

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Zell-Matrix Interaktionen in Mammatumoren des Hundes  
unter besonderer Berücksichtigung der sulfatierten Glykosaminoglykane

Urte Hinrichs

Glykosaminoglykane nehmen bei Zell-Matrix-Interaktionen in neoplastischen Geweben eine zentrale Position ein. In der vorliegenden Untersuchung zu Zell-Matrix Interaktionen in Mammatumoren des Hundes wird die Verteilung von Glykosaminoglykanen in der extrazellulären Matrix untersucht. Die Glykosaminoglykane werden mit Hilfe der Alcian Blau Färbung dargestellt. Die Färbung wird mit der Technik der "critical electrolyte concentration" kombiniert, um Glykosaminoglykane aufgrund ihrer unterschiedlichen Zahl von Sulfatgruppen zu unterscheiden. Durch einen spezifischen Abbau der Glykosaminoglykane mit Hilfe von Enzymen und Säure werden diese zusätzlich charakterisiert. In den untersuchten Neoplasien kann Chondroitinsulfat als wichtigstes extrazelluläres Glykosaminoglykan identifiziert werden. Die Ergebnisse werden durch immunhistochemische Verfahren verifiziert. Dabei wird ein Antikörper gegen Chondroitinsulfat verwendet. Zusätzlich findet ein Antikörper Anwendung, der gegen Epitope des Chondroitinsulfatmoleküls gerichtet ist, deren Expression in jungem und arthrotischem Knorpel nachgewiesen wurde. Die Expression dieser Epitope in caninen Mammatumoren wird beschrieben.

Glykosaminoglykane werden im extrazellulären Raum der caninen Mammatumoren in einer begrenzten Anzahl von Mustern akkumuliert. Die Muster werden wie folgt beschrieben:

- mesenchymale Akkumulation um Ansammlungen von Tumorzellen
- fibrilläre Strukturen, die Basalmembranen zuzuordnen sind
- hyaline Anhäufungen von Glykosaminoglykanen zwischen Tumorzellen
- Anhäufungen von Glykosaminoglykanen in chondroiden und prächondroiden Bezirken
- intrazelluläre Akkumulation in Mastzellen

In einigen Lokalisationen kann eine Akkumulation von hochsulfatiertem Chondroitinsulfat nachgewiesen werden. Die Verteilung der Akkumulationsmuster in den verschiedenen Tumortypen wird untersucht. Es ergibt sich keine deutliche Korrelation zwischen bestimmten Mustern der Glykosaminoglykanakkumulation und malignen oder benignen Tumoren. In den verschiedenen Tumoren können jedoch Unterschiede hinsichtlich der Glykosaminoglykanakkumulation festgestellt werden, die von pathogenetischer Bedeutung sein können.

Die Untersuchung der Verteilungsmuster von Glykosaminoglykanen wird ergänzt durch immunhistochemische Studien zur Akkumulation von Fibronectin und Tetranectin in der Extrazellulärsubstanz. Von beiden Proteinen ist aus immunhistochemischen Untersuchungen an humanem Mammagewebe bekannt, daß die Verteilungsmuster dieser Proteine in der extrazellulären Matrix von Tumoren den Akkumulationsmustern der Glykosaminoglykane, wie in der vorliegenden Studie beschrieben, in einigen Punkten ähneln. Beide Proteine binden *in vitro* an Glykosaminoglykane.

Im caninen Mammatumorgewebe können die Verteilungsmuster, wie sie beim Menschen bekannt sind, nicht reproduziert werden. In Mammatumoren des Hundes wird Tetranectin im extrazellulären Raum von benignen und malignen Tumoren im zellreichen Gewebe der direkten Umgebung des Tumors exprimiert. Eine Relation zur Akkumulation der Glykosaminoglykane ist nicht evident.

Fibronectin ist gleichmäßig und ubiquitär im caninen Mammagewebe verteilt. Die für Mammatumoren des Menschen typische Akkumulation dieses Proteins in fibroplastischen und desmoplastischen Bezirken kann nicht nachgewiesen werden.

Die Immunreaktivität von Fibronectin wird in Gebieten mit intensiver Akkumulation von Chondroitinsulfat durch dieses Glykosaminoglykan abgeschirmt. Erst nach enzymatischer Vorbehandlung mit Chondroitinasen wird Fibronectin auch hier sichtbar. Aus *in vitro* Studien ist bekannt, daß die Bindung von Chondroitinsulfat an Fibronectin dessen Eigenschaften als wichtiges Adhärenzprotein der extrazellulären Matrix verändert. Die gemeinsame Akkumulation von Fibronectin und Chondroitinsulfat, kann daher von

pathogenetischer Bedeutung für das invasive und metastasierende Verhalten von Tumoren sein.

Die Untersuchungen am histologischen Material werden durch in vitro Studien ergänzt. Es wird untersucht, ob die tumorinduzierte Produktion von Glykosaminoglykanen durch Fibroblasten, die durch die histochemischen und immunhistochemischen Befunde suggeriert wird, auch in vitro nachzuweisen ist. In einem Kokultursystem von Fibroblasten und Tumorzellen ist die Produktion von Glykosaminoglykanen im Kulturmedium mit Hilfe eines spektrophotometrischen Verfahrens (DMB-assay) nachzuweisen. In einem Kokultursystem im Kollagengel ist es möglich, Chondroitinsulfatproduktion durch Fibroblasten auch immunhistochemisch mit monoklonalen Antikörpern sichtbar zu machen. In beiden Systemen kann gezeigt werden, daß canine Mammatumorzellen Fibroblasten zur Glykosaminoglykanproduktion anregen. Die Stimulation wird über Zytokine oder Wachstumsfaktoren vermittelt, da direkter Zell-Zell Kontakt nicht notwendig ist. Als mögliche Mediatoren dieser Stimulation werden Insulin, insulin-like growth factor I and II and epidermal growth factor getestet. Diese Wachstumsfaktoren stimulieren die Glykosaminoglykanproduktion durch Fibroblasten unter den angewandten experimentellen Bedingungen jedoch nicht.

Neben den Studien zur tumorinduzierten Produktion von Glykosaminoglykanen wird der Einfluß von Glykosaminoglykanen auf das Wachstumsverhalten von caninen Mammatumorzelllinien in vitro untersucht. Dabei wird festgestellt, daß das Wachstum einiger Tumorzelllinien durch Chondroitinsulfat unterdrückt wird. Die Wachstumshemmung tritt nur auf, wenn in Medien ohne Wachstumsfaktoren kultiviert wird. Eine Wachstumshemmung durch Chondroitinsulfat ist nicht bei allen untersuchten Zelllinien nachzuweisen.

Werden dem Kulturmedium Wachstumsfaktoren zugesetzt, so wird deutlich, daß Chondroitinsulfat die mitogene Wirkung von insulin-like growth factor II hemmt, nicht jedoch die von Insulin, insulin-like growth factor I und epidermal growth factor. Insulin-like growth factor II ist ein wichtiger autokriner Wachstumsfaktor von Tumorzellen. Es ist

deshalb möglich, daß die Wachstumshemmung durch Chondroitinsulfat auf einer Interaktion dieses Glykosaminoglykans mit der autokrinen Schleife des Wachstumsfaktors beruht. Die Interaktion erfolgt wahrscheinlich in der extrazellulären Matrix durch Bindung an den Wachstumsfaktor. Diese Hypothese sollte durch weitere in vivo und in vitro Untersuchungen überprüft werden.

## 6. SUMMARY

Cell-matrix interactions in mammary tumours of dogs  
with special attention to sulfated glycosaminoglycans

Urte Hinrichs

Glycosaminoglycans play an important role in cell-matrix interactions in neoplasias. In the present study of cell-matrix interactions in mammary tumours of dogs, the accumulation of glycosaminoglycans in these tumours was investigated. Glycosaminoglycans were visualized using Alcian blue staining combined with the technique of "critical electrolyte concentration" to distinguish glycosaminoglycans by their degree of sulfation. Glycosaminoglycans were additionally characterized by degrading them with specific enzymes or nitrous acid. Chondroitin sulfate was the most prominent glycosaminoglycan in the mammary tumours of dogs. The findings were verified with immunohistochemical techniques using a monoclonal antibody against chondroitin sulfate and an antibody against epitopes on the chondroitin sulfate molecule that are specific for young and arthrotic cartilage. The expression of these epitopes in canine mammary tumours was described.

The results of the histochemical and immunohistochemical investigations showed a limited number of sulfated glycosaminoglycan accumulation patterns. The patterns are described as

- mesenchymal reaction around clusters of tumour cells
- fibrillar, basement-membrane-related matrix between tumour cells
- hyaline matrix between tumour cells
- cartilaginous or precartilaginous tissue and
- intracellular deposition of sulfated glycosaminoglycans in mast cells

In some localizations there was an accumulation of highly sulfated chondroitin sulfate. The distribution of patterns of glycosaminoglycan accumulation among tumour types was investigated. No distinct correlation of these patterns with either malignant or

benign tumours was found. However, different tumour types show different sites of glycosaminoglycan accumulation, what may have pathogenetic significance.

The results were completed by immunohistochemical studies of the distribution of fibronectin and tetranectin in the extracellular matrix of canine mammary tumours. Immunohistochemical studies of human tissues had demonstrated that the accumulation of these extracellular matrix proteins in mammary tumours resembles in some aspects the glycosaminoglycan accumulation in the canine neoplasias, as described in the present study. It is well known that fibronectin and tetranectin bind to glycosaminoglycans *in vitro*.

In canine mammary tumours though, an accumulation of these proteins comparable to that of human mammary tumours could not be found. In the canine tissues tetranectin was expressed in the direct vicinity of malignant and benign tumours. The accumulation of tetranectin was not related to that of glycosaminoglycans.

Fibronectin was expressed ubiquitous throughout the extracellular matrix of the canine tissues. Fibronectin expression was not restricted to desmoplastic and fibroplastic areas, as it is in human mammary tumours.

The immunoreactivity of fibronectin was blocked in areas of abundant chondroitin sulfate accumulation. After enzymatic predigestion with chondroitinase, fibronectin became visible. From *in vitro* studies it is known that binding of chondroitin sulfate to fibronectin alters its function as cell-adherence protein. Therefore, the co-accumulation of fibronectin and chondroitin sulfate, as presented in this study, may have significance for the invasive and metastatic behaviour of tumours.

In addition to the histological investigations, *in vitro* studies were performed. First, it was investigated whether tumour-induced production of glycosaminoglycans by fibroblasts, as suggested by the histochemical and immunohistochemical findings *in vivo*, was also detectable *in vitro*. In a coculture system of canine tumour cells and fibroblasts glycosaminoglycan production was detectable in the culture medium using a spectrophotometrical assay (DMB assay). With coculture systems in collagen-gel, it was possible to

show that fibroblasts produce chondroitin sulfate by staining the gels with a monoclonal antibody. In both cases glycosaminoglycan production was stimulated by canine mammary tumour cells. The stimulatory effect was mediated by cytokines or growth factors since cell-cell contact was not necessary. Insulin, insulin-like growth factor I and II and epidermal growth factor were tested as possible mediators, but failed to stimulate glycosaminoglycan production of fibroblasts under the experimental conditions applied.

Apart from the investigation of glycosaminoglycan production in vitro, the effects of glycosaminoglycans on the growth of canine mammary tumour cell lines were investigated. It was shown that the growth of the cell lines was inhibited by chondroitin sulfate. The inhibitory effect occurred only, when cells were cultured in media without growth factors. The inhibitory effect was not a general finding in all cell lines investigated. By supplementing the culture media with growth factors, it was shown that chondroitin sulfate inhibited the mitogenic action of insulin-like growth factor II but not of insulin, insulin-like growth factor I and epidermal growth factor. Insulin-like growth factor II is an important autocrine growth factor of tumour cells. Chondroitin sulfate may thus display its growth inhibitory action via interaction with the autocrine loop of this growth factor. Probably, the interaction takes place in the extracellular matrix by direct binding to the growth factor. However, further research in vitro and in vivo is necessary to confirm this hypothesis.