytogenetic analysis is described of transfected SW480 cells. All cell lines demonstrated new clonal chromosomal abnormalities, but genetic instability was significantly increased only in c-Ha-ras oncogene transfected SW480 cells with an increased level of c-Ha-ras mRNA. The application of the method developed in chapter 3 demonstrated that Ras-containing plasmids integrated predominantly in new structurally rearranged chromosomes (five of eight). Three of five integration sites in new structurally rearranged chromosomes were localized at or near translocation breakpoints situated in telomeric regions. However, specific chromosomes were not involved in the chromosome rearrangements. It was concluded that the c-Ha-ras

oncogene might increase the genetic instability and that chromosomal integration sites were especially associated with breakpoints in telomeric bands.

In **Chapter 5** the phenotypic effects of c-Ha-ras oncogene transfection on CaCo 2 and SW480 cells are described. CaCo 2 cells became highly tumorigenic, but not invasive, in nu/nu mice and induction of gelatinase activity was observed along with a possible increase in urokinase-plasminogen activator production. Specific changes in vitro in invasive capacity, tissue-type plasminogen activator production, proliferative potential, expression of β_1 integrin receptors, and differentiation were not noted. None of these parameters was altered in c-Ha-ras oncogene transfected SW480 cells, nor did the transfected cells become invasive. These results suggested that the c-Ha-ras oncogene might be involved in the progression of colorectal cancer, particularly in the induction of tumorigenic potential, but is most likely not required for the acquisition of invasive potential.

Chapter 6 describes in detail phenotypic characteristics of parental and c-Ha-ras oncogene transfected CaCo 2 cells in vivo. The routine xenograft procedures with the parental CaCo 2 cells did not yield xenografts in nu/nu mice. Therefore, CaCo 2 cells were inoculated in collagen gel and by suppressing natural killer cell activity to obtain xenografts. Both CaCo 2 and c-Ha-ras oncogene transfected CaCo 2 cells displayed in vivo goblet cell, enterocytic, Paneth cell, and endocrine differentiation. The latter is of interest because of the scarcity of colorectal cancer cell lines with endocrine differentiation. Endocrine differentiation was not observed in vitro, neither under standard conditions nor with extracellular matrix components as differentiation inducers. It was concluded that CaCo 2 cells and its c-Ha-ras oncogene transfected CaCo 2 subline display in vivo similar differentiation characteristics, which included endocrine features. Therefore, ras overexpression does not alter the pattern of differentiation, but due to the favorable growth properties of the c-Ha-ras oncogene transfected CaCo 2 cells in vivo, this subline may be a suitable model to study endocrine differentiation in colorectal cancer.

In **Chapter 7** the results of the studies presented in the previous chapters are integrated with regard to current models employed to study colorectal carcinoma, and to the role of the c-Ha-ras oncogene in: 1. Genetic instability in colorectal carcinoma and 2. Intracellular proliferation and differentiation pathways.

SAMENVATTING VOOR DE LEEK

Kanker ontstaat als het evenwicht tussen celaanmaak en celsterfte verstoord is. In normale omstandigheden is celsterfte gelijk aan celaanmaak, bij kanker is de laatste hoger dan de eerste, waardoor plaatselijk te veel weefsel ontstaat, een tumor. Suksevolle behandeling van kanker is in hoge mate afhankelijk van het groeigedrag van de tumor. Is de groei alleen plaatselijk dan kan de tumor goed behandeld worden, bijvoorbeeld door volledige verwijdering via chirurgisch ingrijpen, en is de kans op genezing groot. Is de tumor echter ook doorgedrongen in omringend weefsel, zogenaamd invasief groeigedrag, dan is het waarschijnlijk dat door middel van behandeling niet alle tumorcellen verwijderd kunnen worden. Achtergebleven tumorcellen kunnen vervolgens weer uitgroeien tot tumoren. Bereiken invasieve tumorcellen de bloedbaan, dan kunnen ze verspreid worden naar andere delen van het lichaam, en daar uitgroeien tot nieuwe tumoren. Dit proces heet metastasering en is vaak verantwoordelijk voor de fatale afloop van kanker. Het groeigedrag van de tumor is dus van groot belang voor een succesvolle behandeling van kanker. Inzicht in de factoren betrokken bij: (1) het ontstaan van kanker; (2) de overgang van niet-invasieve naar invasieve tumorgroei en; (3) het metastaserings proces kunnen de behandeling van kanker mogelijk verbeteren.

Het ontstaan van kanker is waarschijnlijk toe te schrijven aan afwijkingen in eiwitten die normaal celgroei en celdeling reguleren. Een belangrijk groeiregulerend eiwit is het Ha-ras eiwit. Bepaalde afwijkingen in het Ha-ras eiwit resulteren in een eiwit dat continu actief is en in staat blijkt te zijn om groei en deling van verschillende typen cellen te stimuleren. Het is mogelijk dat het afwijkende of mutante Ha-ras eiwit kanker veroorzaakt doordat het een cel continu prikkelt tot groei en deling, onafhankelijk van regulerende signalen van buitenaf. Deze visie wordt ondersteund door de aanwezigheid van genetische afwijkingen in het Ha-ras gen in verschillende typen tumoren, wat betekent dat deze tumorcellen afwijkende Ha-ras eiwitten produceren.

De overgang van niet-invasieve groei naar invasieve groei betekent dat een tumor cel in staat is zijn normale omgeving te verlaten. Cellen blijven op hun plaats doordat speciale eiwitten op het oppervlak van een cel, zogenaamde cel-adhesie molekulen, binden aan andere cel-adhesie molekulen op naast gelegen cellen. Tumorcellen met een verminderde expressie van deze eiwitten kunnen hun directe omgeving waarschijnlijk makkelijker verlaten doordat ze minder hard plakken aan naast gelegen cellen. Daarnaast is elk orgaan van het lichaam ingekapseld in een mengsel van grote eiwitten, de extracellulaire matrix, die voornamelijk bestaat uit collageen en laminine. De extracellulaire matrix geeft steun aan weefsels en scheidt organen van elkaar en van omringend weefsel. Bepaalde klassen van eiwitten, met name collagenases en plasmine en hun aktivatoren, kunnen de bouwstenen van de extracellulaire matrix afbreken. Vermoedelijk vergemakkelijkt een hoge expressie van collagenases en/of plasmine en hun aktivatoren de passage van een tumorcel door de extracellulaire

matrix, wat nodig is om omringend weefsel te kunnen binnendringen. Dit wordt ondersteund door de waarneming dat hoge expressie van collagenases gepaard gaat met een verhoogd invasief vermogen van verschillende typen tumorcellen. Mogelijk speelt het Ha-ras eiwit ook een rol in de overgang van niet-invasieve naar invasieve groei, want een verhoogde expressie van mutant Ha-ras eiwit in bepaalde tumorcel typen is ook gekoppeld aan verhoogd invasief vermogen en aan verhoogde expressie van collagenase.

Metastasering is een nog grotendeels onbegrepen proces. Kenmerkend voor een groot aantal metastaserende tumor typen is een sterke toename in genetische afwijkingen. Dit betekent dat mutante eiwitten worden geproduceerd, en/of dat de productie van bepaalde eiwitten verhoogd, verminderd of volledig stilgelegd kan zijn. Dit kan de groei en deling van cellen ingrijpend veranderen als het eiwitten betreft met een functie in de regulering van groei en deling. Hiermee mogelijk verband houdend is het feit dat metastaserende tumoren vaak een lage differentiatiegraad vertonen. Dit betekent dat veel van de specifieke kenmerken van bijvoorbeeld darmcellen niet meer aanwezig zijn in cellen van een metastaserende darmtumor. Ook in dit aspect heeft het Ha-ras eiwit mogelijk een functie, want mutant Ha-ras eiwit kan de differentiatiegraad van tumorcellen beïnvloeden, maar ook de genetische instabiliteit verhogen, waardoor de toename in het aantal genetische afwijkingen in tumorcellen wordt versneld.

In de vakgroep Pathologie houdt een onderzoeksgroep zich bezig met darmkanker. Dit is de meest voorkomende vorm van kanker in West Europa en de Verenigde Staten na longkanker en prostaatcancer bij mannen en borstkanker bij vrouwen, en is verantwoordelijk voor 10% van de sterfte aan kanker bij mannen en voor 14% van de sterfte aan kanker bij vrouwen. De behandeling van darmkanker is in de afgelopen decennia niet of nauwelijks verbeterd. Meer inzicht in het mechanisme van invasie en metastasering van darmtumorcellen kan behandeling van kwaadaardige tumoren verbeteren. De mogelijke relaties tussen mutant Ha-ras eiwit en (1) het ontstaan van kanker, (2) invasief, en (3) metastaserend gedrag in verschillen typen tumorcellen is reden om te veronderstellen dat het mutante Ha-ras eiwit eenzelfde betrokkenheid kan hebben bij darmtumoren. Ten einde dit nader te onderzoeken is het mutante Ha-ras eiwit ingebracht in humane darmtumorcellen en zijn de effecten bekeken op de genetische stabiliteit en op het gedrag van darmtumorcellen.

Hoofdstuk 1 beschrijft de kenmerken van invasieve en metastaserende cellen, en de structuur en mogelijke functie van het Ha-ras eiwit. Tevens worden de effecten van het mutante Ha-ras eiwit op verschillende typen tumorcellen beschreven.

Hoofdstuk 2 beschrijft het gedrag van menselijke darmtumor cellijnen onder verschillende condities. Tumor cellijnen ontstaan uit tumorcellen, die verwijderd zijn uit een patiënt, en buiten het lichaam (= in vitro) doorgroeien en delen onder optimale voedings condities. Het gedrag van verschillende darmtumor cellijnen werd bekeken na injectie van tumorcellen in het lichaam (= in vivo) van een speciaal soort muis zonder immunologisch afweersysteem. Een gedeelte van de darmtumor cellijnen was

invasief en metastaseerde, een gedeelte was invasief maar metastaseerde niet, en een gedeelte vormde tumoren die niet invasief en niet metastaserend waren. Het waarnemen van invasief groeigedrag en metastasering betekent dat dit model gehanteerd kan worden om invasie en metastasering te onderzoeken.

Vervolgens werd gekeken of er een verband was tussen in vivo invasief vermogen en in vitro expressie van cel-adhesie molekulen en plasminogeen aktivator. Er werd geen verband gevonden, wel bleek er een verband te zijn tussen in vitro expressie van zowel cel-adhesie molekulen als een plasminogeen aktivator met invasie in vitro. Uit de bovenstaande experimenten werd gekonkludeerd dat de direkte omgeving van een tumorcel een faktor is die invasief en metastaserend gedrag beïnvloedt.

Twee menselijke cellijnen werden geselecteerd voor verdere experimenten. CaCo 2, een cellijn die geen tumoren vormde in de muis, en SW480, een cellijn die niet-invasieve tumoren vormde in de muis. Het mutant Ha-ras gen werd ingebracht in CaCo 2 en SW480 cellen. Voor blijvende expressie van het Ha-ras eiwit moet het Ha-ras gen ingebouwd worden in het genetisch materiaal. Dit betekent dat het gen moet integreren in een chromosoom. Om na te gaan of integratie willekeurig plaatsvond of niet, werd de chromosomale integratie plaats zichtbaar gemaakt.

Hoofdstuk 3 beschrijft een methode waarmee de chromosomale integratie plaats bepaald kan worden van het ingebrachte mutante Ha-ras gen.

Hoofdstuk 4 beschrijft de toepassing van deze methode op verschillende cellijnen van SW480 waar een mutant Ha-ras gen is ingebracht. Het blijkt dat het ingebrachte Ha-ras gen voornamelijk aangetoond wordt op nieuwe afwijkende chromosomen. De resultaten suggereren eveneens dat het inbrengen van het mutante Ha-ras gen de genetische instabiliteit van SW480 verhoogt.

Hoofdstuk 5 beschrijft het gedrag en de expressie in vitro van verschillende eiwitten met een mogelijke rol in invasie en metastasering van CaCo 2 en SW480 cellen na het inbrengen van het mutante Ha-ras gen. Het blijkt dat CaCo 2 cellen collagenases verhoogd tot expressie brengen en nu wel tumoren vormen in de muis. Deze tumoren zijn niet-invasief. Het inbrengen van het mutante Ha-ras eiwit sorteert geen effect op het gedrag van SW480 cellen en brengt ook geen veranderingen teweeg in de expressie van de onderzochte eiwitten.

Hoofdstuk 6 beschrijft in detail de differentiatiegraad van de CaCo 2 tumoren in vivo. Het blijkt dat de differentiatie van de tumorcellen ondermeer afhangt van de direkte omgeving, maar lijkt niet beïnvloedt te worden door het inbrengen van een mutant Ha-ras eiwit.

Hoofdstuk 7 integreert de data gepresenteerd in de voorgaande hoofdstukken. De belangrijkste effekten van het inbrengen van het mutante Ha-ras gen op menselijke darmtumorcellen is een verhoging van de genetische instabiliteit en een verhoging van het vermogen tot niet-invasieve tumor vorming in de muis. Deze resultaten suggereren een rol voor het mutante Ha-ras eiwit in het ontstaan van darmkanker, maar geen rol in de overgang van niet-invasief naar invasief groeigedrag en van niet naar wel metastaserend gedrag.