

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Analyse der Rolle tumorassoziierter Gene aus der Familie der Discoidin-Domain-Rezeptortyrosinkinasen bei Vorgängen der Tumorprogression. Die starke Expression von DDR1 in Tumorzellen und von DDR2 in den die Tumorzellen umgebenden Stromazellen sowie die Strukturhomologie zu Adhäsionsproteinen und die Identifikation von Kollagenen als biologisch aktive Liganden führten zur Hypothese, daß DDR1 und DDR2 bei Stroma-Tumorzell-Interaktionen während Vorgängen der Tumorinvasion und Metastasierung beteiligt sind.

Da die Klärung dieser Frage ein geeignetes *in vivo* Modell voraussetzt, in dem alle Schritte der metastatischen Kaskade durchlaufen werden, wurde mit der Xenotransplantation der Pankreasadenokarzinomzelllinie, PancTu in die *scid/scid*-Maus ein solches etabliert. Die in das proximale Pankreas der Maus transplantierten Tumorzellen bildeten lokal einen Tumor, der invasiv in umgebende Organe einwuchs und zu ähnlichen Komplikationen führte, wie sie auch beim Patienten mit Pankreaskarzinomen beobachtet werden. Der Tumor metastasierte sowohl hämatogen und lymphogen als auch in Form von Implantations- und Abklatschmetastasen. Die Tumorzellen induzierten in der Maus eine deutliche Desmoplasie, die für das humane Pankreaskarzinom charakteristisch ist. Dies zeigt, daß in diesem Modell neben allen Schritten der metastatischen Kaskade auch Interaktionen zwischen Tumor- und Stromazellen stattfinden. Daher ist es ebenfalls geeignet, Mechanismen der Tumorzell-Stroma-Interaktionen zu untersuchen.

Zunächst sollte die funktionelle Bedeutung von DDR1 bei Vorgängen der Tumorprogression analysiert werden. Es wurden mittels retroviralem Gentransfer transfizierte, DDR1 stabil überexprimierende PancTu-Zellen orthotop in *scid/scid*-Mäuse transplantiert und Tumorwachstum und -ausbreitung mit der Kontrollzelllinie verglichen. Die vermehrte Expression von DDR1 führte in den Tumoren zu einem aggressiverem Wachstum, deutlich an einer erhöhten Invasivität und Metastasierungsrate im Vergleich zur Kontrolle. Desmoplasie und Proliferation unterscheiden sich in den beiden experimentellen Gruppen nicht.

Immunhistochemische Analysen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, CD44v5 sowie E-Cadherin deren Expression mit dem Invasionspotential der Tumoren negativ korreliert, wurden durchgeführt. Bereits in der Kontrolle sind ICAM-1 und CD44v5 nicht nachweisbar und der E-Cadherin-Catenin-Komplex war hochgradig gestört. Die DDR1 überexprimierende Zelllinie zeigte ein vergleichbares Expressionsmuster dieser Adhäsionsproteine. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die PancTu-Zelle bereits mit einem hohen Potential, invasiv zu wachsen, ausgestattet ist. Kollagen Typ IV, ein Parameter der Basalmembranintegrität, wurde in diesen Tumoren ebenfalls gering exprimiert.

Weitere Experimente sollten klären, ob DDR1 bei Vorgängen der Apoptose und DNA-Reparatur eine Bedeutung hat. Anhand von immunhistochemischen und Western-Blot Analysen konnte gezeigt werden, daß das Tumorsuppressorgen p53 in den DDR1 überexprimierenden Tumoren im Vergleich zur Kontrolle weniger stark

exprimiert wird. Zudem gibt es Hinweise auf eine höhere Strahlenresistenz der DDR1 überexprimierenden Tumorzelle. Dies deutet darauf hin, daß DDR1 eine Schutzfunktion vor der Apoptose ausübt oder bei Vorgängen der DNA-Reparatur eine Rolle spielt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die funktionelle Bedeutung von DDR2 in Stromazellen bei der Tumorprogression untersucht werden. Hierfür wurden mittels retroviralem Gentransfer transfizierte, stabil DDR2 überexprimierende, murine Fibroblasten mit den Tumorzellen in die SCID-Maus kotransplantiert. Bereits die Kotransplantation der Kontrollzellelinie zeigte ein auffälliges Tumorstadium. Die Tumoren bildeten in weiten Bereichen eine Bindegewebskapsel aus, waren kaum invasiv und metastasierten wenig. Die Fibroblasten ordneten sich um die Tumorzellen an und schützten die Maus vor einer weiteren Ausbreitung des Tumors. Sie waren selbst transformiert, so daß es sich hier um Karzinosarkome handelte.

Zudem konnte beobachtet werden, daß bei Tumoren, die nach alleiniger Transplantation von Tumorzellen oder Fibroblasten entstanden sind, Bereiche vom Pankreasnormalgewebe der Maus zu finden sind, die wie das Pankreas überwiegend aus Azinuszellen bestehen. Dagegen bleiben bei der Kotransplantation von Tumorzellen und Fibroblasten vom Normalgewebe der Maus überwiegend Ausführungsgänge des Pankreas erhalten. Das Zugrundegehen der Azinuszellen in diesen Tumoren kann durch eine Verlegung der Ausführungsgänge bedingt sein. Die Größe der Karzinosarkome könnte eine ausgeprägte Kompression der Ausführungsgänge des Pankreas der Maus mit einem Zugrundegehen der Azinuszellen durch diese Tumoren erklären. Bei Tumoren, deren Stromazellen DDR2 überexprimieren, könnte dies ein Hinweis auf eine besonders ausgeprägte Invasivität der Tumorzellen, in die Ausführungsgänge des Pankreas sein. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, daß die Ausführungsgänge des Pankreas der Maus in diesen Tumoren von Tumorzellen ummauert sind, wobei es möglicherweise zu einer Invasion der Tumorzellen in das Ausführungsgangsystem kommt. Für das hohe invasive Potential DDR2 überexprimierender Tumoren spricht eine weitere Beobachtung: der Tumor zeigte ein hohes metastasierendes Potential und das Stroma dieser Tumoren war sehr kollagenreich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß eine vermehrte Expression von DDR2 in den Stromazellen Vorgänge der Tumordinvasion potenzieren. Möglicherweise induziert DDR2 in den Stromazellen die Expression fibrillärer Kollagene, die wiederum als biologisch wirksame Liganden den Rezeptor aktivieren.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß die Rezeptortyrosinkinasen DDR1 und DDR2 in Zell-Stroma-Interaktionen während Vorgängen der Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt sind und macht sie zu interessanten Zielgenen neuer Strategien in der Tumorthherapie.

Summary

Silke Contag (1999)

Analysis of the functional role of the receptor tyrosine kinases DDR1 and DDR2 in tumour progression applying orthotopic transfer of human pancreatic tumour cells in *scid/scid* mice

The current study represents an analysis of the role of tumour-associated genes from the family of discoidin-domain receptor tyrosine kinases, in processes of tumour progression. The pronounced expression of DDR1 in tumour cells and of DDR2 in stromal cells surrounding the tumour cells, as well as the structure homology to adhesion proteins, and the identification of collagens as biologically active ligands, led to the hypothesis that DDR1 and DDR2 participate in interactions between stroma and tumour cells during processes of tumour invasion and metastasis.

Since a suitable in-vivo model which passes through all steps of the metastatic cascade represents a prerequisite for the elucidation of this question, the orthotopic transplantation of the human pancreas adenocarcinoma cell line in *scid/scid* mice was done. The tumour cells transplanted proximally into the pancreas of the mouse. These cells produced tumours which invade the surrounding organs resulting into complications similar to those observed among patients with pancreatic carcinoma. The tumour metastasised not only haematogenously and lymphogenously, but also in the form of implantation and contact metastases. The tumour cells induced distinct desmoplasia in the mouse, a characteristic of human pancreatic carcinoma. It was observed from this model that interactions occurred between tumour and stromal cells. In addition, all steps of the metastatic cascade were demonstrated. This model may therefore be a suitable tool to investigate mechanisms of interactions between tumour and stromal cells.

The initial step was the analysis of the functional significance of DDR1 in tumour progression. DDR1-stable, overexpressing PancTu cells were transfected by means of retroviral gene transfer and implanted orthotopically in *scid/scid* mice. Tumour growth and proliferation were then compared with the control cell line. The augmented expression of DDR1 led to aggressive growth of the tumours, and to a definite increase in invasiveness and metastatic potential in comparison to the control. There was no difference between desmoplasia and proliferation in the two experimental groups.

Immunohistochemical analyses of the adhesion molecules ICAM-1, CD44v5, and E-cadherin were conducted – the expression of which was negatively correlated to the invasiveness of tumours. It was not possible to detect ICAM-1 and CD44v5 in the PancTu cells. In addition the E-cadherin-catenin complex was disturbed extensively. The DDR1-overexpressing cell line demonstrated a comparable expression pattern of these adhesion proteins. These results indicate that the PancTu cells are already clearly invasive. Collagen IV, a parameter of basal-membrane integrity, was likewise expressed to only a slight degree in these tumours.

Further experiments were conducted to clarify whether DDR1 plays a significant role in processes of apoptosis and DNA repair. Immunohistochemical and Western-blot analysis showed that the tumour-suppressor gene p53 was expressed to a lesser degree in the DDR1-overexpressing tumours than in the control. The DDR1-overexpressing tumour cells furthermore demonstrated augmented resistance to radiation. This phenomenon indicates that DDR1 might carry out a protective function with respect to apoptosis, or that it plays a role in processes of DNA repair.

The second phase of the study investigated the functional significance of DDR2 in stromal cells during tumour progression. Transfected stable DDR2-overexpressing murine fibroblasts, and the tumour cells were co-transplanted into the SCID mouse. Even the co-transplantation of the control fibroblast cell line showed an interesting result. Three observations were made: firstly in most areas the tumours produced a connective-tissue capsule, secondly they rarely were invasive and lastly they metastasised to a lesser extent than the other tumours. The fibroblasts arranged themselves around the tumour cells and protected the mouse from further progression of the tumour. The fibroblasts were already transformed and therefore the tumour was defined as a carcinosarcoma.

In addition, it was observed that when only tumour cells or fibroblasts were transplanted the tumour contained normal pancreatic tissue which was composed mainly of acinus cells with only a few duct cells. In contrast after co-transplantation of tumour cells and fibroblasts only duct cells of the normal pancreas remained in the tumours. The degradation of the acinus cells can be caused by the obstruction of the pancreatic ducts. This could be due to an extensive compression of the ducts caused by the massive tumour mass of the carcinosarcomas.

In the tumours with the DDR2-overexpressing fibroblasts one may suspect that the tumour cells invade into the ducts and therefore cause duct obstruction. This is supported by the observation, that in these tumours the pancreatic ducts were lined by the tumour cells. The tumour showed a high metastatic potential and the stroma was particularly rich of collagen. These results indicate that increased expression of DDR2 in the stromal cells potentiates the process of tumour invasion. It is possible that DDR2 induces the expression of fibrillary collagens in stromal cells, which in turn activates the receptor as biologically active ligands.

The results of this study confirm the hypothesis that the receptor tyrosine kinases DDR1 and DDR2 participate in interactions between tumour cells and stroma during processes of tumour invasion and metastasis, and make these kinases interesting target genes of new strategies in tumour therapy.