

DEPARTEMENT INDUSTRIËLE WETENSCHAPPEN

CHEMIE OPTIE BIOCHEMIE

**Epigenetische onderdrukking van het  
tetraspanine CD9 gedurende  
de ziekteprogressie in  
multipel myeloom cellen**

Eindwerk voorgedragen tot het  
behalen van de graad en het diploma  
van industrieel ingenieur / master  
Academiejaar 2006-2007

Door: Sandra Van Lint

Promotor hogeschool: dr.ir. H. Rediers  
Promotor bedrijf: prof. K. Vanderkerken  
lic. E. De Bruyne

---

---

## Dankwoord

---

---

Deze thesis is het resultaat van de hulp en kennis van een aantal personen die ik hiervoor wil bedanken.

In de eerste plaats gaat mijn dank naar Professor Vanderkerken omwille van de kans die ze mij gaf om deze thesis tot een goed einde te brengen binnen het onderzoekskader van haar interessante dienst.

Een bijzonder woord van dank wens ik te richten naar Lic. Elke De Bruyne voor haar aangename begeleiding, professionele hulp en uitstekend wetenschappelijk advies. Verder zou ik alle medewerkers van de dienst Hematologie en Immunologie willen bedanken voor de aangename werksfeer en de grote hulpvaardigheid. Bedankt voor de leuke tijd zowel in het labo als daarbuiten.

Ook een woord van dank aan mijn hogeschoolpromotor Hans Rediers voor de nodige inspanningen en de interesse die hij toonde om van dit eindwerk iets moois te maken. Hierbij wens ik tevens alle leerkrachten en docenten die mij begeleid hebben doorheen mijn schooljaren te bedanken voor de opgedane kennis en voor het aanwakkeren van mijn wetenschappelijke interesse.

Verder bedank ik al mijn vrienden voor de aanmoedigen in mijn wilde studieplannen. Bovendien bedank ik al mijn klasgenootjes die van het studeren iets tof gemaakt hebben.

Ook mijn ouders, broer en zus verdienen een bedankje. Hartelijk bedankt voor alle aanmoedigende woorden en grote steun die ik altijd van jullie kreeg.

Sandra Van Lint  
Nieuwenrode, 2007



---

---

## Samenvatting

---

---

Multipel myeloom (MM) is een kanker die gekenmerkt wordt door een ongecontroleerde expansie van monoclonale plasmacellen in het beenmerg (BM). Er werd reeds voor verschillende vaste tumoren aangetoond dat de oppervlakte expressie van het tetraspanine CD9 omgekeerd correleert met de tumorprogressie. De CD9 expressie werd nagegaan gedurende de MM progressie. Immunofenotypering van primaire BM plasma cellen toonde CD9 expressie aan in de meerderheid van de MM patiënten met niet actieve ziekte, terwijl de meeste gevallen met agressieve ziekte CD9 negatief waren. De data werden bevestigd op eiwitniveau in het 5T2MM en 5T33MM muismodel. Daar de CD9 promoter rijk is aan CpG gebieden, zou hypermethylering verantwoordelijk kunnen zijn voor deze CD9 silencing. Er werd aangetoond dat de CD9 promoter regio van de CD9 negatieve 5T33MM<sub>vt</sub> cellen twee maal meer gemethyleerde CpG sites bevat dan de CD9 positieve 5T33MM<sub>vv</sub> cellen. Bovendien resulteerde co-behandeling van de 5T33MM<sub>vt</sub> cellen met een methylering en een histone deacetylase inhibitor in een sterke synergistische reactivatie van CD9 op zowel mRNA als eiwit niveau. De 5T33MM<sub>vv</sub> cellijn blijkt bovendien vatbaarder voor NK cel gemedieerde cytolyse dan de 5T33MM<sub>vt</sub> cellijn. CD9 expressie in de 5T33MM<sub>vt</sub> cellijn werd bekomen door transductie met een mCD9 lentivirale vector hetgeen resulteerde in een hogere vatbaarheid voor NK cel gemedieerde cytolyse in vergelijking met een cellijn getransduceerd met een controle vector. Epigenetische modificaties zijn dus deels verantwoordelijk voor de CD9 silencing tijdens de 5T33MM progressie wat een verminderde gevoeligheid voor NK cel gemedieerde cytolyse tot gevolg heeft.

---

---

## Abstract

---

---

Multiple Myeloma (MM) is a lethal plasma cell malignancy characterized by the uncontrolled accumulation of monoclonal plasma cells in the bone marrow (BM). The surface expression of the tetraspanin CD9 inversely correlates with progression in several solid tumors.

We investigated CD9 expression during MM progression. Immunophenotyping on primary BM plasma cells showed CD9 expression in the majority of MGUS and MM patients with non-active disease, while most cases with aggressive disease were CD9 negative. Moreover, CD9 expression on murine 5T33MM and 5T2MM cells was significantly down-regulated during disease development. As the CD9 promoter was found rich in CpG dinucleotides, hypermethylation might be responsible for this silencing. The promoter region of CD9 non-expressing 5T33MM<sub>vt</sub> cells was found to contain twice as much methylated CpG sites compared to CD9 expressing 5T33MM<sub>vv</sub> cells. Co-treatment of 5T33MM<sub>vt</sub> cells with the demethylation agent 5-Aza-2'-deoxycytidine and the histone deacetylase inhibitor LBH589 resulted in strong synergistic reactivation of CD9 at mRNA and protein level. CD9 expressing 5T33MM<sub>vv</sub> cells were demonstrated to be more susceptible to NK cell mediated cytotoxicity than the CD9 negative 5T33MM<sub>vt</sub> cells. 5T33MM<sub>vt</sub> cells stably transduced with a mCD9 lentiviral transferplasmid were more sensitive to NK cell mediated lysis than control transduced cells.

We thus demonstrate an inverse correlation between CD9 expression and MM progression. In the 5T33MM model, epigenetic silencing seems to be involved in this CD9 down-regulation. Furthermore, we showed that as CD9 expression becomes silenced during MM progression, 5T33MM cells become less susceptible to NK cell-mediated cytotoxicity.

---

---

# Inhoudsopgave

---

---

<b>Dankwoord</b> .....	1
<b>Samenvatting</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	4
<b>Inhoudsopgave</b> .....	5
<b>Lijst van afkortingen</b> .....	8
<b>Lijst van figuren</b> .....	10
<b>Lijst van tabellen</b> .....	12
<b>Situering en doelstelling</b> .....	13
<b>Literatuurstudie</b> .....	15
1. Lymfoïde cellen van het immuunsysteem.....	16
1.1 Ontstaan van lymfoïde en myeloïde cellen in het beenmerg en hun differentiatie in bloed en weefsels .....	16
1.2 Lymfoïde cellen.....	17
1.2.1 Inleiding .....	17
1.2.2 B-lymfocyten.....	17
1.2.3 Natural Killer cellen .....	18
1.2.4 T-lymfocyten.....	19
1.3 Ontwikkeling van de normale plasmacel .....	19
2. Multipel myeloom.....	21
2.1 Historische achtergrond .....	21
2.2 Epidemiologie van multipel myeloom .....	22
2.3 Symptomatologie .....	22
2.4 Ziekteverloop van multipel myeloom .....	23
2.5 Ontwikkeling van de myeloom cel.....	24
2.6 Homing en interactie met beenmerg stromale cellen .....	25
2.6.1 Homing van lymfocyten in het algemeen .....	25
2.6.2 Homing van de multipel myeloom cellen .....	27
3. CD9 .....	28

4. Ziektemodellen voor multipel myeloom .....	29
4.1 <i>In vivo</i> model .....	29
4.2 5TMM murine myeloom model .....	30
5. Invloed van epigenetische modificaties .....	31
5.1 Algemene achtergrond .....	31
5.1.1 Chromatine organisatie .....	31
5.1.2 Histon proteïnen .....	32
5.2 Epigenetische transcriptionele modificaties.....	34
5.2.1 Inleiding tot de epigenetica .....	34
5.2.2 Methylatie en kanker .....	34
5.2.3 Acetylatie/deacetylatie en kanker .....	37
6. Lentivirale vectoren .....	39
6.1 Inleiding .....	39
6.2 Moleculaire aspecten van de lentivirale transfectie .....	39
6.2.1 Lentivirale vectorproductie .....	40
<b>Materiaal en Methoden.....</b>	<b>43</b>
1. Proefdieren .....	44
2. Cellijnen .....	44
2.1 <i>In vivo</i> cellijnen .....	44
2.2 <i>In vitro</i> cellijnen .....	45
3. Tellen van de cellen .....	45
3.1 Theoretische achtergrond .....	45
3.2 Methode.....	46
4. Celzuivering .....	46
5. Flow cytometrie.....	47
5.1 Theoretische achtergrond .....	47
5.2 CD9 kleuring .....	47
5.3 Propidium Iodide kleuring .....	48
6. Behandeling met de histone deacetylase inhibitor LBH589 en de methylatie inhibitor 5-aza-2'deoxyctidine.....	49
7. DNA isolatie.....	49
8. Bisulfietbehandeling en DNA opzuivering .....	50
8.1 Theoretische achtergrond .....	50
8.2 Methode.....	51

9. Bepaling status promotorregio CD9.....	52
10. RNA isolatie.....	54
11. cDNA synthese.....	55
12. Real time RT-PCR .....	55
12.1 Theoretische achtergrond.....	55
12.2 Methode.....	57
13. Isolatie van Natural Killer cellen .....	58
14. Chromlabeling.....	58
15. Cytotoxiciteitstest.....	59
16. Statistiek.....	59
<b>Resultaten</b> .....	61
1. Voorafgaand onderzoek naar de expressie van CD9 tijdens de ziekteprogressie van multipel myeloom .....	62
1.1 Expressie van CD9 op primaire humane MM cellen is omgekeerd gecorreleerd met de MM progressie.....	62
1.2 CD9 expressie gedurende de ziekteprogressie in het 5T2MM en 5T33MM muismodel.....	63
2. CD9 promotor status .....	63
3. Effect van methylatie en histone deacetylatie op de CD9 expressie.....	65
3.1 Optimalisatie van de werkingscondities voor de methylatie inhibitor 5'aza-dc.....	65
3.2 Optimalisatie van de werkingscondities voor de histone deacetylase inhibitor LBH589.....	66
3.3 Simultane behandeling met de methylatie inhibitor en de histone deacetylase inhibitor.....	68
4. Methylatiestatus na behandeling met een methylatie inhibitor en een histone deacetylase inhibitor.....	69
5. Rol van CD9 in Natural Killer cel gemedieerde cytolyse: 5T33MM <sub>vv</sub> versus 5T33MM <sub>vt</sub> .....	70
6. Rol van CD9 in Natural Killer cel gemedieerde cytolyse: 5T33MM <sub>vt</sub> versus mCD9 5T33MM <sub>vt</sub> .....	71
<b>Discussie</b> .....	73
<b>Bibliografie</b> .....	79
<b>Bijlagen</b> .....	91



---

---

## Lijst van afkortingen

---

---

5'aza-dc	5-aza-2'-deoxycytidine
Az	Aminozuur
BM	Beenmerg
BMEC	Beenmerg endotheelcellen
BMSC	Beenmerg stromale cellen
BSP	Bisulfiet specifieke primers
CAM-DR	Cell adhesion mediated drug resistance
CMV	Cytomegalovirus
DNA	Deoxyribonucleïnezuur
dsDNA	Dubbelstrengig deoxyribonucleïnezuur
EC	Extracellulair
ECM	Extracellulaire matrix
ER	Experimentele vrijgave
FDC	Folliculair dendritische cel
gDNA	Genomisch deoxyribonucleïnezuur
GUS	$\beta$ -glucuronidase
HAT	Histone acetyl transferase
HDAC	Histone deacetylase
HDACi	Histone deacetylase inhibitor
HIV-1	Humaan immunodeficiëntie virus type 1
Ig	Immunoglobuline
IGF-1	Insulin like growthfactor 1
IL	Interleukine
kb	Kilo baseparen
LB	Luria Bertani
LTR	Long Terminal Repeat
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MGUS	Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance

MHC	Major histocompatibility complex
MM	Multipel myeloom
MR	Maximale vrijgave
NK	Natural Killer
PI	Propidium Iodide
Pol	Polymerase
PS	Fosfatidylserine
RCR	Replicatie competent retrovirus
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SIN	Self-inactivating vector
SR	Spontane vrijgave
TF	Transcriptie factor
TNF	Tumor necrosis factor
vRNA	Viraal ribonucleïnezuur
VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus - Glycoproteïn

---

---

## Lijst van figuren

---

---

Fig. 1	Overzicht van de differentiatie van de cellen van het bloed uit de pluripotente hematopoëtische stamcel in het BM.....	16
Fig. 2	De ontwikkeling van B-cellen doorheen verschillende stadia gekenmerkt door de herschikking en expressie van de immunoglobuline genen.....	18
Fig. 3	De gespecialiseerde regio's van de perifere lymfoïde weefsels zorgen voor een omgeving waar antigeen specifieke naïeve B-cellen kunnen interageren met helper T-cellen specifiek tegen hetzelfde antigeen.....	21
Fig. 4	X-stralen opname van een schedel (a) en voorarm (b) met osteolytische letsels.....	23
Fig. 5	Moleculaire pathogenese van MM.....	25
Fig. 6	Opeenvolgende stappen in de homing van lymfocyten.....	26
Fig. 7	Schematische weergave van de structuur van tetraspanines.....	28
Fig. 8	Voortzetting van het 5TMM muismodel.....	30
Fig. 9	Organisatie van de histonen in een nucleosoom.....	31
Fig. 10	Algemeen overzicht van de chromatine condensatie.....	32
Fig. 11	Afbeelding van een nucleosoom.....	33
Fig. 12	Interactie van HATs en HDAC's tijdens DNA transcriptie.....	33
Fig. 13	DNA methylatie.....	34
Fig. 14	Schematisch overzicht van de drie mechanismen voor transcriptionele onderdrukking te wijten aan DNA methylatie.....	35
Fig. 15	Schematisch overzicht van de vier meest voorkomende mechanismen in de ontwikkeling van kanker.....	36
Fig. 16	Structuurformule van 5-aza-2'-deoxycytidine.....	36
Fig. 17	Algemene structuur van een HDAC (A) en een hydroxamide zuur HDAC inhibitor (B).....	38
Fig. 18	De organisatie van het HIV-1 genoom.....	39
Fig. 19	Het transfer plasmide pHR'tripCMV-mCD9-SIN.....	40
Fig. 20	Schematische voorstelling van de productie van lentivirale vectoren.....	41

Fig. 21	Verskil in DNA sequentie voor gemethyleerd en ongemethyleerd DNA na bisulfiet behandeling.....	50
Fig. 22	RT-PCR proces.....	56
Fig. 23	5'-3' nuclease activiteit van het DNA polymerase systeem.....	57
Fig. 24	FACS analyse van de CD9 expressie op proteïne niveau in de muis cellijnen 5T33MM $vt$ (A) en 5T33MM $vv$ (B).....	64
Fig. 25	Schematische weergave van de geselecteerde CD9 promotor regio.....	64
Fig. 26	Sequenering van de geselecteerde CD9 promotor regio van het bisulfiet gemodificeerd gDNA van de 5T33MM $vt$ en de 5T33MM $vv$ cellen.....	65
Fig. 27	Effect van de methylatie inhibitor 5'aza-dc op de celdood na 24, 48 en 72 h.....	66
Fig. 28	Effect van de HDACi LBH589 op de celdood na 24 en 48 h.....	67
Fig. 29	Effect van LBH589 (4 nM) op de CD9 expressie na 24 en 48 h.....	67
Fig. 30	Relatieve hoeveelheid CD9 expressie van de verschillende stalen op mRNA niveau.....	68
Fig. 31	Synergistische membraire re-expressie van CD9 op 5T33MM $vt$ myeloma cellen na behandeling met LBH589 en 5'aza-dc.....	69
Fig. 32	Bisulfiet sequenering van de geselecteerde CD9 promotor regio van 5T33MM $vt$ cellen 48 h behandeld met LBH589 (HDAC inhibitor), 5'aza-dc (methylatie inhibitor) en een combinatie van beide.....	70
Fig. 33	Specifieke lyse van de 5T33MM $vv$ en 5T33MM $vt$ cellen gemedieerd door NK cellen bij verschillende effector:target (E:T) ratio's.....	71
Fig. 34	Vergelijking van de membraire CD9 expressie van de 5T33MM $vt$ en de CD9 getransduceerde 5T33MM $vt$ cellijnen.....	72
Fig. 35	Gevoeligheid van de 5T33MM $vt$ en CD9 getransduceerde 5T33MM $vt$ cellen voor NK cel gemedieerde cytolyse.....	72

---

---

## Lijst van tabellen

---

---

Tabel 1	ThermoCycler condities voor de bisulfiet omzetting.....	51
Tabel 2	Reactiemengsel voor het uitvoeren van een PCR waarbij bisulfiet behandeld genomisch DNA geamplificeerd wordt.....	52
Tabel 3	Programma voor de thermocycler waarbij het bisulfiet behandeld genomisch DNA geamplificeerd wordt.....	53
Tabel 4	Ligatiemengsel voor het kloneren van het PCR fragment.....	53

---

---

## Situering en doelstelling

---

---

Multipel myeloom (MM) is een, tot op heden, ongeneeslijke plasmacelkanker die gekenmerkt wordt door een ongecontroleerde expansie en vermenigvuldiging van monoclonale plasmacellen in het beenmerg (BM), secretie van paraproteïne in het serum en de urine, ontwikkeling van osteolytische letsels en verhoogde angiogenese in het BM. In het BM ontvangt de MM cel signalen voor overleving en proliferatie doordat er functionele, wederzijdse interacties bestaan met de stromale BM cellen. Bovendien speelt het BM stroma ook een rol in de drugresistentie van de MM cel.

Er werd reeds voor verschillende vaste tumoren aangetoond dat de membranaire CD9 expressie omgekeerd correleert met de tumorprogressie. CD9 is lid van de tetraspanine superfamilie. Tetraspanines zijn glycoproteïnen die zowel vrij voorkomen als gekoppeld aan andere tetraspanines, integrines, receptoren of MHC moleculen. Hierbij kunnen ze dienst doen als adaptermoleculen. Tot op heden zijn de liganden van CD9 ongekend. CD9 beïnvloedt verscheidene biologische en pathologische processen waaronder celadhesie, celmigratie, metastasering, proliferatie en differentiatie.

Immunofenotypering van primaire BM plasmacellen van MM en MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) patiënten toonde aan dat CD9 tot expressie komt in de meerderheid van de MGUS en MM patiënten met niet actieve ziekte, terwijl de meeste gevallen met agressieve ziekte CD9 negatief waren. De data werden in het 5TMM model op eiwitniveau bevestigd door middel van FACS kleuring (dubbelkleuring voor idiotype en CD9) voor zowel het 5T33MM als 5T2MM model.

Het eerste doel van de masterproef richt zich op de identificatie van het mechanisme verantwoordelijk voor het verdwijnen van de CD9 expressie. In de literatuur werd recent beschreven dat de afwezigheid van CD9 op humane MM cellijnen gepaard gaat met gedaalde mRNA waarden en methylering van de promotor regio [29]. Bovendien voldoet de CD9 promotor aan de criteria van een homeostatische gen promotor: de regio meteen aangrenzend aan de 5' van het mRNA ontbreekt namelijk een 'echte' TATA-box en CAAT sequentie en is rijk aan CpG nucleotiden [88]. Er wordt verondersteld dat hypermethylering mogelijk mede verantwoordelijk is voor de CD9 silencing in MM tijdens de tumorprogressie. Daartoe zal de

methylatie status van de promoter regio's van de 5T33MM<sub>vt</sub> cellijn, die CD9 negatief is, en de 5T33MM<sub>vv</sub> cellijn, die CD9 positief is, nagegaan worden. Bovendien zal getracht worden de CD9 expressie te herstellen in de 5T33MM<sub>vt</sub> cellijn door de cellen te behandelen met een methylatie inhibitor. De cellen werden tevens behandeld met een combinatie van een methylatie inhibitor en een histone deacetylase inhibitor (HDACi) omdat er aangetoond werd dat HDACi synergistisch reageren met een DNA methyltransferase inhibitor tot het reactiveren van de 'silenced' genen.

In het tweede deel van de masterproef zal het verband tussen de CD9 expressie en de vatbaarheid voor Natural Killer (NK) cel gemedieerde lyse geanalyseerd worden. In het verleden werd reeds aangetoond dat de CD9 expressie de vatbaarheid van humane MM cellijnen voor T-cel en NK cel gemedieerde cytolyse bevordert [94]. Er kan dus aangenomen worden dat naarmate de ziekte verder schrijdt en CD9 bijgevolg downgereguleerd wordt, de MM cel minder vatbaar zal worden voor de cel gemedieerde cytolyse. Hierdoor kan de MM cel het immuunsysteem ontlopen. De rol van CD9 in de NK cel gemedieerde cytolyse zal bijgevolg onderzocht worden waarbij een vergelijking wordt gemaakt tussen de 5T33MM<sub>vv</sub> en de 5T33MM<sub>vt</sub> cellen enerzijds en de 5T33MM<sub>vt</sub> versus 5T33MM<sub>vt</sub> cellen getransduceerd met een lentivirale vector met mCD9 anderzijds.

# **Literatuurstudie**



---

---

# Literatuurstudie

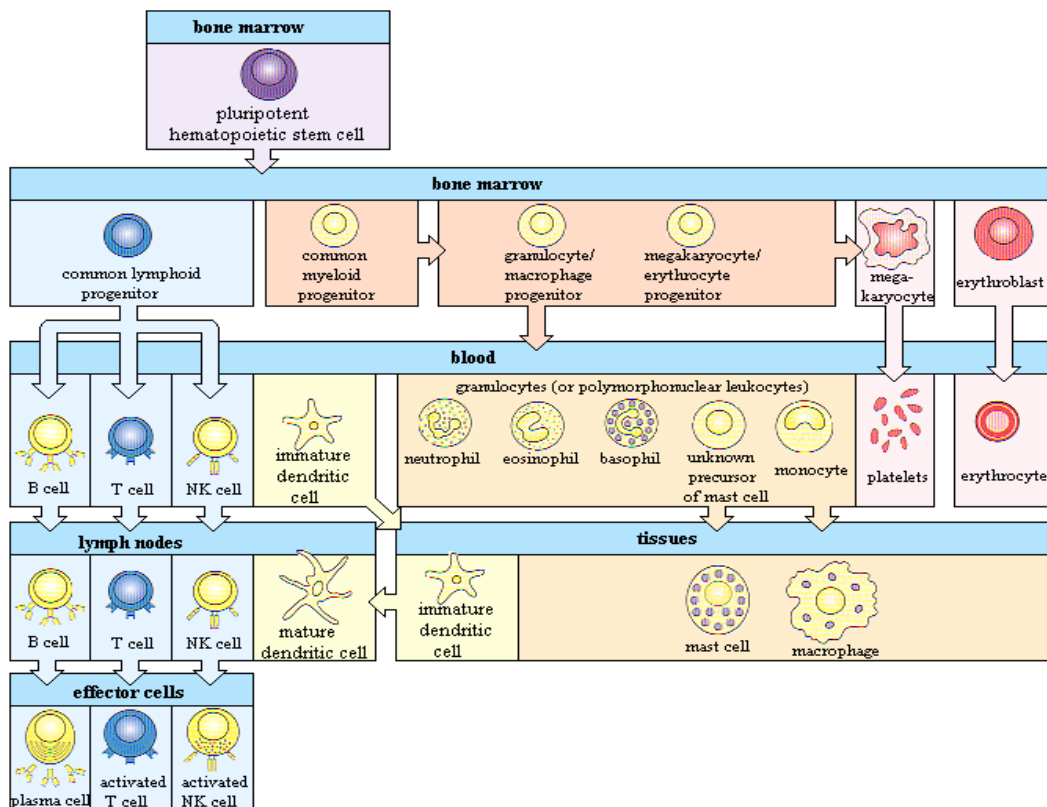
---

---

## 1. Lymfoïde cellen van het immuunsysteem

### 1.1 *Ontstaan van lymfoïde en myeloïde cellen in het beenmerg en hun differentiatie in bloed en weefsels*

Alle cellulaire elementen die deel uitmaken van het bloed, waaronder de cellen van het immuunsysteem, worden gevormd vanaf de pluripotente hematopoëtische stamcel in het beenmerg (BM). Deze pluripotente cellen ondergaan in het BM enkele delingsrondes waarna ze twee types van stamcellen kunnen voortbrengen, een lymfoïde precursor cel, die uiteindelijk differentieert tot B-, T-lymfocyt of Natural Killer (NK) cel en een myeloïde precursor cel die op haar beurt zal uitgroeien tot verschillende types van leukocyten, erythrocyten en megakaryocyten (figuur 1) [56, 64, 87].



Figuur 1: Overzicht van de differentiatie van de cellen van het bloed uit de pluripotente hematopoëtische stamcel in het BM [56].

## **1.2 Lymfoïde cellen**

### **1.2.1 Inleiding**

Onder de lymfocyten kunnen drie grote types onderscheiden worden; waaronder de best gekende de B- en T-lymfocyten, die samen ongeveer 20 à 25% van alle leukocyten vormen. De B- en de T-lymfocyten worden van elkaar onderscheiden door hun differentiatieplaats en door hun antigeen receptor. De gemeenschappelijke lymfoïde precursor kan enerzijds migreren naar de thymus en onder invloed van het daar heersende micro-milieu differentiëren tot een immature T-cel. Anderzijds kan hij in het BM blijven en er differentiëren tot een immature B-cel. Deze naïeve lymfocyten zijn nog niet actief en circuleren in het bloed en de perifere weefsels waar ze geactiveerd kunnen worden wanneer ze hun antigeen ontmoeten. Na contact met een antigeen zullen de B-cellen tot antilichaam secreterende plasmacellen differentiëren terwijl de T-cellen differentiëren tot effector T-cellen met verschillende functies. Per dag worden er ongeveer een miljard nieuwe lymfocyten gevormd zodat er op elk moment zo'n  $10^{12}$  lymfoïde cellen in omloop zijn in het menselijk lichaam. Een derde type lymfoïde cellen zijn de Natural Killer cellen [56, 64, 87].

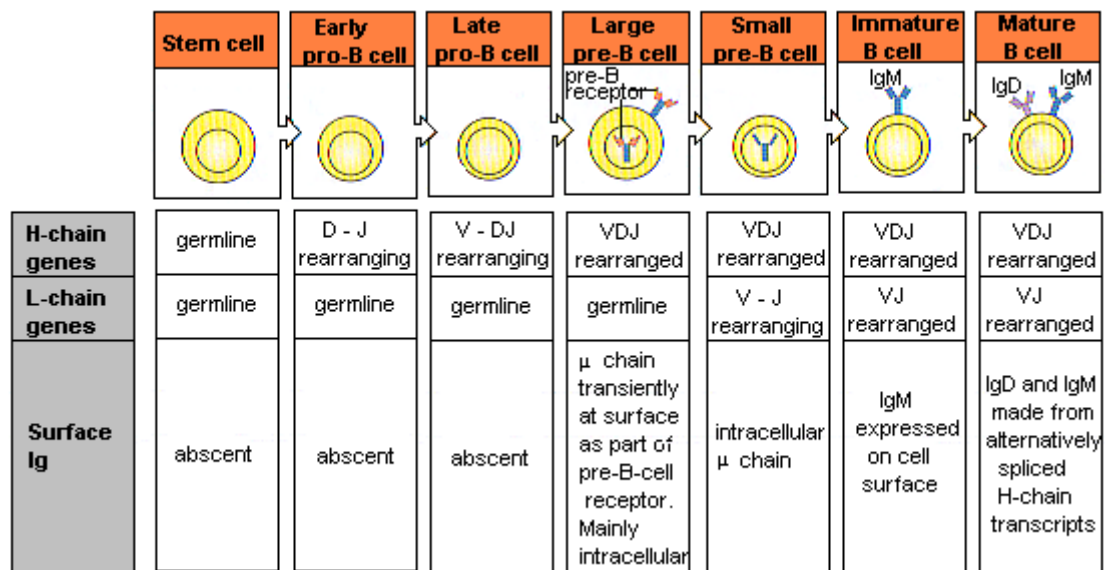
### **1.2.2 B-lymfocyten**

De ontwikkeling van B-cellen verloopt stapsgewijs via verschillende tussenstadia die gekenmerkt worden door immunoglobuline (Ig) genherschikking en expressie van de Ig genen (figuur 2).

Pro-B-cellen hebben zich ontwikkeld uit de pluripotente hematopoëtische stamcel en worden geïdentificeerd door het verschijnen van celoppervlakte proteïnen die karakteristiek zijn voor de vroege B-nakomende cellen. Er vindt in de pro-B-cellen een herschikking plaats van de genen die coderen voor de Ig zware keten. In de vroege pro-B-cel treedt een fusie van het D en J gensegment op, gevolgd door een herschikking van het V gensegment naast een DJ gensegment in de late pro-B-cel fase. Indien de herschikkingen succesvol zijn, zal de Ig zware keten op het niveau van de grote pre-B-cel stadium tot expressie gebracht worden. De expressie gebeurt voornamelijk in het cytoplasma alsook in mindere mate op het membraan als onderdeel van de pre-B-cel receptor. De grote pre-B-cel zal een aantal delingen ondergaan teneinde een kleine pre-B-cel te vormen. De zware keten wordt enkel nog in het cytoplasma uitgedrukt terwijl de lichte Ig-keten locus genherschikkingen ondergaat. Vervolgens wordt

IgM tot expressie gebracht op het membraan, de cellen worden nu immature B-cellen genoemd.

De ontwikkeling van stamcel tot immature B-cel is dus volledig antigen onafhankelijk. De immature B-cellen ondergaan selectie waarna de overlevende cellen verder differentiëren tot mature B-cellen die zowel IgM als IgD uitdrukken. Deze cellen, die ook naïeve B-cellen worden genoemd, circuleren tussen de perifere lymfoïde weefsels waar ze geactiveerd kunnen worden na contact met hun overeenkomstig lichaamsvreemd antigen [56, 64, 87].



Figuur 2: De ontwikkeling van B-cellen verloopt doorheen verschillende stadia die gekenmerkt worden door de herschikking en expressie van de immunoglobuline genen [56].

### 1.2.3 Natural Killer cellen

Natural Killer (NK) cellen ontwikkelen zich in het BM uit de gemeenschappelijke lymfoïde precursor en circuleren na ontwikkeling in het bloed. Ze zijn groter dan de B- en de T-lymfocyten, bezitten kenmerkende cytoplasmatische granulen en worden functioneel geïdentificeerd door hun mogelijkheid om sommige lymfoïde tumor cellijnen *in vivo* te vernietigen zonder dat ze eerst geïmmuniseerd of geactiveerd dienen te worden.

In de eerste plaats is het hun functie de gastheer te verdedigen tegen een eerste fase van de infectie van verschillende intracellulaire pathogenen waardoor ze bijgevolg deel uit maken van de initiële immuunrespons. NK-cellen worden geactiveerd in een respons op interferonen of macrofaag afgeleide cytokines. Geactiveerde NK-cellen dienen om virus infecties onder controle te houden terwijl de adaptieve immuunrespons antigen-specifieke cytotoxische T-cellen genereert die de infectie kan opruimen.

Het mechanisme van de NK-cellen is hetzelfde als dat van de cytotoxische T-cellen die aangemaakt worden in een adaptieve immuunrespons. Cytotoxische granulen worden vrijgezet naar het oppervlak van de gebonden doelwitcel toe. De effector proteïnen uit deze cytotoxische granulen dringen door het celmembraan en induceren een geprogrammeerde celdood of apoptose.

NK-cellen moeten mechanismen bezitten die geïnfecteerde cellen van de lichaamseigen cellen onderscheiden. NK-cellen bezitten twee types van oppervlakte receptoren die hun cytotoxische activiteit controleren. Een eerste type receptor is een activerende receptor die apoptose induceert. Een tweede type receptor inhibeert de activatie van NK-cellen en voorkomt het aanvallen en vernietigen van de lichaamseigen cellen door de NK-cellen [56, 64, 87].

#### **1.2.4 T-lymfocyten [56, 64, 87]**

Er kunnen twee grote klassen van effector T-cellen onderscheiden worden. De eerste klasse differentieert door activatie tot cytotoxische T-cellen die de geïnfecteerde cellen vernietigen terwijl de tweede klasse T-cellen differentiëren tot helper cellen die andere cellen, zoals B-cellen en macrofagen, activeren. De T-lymfocyten worden verder niet besproken in de thesis aangezien dit niet van toepassing is [56, 64, 87].

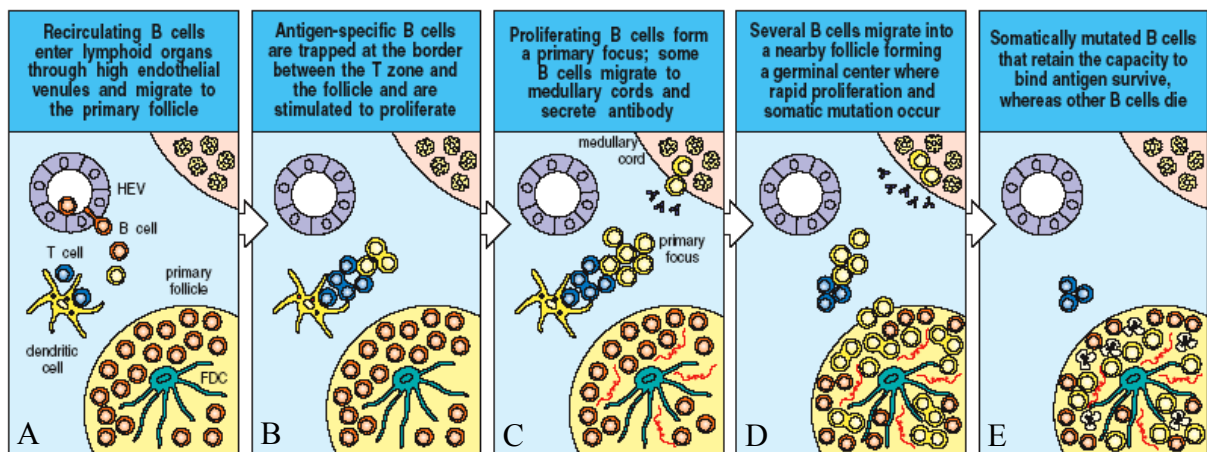
### **1.3 *Ontwikkeling van de normale plasmacel***

De plasmacel vertegenwoordigt het terminale differentiatiestadium van de mature B-cel en vormt de effectorcel van het humoraal immuunsysteem dat deel uitmaakt van de adaptieve immuunrespons. Dit immuunsysteem is nodig om extracellulaire pathogenen onschadelijk te maken en te elimineren door het secreteren van antilichamen of immunoglobulinen.

B-cellen die hun ontwikkeling in het BM beëindigd hebben, komen uiteindelijk in de bloedbaan terecht waar ze circuleren en migreren naar de perifere of secundaire lymfoïde organen. Indien de naïeve B-cel niet in contact komt met het specifieke antigeen, zal deze terug naar het bloedcompartiment migreren. Deze voortdurende uitwisseling van naïeve B-cellen tussen de secundaire lymfoïde weefsels en het bloed zal blijven bestaan totdat de cel ofwel haar specifiek antigeen ontmoet ofwel totdat ze in apoptose gaat omwille van ouderdomsverschijnselen. B-cellen die hun specifiek antigeen ontmoeten kunnen niet geactiveerd worden om te vermenigvuldigen totdat ze een helper T-cel ontmoeten die

specifiek is voor een van de peptiden afgeleid van dat antigen. Enkel B-cellen die het specifiek antigen gebonden hebben, zullen gevangen worden in de T-cel zone van de perifere lymfoïde organen waarop ze geactiveerd kunnen worden door de antigen-specifieke gewapende helper T-cel en een primaire focus van clonale expansie vormen (figuur 3B). Bij afwezigheid van een signaal van een specifieke helper T-cel zullen de antigen gestimuleerde B-cellen sterven.

Sommige van de B-cellen die in de primaire focus geactiveerd werden, zullen migreren naar ofwel de medullaire mergstrengen van de betrokken lymfeknopen ofwel naar deze delen van het rode merg die naast de T-cel zones van de milt gesitueerd zijn waar ze differentiëren tot kortlevende plasmacellen om gedurende enkele dagen antilichamen te secreteren (figuur 3C) en aldus een directe bescherming bieden; dit wordt de primaire respons genoemd. Deze cellen hebben geen somatische hypermutatie ondergaan, maar soms wel een isotype switch. De tweede ontwikkelingsfase is bijgevolg antigen en T-cel afhankelijk. De overige geactiveerde B-cellen migreren naar primaire follikels (figuur 3D) waar ze verder prolifereren en uiteindelijk germinale centra vormen zodat een latere effectievere respons bekomen wordt (secundaire respons). In deze germinale centra differentiëren de cellen tot centroblasten, die aan hoge snelheid prolifereren en geen B-cel receptor tot expressie brengen. In dit stadium zal er IgG-isotype switch en somatische hypermutatie optreden. Door somatische hypermutatie kunnen de gevormde antilichamen met hogere affiniteit aan hun overeenkomstige antigen binden. Vervolgens rijpen de centroblasten verder uit tot centrocyten en brengen uiteindelijk de aangepaste receptor tot expressie. Centrocyten met een hoge affiniteitsreceptor kunnen differentiëren tot geheugen B-cellen of tot plasmablasten. De plasmablasten zullen naar het BM 'homen' en er differentiëren tot plasmacellen. Deze plasmacellen zijn verantwoordelijk voor het overgrote deel van de IgG-secretie en overleven gemiddeld 30 dagen waarna ze apoptose ondergaan. De geheugencellen daarentegen kunnen jaren overleven en zullen weer circuleren in het bloed en de perifere lymfoïde organen op zoek naar hun specifiek antigen. Bij contact van de geheugencel met het specifiek antigen wordt de cyclus weer herhaald waardoor opnieuw antilichamen gevormd worden. Deze binden hun antigen met een nog hogere affiniteit dan voorheen [56, 64, 87].



**Figuur 3:** De gespecialiseerde regio's van de perifere lymfoïde weefsels zorgen voor een omgeving waar antigeen specifieke naïeve B-cellen kunnen interageren met helper T-cellen met specificiteit tegen hetzelfde antigeen [56].

FDC: folliculaire dendritische cel

## 2. Multipel myeloom

### 2.1 Historische achtergrond

Multipel myeloom (MM) of ziekte van Kahler is een kanker van de plasmacellen. De symptomen van pijn en pathologische fracturen in/van de botten werden voor het eerst beschreven in de 19<sup>de</sup> eeuw bij de engelsman Thomas Alexander McBean [110, 111, 112, 113].

Twee maanden na het optreden van de botpijnen stierf Alexander McBean. Bij post-mortem autopsie van zijn botten werd vastgesteld dat deze zeer zacht waren en gemakkelijk braken. Het BM was vervangen door een zachte, rode substantie waarvan de cellen tweemaal zo groot waren als normaal [110, 111, 112, 113].

Deze symptomen leidden uiteindelijk tot de definitie van MM. Het is een plasmacel neoplasmie die gekarakteriseerd wordt door de expansie van een monoklonale plasmacel populatie in het BM en de aanwezigheid van het overeenkomstige monoklonale immunoglobuline, voornamelijk van het IgA- en IgG-isotype, in het serum (M-proteïne of paraproteïne) en/of de overeenkomstige lichte keten in de urine (gekend als Bence-Jones proteïne). MM wordt ook gekenmerkt door de ontwikkeling van osteolytische botletsels die gepaard gaan met hevige pijn aan de botten [110, 111, 112, 113].

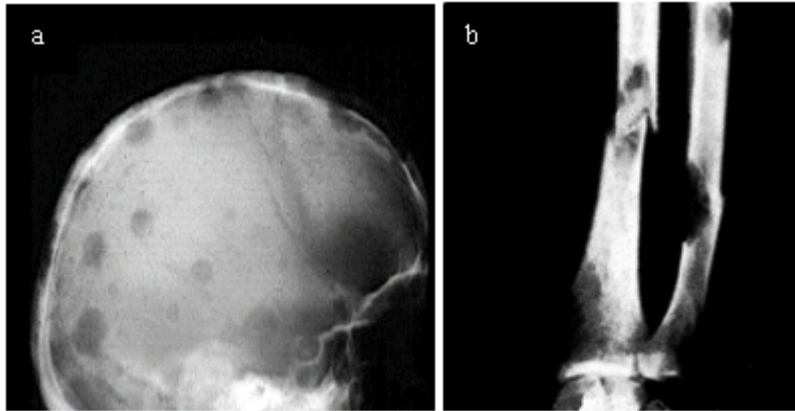
## **2.2 Epidemiologie van multipel myeloom**

Ondanks toenemend onderzoek en de steeds groter wordende vooruitgang in kennis van oorzaak, gevolg en behandelingen van neoplasieën blijft MM tot op heden een ongeneeslijke aandoening. De eigenschap van de MM cellen om resistent te worden aan de conventionele chemotherapie en het feit dat de beginfase van MM asymptomatisch verloopt, vormen hierbij de bepalende factoren. De gemiddelde overlevingsduur wordt geschat op 2,5 tot 3 jaar hoewel dit afhankelijk is van het tijdstip van de diagnose en de respons op de behandeling. Er zijn patiënten die na het stellen van de diagnose nog 6 à 7 jaar kunnen overleven.

MM vertegenwoordigt 15% van alle hematologische neoplasiën en is hiermee de meest voorkomende bloedkanker na Non-Hodgkin's lymfoom. Elk jaar worden er ongeveer 15 000 nieuwe gevallen van MM gediagnoseerd in de Verenigde Staten, waar er reeds meer dan 50 000 patiënten de ziekte hebben. In Europa zijn er meer dan 77 000 mensen in behandeling tegen de ziekte. De aandoening komt vaker voor bij mannen dan bij vrouwen waarbij de incidentie het hoogst blijkt te zijn bij afro-amerikanen met ongeveer 9,5 gevallen op 100 000 inwoners per jaar. Het laagste percentage aan MM patiënten is te vinden bij de Aziaten. Bij het kaukasische ras bijvoorbeeld bedraagt de incidentie 4,1 op 100 000 inwoners per jaar. MM kwam vroeger typisch voor op oudere leeftijd. De voorbije jaren is echter een verontrustende evolutie waargenomen waarbij de leeftijdsgrens progressief blijft dalen. De oorzaken van het ontwikkelen van MM zijn waarschijnlijk te wijten aan erfelijke factoren waarbij ook de omgevingsfactoren een grote rol spelen [110, 111, 112, 113].

## **2.3 Symptomatologie**

De symptomen van MM zijn afhankelijk van het stadium van de ziekte. Het is vaak zo dat in het beginstadium van de ziekte geen symptomen optreden. In een later stadium wordt MM echter gekenmerkt door een hele reeks specifieke klinische kenmerken. Wanneer de symptomen de kop op steken beginnen deze vaak als pijn in de beenderen meestal van de rug, de ribben of de schedel. Hierbij treden "punched out" osteolytische letsels (figuur 4a) op, hetgeen leidt tot een verhoogd risico op pathologische- en compressiefracturen (figuur 4b). Ongeveer 75% van de MM patiënten zullen deze letsels vertonen [110, 111, 112, 113].



Figuur 4: X-stralen opname van een schedel (a) en voorarm (b) met osteolytische letsels. Op de opname van de schedel zijn verschillende punched out osteolytische letsels waar te nemen terwijl de opname van de voorarm breuken vertoont [28].

De voornaamste oorzaak van deze botafbraak is de activatie van de osteoclasten als gevolg van de overproductie van osteoclast activating factoren zoals IL-6, IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  en TNF $\alpha$ . De overproductie wordt direct of indirect veroorzaakt door de MM cellen en de stromale cellen uit het BM. Door de massale proliferatie van de tumorcellen wordt de vorming van osteoblasten bovendien onderdrukt, hetgeen resulteert in een negatieve nettobalans tussen opbouw en afbraak van de beenderen. De balans helt duidelijk over naar de zijde van de botresorptie waardoor een overmaat aan calcium ontstaat wat vervolgens leidt tot hypercalcemia.

Door de vernietiging van het BM en de slechte werking van de nieren treedt er tevens anemia en vermoeidheid op. De nierfilter wordt dichtgeslibt door een overdadige aanwezigheid van een M-proteïne in het serum. Dit vormt, samen met het optreden van recurrenente infecties als gevolg van de vernietiging van witte bloedcellen in het BM, één van de belangrijkste doodsoorzaken van MM patiënten. Verschillende andere symptomen kunnen tevens optreden zoals verlies aan lichaamsgewicht, nausea, constipatie en braken [110, 111, 112, 113].

## **2.4 Ziekteverloop van multipel myeloom**

MM wordt vaak voorafgegaan door de leeftijdsgebonden premaligne aandoening genaamd “Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance” (MGUS). MGUS wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een stabiele maar lage concentratie aan overeenkomstig monoclonaal antilichaam in het serum en door de aanwezigheid van minder dan 10% plasmacellen in het BM. De plasmacellen hebben bijgevolg nog geen transformatie



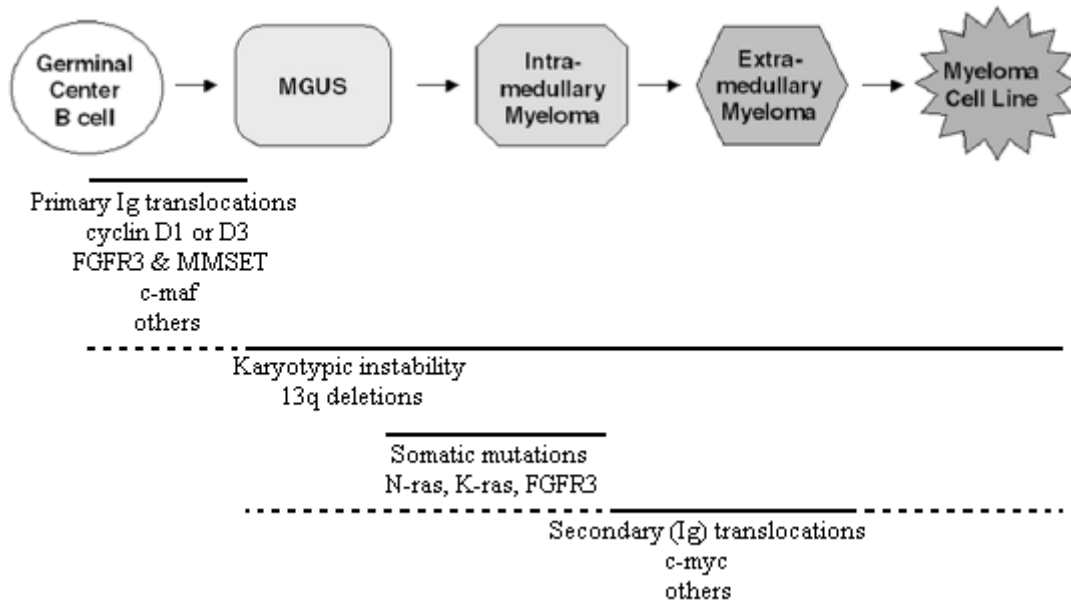
ondergaan maar wel reeds een immortilisatie. Ongeveer 1% van de MGUS patiënten zal binnen het jaar MM ontwikkelen.

Bij MM daarentegen is de intramedullaire tumorcelinhoud groter dan 10% en worden er osteolytische letsels en verhoogde angiogenese in het BM waargenomen. In sommige gevallen verloopt de overgang van MGUS naar intramedullaire MM via een tussenstadium waarin de tumorcelinhoud reeds meer dan 10% bedraagt hoewel er nog geen duidelijke symptomen waarneembaar zijn. Hier wordt er gesproken van een sluimerend MM. In een aantal gevallen kunnen plasmacellen in de eindfase ook opgemerkt worden in het bloed en andere extramedullaire plaatsen. Bij het optreden van MM op extramedullaire plaatsen wordt gesproken van een zeer agressieve tumor [110, 111, 112, 113].

## ***2.5 Ontwikkeling van de myeloom cel***

MM cellen vertonen hetzelfde fenotype als post-germinale langlevende plasmacellen. Ze hebben bijgevolg herschikte Ig-genen, ondergingen voltooide somatische hypermutatie van de variabele regio's en er heeft tevens een productieve isotype switch plaats gevonden [5, 89]. Bovendien wordt er verondersteld dat er een MM precursor bestaat die, als gevolg van opeenvolgende genetische mutaties, stapsgewijs transformeert naar een cel met een agressief fenotype die het vermogen tot ongecontroleerde groei verworven heeft. Tot op heden blijft de identiteit van de MM cel precursor onbekend. Omdat de maturatieweg afgelegd door de normale plasmacel tevens ook door de MM precursor cel moet afgelegd worden, wordt er verondersteld dat de precursorcel een geheugencel of plasmablast zou kunnen zijn. Er kan bijgevolg aangenomen worden dat de oncogenetische gebeurtenissen optreden ofwel na het normale maturatieproces dat leidt tot een langlevende plasmacel ofwel hiermee niet interfereren [5, 48, 62].

Opeenvolgende primaire translocaties zorgen ervoor dat de plasmacel kloon ongecontroleerd kan prolifereren en onsterfelijk wordt. De onsterfelijke plasmacel gedijt vervolgens goed in het BM en breidt uit tot een MM-kloon. Bijkomende mutaties in tumor suppressor genen (secundaire translocaties) zorgen voor de verdere expansie van de tumorkloon. In een verder stadium kunnen de tumorcellen eventueel zodanig muteren dat deze onafhankelijk van groeifactoren kunnen groeien en bijgevolg niet meer afhankelijk zijn van de BM omgeving. Hierdoor kan de MM-kloon extravasieren en voor extramedullaire uitzaaiingen zorgen (figuur 5) [48].



Figuur 5: Moleculaire pathogenese van MM [9, 22].

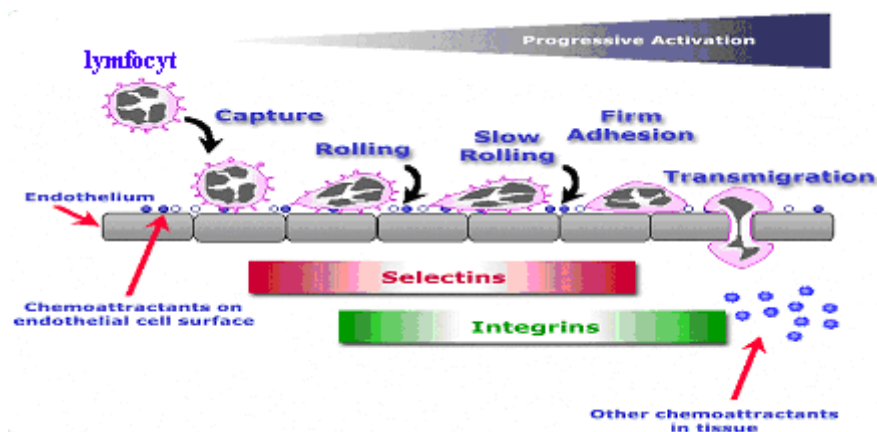
## 2.6 Homing en interactie met beenmerg stromale cellen

### 2.6.1 Homing van lymfocyten in het algemeen

De MM cellen zijn, gedurende het grootste deel van het ziektestadium, van de BM micro-omgeving afhankelijk voor hun overleving en groei, waardoor ze specifiek gelocaliseerd zijn in dit weefsel [16, 62, 66, 71]. Algemeen wordt verondersteld dat de MM cellen van post-germinale oorsprong zijn [4] en vervolgens specifiek migreren naar het extravasculaire compartiment van het BM. Hier zullen de cellen de nodige signalen ontvangen voor overleving, proliferatie, finale differentiatie en productie van osteoclast activerende factoren [100]. Het is enkel in het late stadium van de ziekte dat de groei, proliferatie en overleving van de MM cellen onafhankelijk van het BM kunnen worden, hetgeen resulteert in een extramedullaire groei [16, 62, 66, 71]. Aangezien de MM cellen van post-germinale oorsprong zijn impliceert de aanwezigheid van de cellen in het BM tijdens de verschillende stadia van de ziekte een specifieke migratie van de cellen van de vasculaire componenten naar de extravasculaire component van het BM. Deze migratie wordt specifiek omschreven als ‘*homing*’ [5, 15].

Butcher en Picker [15] beschreven in 1996 een model dat de migratie en de homing van lymfocyten voorstelt als een meerstapsproces waarbij elke stap zijn eigen specifieke kenmerken heeft (figuur 6).

1. Een **primaire, transiënte adhesie** als gevolg van de interacties tussen de constitutioneel functionerende receptoren van de lymfocyten en de overeenkomstige liganden aanwezig op het lumaal oppervlak van de endotheelcellen. Hierdoor is het mogelijk dat de lymfocyt langsheen de vaatwand kan rollen.
2. Het rollen langsheen de vaatwand heeft als gevolg dat de cellen gedurende langere tijd worden blootgesteld aan chemokines, die gesecreteerd worden door het daar heersende micromilieu. Deze cytokines zullen binden aan de transmembranaire, G-proteïne gekoppelde receptoren aanwezig op de lymfocyt waardoor de lymfocyt geactiveerd zal worden.
3. De voorafgaande activatiestap brengt een conformationele verandering van de integrines, aanwezig op de lymfocyt, teweeg waardoor de integrines zeer hecht zullen binden aan hun overeenkomstige vasculaire liganden. De lymfocyten worden aldus tot stilstand gebracht. Deze stap wordt ook de **activatie-afhankelijke stabiele adhesiestap** genoemd.
4. Onder invloed van de chemokines of andere chemotactische moleculen zullen de lymfocyten migreren over de endotheelcellen. Dit proces wordt diapedese genoemd en vereist proteolyse van het basaal membraan. Hierbij spelen metalloproteasen een belangrijke rol.



Figuur 6: Opeenvolgende stappen in de homing van lymfocyten

Homing van lymfocyten wordt dus voornamelijk gemedieerd door adhesiemoleculen en chemotactische stoffen waarbij een differentiële expressie van deze ter hoogte van de verschillende organen de homing zeer specifiek maakt. Bijkomende variatie wordt bovendien mogelijk gemaakt door een combinatie van de vier stappen beschreven hierboven waarbij een wijziging in één van de stappen reeds grote gevolgen kan hebben wat betreft de specifieke homing.

### **2.6.2 Homing van de multipel myeloom cellen**

Aangezien verondersteld wordt dat MM cellen ontspoorde post-germinale plasmablasten zijn, kan er aangenomen worden dat hun homing ongeveer parallel verloopt met deze van normale B-cellen en plasmablasten. In 2000 [99] werd door Vanderkerken *et al.* aangetoond dat de specifieke homing van MM cellen naar het BM inderdaad te wijten is aan een selectieve adhesie aan de endotheelcellen van het BM, die dan wel gecombineerd wordt met een selectieve overleving van de MM cellen in het micromilieu van het BM. De BM micro-omgeving is een complexe structuur die bestaat uit verschillende extracellulaire componenten, groeifactoren en verschillende andere celtypes waaronder fibroblasten, endotheelcellen, adipocyten, osteoclasten, osteoblasten, immuuncellen en hematopoëtische voorlopers [52, 73, 82].

Migratie ofwel de initiële aantrekking naar de beenmerg endotheel cellen (BMEC) door secretie van chemo-attractanten vormt een eerste vereiste voor de transendotheliale invasie naar het extravasculaire compartiment van het BM. In het proces van homing spelen chemo-attractantia niet alleen een rol in de aantrekking naar het endothelium maar zijn ze tevens betrokken in de activatie van MM cellen en de aantrekking naar de BM micro-omgeving [25]. Eén van de chemo-attractanten is IGF-1, een cytokine dat in hoge concentraties aanwezig is in het BM en een belangrijke overlevings- en groeifactor vormt voor MM cellen [35, 44].

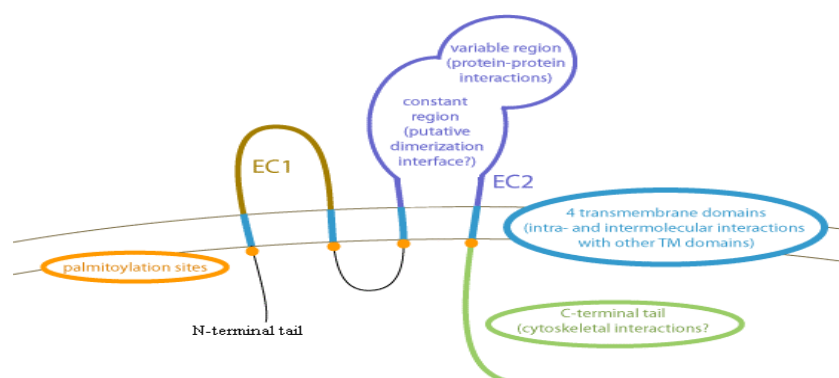
Adhesiemoleculen zijn vervolgens noodzakelijk voor de aanhechting van de cellen aan het endothelium en voor de activatie. Daarnaast spelen ze ook een grote rol bij de interactie met BM stromale cellen (BMSC) [25]. Wijzigingen in de expressie van adhesiemoleculen worden geassocieerd met kwaadaardige tumor transformatie, tumor verspreiding en immortalisatie. Adhesie van de MM cellen aan fibronectine en aan BMSC resulteert in een reversibele, *de novo* resistentie aan de conventionele chemotherapeutische geneesmiddelen en wordt cel adhesie gemedieerde resistentie of CAM-DR genoemd [23, 24].

Tijdens de volgende stap van invasie zullen de cellen doorheen de endotheliale laag en het onderliggende membraan tot in de extracellulaire matrix (ECM) dringen. Dit proces vereist proteases om het onderliggende membraan en de ECM af te breken [25].

Tumoren hebben nood aan de ontwikkeling van nieuwe collaterale bloedvezels om te kunnen aanhechten, uitbreiden en metastaseren. Angiogenese is een van de processen die de tumorcel hiervoor gebruikt. Angiogenese is het aanmaken van nieuwe cappilaren uit reeds bestaande bloedvaten [27]. Angiogenese is een zeer complex en nauwkeurig gereguleerd proces dat interactie tussen cellen, oplosbare factoren en ECM componenten vereist. Gedurende dit proces zullen endotheliale cellen prolifereren, het onderliggende membraan afbreken, migreren, lumen vormen en uiteindelijk differentiëren en matureren in een tubulair netwerk [45, 86].

### 3. CD9

CD9 is een celoppervlakte glycoproteïne dat behoort tot de familie van de tetraspanines. Sinds de ontdekking van de tetraspanines in 1990 vormen deze een familie die meer dan 30 glycoproteïnen bevat. Tetraspanines zijn lid van de transmembranaire-4-superfamilie en worden uitgedrukt op het celoppervlak en/of in intracellulaire vesikels van alle cellen met een kern. Ze bestaan uit vier hydrofobe transmembranaire domeinen, twee extracellulaire domeinen en twee korte intracellulaire staarten. Hierbij omspannen ze het membraan vier keer waardoor een grote en een kleine extracellulaire lus ontstaan (figuur 7) [105].



Figuur 7: Schematische weergave van de structuur van tetraspanines. De kleine extracellulaire lus (EC1) bevat 20 tot 28 aminozuren (az) terwijl de grote extracellulaire lus (EC2) 76 tot 131 az telt. De cytoplasmatische staarten bevatten tot 15 az [93, 101]. Het tetraspanine CD9 is, in tegenstelling tot de meeste tetraspanines, geglycosileerd in EC1 [12].

Er wordt verondersteld dat tetraspanines reageren als adaptor moleculen die de organisatie en localisatie van multiproteïne complexen in membranaire microdomeinen vergemakkelijken door hun capaciteit om te kunnen interageren met belangrijke receptoren, signaal moleculen en met elkaar [8, 14, 49, 67, 69, 105]. Aldus moduleren ze verschillende biologische en pathologische processen zoals celmigratie en metastasering, adhesie, cel proliferatie, differentiatie, fusie, cel signaling, cytoskeletale reorganisatie en virus infectie [50, 69, 105]. Tetraspanines interageren ook met verschillende proteïnen die belangrijk zijn bij de immuunfunctie zoals integrines, B-cel receptoren, T-cel receptoren, de peptide receptoren MHC klasse I en II en co-receptoren. Verschillende studies tonen aan dat tetraspanines betrokken zijn in lymfoïde en myeloïde celfuncties [105]. De expressie van vele leden van de tetraspanine familie is gewijzigd in verschillende types carcinoma's [13, 105]. In het bijzonder suggereert de inverse correlatie tussen CD9 expressie levels, tumor progressie en metastasering in verschillende vaste tumoren, dat lage CD9 expressie een van de stappen zou kunnen zijn die de kanker progressie bevorderen [1, 54, 75, 76, 95]. Recente studies toonden echter aan dat CD9 inderdaad globaal downgereguleerd is in de meeste invasieve cervicale carcinomas maar terug tot expressie gebracht wordt in de cellen dicht tegen bloedvaten en in het proces van transendotheliale overgang [92]. Deze bevindingen wijzen op de zeer complexe rol van CD9 in kanker progressie.

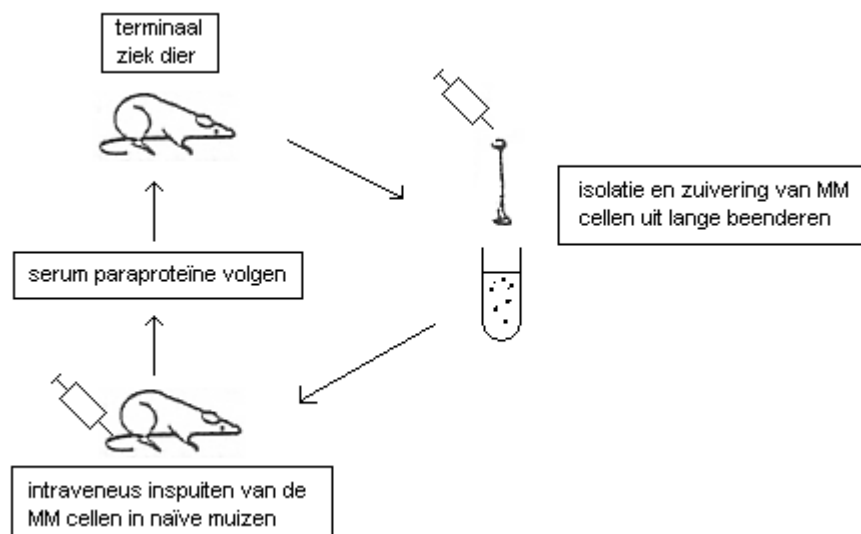
## **4. Ziektemodellen voor multipel myeloom**

### **4.1 *In vivo model***

Er werden reeds verschillende *in vivo* modellen beschreven die het mogelijk maken om onderzoek te verrichten naar MM. Geen enkel model biedt echter een totaalbeeld van de ziekte waardoor van elk model de voor- en nadelen tegen elkaar moeten worden afgewogen. Een bruikbaar experimenteel model moet in de eerste plaats de karakteristieke kenmerken van de humane MM ziekte voorstellen met gelijkaardige symptomen, overeenkomstige biologie van de tumorcellen en behandelingswijzen.

## 4.2 5TMM murine myeloom model

Eén van de meest gebruikte *in vivo* modellen bij het onderzoek naar MM is het 5TMM murine myeloom model. De muizenstam van het C57BL/KaLwRij type is gekend voor zijn spontane ontwikkeling van monoclonale ongeregeldeheden. Ongeveer 80% van deze muizen vertonen “monoclonal gammopathy of undetermined significance” (MGUS) die gelijkaardig is aan dat van de mens. Radl *et al.* (1999) [84] ontdekten dat ongeveer 0,5% van deze muizenstam ouder dan 2 jaar spontaan MM ontwikkelen. De intraveneuze transplantatie van deze MM cellen in jonge, syngene muizen leidde tot het ontstaan van het 5TMM model. Sindsdien wordt het model voortgezet door intraveneuze injectie van BM cellen, afkomstig van zieke muizen, in jonge naïeve muizen (figuur 8) [3]. Het model vertoont heel wat overeenkomsten met de humane aandoening: de ziekte ontwikkelt zich spontaan, de frequentie van ontstaan van de ziekte is leeftijdsgebonden, de tumorconcentratie kan bepaald worden door de concentratie van het M-proteïne in het bloed te meten [99], er worden osteolytische letsels gevormd [3, 99] en verhoogde angiogenese wordt waargenomen [98, 102].



Figuur 8: Voortzetting van het 5TMM muismodel [3].

Er zijn op dit ogenblik ongeveer 10 5TMM modellen die verschillende vormen van MM trachten voor te stellen. Deze vormen gaan van smeulend tot zeer agressieve MM. De meest gebruikte en best gekarakteriseerde modellen zijn het 5T2MM en het 5T33MM model. Het eerste model benadert best de algemene vormen van humaan MM, waarbij hoofdzakelijk het BM en de milt geïnfilteerd worden. Er worden osteolytische letsels ontwikkeld en er treedt een trage groei op. Het 5T33MM model is een meer agressieve vorm met een snelle

tumorgroei en met grotere infiltraties in lever en milt. De infiltratie in de milt is niet verrassend omdat bij de muizen de milt zijn hematopoëtische functie blijft behouden na de geboorte. Tijdens stress situaties kan ook de lever van de muis, net zoals bij de mens, deze functie weer opnemen [99]. Er worden weinig of geen botletsels waargenomen en bovendien is de overlevingsduur veel korter.

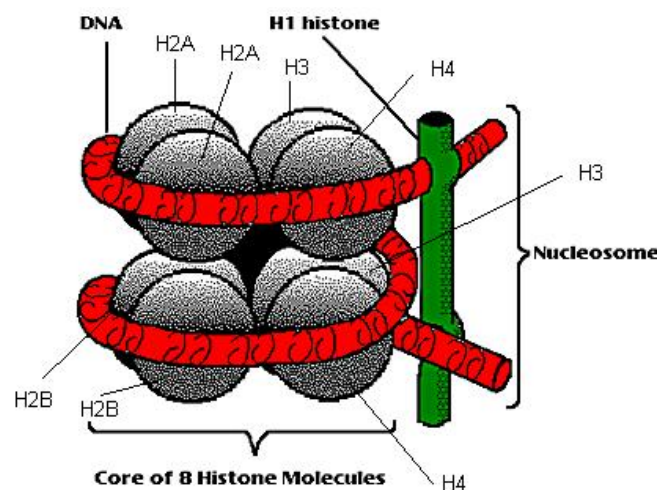
Uit dit laatste model is tevens een cellijn ontwikkeld die *in vitro* stroma-onafhankelijk groeit, namelijk de 5T33MMvt cellijn.

## 5. Invloed van epigenetische modificaties

### 5.1 Algemene achtergrond

#### 5.1.1 Chromatine organisatie [21]

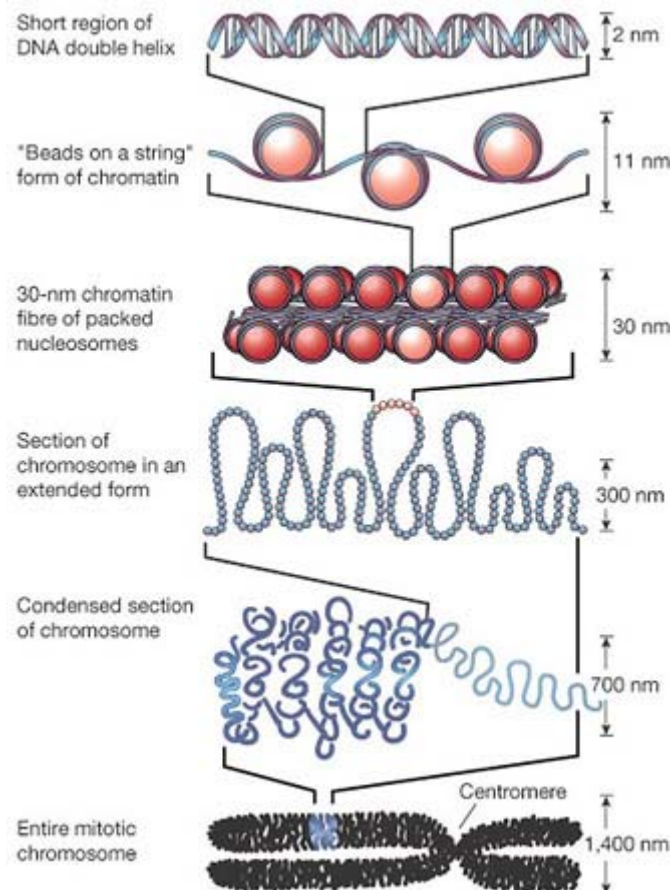
De massa van eukaryotische chromosomen bestaat voor 30% uit DNA terwijl de overgebleven 70% verschillende structurele en DNA-bindende proteïnen bevat. Deze proteïnen zijn verantwoordelijk voor de verschillende graden van condensatie van het chromatine. Een dubbelstrengige DNA molecule heeft een diameter van 2 nm. Histonen zijn structurele proteïnen die positief geladen aminozuren bevatten welke interageren met de negatief geladen fosfaatgroepen van de nucleotiden. Ongeveer 146 baseparen van het DNA worden in twee omwentelingen rond een octameer van histonen gewikkeld ter vorming van een nucleosoom (figuur 9).



Figuur 9: Organisatie van de histonen in een nucleosoom



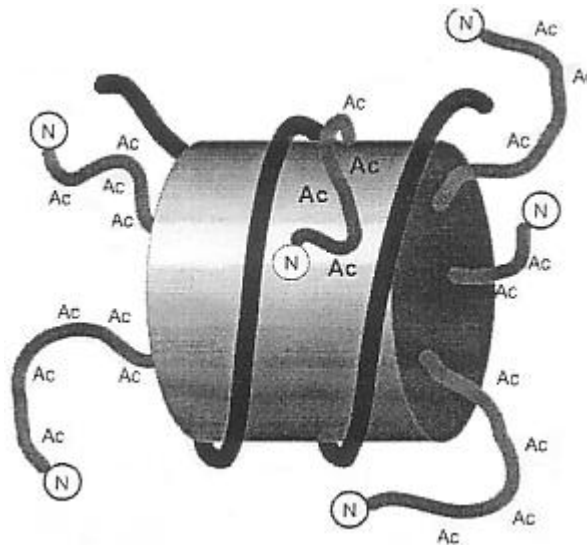
Het uiteindelijke resultaat is een structuur van ongeveer 11 nm. Een extra histon proteïne (H1) induceert verdere condensatie door binding van het linker DNA hetgeen resulteert in een 30 nm gecondenseerd chromatine waarbij de nucleosomen georganiseerd worden in een solenoïde structuur van 6 nucleosomen per omwikkelling. Associatie met niet-histon proteïnen resulteert in een verdere condensatie hetgeen uiteindelijk leidt tot de wel gekende chromosoom structuur (figuur 10).



Figuur 10: Algemeen overzicht van de chromatine condensatie [34].

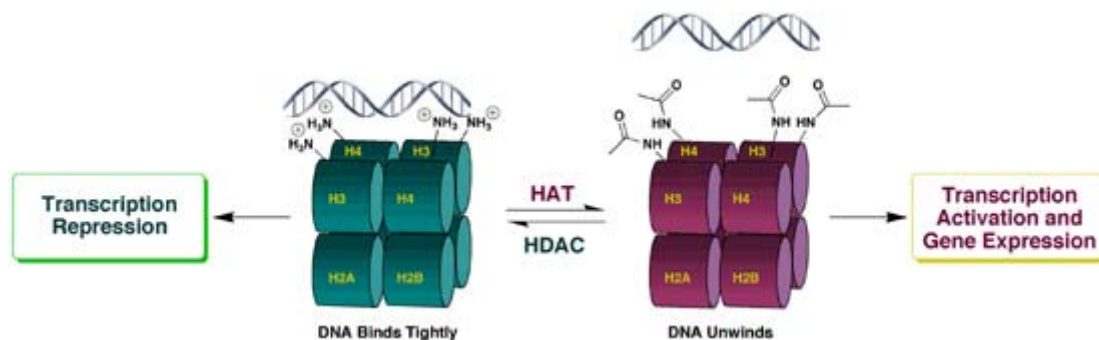
### 5.1.2 Histon proteïnen [21]

Histon proteïnen spelen een belangrijke rol bij verschillende processen in de kern. Ze bezitten flexibele N-terminale uiteinden, van ongeveer 20 à 40 aminozuren, die positief geladen lysine groepen bevatten (figuur 11). Wanneer de histonen georganiseerd worden tot nucleosomen zullen de flexibele regio's uitstrekken. Hierdoor kunnen de lysines interageren met de fosfaatgroepen in de DNA keten van hetzelfde nucleosoom, een naburig nucleosoom en "linker DNA".



**Figuur 11:** Typische afbeelding van een nucleosoom. De flexibele einden strekken zich uit waardoor lysine residu's kunnen interageren met het DNA.

Lysines ondergaan reversibele acetylatie/deacetylatie door enzymen (HAT: histone acetyltransferases / HDAC: histone deacetylases) (figuur 12) die specifiek ingrijpen op de N-terminale uiteinden van de aminozuren. Geacetylerde histonen zijn geneutraliseerd hetgeen leidt tot een verlies aan interactie met de fosfaatgroep van het DNA wat uiteindelijk zal leiden tot een verlies aan affiniteit van het histon/nucleosoom met het DNA. Hierdoor wordt de chromatine structuur geopend en krijgen transcriptiefactoren toegang tot het DNA, wat resulteert in verhoogde genexpressie. Dit reversibel proces is dus cruciaal in de (de)condensatie van DNA tijdens de transcriptie.



**Figuur 12:** Interactie van HATs en HDAC's tijdens DNA transcriptie [114].

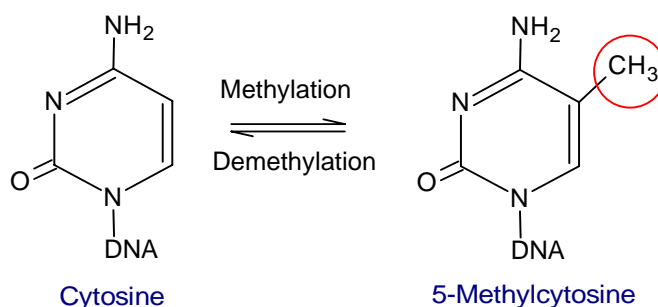
## 5.2 Epigenetische transcriptionele modificaties

### 5.2.1 Inleiding tot de epigenetica

De term epigenetica verwijst naar een erfelijke verandering in de genexpressie die veroorzaakt wordt door andere mechanismen dan veranderingen in de primaire nucleotide sequenties. De, tot nu toe, best bestudeerde epigenetische transcriptionele controle mechanismen zijn DNA methylatie en covalente modificaties van histonproteïnen [42]. In kanker blijkt de regulatie van deze epigenetische mechanismen uit balans te zijn.

### 5.2.2 Methylatie en kanker

Methylatie van DNA houdt een biochemische modificatie in waarbij de C-5 positie van het cytosine residue van CpG dinucleotides gemethyleerd wordt door een DNA methyltransferase in aanwezigheid van een methyl donor (figuur 13) [51, 55].

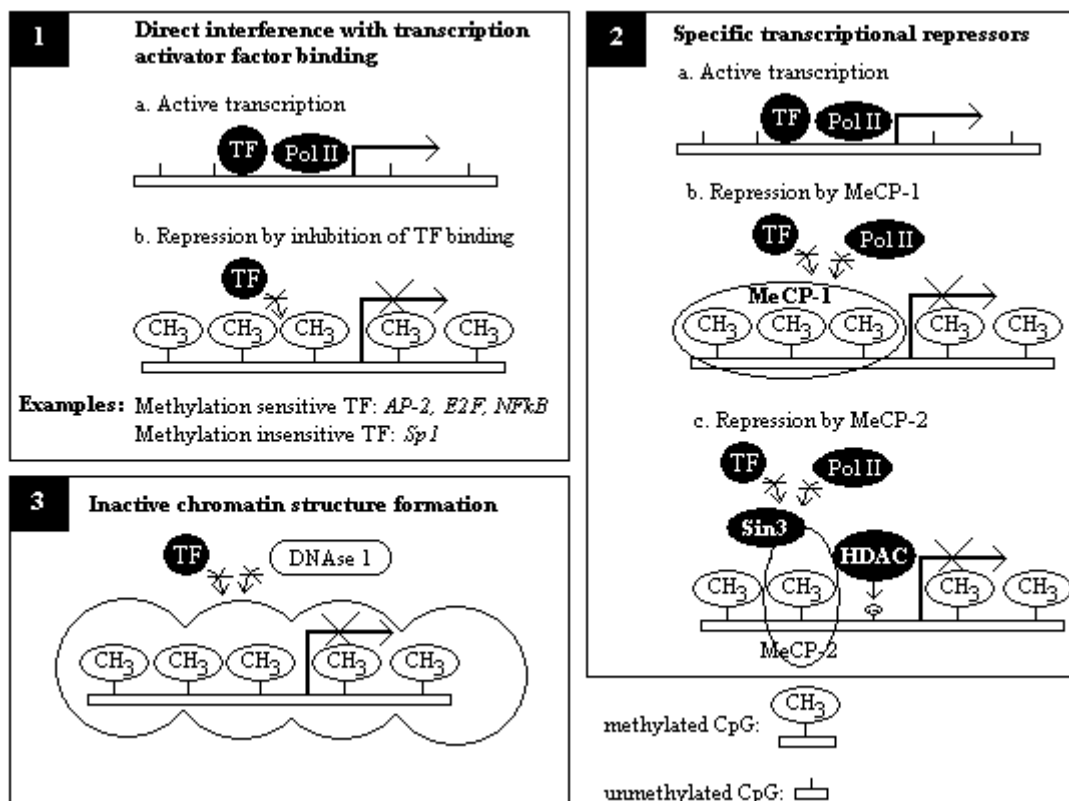


Figuur 13: DNA methylatie

CpG dinucleotiden zijn cytosines in de DNA sequentie die voorafgegaan worden door een guanosine [11, 53]. CpG dinucleotiden zijn vaak gegroepeerd in kleine DNA regio's van 0,5 tot 5 kb lang die gekend zijn als CpG eilandjes, waarbij deze meestal geassocieerd worden met de promotor van genen [43, 51, 55]. In het grootste deel van het genoom zijn CpG dinucleotiden, die niet geassocieerd worden met CpG eilandjes, overwegend gemethyleerd. Methylatie in normale cellen resulteert in een voor transcriptiefactoren ontoegankelijke structuur en kan bijgevolg bijdragen tot de grote hoeveelheid niet-coderend DNA [32, 51]. In tegenstelling hiermee zijn de cytosines in de CpG eilandjes, en voornamelijk deze geassocieerd met de promotor regio's, meestal niet gemethyleerd waardoor expressie van genen toegelaten wordt wanneer de juiste transcriptiefactoren beschikbaar zijn en wanneer de chromatine structuur binding van de transcriptiefactoren toelaat [59]. Enkel methylatie in of rond de promotor regio en niet methylatie in de coderende sequentie van het gen zal de transcriptie verhinderen [58].

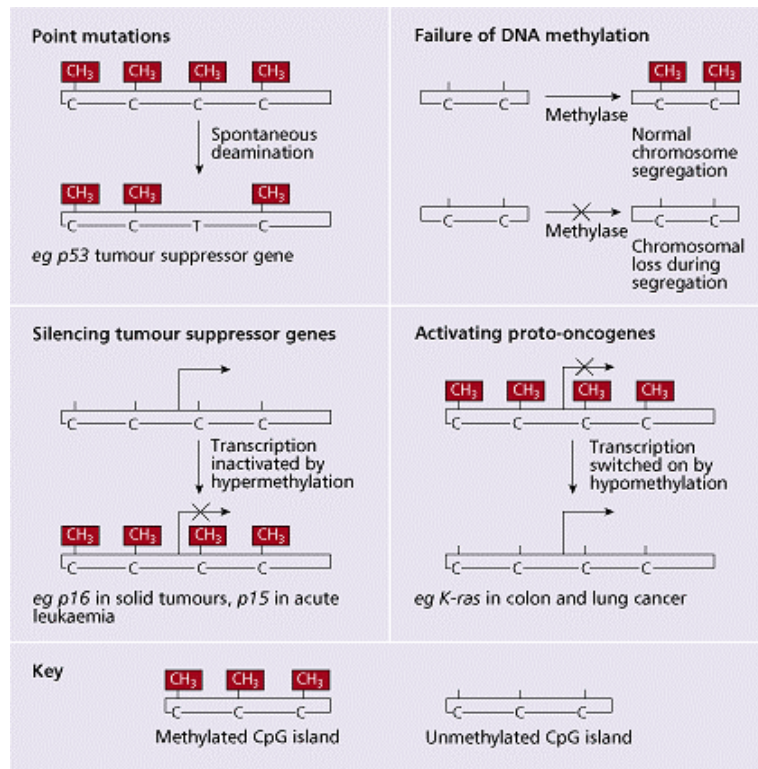
Er zijn globaal genomen drie mogelijke mechanismen voor transcriptionele onderdrukking te wijten aan DNA methylatie (figuur 14) [96]:

- Directe sterische hindering van de binding van specifieke transcriptiefactoren met hun herkenningsequentie in de specifieke promoterregio's
- Directe binding van specifieke transcriptionele onderdrukkers aan gemethyleerd DNA
- DNA methylatie kan de chromatine structuur veranderen hetgeen leidt tot verlies van de toegang tot promoter regio's voor de transcriptionele factoren



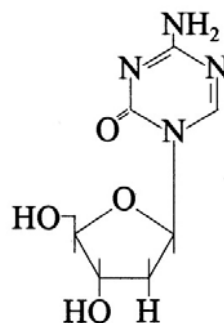
**Figuur 14:** Schematisch overzicht van de drie mechanismen voor transcriptionele onderdrukking te wijten aan DNA methylatie [96].

Kankercellen vertonen een verlies aan globale methylatie terwijl er selectieve hypermethylatie optreedt in de CpG eilandjes van de promoters van specifieke genen, in het bijzonder tumor suppressor genen [7, 11, 33, 59]. Bovendien veroorzaakt globale genomische hypomethylatie oncogeen expressie en genomische instabiliteit, wat het DNA vatbaar kan maken voor het breken van strengen waarna recombinatie ontstaat, en dus genomische instabiliteiten kunnen ontstaan [31]. Figuur 15 vertoont een schematisch overzicht van de vier meest voorkomende mechanismen bij de ontwikkeling van kanker door methylatie van de cytosineresidu's [96].



Figuur 15: Schematisch overzicht van de vier meest voorkomende mechanismen in de ontwikkeling van kanker [96].

Het deoxycytidine analog 5-aza-2'-deoxycytidine (5'aza-dc) (figuur 16) is een potente DNA demethylator en vertoont een chemotherapeutische werking in verscheidene kankers als gevolg van zijn cytotoxische eigenschappen [39, 46, 57, 91]. Het moleculaire mechanisme waarmee 5'aza-dc celdood van de kankercellen induceert, is tot op heden nog niet gekend. Er wordt aangenomen dat het mechanisme een toxiciteit uitlokt, te wijten aan de covalente binding tussen de DNA methyltransferasen en het 5'aza-dc gesubstitueerde DNA. Het 5'aza-dc gesubstitueerde DNA wordt bekomen doordat 5'aza-dc geïncorporeerd wordt in het genomisch DNA [19, 36, 39, 60, 72, 90]. Door deze incorporatie in het genomisch DNA kunnen de nucleotiden niet meer gemethyleerd worden.



Figuur 16: Structuurformule van 5-aza-2'-deoxycytidine

Afwijkende methylatie van genpromoterregio's is één van de belangrijkste epigenetische veranderingen die gevonden worden bij MM [78]. In MM wordt hypermethylatie van genen zoals p15, p16, DAP-kinase, BAD, BAK, BAX, BIK, SOCS-1 en E-Cadherine beschreven [20, 40, 70, 79, 80, 83, 97]. Er werd tevens een correlatie vastgesteld tussen de methylatie patronen en de klinische karakteristieken in MM patiënten [41].

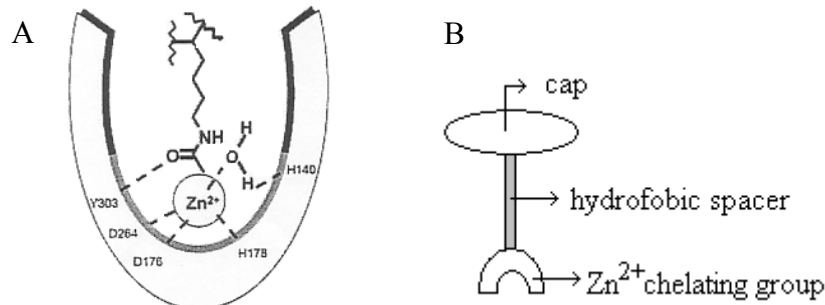
### 5.2.3 Acetylatie/ deacetylatie en kanker

Naast methylatie van het DNA spelen post-translationele modificaties van histonen een belangrijke rol in de transcriptionele structuur. De acetylatie van histonen wordt in het algemeen gelinkt aan het opnieuw modelleren van het nucleosoom en aan transcriptionele activatie terwijl deacetylatie geassocieerd wordt met chromatine condensatie en transcriptionele repressie [85]. In kanker wordt vaak een verhoogde HDAC expressie waargenomen wat resulteert in deacetylatie van de histone proteïnen en bijgevolg leidt tot inhibitie van de genexpressie. In MM zijn p16 en BNIP3 genen hiervan voorbeelden [30, 77]. Er werd aangetoond dat HDAC inhibitoren een dalende overleving van humane MM cellen *in vitro* veroorzaken door enerzijds het beïnvloeden van genen die betrokken zijn in de celcyclus en de celdood en anderzijds door het bevorderen van andere pro-apoptotische agentia [17, 18, 61, 68, 74, 81].

Farmaceutische bedrijven vertonen meer en meer interesse in natuurlijke en synthetische histone deactetylase inhibitoren (HDACi) omdat deze beschouwd worden als belangrijke hulpmiddelen bij de behandeling van kanker [47, 104]. Het mechanisme van hun anti-kanker effect blijft echter grotendeels onbekend. Er wordt verondersteld dat HDAC inhibitoren de expressie van tumor suppressor genen reactiveren.

LBH589 is een relatief nieuw hydroxamide zuur derivaat dat inductie van apoptose en inhibitie van proliferatie van MM cellen induceert [17]. Hydroxamide zuren vormen de grootste groep van de HDACi. De algemene structuur bestaat uit een bindende groep, een functionele groep en een hydrofobe linker die tot aan het  $Zn^{2+}$  ion binnendringt in de katalytische site van de HDACs (figuur 17B). De functionele groep zal het  $Zn^{2+}$  ion, dat zich in een katalytische site van de HDAC bevindt (figuur 17A), binden terwijl de bindende groep van de molecule, de zogenaamde “cap”, fungeert als een afsluitend deel voor de katalytische site van de HDAC. De meeste van deze inhibitoren zijn krachtig en actief bij nano- en

micromolaire concentraties [37, 104, 107]. De, in water oplosbare, inhibitor vertoont geen toxiciteit voor het BM of voor perifeer bloed. Het enige nadeel aan dit type inhibitor is het reversibele karakter van de inhibitie.



**Figuur 17:** Algemene structuur van een HDAC (A) [37] en een hydroxamide zuur HDAC inhibitor (B) [107]. De HDAC bevat een katalytische site met onderaan een zink kation dat interacties aangaat met een acetyl-lysine residu en met water. De hydrofobe spacer van de HDACi dringt door in de katalytische site van de HDAC waardoor het zink kation gecomplexeerd kan worden.

De HDACi, LBH589, vertoont reeds aan nanomolaire concentraties belovende resultaten bij de behandeling in myeloïde leukemia. Bovendien werd door Maiso *et al.* (2006) [68] aangetoond dat LBH589 de groei van MM significant inhibeert en daarenboven de cytotoxiciteit van de conventionele geneesmiddelen zoals melphalan en bortezomib bevordert. Mogelijke doelwitten van LBH589 zijn genen die betrokken zijn in de regulatie van de celcyclus en de celdood, waarbij LBH589 apoptose van de MM cellen veroorzaakt. Analyse van het effect van LBH589 op MM cellen wijst op het veroorzaken van celdood door mitochondriale perturbatie. Verlies aan mitochondriale membraan potentiaal veroorzaakt een toename aan permeabiliteit van het buitenste mitochondriaal membraan waardoor de pro-apoptotische proteïnen gemakkelijker worden vrijgegeven [68].

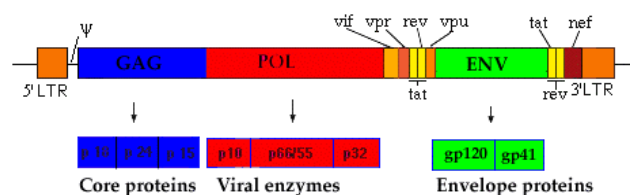
## 6. Lentivirale vectoren

### 6.1 Inleiding

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van de *lentiviridae*, de lentivirussen, die een subfamilie vormen van de *retroviridae* (retrovirussen). Het best gekende voorbeeld van dit type virus is het *humanaan immunodeficiëntie virus type 1* (HIV-1). Alle leden van de *retroviridae* worden gekenmerkt door het vermogen om via reverse transcriptase hun viraal RNA (vRNA) om te zetten naar dubbelstrengig DNA (dsDNA) zodat dit vervolgens geïncorporeerd kan worden in het genoom van de gastheer [2, 26, 63]. In tegenstelling tot de gewone retrovirussen zijn de lentivirussen veel complexer opgebouwd en zijn ze in staat om ook niet-delende cellen te infecteren. De lentivirale vectoren bezitten deze eigenschap ook.

### 6.2 Moleculaire aspecten van de lentivirale transfectie

Het genoom van alle retrovirussen bevat 3 essentiële structurele virale genen; gag, pol en env. Het gag-gen codeert voor structurele proteïnen zoals matrix-, capside- en nucleocapside proteïnen. Het pol-gen codeert voor virale enzymen nodig voor replicatie (waaronder het reverse transcriptase, integrase en protease). Het env-gen codeert voor envelope-eiwitten die zorgen voor de verpakking van nieuw gevormde virionen. Retrovirussen die enkel over deze elementaire genetische informatie beschikken, worden eenvoudige retrovirussen genoemd [26]. HIV en andere lentivirussen zijn complexe retrovirussen omdat het genoom naast de structurele virale genen tevens een aantal regulatorische (tat en rev) en accesoire (vif, vpr, vpu en nef) genen bevat. De coderende regio's worden langs beide kanten omgeven door *long terminal repeats* (LTR's). Deze LTR's zijn opgebouwd uit een aantal regio's die enerzijds de provirale transcriptie regelen en anderzijds een belangrijke rol spelen in de reverse transcriptie van de virale genen [2]. Aan de buitenzijde van beide LTR's ligt een *att* sequentie die essentieel is voor de integratie in het gastheergenoom (figuur 18).



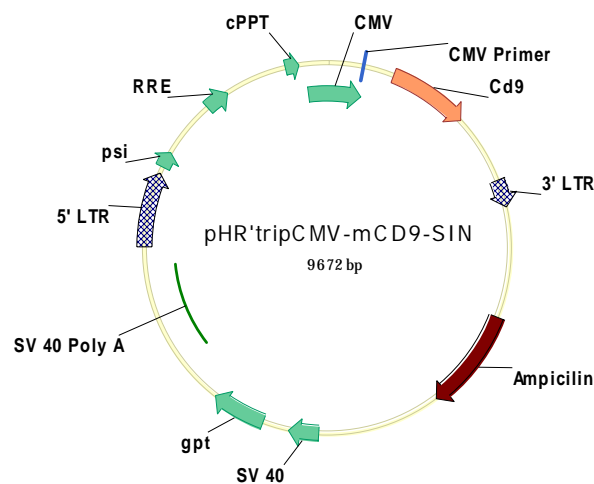
Figuur 18: De organisatie van het HIV-1 genoom [115].



## 6.2.1 Lentivirale vectorproductie

Lentivirale vectoren kunnen, net als het wildtype virus, niet-delende cellen infecteren. Een vector onderscheidt zich echter van een virus doordat hij niet kan repliceren. De lentivirale vector wordt hierbij zodanig ontworpen dat overbodige virale genen gedeleteerd worden. Alle genetische informatie nodig voor de aanmaak van viruspartikels wordt op verschillende plasmiden gecodeerd. Tijdens deze thesis wordt er gebruik gemaakt van een drie-plasmide systeem waarbij de genetische informatie op het transferplasmide, het packagingplasmide en het envelopeplasmide wordt gecodeerd.

Werken met verschillende plasmiden verkleint de kans op homologe recombinatie van virale en niet-virale sequenties tijdens de vectorproductie zodat de vorming van replicatie competente retrovirussen (RCR) verhinderd wordt. Gelijktijdige transiënte cotransfectie van deze drie plasmiden in 293T-productiecellen resulteert in de vorming van mature viruspartikels die het transgene RNA transcript bevatten. Het muis CD9 (mCD9) gen zal gecloneerd worden in de lentivirale vector pHR'tripCMV-IRES-tNGFR-SIN; een self-inactivating vector (SIN) met een deletie in de 3'LTR. Tijdens de reverse transcriptie in de getransduceerde cel wordt deze deletie overgebracht naar de 5'LTR waardoor de daar aanwezige promotor geïnactiveerd wordt. Productie van vector RNA wordt nu onmogelijk [103] (figuur 19).



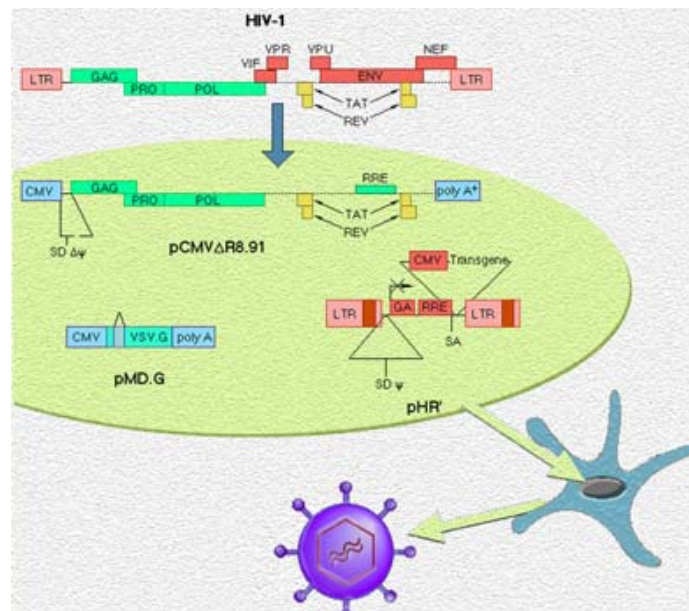
Figuur 19: Het transfer plasmide pHR'tripCMV-mCD9-SIN

Naast het transgen beschikt het transferplasmide eveneens over de virale componenten LTR, RRE en  $\psi$  waardoor het RNA efficiënt ingepakt kan worden in een vectorpartikel. De sequentie moet niet alleen ingepakt worden in vectorpartikels, ze moeten eveneens over de

structurele en enzymatische eigenschappen beschikken om de doelwitcel te transduceren. Omwille van de mogelijkheid tot homologe recombinatie zullen de genen die verantwoordelijk zijn voor enerzijds het inpakken in vectorpartikels en anderzijds het infecteren van de doelwitcellen, via andere plasmiden ter beschikking gesteld worden (figuur 20).

In het packaging plasmide (pCMV $\Delta$ R8.9) zijn enkel de genen pol, gag, tat en rev aanwezig en worden de 5'LTR en de 3'LTR vervangen door respectievelijk de sterke promotor CMV en het polyadenylatie signaal [103] zodat er geen reverse transcriptase of integratie van packaging genen kan optreden indien er toevallige inkapseling zou gebeuren. Het plasmide pCMV $\Delta$ R8.9 bestaat bijgevolg uit een meervoudig gedeleteerd HIV-1 genoom (figuur 20).

Het HIV envelope proteïne wordt vervangen door het *Vesicular Stomatitis Virus – G* proteïne (VSV-G) dat een breed tropisme vertoont. Dit impliceert dat de gepseudotypeerde vector ongeveer alle eukaryotische cellen kan infecteren zonder onderscheid te maken. De uptake van deze endocytotische vesikels gebeurt via fusie van gepseudotypeerde vectoren en niet ten gevolge van viruscelmembraan fusie zoals bij HIV-1. Het envelope plasmide bestaat enkel uit het VSV-G gen dat onder controle staat van de CMV promotor [63] (figuur 20).



**Figuur 20:** Schematische voorstelling van de productie van lentivirale vectoren. Het transferplasmide wordt samen met het packaging- en het envelopeplasmide in 293T cellen gebracht, waarna elk plasmide tot expressie komt, hetgeen resulteert in een functioneel virion [116].



# **Materiaal en Methoden**

---

# Materiaal en methoden

---

## 1. Proefdieren

De C57BL/KaLwRij muizen worden verkregen bij Harlan CPB (Zeist, Nederland). De dieren kunnen vrij bewegen en hebben voldoende voedsel en water ter beschikking. Alle maatregelen worden genomen om pijn en discomfort tot een minimum te beperken. Bij gebruik zijn de muizen 5 tot 7 weken oud. Euthanasie gebeurt door middel van cervicale dislocatie.

Alle experimenten verlopen volgens een welbepaald protocol dat overeenstemt met de nationale richtlijnen voor dierproeven, opgesteld en goedgekeurd door de Ethische commissie voor Dierproeven van de Faculteit voor Geneeskunde en Farmacie aan de Vrije Universiteit Brussel (VUB).

## 2. Cellijnen

### 2.1 *In vivo* cellijnen

De 5T33MM<sub>vivo</sub> (5T33MM<sub>vv</sub>) en 5T2MM<sub>vivo</sub> (5T2MM<sub>vv</sub>) cellijnen zijn oorspronkelijk afkomstig van meer dan 2 jaar oude muizen van het type C57BL/KaLwRij die spontaan MM ontwikkelden. Om het muismodel voort te zetten, worden de MM cellen geïsoleerd uit terminaal zieke muizen en intraveneus geïnjecteerd in een laterale staartvene van syngene muizen. Na ongeveer 4 weken (5T33MM) of 12 weken (5T2MM) zijn de muizen terminaal ziek hetgeen gekenmerkt wordt door verlamming van de achterpoten en door de aanwezigheid van een hoge concentratie aan paraproteïne in het serum (10 mg/ml). De MM cellen worden uit het BM (voornamelijk van de achterpoten en de wervelzuil) van deze terminaal zieke dieren geïsoleerd. De achterpoten worden van de huid ontdaan en ter hoogte van de heup van het lichaam losgeknipt. De botjes worden aan beide uiteinden opgeknipt waarna de BM cellen kunnen uitgeflushed worden met behulp van een spuit met 26G naald. De cellen komen

terecht in serumvrij RPMI 1640 medium (GIBCO, Life Technologies, Gent, België) om uitdrogen van de cellen (en zo celdood) te voorkomen. De wervelzuil wordt eveneens uit het lichaam geïsoleerd en vrijgemaakt van vet- en spierweefsel. Deze wordt vervolgens in stukjes verdeeld, waarna elk stukje afzonderlijk met de achterkant van een spuit verbrijzeld wordt in eenzelfde petrischaal met medium. Om een single cell suspensie te bekomen worden de cellen over een nylongaas gehaald en in een falcon tube opgevangen. Vervolgens wordt de suspensie opgezuiverd door middel van gradiënt centrifugatie met behulp van ficoll (zie 4. celzuivering).

## **2.2 *In vitro* cellijnen**

Er wordt gebruik gemaakt van de tumorcellijn 5T33MM*in vitro* (5T33MM*vt*). Deze cellijn is een *in vitro* groeiende, stroma-onafhankelijke variant van de 5T33MM*vv* cellijn en kan bijgevolg *in vitro* ongelimiteerd geëxpandeerd worden. Deze *in vitro* cellijn wordt gekweekt in RPMI 1640 medium (GIBCO, Life Technologies, Gent, België) aangevuld met 1% MEM (minimum essentieel medium) niet-essentiële aminozuren (GIBCO), 1% L-glutamine (GIBCO), 1% penicilline en streptomycine (GIBCO), 1% natriumpyruvaat en 10% foetaal kalfserum (Fetal Clone I, Hyclone, Utah, Verenigde Staten). De cellen worden in kweek gehouden in een incubator op 37°C en 5% CO<sub>2</sub>.

## **3. Tellen van de cellen**

### **3.1.1 Theoretische achtergrond**

Trypaanblauw is een kleurstof die gebruikt wordt om een schatting te maken van het aantal levende cellen in een populatie. De reactiviteit van de kleurstof is gebaseerd op het feit dat het chromofoor negatief geladen is en daardoor niet zal reageren met de cellen zolang het celmembraan niet beschadigd is. Levende cellen nemen bijgevolg de kleurstof niet op terwijl dode cellen een blauwe kleur aannemen.

### 3.1.2 Methode

Om de cellen te kunnen tellen worden ze vooreerst gemengd met een trypaanblauwoplossing (Merck, Darmstadt, Duitsland) in een 1 op 1 verhouding. Er ontstaat bijgevolg een verdunningsfactor van 2. Het dekglasje wordt op de telkamer gelegd waarna met een micropipet de cellen met kleurstof worden toegevoegd. Deze zullen door capillaire krachten onder het dekglasje gezogen worden. Twee diagonaal over elkaar liggende kamers (16 vakjes) worden geteld. Indien de aantallen van beide kamers sterk van elkaar afwijken, worden de twee andere kamers ook geteld. Een verschil van maximum 10% is toegestaan. Door maar twee kamers te tellen wordt de verdunningsfactor van de celsuspensie opgeheven, waardoor de nauwkeurigheid toeneemt. De berekening van het aantal cellen is afhankelijk van het type telkamer waarbij rekening gehouden wordt met de diepte en de oppervlakte van het telraam. In het labo wordt gebruik gemaakt van een telraam type Neubauer met een diepte van 0,100 mm en een oppervlakte van 0,0025 mm<sup>2</sup>.

Het aantal cellen per ml komt neer op volgende formule:

Cellen/ml = gemiddelde van de getelde cellen van de 2 diagonale vierkanten x verdunningsfactor x 10<sup>4</sup> (de conversiefactor specifiek voor de telkamer)

Totaal aantal cellen = cellen/ml x volume

## 4. Celzuivering

De cellen worden na isolatie over een nylongaas gebracht om een suspensie van aparte cellen te bekomen. Deze worden voorzichtig op een Ficollplossing (Lympholyte M, Cedarlane, Ontario, Canada) gebracht waarbij geen menging tussen de cellen en de ficoll mag ontstaan. Ficoll bestaat uit een gekoppeld suiker waaraan diastriozaat werd toegevoegd waardoor de densiteit verandert. Hierdoor ontstaat er na centrifugatie een gradiënt tussen de mononucleairen in de bovenlaag en polynucleairen en rode bloedcellen die een pellet vormen. De cellen sedimenteren in een densiteitsgradiënt totdat ze blijven hangen ter hoogte van een gradiënt met dezelfde densiteit als de cellen zelf. Het bekomen bandje van mononucleaire BM cellen wordt voorzichtig afgenomen en gewassen met serumvrij medium RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies, Gent, België).

## 5. Flow Cytometrie

### 5.1 Theoretische achtergrond

“Fluorescent activated cell sorting” (FACS) is een van de eerste technieken die ontwikkeld werden waarbij de cellen gescheiden worden op basis van hun fluorescentie. Er kan aan de hand van FACS analyse bepaald worden hoeveel cellen een specifiek proteïne uitdrukken en hoeveel ze van dit proteïne uitdrukken. Tijdens de FACS worden de cellen één voor één aangestraald met een laser waarbij verstrooiing optreedt. De voorwaartse verstrooiing staat in verband met de grootte van de cel terwijl de zijwaartse verstrooiing in verband staat met de complexiteit van het cytoplasma en het membraan.

De cellen worden vooraf gemerkt met een antilichaam tegen het antigeen waarnaar de interesse uitgaat. Ofwel is dit eerste gebonden antilichaam rechtstreeks gekoppeld ofwel wordt het herkend door een tweede antilichaam dat geconjugeerd is met een fluorochroom. Tijdens het aanstralen wordt de fluorescentie van het fluorochroom gemeten.

### 5.2 CD9 kleuring

Om de CD9 celmembraan expressie van de 5TMM MM cellen na te gaan, wordt een FACS kleuring uitgevoerd.

De cellen van elk staal worden in een concentratie van  $0,5 \cdot 10^6$  cellen verdeeld over twee tubes, een negatieve en positieve controle. De negatieve controle van elk staal is bedoeld als isotype controle en bevat als primair antilichaam een antilichaam dat dezelfde eigenschappen (isotype) bezit als het antilichaam specifiek tegen CD9 maar gericht tegen een verschillend antigeen dat niet door de cellen uitgedrukt wordt. Hierdoor wordt controle op specifieke bindingen uitgevoerd. Het positieve staal bevat als primair antilichaam een antilichaam specifiek tegen muis CD9.

De cellen worden gewassen met 500  $\mu$ l BSA/PBS Azide [PBS/BSA azide wasbuffer, (PBS, phosphate Buffered Saline, Cambrex BioScience, Verviers, België) met 1% BSA (Bovine Serum Albumine Fraktion V, Roche Diagnostics, Mannheim, Duitsland) en 0,02% azide (Natrium azide 99%, Acros Organics, Geel, België)] waarna ze voor 30 min op 4°C geïncubeerd worden met een 1 op 500 verdunning van respectievelijk de IC (Isotype Controle, Rat IgG2a Isotype Control, Clone eBR2a, 1 mg/ml, eBioscience, San Diego,



Verenigde Staten) of CD9 primair antilichaam (Anti-mouse CD9, KMC8, Rat IgG2a, BD Pharming<sup>TM</sup>, Mountain View, CA, Verenigde Staten). Na incubatie met het eerste antilichaam wordt er twee maal gewassen met 500 µl BSA/PBS Azide waarna de cellen 30 min op 4°C geïncubeerd worden met een 1 op 200 verdunning van het tweede antilichaam namelijk Goat anti rat Ig (H + L) (Biotechnology, Oxford, Verenigd Koninkrijk) dat specifiek gericht is tegen het eerste en gemerkt is met het fluorochroom fluorescent isothiocyanaat (FITC).

Nadien worden de cellen opnieuw twee maal gewassen in 500 µl BSA/PBS Azide en in 400 µl FACSFlow (Becton Dickinson, LA, Verenigde Staten) gezet om aflezing op een FACSCanto flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, Californië, Verenigde Staten) mogelijk te maken waardoor de CD9 expressie op proteïne niveau kan bepaald worden. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van CellQuest en FACS Diva Software (Becton Dickinson, Mountain View, Californië, Verenigde Staten).

### ***5.3 Propidium iodide kleuring***

Propidium Iodide (PI) is een DNA-bindend eiwit. Dode cellen hebben de integriteit van hun celmembraan verloren waardoor het PI het DNA kan binden terwijl levende cellen hiervoor impermeabel zijn. Cellen in een vroeg stadium van apoptose zullen negatief kleuren voor PI terwijl cellen die positief kleuren ofwel dode cellen zijn, ofwel necrotische cellen ofwel cellen in een laat stadium van apoptose.

De cellen worden na behandeling overgebracht in FACS tubes waar ze tweemaal gewassen worden met koud PBS (phosphate Buffered Saline, Cambrex BioScience, Verviers, België). Na de wasstap worden ze in PBS (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, Californië, Verenigde Staten) geresuspendeerd tot een uiteindelijke concentratie van  $1 \cdot 10^6$  cellen/ml. Aan 100 µl van de celsuspensie wordt vervolgens 2 µl Propidium Iodide (BD Biosciences, San Jose, Californië, Verenigde Staten) toegevoegd. De stalen worden gedurende 15 min in het donker geïncubeerd op kamertemperatuur waarna 400 µl PBS wordt toegevoegd alvorens ze af te lezen met behulp van de BD FACSCanto<sup>TM</sup> Flow Cytometer (Becton Dickinson).

## **6. Behandeling met de histone deacetylase inhibitor LBH589 en de methylatie inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine**

De 5T33MM<sub>vt</sub> cellen worden behandeld met de histone deacetylase inhibitor (HDACi) LBH589 (Novartis, Cambridge, Massachusetts, Verenigde Staten), de methylatie inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (5'-aza-dc, Sigma, Bornem, België) of een combinatie van beide. De concentraties voor de inhibitoren worden eerst afzonderlijk geoptimaliseerd, waarna een behandeling van de cellen volgt met de beide inhibitoren afzonderlijk en een combinatie van de inhibitoren in hun geoptimaliseerde concentraties. De cellen worden voor elke behandeling in een gelijke concentratie gezet van  $0,5 \cdot 10^6$  cellen/ml.

De optimale concentraties van de inhibitoren worden in de eerste plaats bepaald op basis van het percentage celdood dat de inhibitoren in een bepaalde concentratie induceren. Dit percentage moet kleiner zijn dan 15%. In een tweede fase van de optimalisatie wordt de CD9 expressie nagegaan met behulp van FACS analyse aangezien dit een weinig tijdrovende techniek is. Daar 5'-aza-dc onstabiel is bij 37°C maar tijd nodig heeft om in het DNA te integreren werd deze iedere 24 h opnieuw toegevoegd in vers medium. Ook LBH589 werd elke 24h opnieuw toegevoegd aangezien de inhibitie reversibel is (zie literatuurstudie: 5.2.3 acetylatie/deacetylatie en kanker).

Om een synergistisch effect te kunnen waarnemen werd vervolgens voor beide inhibitoren de suboptimale concentratie genomen. Hierbij wordt het medium na 24 h verversd en worden de inhibitoren opnieuw toegevoegd.

## **7. DNA isolatie**

Voor het isoleren en opzuiveren van genomisch DNA (gDNA) wordt er gebruik gemaakt van de QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit van Qiagen (Venlo, Nederland). Het pellet van 5T33MM cellen, ingevroren op -80°C, wordt opgelost in 200 µl PBS en 20 µl proteïnase K. Proteïnase K wordt gebruikt voor de klieving van proteases gedurende de DNA preparatie. De cellen worden gelyseerd waarna het DNA door een bepaalde zoutconcentratie en pH op de kolom bindt en opgezuiverd kan worden. Nadien kan het DNA van de kolom geëluëerd worden door verandering van de pH en zoutconcentratie. De concentratie van het DNA wordt bepaald met

behulp van een RNA/DNA calculator (GeneQuant Pro, Pharmacia Biotech, Cambridge, Verenigd Koninkrijk).

Het toestel is een spectrofotometer dat de absorptie van DNA meet bij een golflengte van 260 nm. Een absorptie van 1 komt overeen met een concentratie van 50 µg/ml.

Formule:  $50 \times \lambda_{260 \text{ nm}} \times \text{verdunningsfactor}$

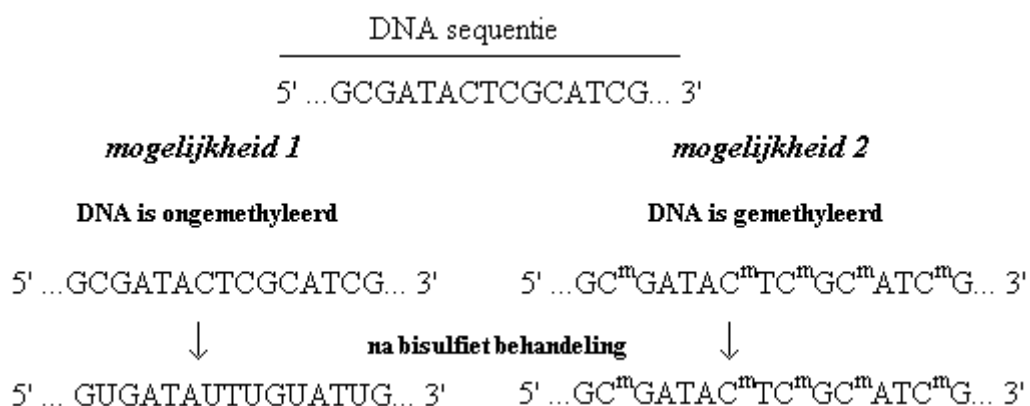
Het overgebleven opgezuiverde DNA wordt bewaard bij -20°C.

## 8. Bisulfietbehandeling en DNA opzuivering

### 8.1 Theoretische achtergrond

Er werd reeds aangetoond dat methylatie van de CpG eilandjes door DNA methylasen enerzijds geassocieerd worden met de inactivatie van genen en anderzijds een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van kanker en celveroudering.

De methylatie status van een DNA sequentie kan bepaald worden door een behandeling van het DNA met natrium bisulfiet. Incubatie van het doelwit DNA met natrium bisulfiet resulteert in de omzetting van ongemethyleerde cytosine residues naar uracil terwijl de gemethyleerde cytosines onveranderd blijven. Hierdoor geeft een bisulfiet behandeling aanleiding tot een verschillende DNA sequentie voor gemethyleerd en ongemethyleerd DNA (figuur 21).



Figuur 21: Verschil in DNA sequentie voor gemethyleerd en ongemethyleerd DNA na bisulfiet behandeling.

De meest kritieke stap voor de bepaling van het methylatiepatroon is de volledige omzetting van de ongemethyleerde cytosines. Deze stap wordt bereikt door de incubatie van het DNA in hoge bisulfiet zoutconcentraties bij een hoge temperatuur en een lage pH. Deze condities leiden echter vaak tot een hoge graad van DNA fragmentatie en een verlies aan DNA gedurende de opzuivering. Na de bisulfiet behandeling en de opzuivering kan het DNA gesequeneerd worden voor de verdere bepaling van de methylatiestatus van het DNA.

## 8.2 Methode

Tijdens de behandeling van het DNA met bisulfiet en de daaropvolgende zuiveringsstappen wordt er gebruik gemaakt van de EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite kit van Qiagen (Venlo, Nederland).

Aan een volume DNA met een concentratie van 1 µg wordt 85 µl Bisulfiet mix en 35 µl ‘DNA protected Buffer’ toegevoegd. De mix wordt vervolgens aangelengd met RNase vrij water tot een totaal volume van 140 µl. De ‘DNA protected buffer’ voorkomt het optreden van DNA fragmentatie geassocieerd bij de bisulfiet behandeling van het DNA bij hoge temperatuur en lage pH. Het zorgt bovendien voor een effectieve denaturatie van het DNA hetgeen resulteert in ssDNA nodig voor de volledige cytosine omzetting. De uiteindelijke bisulfiet DNA omzetting gebeurt met behulp van een ‘thermoCycler’ (Techne PHC-3, New Brunswick Scientific, Rotselaar, België) waarbij volgende condities in acht worden gehouden:

Conditie	Tijd	Temperatuur
Denaturatie	5 min	99°C
Incubatie	25 min	60°C
Denaturatie	5 min	99°C
Incubatie	85 min	60°C
Denaturatie	5 min	99°C
Incubatie	175 min	60°C
Aanhouden	∞	20°C

Tabel 1: ThermoCycler condities voor de bisulfiet omzetting.

Eens de bisulfiet omzetting voltooid is, kan er een opzuivering van het bisulfiet geconverteerd DNA uitgevoerd worden met behulp van een ‘EpiTect spin’ kolom. De EpiTect Bisulfite Kit bevat geoptimaliseerde buffers die een maximale omzetting en DNA opzuivering toelaten. Toevoeging van 560 µl BL buffer zorgt voor een binding van het geconverteerde ssDNA aan

de kolom. Vervolgens wordt het membraan gebonden DNA gewassen met wasbuffer om het residuele natriumbisulfiet te verwijderen. Na desulfonatie door toevoeging van de desulfonatiebuffer BD wordt het DNA verder ontzout met wasbuffer. Na deze opzuiveringsstappen wordt het DNA met elutiebuffer van de kolom geëluëerd waarna het kort bewaard kan worden op  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 9. Bepaling status promoterregio CD9

Om de methylatiestatus van de CD9-promoter na te gaan, werd de 3kb regio upstream van de transcriptiestart geanalyseerd op mogelijk gemethyleerde CpG sites (Primer Express v 1.0, Applied Biosystems, Californië, Verenigde Staten). Hieruit bleek dat een regio van ongeveer 300 bp onmiddellijk voor de transcriptiestart een relatief hoge concentratie aan CpG sites bevatte. Bisulfiet specifieke primers (BSP's) werden ontwikkeld om deze regio in het bisulfiet behandelde gDNA te amplificeren;

sense primer: 5'-GAGAGAGTTTTGTATTGAGGGT-3'

antisense primer: 5'-ACCCAAAAAATAAAATTAATCC-3'.

Met behulp van onderstaand reactiemengsel, werd een PCR uitgevoerd waarin 50 ng bisulfiet behandeld DNA geamplificeerd werd.

0,5 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{M}$ sense primer
0,5 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{M}$ anti-sense primer
0,75 $\mu\text{l}$	BioXact DNA Polymerase
1 $\mu\text{l}$	10 mM dNTP's
5 $\mu\text{l}$	10x OptiBuffer
2 $\mu\text{l}$	50 mM $\text{MgCl}_2$
1 $\mu\text{l}$	50 ng gDNA (bisulfiet)
39,25 $\mu\text{l}$	MQ water
<hr/>	
50 $\mu\text{l}$	

Tabel 2: Reactiemengsel voor het uitvoeren van een PCR waarbij bisulfiet behandeld genomisch DNA geamplificeerd wordt.

Dit mengsel werd in een thermocycler aan onderstaand programma onderworpen:

5 min	94°C	}	30x
30 sec	94°C		
30 sec	57°C		
30 sec	68°C		
7 min	68°C		
∞	20°C		

Tabel 3: Programma voor de thermocycler waarbij het bisulfiet behandeld genomisch DNA geamplificeerd wordt.

Het PCR fragment werd vervolgens opgezuiverd met behulp van de Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, Verenigde Staten). Hierbij wordt het PCR fragment gesmolten en vervolgens opgelost in 1 ml hars. Vervolgens wordt het staal door middel van vacuüm over een kolom gehaald. Het aan de kolom gebonden DNA wordt gewassen met 2 ml van een 80% isopropanol-oplossing en vervolgens gecentrifugeerd op maximale snelheid gedurende 2 minuten. Het DNA wordt geëluëerd door 50 µl warm water aan te brengen op de kolom en vervolgens 1 minuut te centrifugeren op maximale snelheid.

Het BioXact DNA Polymerase genereert A-overhangende nucleotides aan zijn PCR-producten. Hierdoor wordt het mogelijk om deze fragmenten te kloneren in de Topo TA Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, Californië, Verenigde Staten). Deze kit bevat een opengeknipt plasmide (pCR2.1 met ampicillin als antibioticum resistentie-gen) met T-overhangende nucleotides zodat het PCR-fragment met hoge efficiëntie gekloneerd kan worden door onderstaand ligatiemengsel 2 uur te laten ligeren op kamertemperatuur:

1 µl	TA Buffer
1 µl	T4 ligase
1 µl	TA vector (pCR2.1)
7 µl	PCR product
<hr/>	
10 µl	

Tabel 4: Ligatiemengsel voor het kloneren van het PCR fragment.

Vervolgens werden de ligaties getransformeerd in DH5α competente bacteriën. Hievoor werd 50 µl cellen aan elke ligatie toegevoegd en een half uur op ijs geïncubeerd. De ligatiemengsels/bacteriën werden gedurende 30 seconden op 37°C gebracht zodat het plasmide DNA in de bacteriën kan worden opgenomen, waarna 200 µl LB-medium werd

toegevoegd en gedurende 1 uur op 37°C al schuddend geïncubeerd werd. Tenslotte werden de bacteriën uitgeplaat op LB-platen met ampicilline en overnacht op 37°C geplaatst.

De kolonies werden opgepikt en opgekweekt in 5 ml LB medium waaraan 5 µl ampicillin was toegevoegd. Deze culturen werden gedurende 24 uur bij 37°C geïncubeerd. De bacteriën werden vervolgens gepelleteerd door centrifugatie gedurende 20 minuten bij 2000 rpm en het plasmide DNA werd geïsoleerd door middel van de GeneJet Plasmid Miniprep kit (Fermentas, Ontario, Canada). Het bacteriële pellet werd geresuspendeerd in 250 µl Resuspension Buffer, waarna 250 µl Lysis Buffer en 350 µl Neutralisation Buffer werden toegevoegd. Na goed mengen, werden de stalen gedurende 5 minuten gecentrifugeerd bij maximale snelheid. Het supernatans werd door middel van een vacuüm over een kolom gebracht en het gebonden DNA werd vervolgens gewassen met 1 ml Wash Buffer. Het plasmide DNA werd geëluëerd in 100 µl Elution Buffer en vervolgens gesequeneerd door DNA Vision (Gosselies, België).

## 10. RNA isolatie

De cellen worden geresuspendeerd in 250 µl trizol (Invitrogen, Carlsbad, Californië, Verenigde Staten) voor een efficiënte lyse van de cellen en een stabilisatie van het RNA. Hierdoor kan het RNA stabiel bewaard worden bij -80°C. Om het RNA te isoleren wordt 20% chloroform toegevoegd waarna de oplossing door middel van centrifugatie kan gescheiden worden in een waterlaag en een organische laag. De bovenste laag, de waterlaag, bevat het RNA terwijl de onderste laag het trizol en het celdebris bevat. De bovenliggende suspensie met RNA wordt afgenomen en eenzelfde volume 70% ethanol wordt toegevoegd. Verdere opzuivering van het RNA gebeurt met behulp van een kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Venlo, Nederland). Het RNA hecht zich aan de kolom door toevoeging van ethanol en onder een bepaalde pH en zoutconcentratie, waarna het enkele keren gewassen wordt. Door verandering van deze pH en zoutconcentratie kan het RNA geëluëerd worden. De concentratie van het RNA wordt eveneens afgelezen op eenzelfde toestel (RNA/DNA calculator, GeneQuant Pro, Pharmacia Biotech, Cambridge, Verenigd Koninkrijk).

Een absorptie van 1 komt overeen met een concentratie van 40 µg/ml.

Formule:  $40 \times \lambda_{260 \text{ nm}} \times \text{verduunningsfactor}$

Het overgebleven opgezuiverde RNA wordt bewaard bij -20°C.

## 11. cDNA synthese

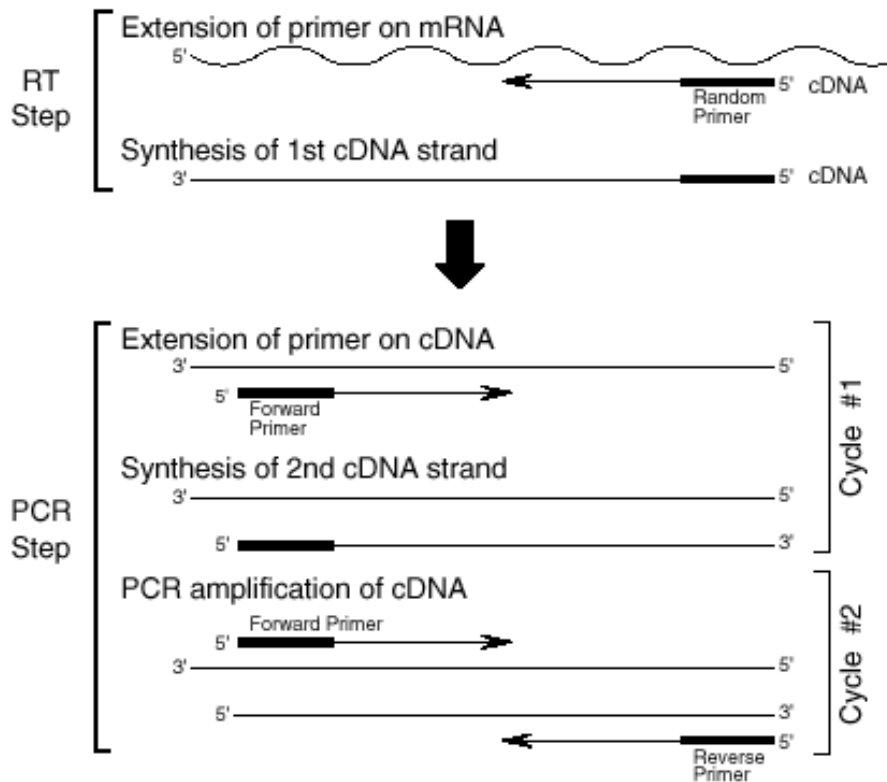
De synthese van enkelstrengig cDNA wordt uitgevoerd met behulp van een kit (First strand cDNA synthese met superscript III Preamplification system, Invitrogen, Carlsbad, Californië, Verenigde Staten) waarbij gebruik gemaakt wordt van random hexameren als primers en van reverse transcriptase. Hierbij wordt een bepaalde hoeveelheid (2 µg) RNA omgezet in eenzelfde hoeveelheid cDNA. Aan de hoeveelheid RNA wordt een mix van 1 µl random hexameren en 1 µl dNTP toegevoegd en aangevuld met DEPC water tot 10 µl. De reactie wordt voor 5 min geïncubeerd aan 65°C waarna de stalen minstens 1 min op ijs wordt bewaard. Hierna wordt 10 µl van een tweede reactie mix met 2 µl 10x PCR buffer, 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl DTT, 1 µl RNaseOUT™ en 1 µl SuperScript™ III RT toegevoegd. Er wordt vervolgens voor 10 min geïncubeerd bij 25°C gevolgd door 50 min bij 50°C. De reactie wordt gestopt door 5 min te incuberen bij 85°C waarna op ijs wordt afgekoeld. Rnase H wordt toegevoegd om de RNA streng af te breken (20 min bij 37°C). De first strand kan bewaard worden bij -20°C.

## 12. Real Time RT-PCR

### 12.1 *Theoretische achtergrond*

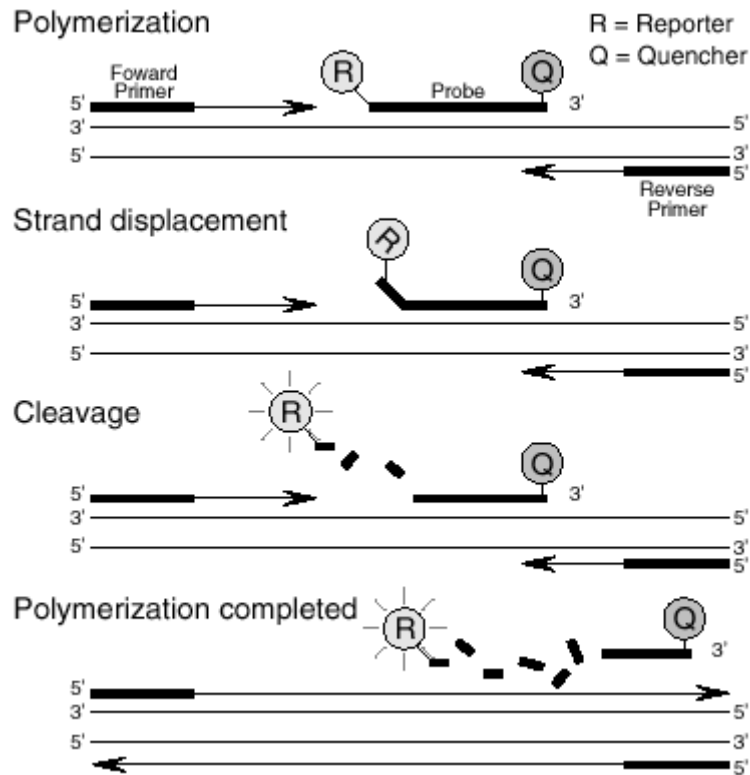
Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) is een tweestaps proces waarbij met behulp van het enzyme reverse transcriptase vanuit een mRNA streng een cDNA kopij wordt gemaakt waarna tijdens de daaropvolgende PCR stap het gevormde cDNA wordt geamplificeerd (figuur 22).





Figuur 22: RT-PCR proces

Bij de kwantitatieve realtime PCR analyse zal de TaqMan probe, die 6-FAM dye-gelabeld is, specifiek aanhechten aan een complementaire sequentie tussen de forward en de reverse primer (polymerisatie figuur 23). Zolang de probe intact is, zal de nabijheid van de reporter bij de quencher resulteren in een onderdrukking van de fluorescentie uitgezonden door de reporter. Het is pas tijdens de elongatie (figuur 23), wanneer de probe gekliefd wordt door het DNA polymerase, dat de fluorescentie vrijkomt. De fluorescentie zal toenemen naarmate de cycli vorderen en er meer DNA gevormd wordt.



Figuur 23: 5'-3' nuclease activiteit van het DNA polymerase systeem

## 12.2 Methode

Voor de kwantitatieve real-time PCR analyse wordt gebruik gemaakt van een 'assay on demand' van Applied Biosystems (Californië, Verenigde Staten) en een ABI PRISM 7700 Sequence detector (Foster City, Californië, Verenigde Staten).

De Taqman PCR wordt uitgevoerd in een reactie mix van 25  $\mu\text{l}$  die bestaat uit 12,5  $\mu\text{l}$  Taqman Universal PCR master mix; 1,25  $\mu\text{l}$  assay-on-demand (primers en probe) en 2,5  $\mu\text{l}$  cDNA of RNA, de rest wordt aangevuld met milliQ water. Een standaardreeks wordt aangemaakt van 25 ng, 5 ng, 1 ng en 0,2 ng. De stalen worden tot een uiteindelijke concentratie van 10 ng/ $\mu\text{l}$  gebracht. Na cDNA synthese heeft het staal een concentratie van 2  $\mu\text{g}/21\mu\text{l}$  hetgeen overeenkomt met een concentratie van 95,24 ng/ $\mu\text{l}$ . Er moet bijgevolg 9,524 keer verdund worden tot de gewenste concentratie van 10 ng/ $\mu\text{l}$ . Hiervoor wordt 1  $\mu\text{l}$  cDNA toegevoegd aan 8,524  $\mu\text{l}$  milliQ water. De uitverdeling gebeurt in een 96 well optical reaction plate (Applied Biosystems) waarin 22,5  $\mu\text{l}$  van de mix wordt gebracht en 2,5  $\mu\text{l}$  van respectievelijk de controles (no template controle en RNA controle), de standaardreeks of het cDNA van de experimentele stalen. Voor de te onderzoeken stalen is er in totaal 25 ng cDNA per well. Elk staal wordt in drievoud uitgevoerd. De stalen worden voor 2 min verwarmd aan

50°C en 10 min aan 90°C gevolgd door 40 cycli van 10 s aan 95°C en 1 min aan 60°C. Om de hoeveelheid RNA te standaardiseren wordt gebruik gemaakt van het endogene referentie gen  $\beta$ -glucuronidase (GUS) waarvoor eveneens een 'assay on demand' wordt gebruikt. De gebruikte reporter is 6'-FAM.

### **13. Isolatie van Natural Killer cellen**

De muizen worden 18 h op voorhand intraperitoneaal ingespoten met 200  $\mu$ g/200  $\mu$ l poly IC (Amersham, Verenigd Koninkrijk) waardoor de cellen van het immuunsysteem geactiveerd worden en in hoge concentratie in de milt aanwezig zullen zijn. Nadien wordt de milt van de muizen geïsoleerd waarbij de cellen worden gewonnen door het orgaan te pletten in medium. De mononucleaire cellen worden vervolgens gezuiverd door Ficoll centrifugatie (4. celzuivering) en geïncubeerd op nylonwol kolommen om adherente cellen te verwijderen.

### **14. Chromolabeling**

Simultaan met de isolatie van NK cellen gebeurt een  $^{51}\text{Cr}$  labeling van de 5T33MM doelwit cellen. De cellen worden in een concentratie van  $6 \cdot 10^6$  cellen gebracht in 500  $\mu$ l waaraan vervolgens radio actief  $^{51}\text{Cr}$  (Amersham, Verenigd Koninkrijk) wordt toegevoegd. Om een hoge spontane vrijgave te vermijden worden de cellen tijdens de incubatie van 80 min om de 15 min zachtjes geschud. Nadien worden de cellen 3 maal gewassen in medium zonder serum door 4 ml medium zonder serum toe te voegen en vervolgens 4 min te centrifugeren aan 1200 rpm. De  $^{51}\text{Cr}$  gelabelde cellen worden geteld en in een uiteindelijke concentratie van  $5 \cdot 10^3$  cellen per 100  $\mu$ l medium met 10% FCI gezet. Met een Geiger-Muller Counter (ThermoScientific, Mini-900, Waltham, Massachusetts, Verenigde Staten) wordt de radio-activiteit geverifieerd.

## 15. Cytotoxiciteitstest

De NK cellen worden gebruikt als effector cellen in de cytotoxiciteitstest waarbij  $^{51}\text{Cr}$  vrijgave gemeten wordt. De juiste concentratie aan effector cellen wordt uitgeplaat in een totaal volume van 100  $\mu\text{l}$  per well in een 96-well weefsel cultuur plaat met U bodem. De effector:target (E:T) ratio's die gebruikt worden zijn 100:1, 50:1, 25:1 en 12,5:1 en worden in drievoud uitgevoerd. De  $^{51}\text{Cr}$  gelabelde doelwitcellen ( $5 \cdot 10^3$  cellen) worden in een totaal volume van 100  $\mu\text{l}$  toegevoegd aan elke well. Vervolgens worden de platen voor 4 h geïncubeerd op  $37^\circ\text{C}$  en na incubatie gecentrifugeerd aan 400 rpm. Een hoeveelheid van 50  $\mu\text{l}$  van het supernatant van elke well wordt overgebracht in 150  $\mu\text{l}$  scintillatievloeistof (Wallac OtiScint 'HiSafe', Perkin Elmer, Life Sciences, Turku, Finland) waarna de  $^{51}\text{Cr}$  vrijgave kan gemeten worden met een 1450 Microbeta Liquid Scintillation Counter (Wallac, Perkin Elmer life Sciences, Waltham, Massachusetts, Verenigde Staten). Als controle worden de doelwitcellen geïncubeerd met 100  $\mu\text{l}$  10% SDS detergent om de maximale vrijgave te bepalen of 100  $\mu\text{l}$  medium om de spontane vrijgave na te gaan. De NK-cel gevoelige T-cel lijn Yac-1 wordt gebruikt als positieve controle.

Het percentage vrijgekomen  $^{51}\text{Cr}$  wordt berekend voor elke E:T ratio door volgende formule en is een maat voor de lyse van de targetcellen gemedieerd door de NK-cellen.

$$\% \text{ lyse} = \frac{\text{experimentele release (ER)} - \text{spontane release (SR)}}{\text{maximale release (MR)} - \text{spontane release (SR)}} \times 100$$

De  $\frac{\text{SR}}{\text{MR}} \times 100$  moet hierbij minder dan 20% bedragen.

## 16. Statistiek

De Mann-Whitney U test werd gebruikt om de statistische significantie van de *in vitro* data aan te tonen. Een  $p$  waarde van  $< 0,05$  werd als significant beschouwd gedurende alle statistische analyses.



# **Resultaten**

---

---

## Resultaten

---

---

### **1. Voorafgaand onderzoek naar de expressie van CD9 tijdens de ziekteprogressie van multipel myeloom**

Voorafgaand aan het onderzoek in het kader van de masterproef werd door het laboratorium Hematologie en Immunologie van professor Vanderkerken onderzoek uitgevoerd naar de expressie van het tetraspanine CD9 tijdens de ziekteprogressie in MM.

#### ***1.1 Expressie van CD9 op primaire humane MM cellen is omgekeerd gecorreleerd met de MM progressie***

Na onderzoek van de BM plasmacellen van 71 patiënten met actieve (n = 49) en niet actieve (n = 22) MM, 6 patiënten met MGUS en een aantal gezonde controle personen voor de membraan CD9 expressie, werd vastgesteld dat patiënten met MGUS en niet-actieve MM een reeds lagere CD9 expressie vertoonden dan de controle personen, terwijl bij actieve MM er nog amper 20% van de patiënten CD9 expressie vertoonden (bijlage 1).

Bovendien werd de overlevingskans van de MM patiënten bepaald aan de hand van de CD9 expressie. In een Kaplan Meier curve (bijlage 2) werd de overlevingskans uitgezet van MM patiënten die op het moment van de diagnose nog CD9 expressie vertoonden in vergelijking met MM patiënten zonder CD9 expressie. De log-rank test werd hierbij gebruikt om de overlevingskansen van de beide groepen MM patiënten met elkaar te vergelijken. Er kon gesteld worden dat er een klein doch niet significant verschil was tussen beide groepen ( $p < 0,0967$ ).

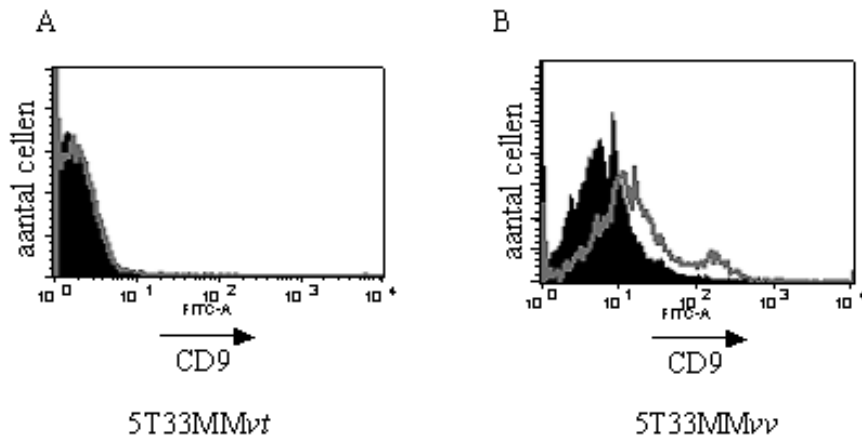
## **1.2 CD9 expressie gedurende de ziekteprogressie in het 5T2MM en 5T33MM muismodel**

De representatieve muismodellen 5T2MM en 5T33MM werden in het gastlabo gebruikt om de downregulatie van CD9 gedurende het ziekteverloop te bevestigen. Het ziekteproces in het 5T2MM en 5T33MM muismodel vertoont drie stadia namelijk een sluimerend, een intermediair en een eindstadium (bijlage 3). Deze stadia zijn gebaseerd op de paraproteïneconcentratie aanwezig in het serum, hetgeen een maat is voor de ziekteprogressie. Met behulp van een dubbele flowcytometrische kleurmethode voor CD9 enerzijds en het tumor-specifiek anti-idiotypen anderzijds werd de membranaire CD9 expressie van de MM cellen in het sluimerend stadium van de ziekte aangetoond voor het 5T2MM model (90% van de cellen). Het percentage CD9 positieve cellen nam reeds duidelijk af in het intermediair stadium (50%) terwijl in het eindstadium van de ziekte er geen CD9 expressie meer waargenomen werd (bijlage 4). Deze resultaten werden bevestigd in het 5T33MM model waarbij ongeveer 70% van de MM cellen CD9 uitdrukken in het intermediair stadium tegenover amper 20% in het eindstadium. Deze data bevestigen de waarnemingen op primaire humane MM cellen, namelijk dat naarmate de ziekte verder schrijdt, de membranaire CD9 expressie verder downgereguleerd wordt.

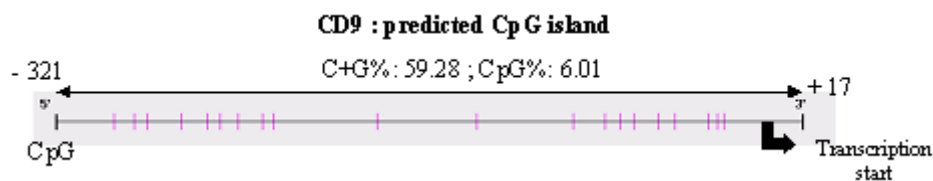
## **2. CD9 promoter status**

Er werd gezocht naar het mechanisme dat betrokken is bij de downregulatie van CD9 in de MM cellen. De CD9 promoter voldoet aan de criteria van een homeostatische genpromoter. Een dergelijke promoter wordt gekenmerkt door de afwezigheid van een ‘echte’ TATA box en CAAT sequentie onmiddellijk ‘upstream’ van de transcriptiestart. Bovendien is deze regio rijk aan CpG nucleotiden [88]. Hypermethylatie is bijgevolg mogelijk mede verantwoordelijk voor de CD9 silencing in MM tijdens de tumorprogressie. Er werd reeds door het gastlabo aangetoond dat 5T33MM<sub>vv</sub> cellen van terminaal zieke muizen CD9 tot expressie brengen (figuur 24B) terwijl de stroma-onafhankelijke variant 5T33MM<sub>vt</sub> geen CD9 uitdrukken (figuur 24A). Om na te gaan of de cellijnen een verschil in methylatie patroon vertonen, werd de CD9 promoter regio, die 20 CpG sites bevat, vanuit bisulfit gemodificeerd gDNA geamplificeerd (figuur 25).



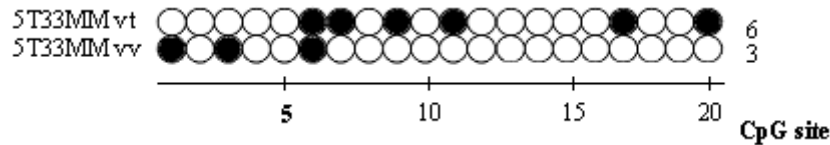


**Figuur 24:** FACS analyse van de CD9 expressie op proteïne niveau in de muis cellijnen 5T33MM<sub>vt</sub> (A) en 5T33MM<sub>vv</sub> (B). De grafiek van 5T33MM<sub>vv</sub> stelt de dubbel positieve cellen voor waarbij zowel op 5T33MM idiotype positieve cellen als op CD9 gecreend wordt. De celcount werd uitgezet in functie van de CD9 expressie. De zwarte histogrammen stellen de isotype controle voor terwijl de grijze lijn duidt op de CD9 expressie van de cellijnen.



**Figuur 25:** Schematische weergave van de geselecteerde CD9 promoter regio, die 20 CpG sites (aangeduid door de verticale streepjes) bevat en vanuit bisulfiet gemodificeerd genomisch DNA geamplificeerd werd.

De specificiteit van de primers werd geanalyseerd door hun falen bij het amplificeren van niet-bisulfiet behandeld gDNA. Het geamplificeerde product van drie onafhankelijke PCRs werd gekloneerd in het gastlabo om te verzekeren dat de methylatie patronen representatief zijn voor de originele stalen. Voor elk staal werden 10 verschillende klonen gesequeneerd waarbij telkens de methylatie patronen bepaald werden. Zoals weergegeven in figuur 26 bevat de CD9 promoter regio van de 5T33MM<sub>vt</sub> cellen twee keer zoveel gemethyleerde CpG sites in vergelijking met de 5T33MM<sub>vv</sub> cellen.



**Figuur 26:** Sequencing van de geselecteerde CD9 promotor regio van het bisulfit gemodificeerd gDNA van de 5T33MMvt en de 5T33MMvv cellen. Elke cirkel stelt een individuele CpG site voor waarbij de volle, zwarte cirkels gemethyleerde CpG sites voorstellen terwijl de open cirkels duiden op ongemethyleerde CpG's.

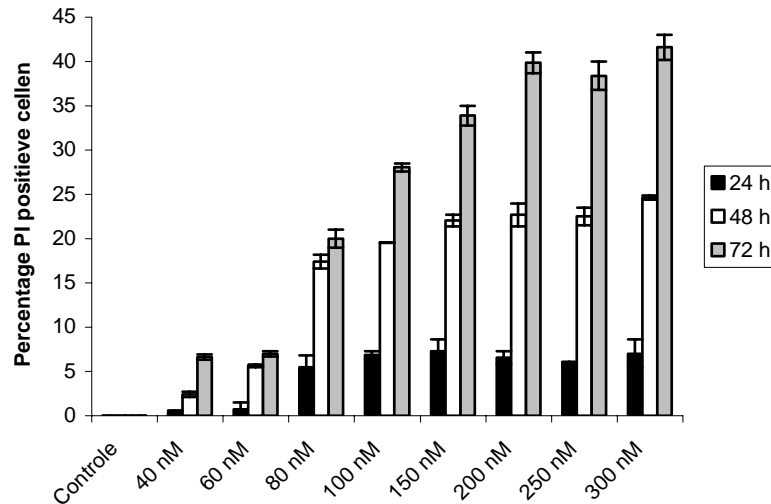
### 3. Effect van methylatie en histone deacetylatie op de CD9 expressie

Om de centrale rol van de hypermethylatie in de downregulatie van CD9 gedurende de ziekteprogressie van MM te bevestigen, werden de 5T33MMvt cellen behandeld met een methylatie inhibitor 5-Aza-2'deoxyctidine (5'aza-dc), een histone deacetylase inhibitor (LBH589) of een combinatie van beide. Vooreerst werden er verschillende experimenten uitgevoerd om een optimale concentratie aan methylatie- en histone deacetylase inhibitor te bekomen.

#### 3.1 *Optimalisatie van de werkingscondities voor de methylatie inhibitor 5'aza-dc*

In een eerste experiment werd het effect van 5'aza-dc op de celdood en de CD9 expressie nagegaan binnen een concentratierange van 100, 150, 200, 250 en 300 nM voor 24, 48 en 72 h.

Na 24 h werd er een klein effect waargenomen op de celdood (figuur 27), maar was er nog geen effect waarneembaar op de CD9 expressie. Het gebrek aan effect na 24 h was echter verwacht aangezien 5'aza-dc tijd nodig heeft om te integreren in het DNA. Na 48 h en 72 h was er nog steeds geen effect waarneembaar op de CD9 expressie, maar werd er een te groot effect waargenomen op de celdood (figuur 27).

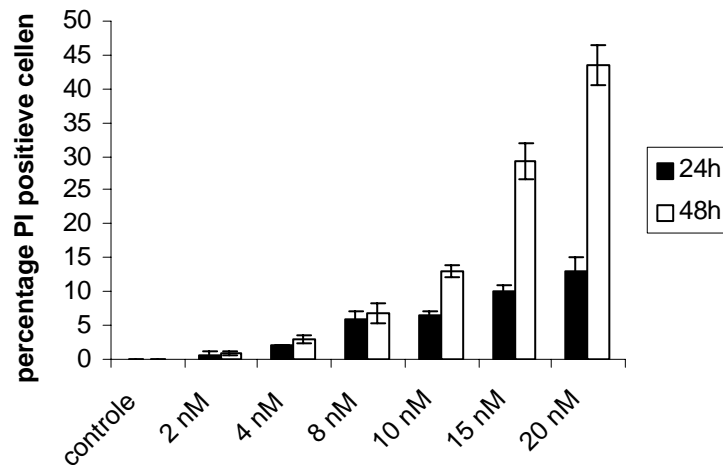


Figuur 27: Effect van de methylatie inhibitor 5'aza-dc op de celdood na 24, 48 en 72 h.

Het teveel aan celdood zou dus mogelijk het effect op de CD9 expressie kunnen maskeren. Er werd bijgevolg besloten om een concentratierange van 40, 60, 80 en 100 nM uit te testen en dit opnieuw voor 24, 48 en 72 h. Opnieuw was er weinig tot geen effect na 24 h (figuur 27). Na 48 h was het effect op de celdood voor de concentraties lager dan 80 nM onder de 15%. Ook na 72 h bleef de geïnduceerde celdood voor de concentraties onder de 80 nM onder de grens van 15%. Het effect op de CD9 expressie na 48 h en 72 h was voor deze concentraties verwaarloosbaar (2-5%). De CD9 expressie op mRNA en proteïne niveau na 5'aza-dc behandeling (60 nM, 48 h) wordt respectievelijk weergegeven in figuren 30 en 31.

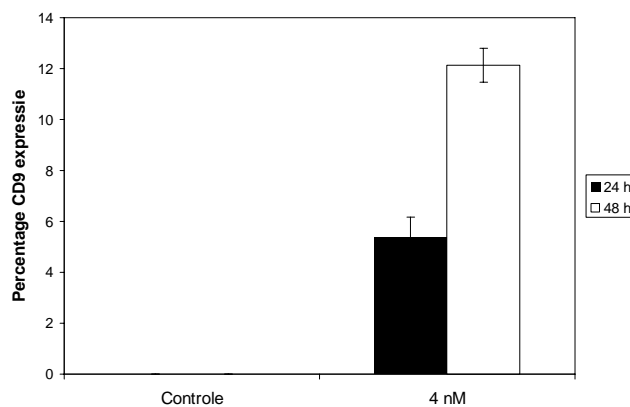
### **3.2 Optimalisatie van de werkingscondities voor de histone deacetylase inhibitor LBH589**

Voor LBH589 werd er een concentratierange van 2, 4, 8, 10, 15 en 20 nM uitgetest voor 24 en 48 h. Na 24 h was er tot een concentratie van 10 nM weinig effect op de celdood (figuur 28). Ook na 48 h bleef het effect voor de concentraties tot 10 nM onder de aanvaardbare grens.



Figuur 28: Effect van de HDACi LBH589 op de celdood na 24 en 48 h.

Het effect op de CD9 expressie was klein doch waarneembaar na 24 h vanaf een concentratie van 4 nM ( $5,367 \% \pm 0,793$ ;  $p < 0,045$ ) (figuur 29). Na 48 h werd vanaf 4 nM een duidelijke en significante opregulatie waargenomen van de CD9 expressie ( $12,13 \pm 0,65$ ;  $p < 0,045$ ). Toename van de concentratie tot 10 nM resulteerde niet in een hogere opregulatie van de CD9 expressie, maar wel in een toename van de celdood.



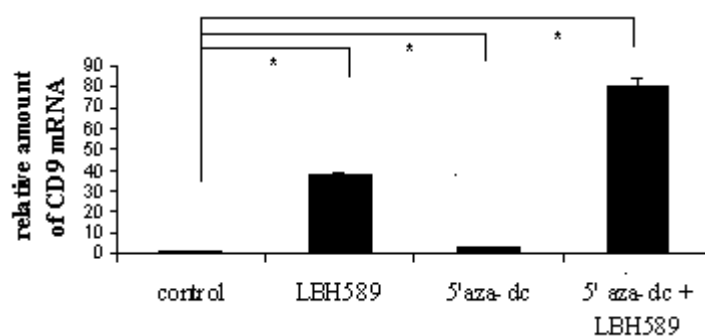
Figuur 29: Effect van LBH589 (4 nM) op de CD9 expressie na 24 en 48 h. Na 24 h drukt  $5,367 \pm 0,793$  percent van de 5T33MMvt cellen CD9 uit. Na 48 h drukt echter  $12,13 \pm 0,65$  percent van de 5T33MMvt cellen CD9 uit. De p waarde is voor beide incubatietijden kleiner dan 0,045.

### 3.3 *Simultane behandeling met de methylatie inhibitor en de histone deacetylase inhibitor*

Aan de hand van bovenstaande data werd besloten om een respectievelijke concentratie van 60 nM 5'aza-dc en 4 nM LBH589 te gebruiken. De meest geschikte incubatieperiode voor de behandeling van de cellen werd vastgelegd op 48 h waarbij het medium na 24 h verversd werd en er opnieuw methylatie inhibitor en HDACi werden toegevoegd.

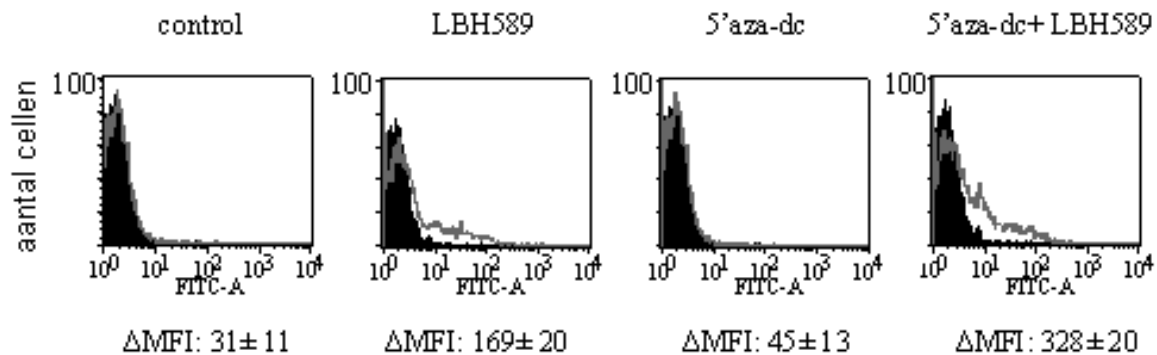
Vooreerst werd het effect van een behandeling met een methylatie- en een histone deactylase inhibitor op de CD9 expressie van 5T33MMvt cellen nagegaan op mRNA niveau met behulp van real time RT-PCR.

Een 48 h durende behandeling met 5'aza-dc resulteerde in een bescheiden 2 tot 4 voudige stijging van de CD9 mRNA levels (figuur 30). In tegenstelling hiermee induceerde een 48 h durende behandeling met 4 nM LBH589 een 40-voudige stijging van de CD9 mRNA hoeveelheid. Dit wijst erop dat promoter demethylatie niet noodzakelijk is voor CD9 inductie. Behandeling van de MM cellen met zowel 5'aza-dc als LBH589 gedurende 48 h resulteerde in een sterke synergistische retranscriptie van CD9 hetgeen bevestigt dat epigenetische regulatie een belangrijke rol speelt bij de CD9 onderdrukking in MM.



Figuur 30: Relatieve hoeveelheid CD9 expressie van de verschillende stalen op mRNA niveau. De hoeveelheid CD9 expressie werd voor de controle (onbehandelde 5T33MMvt cellen) gelijk gesteld aan 1. De andere data tonen de relatieve hoeveelheid CD9 mRNA in verhouding met de controle. De gemiddelde waarde van drie onafhankelijke experimenten worden weergegeven (\* $p < 0,05$ ) waarbij de foutenbalk de standaard deviatie voorstelt.

Vervolgens werd het effect van een behandeling met 5'aza-dc en LBH589 op de CD9 expressie van 5T33MMvt cellen nagegaan op proteïne niveau met behulp van flow cytometrische analyse. Hierbij werd, in navolging van de resultaten waargenomen op mRNA niveau, een synergistisch effect van de inhibitoren vastgesteld op het CD9 eiwitniveau (figuur 31).

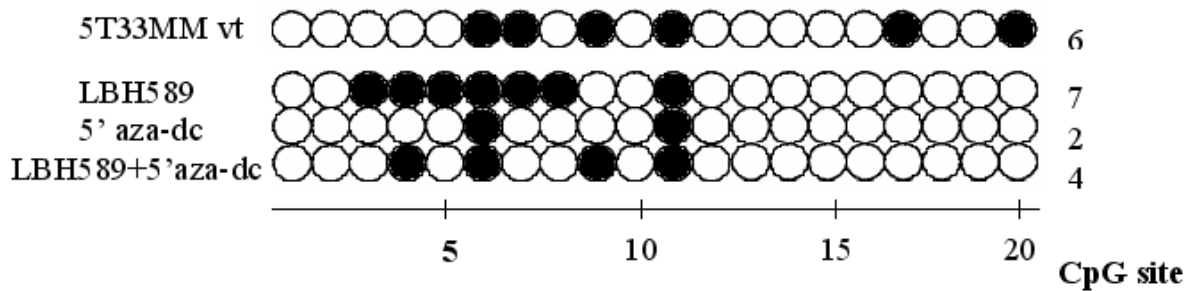


**Figuur 31:** Synergistische membranaire re-expressie van CD9 op 5T33MMvt MM cellen na behandeling met LBH589 en 5'aza-dc. Flow cytometrische analyse toont, in vergelijking met de controle, de CD9 expressie van de 5T33MMvt cellen na behandeling met LBH589, 5'aza-dc of een combinatie van 5'aza-dc en LBH589. Hierbij werd het aantal getelde cellen uitgezet in functie van de CD9 expressie. De zwarte histogrammen stellen de isotype controle voor, de grijze lijn de CD9 kleuring. Enkel resultaten van 1 representatief experiment van de 4 worden getoond. De  $\Delta$ MFI geeft de toename van de gemiddelde fluorescentie intensiteit weer in vergelijking met de controle kleuring. De gemiddelde waarde  $\pm$  standaard deviatie voor vier onafhankelijke experimenten wordt weergegeven ( $p < 0,02$ ).

#### 4. Methylatiestatus na behandeling met een methylatie inhibitor en een histone deacetylase inhibitor

De methylatie status van de CD9 promotor regio van de 5T33MMvt cellen behandeld met 5'aza-dc, LBH589 en een combinatie van beide werd geanalyseerd door bisulfiet sequencering zoals beschreven in hoofdstuk 2 'CD9 promotor status'. Figuur 32 toont de methylatie spreiding over 20 geanalyseerde CpG sites binnen de CD9 promotor. Zoals verwacht is de hoeveelheid gemethyleerde cytosines in de stalen behandeld met 5'aza-dc veel lager dan bij de onbehandelde 5T33MMvt controle cellen. In tegenstelling hiermee resulteerde een behandeling met LBH589 in een toename van het aantal gemethyleerde CpG sites. Een behandeling van de cellen met zowel 5'aza-dc als LBH589 leidde tot een gereduceerde

hoeveelheid gemethyleerde CpG sites in vergelijking met de cellen behandeld enkel met LBH589 hoewel deze zich niet zover uitstrekt als bij een behandeling met enkel 5'aza-dc. Deze data bewijzen dat 5'aza-dc functioneel blijkt te zijn en suggereren bovendien dat deacetylatie het dominante mechanisme is dat resulteert in een hogere CD9 reactivatie in het 5T33MM model.

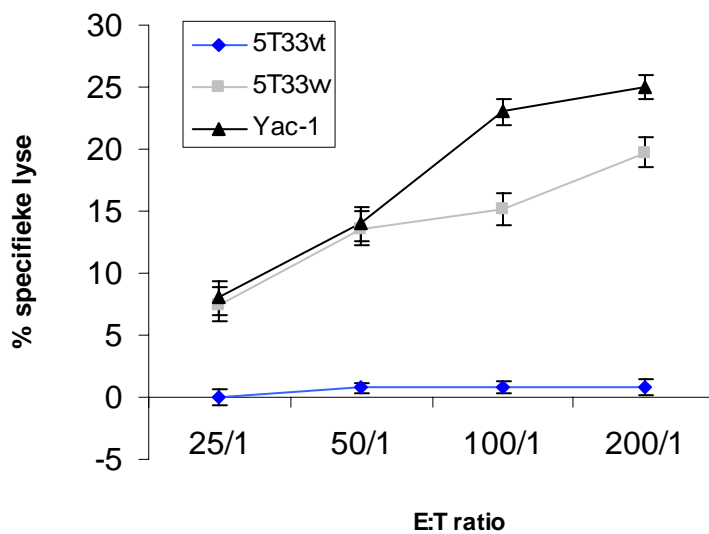


**Figuur 32:** Bisulfiet sequencering van de geselecteerde CD9 promoter regio van 5T33MM<sub>vt</sub> cellen 48 h behandeld met LBH589 (HDAC inhibitor), 5'aza-dc (methylatie inhibitor) en een combinatie van beide. Elke cirkel stelt een individuele CpG site voor waarbij de volle, zwarte cirkels gemethyleerde CpG sites voorstellen terwijl de open cirkels duiden op ongemethyleerde sites.

## 5. Rol van CD9 in Natural Killer cel gemedieerde cytolyse: 5T33MM<sub>vv</sub> versus 5T33MM<sub>vt</sub>

In het verleden werd er reeds aangetoond dat de CD9 expressie de vatbaarheid van humane MM cellen voor cel gemedieerde cytolyse verhoogt [94]. De centrale hypothese is dat wanneer de CD9 expressie downgereguleerd wordt gedurende de ziekteprogressie, de MM cellen waarschijnlijk minder vatbaar zullen worden voor cel gemedieerde cytolyse en zo het immuunsysteem ontlopen. Om deze hypothese te onderzoeken werden er natural killer cytotoxiciteitstesten uitgevoerd op de CD9 uitdrukken 5T33MM<sub>vv</sub> en de 5T33MM<sub>vt</sub> cellijn die CD9 niet tot expressie brengt (figuur 24).

Zoals verwacht waren de CD9 positieve cellen vatbaarder voor NK gemedieerde cytolyse dan de 5T33MM<sub>vt</sub> cellen die CD9 niet uitdrukken (figuur 33). Naarmate de effector-target ratio stijgt zal ook het percentage specifieke lyse toenemen. Het percentage specifieke lyse ligt voor de CD9 positieve cellen beduidend hoger dan bij de CD9 negatieve cellijn.



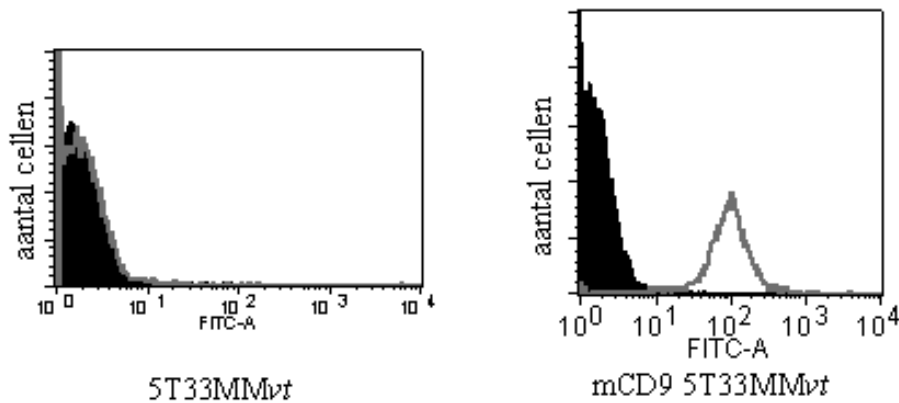
**Figuur 33:** Specifieke lyse van de 5T33MM<sub>vt</sub> en 5T33MM<sub>vv</sub> cellen gemedieerd door NK cellen bij verschillende effector:target (E:T) ratio's. De 5T33MM<sub>vt</sub> en 5T33MM<sub>vv</sub> cellen werden gebruikt als doelwitcellen in een 4 uur durende <sup>51</sup>Cr vrijgave test. NK cellen werden gebruikt als effectorcellen met E:T ratio's van 25:1, 50:1, 100:1 en 200:1. YAC-1 cellen (T-celijn afkomstig van de muis) werden tijdens de test meegenomen als positieve controle. Eén experiment representatief voor drie werd getoond (p < 0,045). De foutenbalk stelt de standaarddeviatie voor van elke punt dat het gemiddelde van een triplicaat is.

## 6. Rol van CD9 in Natural Killer cel gemedieerde cytolyse: 5T33MM<sub>vt</sub> versus mCD9 5T33MM<sub>vt</sub>

Om de rol van CD9 in de NK gemedieerde cytolyse in het 5T33MM model te bevestigen, werd in het gastlabo de CD9 negatieve cellijn 5T33MM<sub>vt</sub> getransduceerd met een lentiviraal transferplasmide dat muis CD9 gen bevat. Het mCD9 gen wordt geïsoleerd door een *EcoRI* digestie van pBluescript II-mCD9 en wordt vervolgens in het transferplasmide pHR'tripCMV-IRES-tNGFR-SIN gebracht om uiteindelijk de vector pHR'tripCMV-mCD9-SIN te bekomen (figuur 19).

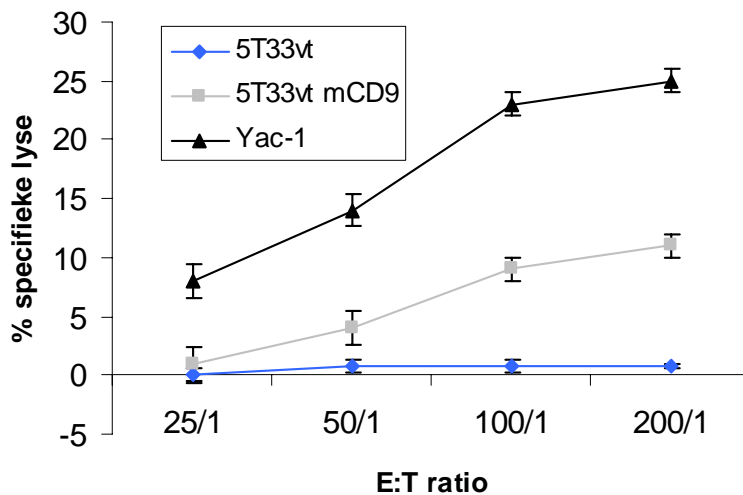
Twee weken posttransductie werden de cellen gesorteerd door middel van flow cytometrische sortering, waarna de prolifererende klonen gescreend worden door middel van FACS analyse. Er werd voor CD9 een kloon met een zuiverheid van 99% bekomen met sterke CD9 expressie zoals getoond in figuur 34.





**Figuur 34:** Vergelijking van de membranaire CD9 expressie van de 5T33MMvt en de CD9 getransduceerde 5T33MMvt cellijnen. De linkse figuur stelt de 5T33MMvt cellijn voor, de rechtse figuur de CD9 getransduceerde cellijn. Het aantal cellen werd uitgezet in functie van de CD9 expressie. De zwarte histogrammen stellen de isotype controle voor, de grijze lijn de CD9 kleuring. Enkel resultaten van één representatief experiment op de drie worden getoond.

Om aan te tonen dat CD9 positieve cellen gevoelig zijn voor cel gemedieerde cytolyse, werd een analoog experiment als in punt 5 uitgevoerd. De resultaten worden getoond in figuur 35. Opnieuw werd bewezen dat de MM cellen die CD9 tot expressie brengen gevoeliger zijn aan cel gemedieerde cytolyse dan de niet getransduceerde 5T33MMvt cellen (figuur 35).



**Figuur 35:** Gevoeligheid van de 5T33MMvt en de CD9 getransduceerde 5T33MMvt cellen voor NK cel gemedieerde cytolyse. NK cellen werden gebruikt als effector cellen terwijl bovengenoemde cellijnen gebruikt worden als doelwitcellen in een  $^{51}\text{Cr}$  vrijgave test. Specifieke lyse van de cellen gemedieerd door NK cellen in verschillende effector:target (E:T) ratio's van 25:1, 50:1, 100:1 en 200:1 wordt getoond. YAC-1 cellen werden tijdens de test meegenomen als positieve controle. Enkel resultaten van één representatief experiment op de drie worden getoond ( $p < 0,045$ ). De foutenbalk stelt de standaarddeviatie voor van elke punt dat het gemiddelde van een triplicaat is.

# **Discussie**

---

---

## Discussie

---

---

Ondanks het intensief onderzoek van de voorbije jaren blijft multipel myeloom (MM) een ongeneeslijke kanker die voornamelijk gekenmerkt wordt door de selectieve aanwezigheid van de MM cellen in het beenmerg (BM). Deze selectieve aanwezigheid is waarschijnlijk te wijten aan een combinatie van een selectieve homing van de cellen enerzijds en een daaropvolgende selectieve overleving als gevolg van de functionele interacties tussen de MM cellen en de BM micro-omgeving anderzijds. Deze interacties worden gemedieerd door membraanmoleculen zoals receptoren voor groeifactoren en cytokines, adhesie- en signaalmoleculen en dragen bij tot de verworven resistentie van de MM cellen aan de conventionele therapieën. Aldus moeten nieuwe geneesmiddelen ontwikkeld worden die gecombineerd kunnen worden met de conventionele therapieën. Deze behandelingen dienen niet alleen de MM cel zelf als doelwit te hebben, maar moeten ook inspelen op de cel-gastheer interacties en de groeifactoren in het BM milieu [65, 106].

CD9 is een oppervlakte glycoproteïne dat behoort tot de familie van de tetraspanines en beïnvloedt verschillende biologische en pathologische processen waaronder deze die als relevant beschouwd worden voor de maligne ontwikkeling van cellen zoals celadhesie, migratie, invasie en proliferatie [14, 50, 92]. Bovendien suggereert de inverse correlatie tussen de CD9 expressie en de tumorprogressie (en metastasering) in verschillende vaste tumoren dat een lage CD9 expressie één van de stappen kan zijn die kanker progressie bevorderen [1, 54, 75, 76, 95]. Er is echter weinig geweten over de expressie en de rol van CD9 in MM. Naar aanleiding van de onderzoeken van Barrena *et al.* [6], die aantoonde dat in MM de CD9 expressie omgekeerd gecorreleerd is met tumorprogressie werd in het gastlabo de CD9 expressie van MM cellen gedurende de ziekteprogressie onderzocht. Hierbij werd een omgekeerde correlatie waargenomen tussen de CD9 expressie en de ziekte activiteit. Patiënten met actieve ziekte vertonen significant minder CD9 expressie in vergelijking met MGUS patiënten en patiënten met niet-actieve ziekte hetgeen aantoont dat de CD9 expressie inderdaad omgekeerd gecorreleerd is met de MM progressie. Om deze data verder te bevestigen werd de CD9 expressie gedurende de verschillende stadia van de ziekteprogressie onderzocht op 5T2MM en 5T33MM cellen. Naar analogie met voorgaande resultaten werd

door het gastlabo vastgesteld dat de CD9 expressie gedurende de ziekteprogressie bij zowel de 5T2MM als de 5T33MM *in vivo* muismodellen downgereguleerd is.

Bovendien werd de overlevingskans van de MM patiënten bepaald aan de hand van de CD9 expressie waarbij patiënten met CD9 expressie op het moment van diagnose een hogere overlevingskans vertonen dan patiënten zonder CD9 expressie. Dit verschil in overlevingskans werd echter niet statistisch significant ( $p < 0,0967$ ) bevonden in de geteste populatie van patiënten. De afwezigheid van de significantie is waarschijnlijk te wijten aan een onvoldoende grote populatie van het aantal geteste patiënten (meer data worden nu nog verzameld). Bovendien werd niet nagegaan hoeveel van de oorspronkelijk CD9 positieve patiënten tijdens de studie CD9 negatief geworden zijn.

In het verdere verloop van de masterproef werd gezocht naar het mechanisme dat betrokken is bij deze downregulatie van CD9 in MM cellen. De CD9 promoter voldoet aan de criteria van een homeostatische genpromoter. Deze promoter wordt gekenmerkt door de afwezigheid van een echte TATA-box en CAAT sequentie in de regio meteen aangrenzend aan de 5' transcriptiestart. Bovendien is de regio rijk aan CpG dinucleotiden [88]. Hypermethylatie is bijgevolg mogelijk mede verantwoordelijk voor de CD9 silencing in MM tijdens de tumorprogressie. Screening van humane MM cellijnen voor tetraspaninen expressie met behulp van flow cytometrische analyse toonde inderdaad een predominante afwezigheid van CD9, CD81 en CD82 aan. Deze afwezigheid werd gekarakteriseerd door enerzijds gereduceerde steady state mRNA en proteïne hoeveelheden en anderzijds door methylatie van de promoterregio. Het opnieuw tot expressie brengen van deze tetraspanines op zowel mRNA als op proteïne niveau na behandeling met een methylatie inhibitor steunt de functionele bijdrage van de hypermethylatie in het reguleren van de transcriptie van het CD9 proteïne [29]. Tot op heden is het echter nog onduidelijk wat het effect is van een behandeling met een histone deacetylase inhibitor (HDACi) alleen of in combinatie met methylatie inhibitoren op de CD9 expressie [38]. Tijdens het onderzoek werd nagegaan of beide inhibitoren een invloed hebben op de CD9 expressie van de 5T33MM<sub>vt</sub> cellen. Vooreerst werden de optimale werkingscondities van beide inhibitoren bepaald. Deze werden uiteindelijk vastgelegd op een respectievelijke concentratie van 60 nM 5-Aza-2'-deoxycytidine (5'aza-dc) en 4 nM LBH589. De optimale incubatieperiode voor de behandeling van de cellen was 48 h waarbij het medium na 24 h verversd werd en beide inhibitoren opnieuw werden toegevoegd.

Na behandeling van de cellen met LBH589 werd een reactivatie van CD9 op zowel transcriptioneel (qRT-PCR analyse) als translationeel (FACS analyse) niveau aangetoond, terwijl enkel een zeer zwakke reactivatie van CD9 op transcriptioneel niveau werd aangetoond

na de behandeling met 5'aza-dc. Hoewel de toename van de membraire CD9 expressie eerder laag is, werd ze na statistische analyse toch significant bevonden. Een gelijkaardige beperkte (14%), maar significante toename van de membraire CD9 expressie werd tevens waargenomen in RPMI 8226 humane MM cellen na demethylatie [29]. Om na te gaan of de behandelde 5T33MMvt een verschil in methylatie patroon vertonen, werd de CD9 promotor regio, die 20 CpG sites bevat, geamplificeerd vanuit bisulfiet gemodificeerd gDNA. De hoeveelheid van het aantal gemethyleerde cytosines in de stalen behandeld met 5'aza-dc lag beduidend lager dan de onbehandelde 5T33MMvt controle cellen, hetgeen resulteerde in een bescheiden maar significante toename van de mRNA CD9 expressie. Dit wijst erop dat 5'aza-dc inderdaad werkzaam is. In tegenstelling hiermee resulteerde een behandeling van de cellen met LBH589 gedurende 48 h in een lichte toename van het aantal gemethyleerde CpG sites en een sterke stijging van de CD9 mRNA expressie. Wanneer de cellen voor 48 h behandeld werden met zowel de methylatie als de histone deacetylase inhibitor werd een sterke synergistische re-transcriptie van CD9 waargenomen. Deze data suggereren dat zowel methylatie als histone deacetylatie een cruciale rol spelen in de epigenetische silencing van CD9 in MM waarbij voornamelijk deacetylatie het dominante mechanisme vormt. Recent werd door Zhong *et al.* aangetoond dat in longkanker CD9 dominant gereguleerd wordt door histone deacetylatie [108]. Ook het moleculaire mechanisme waarbij LBH589 de 'silenced' genexpressie van de estrogeen receptor in de borstkanker cellijn MDA-MB-231 reactiveert, werd zeer recent aangetoond [109]. Door middel van chromatine immunoprecipitatie analyse werd na een behandeling met LBH589 een vrijgave van DNMT1, HDAC1 en de H3-lysine 9 (H3-K9) methyltransferase SUV39H1 waargenomen vanuit de promotor. Deze veranderingen resulteerden in een accumulatie van geacetyleerde histonen H3 en H4 (histone modificaties geassocieerd met actieve chromatine), een daling van gemethyleerde H3-K9 (onderdrukkende histone modificaties) en in een verzwakte binding van het heterochromatine proteïne 1 (HP1 $\alpha$ ) hetgeen uiteindelijk resulteerde in een meer open chromatine structuur. Bovendien ging een behandeling met LBH589 niet samen met demethylatie van de CpG sites. Het moleculaire mechanisme waarmee de HDACi Trichostatine A (TSA) de onderdrukte estrogeen receptor genexpressie heractiveert, bleek hetzelfde te zijn behalve voor de vrijgave van SUV39H1. Er werd door Zhong *et al.* aangetoond dat voor CD9 een accumulatie van geacetyleerd histone H4, een toename van histone H3 lysine 4 methylatie (een histone modificatie geassocieerd met actieve chromatine) en een daling van gemethyleerde H3-K9 plaatsvinden in longkanker cellen nadat deze behandeld werden met TSA [108]. Het is bijgevolg aannemelijk om te suggereren dat LBH589 de CD9 expressie in MM herstelt door een reorganisatie van de heterochromatine

geassocieerde proteïnen hetgeen uiteindelijk leidt tot het openen van de chromatine structuur. In overeenstemming met de data voor CD9 werd een synergistisch effect op de estrogeen receptor genexpressie aangetoond na behandeling met 5'aza-dc en LBH589.

Bovendien werd in het verleden reeds aangetoond dat de CD9 expressie de vatbaarheid van humane MM cellen voor cel gemedieerde cytolyse verhoogt [94]. De centrale hypothese is dat wanneer de CD9 expressie downgereguleerd wordt gedurende de ziekteprogressie, de MM cellen minder vatbaar worden voor cel gemedieerde cytolyse en zo het immuunsysteem ontlopen. In overeenstemming hiermee werd aangetoond dat de 5T33MM<sub>vv</sub> cellen die CD9 tot expressie brengen meer vatbaar zijn voor NK cel gemedieerde cytolyse dan de 5T33MM<sub>vt</sub> cellen die CD9 niet tot expressie brengen. Om de rol van CD9 in de NK gemedieerde cytolyse in het 5T33MM model te bevestigen, werd de CD9 negatieve cellijn 5T33MM<sub>vt</sub> getransduceerd met een lentivirale vector die muis CD9 bevat. De mCD9 5T33MM<sub>vt</sub> cellen bleken significant gevoeliger te zijn voor NK cel gemedieerde cytolyse dan de controle cellen. In een algemeen besluit kan gesteld worden dat een omgekeerde correlatie kan aangetoond worden tussen de CD9 expressie en de MM progressie. Epigenetische silencing door DNA methylatie en voornamelijk histone deacetylatie blijkt het mechanisme te zijn dat betrokken is bij deze CD9 silencing. Bovendien werd tijdens het onderzoek in het kader van de masterproef aangetoond dat naarmate CD9 downgereguleerd wordt, de MM cellen minder vatbaar worden voor NK cel gemedieerde cytolyse waardoor ze het immuunsysteem kunnen ontlopen en zo overleven.



# **Bibliografie**



---

---

## Bibliografie

---

---

1. ADACHI, M., TAKI, T., KONISHI, T., HUANG, C.I., HIGASHIYAMA, M., MIYAKE, M., Novel staging protocol for non-small-cell lung cancers according to MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 gene expression, *J Clin Oncol*, **16** (4), 1397-1406, 1998.
2. AMADO, R.G., CHEN, I.S.Y., Lentiviral vectors-the promise of gene therapy within reach?, *Science*, **285**, 674-676, 1999.
3. ASOSINGH, K., DE RAEVE, H., MENU, E., *et al.*, Angiogenic switch during 5T2MM murine myeloma tumorigenesis: role of CD45 heterogeneity, *Blood*, **103**, 3131-3137, 2004.
4. BAKKUS, M.H.C., HEIRMAN, C., VAN RIET, I., VAN CAMP, B., THIELEMANS, K., Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation, *Blood*, **80**, 2326-2335, 1992.
5. BAKKUS, M.H.C., ASOSINGH, K., VANDERKERKEN, K., THIELEMANS, K., HAGEMEIJER, A., DE RAEVE, H., VAN CAMP, B., Myeloma isotype-switch variants in the murine 5T myeloma model: evidence that myeloma IgM and IgA expressing subclones can originate from the IgG expressing tumour, *Leukemia*, **15**, 1127-1132, 2001.
6. BARRENA, S., ALMEIDA, J., YUNTA, M., LOPEZ, A., FERNANDEZ-MOSTEIRIN, N., GIRALT, M., *et al.*, Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation, *Leukemia*, **19** (8), 1376-83, 2005.
7. BAYLIN, S.B., HERMAN, J.G., DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics, *Trends Genet*, **16**, 168-174, 2000.
8. BERDITCHEVSKI, F., Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye, *J. Cell Sci*, **114**, 4143-4151, 2001.
9. BERGSAGEL, P.L., KEUHL, W.M., Chromosome translocations in multiple myeloma, *Oncogene*, **20**, 5611-5622, 2001.
10. BHALLA, K.N., Epigenetic and Chromatin Modifiers As Targeted Therapy of Hematologic Malignancies, *Journal of Clinical Oncology*, **23** (17), 3971-3993, 2005.
11. BIRD, A., DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev*, **16**, 6-21, 2002.

12. BOUCHEIX., C., *et al.*, Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins, *J Biol Chem*, **266**, 117-122, 1991.
13. BOUCHEIX, C., DUC, G.H., JASMIN, C., RUBINSTEIN, E., Tetraspanins and malignancy, *Expert Rev Mol Med*, **2001**, 1-17, 2001.
14. BOUCHEIX, C., RUBINSTEIN, E., Tetraspanins, *Cell Mol Life Sci*, **58** (9), 1189-1205, 2001.
15. BUTCHER, E.C., PICKER, L.J., Lymphocyte homing and homeostasis, *Science*, **272**, 60-66, 1996.
16. CALIGARIS-CAPPIO, F., BERGUI, L., GREGORETTI, M.G., *et al.*, Role of the bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma, *Blood*, **77**, 2688-2693, 1991.
17. CATLEY, L., WEISBERG, E., TAI, Y.T., ATADJA, P., REMISZEWSKI, S., HIDESHIMA, T., *et al.*, NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma, *Blood*, **102** (7), 2615-2622, 2003.
18. CATLEY, L., WEISBERG, E., KIZILTEPE, T., TAI, Y.T., HIDESHIMA, T., NERI, P., *et al.*, Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells, *Blood*, **108** (10), 3441-3449, 2006.
19. CHRISTMAN, J.K., 5-Aza-cytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic study and their implications for cancer therapy, *Oncogene*, **21** (35), 5483-5495, 2002.
20. CHIM, C.S., KWONG, Y.L., FUNG, T.K., LIANG, R., Methylation profiling in multiple myeloma, *Leuk Res*, **28** (4), 379-385, 2004.
21. CLARK, D.P., Molecular Biology, Understanding the genetic revolution, Elsevier, 2005.
22. DALTON, W.S., BERGSAGEL, L., KEUHL, W.M., ANDERSON, K.C., HAROUSSEAU, J.L., Multiple Myeloma, *Hematology Am soc Hematol Educ Prog*, 157-177, 2001.
23. DAMIANO, S., CRESS, A.E., HAZLEHURST, L.A., SHTIL, A.A., DALTON, W.S., Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines, *Blood*, **93**, 1658-1667, 1999.
24. DAMIANO, S., DALTON, W.S., Integrin-mediated drug resistance in multiple myeloma, *Leuk Lymphoma*, **38**, 71-81, 2000.

25. DE BRUYNE, E., MENU, E., VAN VALCKENBORG, E., DE RAEVE, H., VAN CAMP, B., VAN RIET, I., VANDERKERKEN, K., Myeloma cells and their interactions with the bone marrow endothelial cells, *Current Immunology Reviews*, **3**, 41-55, 2007.
26. DEBYSER, Z., Viral vectors for gene therapy, *Rega Institute for Medical Research KUL*, 2000.
27. DE RAEVE, H., VAN MARCK, E., VAN CAMP, B., VANDERKERKEN, K., Angiogenesis and the role of bone marrow endothelial cells in the haematological malignancies, *Histol Histopathol*, **19**, 935-950, 2004.
28. DEVITRA, J. V.T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S.A., et al., Cancer: Principles and Practice of Oncology, 5de editie, 1997.
29. DRUCKER, L., TOHAMI, T., TARTAKOVER-MATALON, S., ZISMANOV, V., SHAPIRO, H., RADNAY, J., et al., Promotor hypermethylation of tetraspanin members contributes to their silencing in myeloma cell lines, *Carcinogenesis*, **27** (2), 197-204, 2006.
30. DU, H.L., Qi, Y., SHI, Y.J., BU, D.F., WU, S.L., Apoptosis and re-expression of p-16 gene in the myeloma cell line U266 induced by synergy of histone deacetylase inhibitor and demethylating agent, *Ai Zheng*, **21** (10), 1057-1061, 2002.
31. EHRLICH, M., DNA methylation in cancer: Too much, but also too little, *Oncogene*, **21**, 5400-5413, 2002.
32. ESTELLER, M., HERMAN, J.G., Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours, *J Pathol*, **196**, 1-7, 2002.
33. FEINBERG, A.P., TYCKO, B., The history of cancer epigenetics, *Nat Rev Cancer*, **4**, 143-153, 2004.
34. FELSENFELD, G., GROUDINE, M., Controlling the double helix, *Nature*, **421** (6921), 448-453, 2003.
35. FERLIN, M., NORAZ, N., HERTOIGH, C., BROCHIER, J., TAYLOR, N., KLEIN, B., Insulin-like growth factor I induces the survival and proliferation of myeloma cells through an interleukin-6-independent transduction pathway, *Br. J., Haematol.*, **111**, 626-634, 2000.
36. FERGUSON, A.T., VERTINO, P.M., SPITZNER, J.R., BAYLIN, S.B., MULLER, M.T., DAVIDSON, N.E., Role of estrogen receptor gene demethylation and DNA methyltransferase. DNA adduct formation in 5-aza-2'-deoxycytidine-induced cytotoxicity in human breast cancer cells, *J Biol Chem*, **272** (51), 32260-32266, 1997.

37. FINNIN, M.S., DONIGIAN, J.R., COHEN, A., RICHON, V.M., RIFKIND, R.A., MARKS, P.S., BRESLOW, R., PAVLETICH, N.P., Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors, *Nature*, **401**, 188-193, 1999.
38. FUKS, F., DNA methylation and histone modifications:teaming up to silence genes, *Curr Opin Genet Dev*, **15** (5), 490-495, 2005.
39. GABBARA, S., BHAGWAT, A.S., The mechanism of inhibition of DNA (cytosine-5)-methyltransferases by 5-azacytosine is likely to involve methyl transfer to the inhibitor, *Biochem J.*, **307** (1), 87-92, 1995.
40. GALM, O., YOSHIKAWA, H., ESTELLER, M., OSIEKA, R., HERMAN, J.G., SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma, *Blood*, **101** (7), 2784-2788, 2003.
41. GALM, O., WILOP, S., REICHELT, J., JOST, E., GEHBAUER, G., HERMAN, J.G., OSIEKA, R., DNA methylation changes in multiple myeloma, *Leukemia*, **18**, 1687-1692, 2004.
42. GALM, O., HERMAN, J.G., BAYLIN, S.B., The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies, *Blood Reviews*, **20**, 1-13, 2006.
43. GARDINER-GARDEN, M., FROMMER, M., CpG islands in vertebrate genomes, *J Mol Biol*, **196**, 261-282, 1987.
44. GEORGII-HEMMING, P., WIKLUND, H.J., LJUNGGREN, O., NILSSON, K., Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor for human multiple myeloma cell lines, *Blood*, **88**, 2250-2258, 1996.
45. GIULIANI, N., COLLA, S., RIZOLLI, V., Angiogenetic switch in multiple myeloma, *Haematology*, **9**, 377-381, 2004.
46. GOFFIN, J., EISENHAUER, E., DNA methyltransferase inhibitors-state of the art, *Ann Oncol*, **13** (11), 1699-1716, 2002.
47. HAGGARTY, S.J., KOELLER, K.M., WONG, J.C., GROZINGER, C.M., SCHREIBER, S.L., Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation, *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 4389-4394, 2003.
48. HALLEK, M., BERGSAGEL, P.L., ANDERSON, K.C., Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process, *Blood*, **91**, 3-21, 1998.
49. HEMLER, M.E., Integrin associated proteins, *Curr Opin Cell Biol*, **10** (5), 578-585, 1998.
50. HEMLER, M.E., Specific tetraspanin functions, *J Cell Biol*, **155** (7), 1103-1107, 2001.

51. HERMAN, J.G., BAYLIN, S.B., Gene silencing in cancer association with promotor hypermethylation, *N Engl J Med*, **349**, 2042-2054, 2003.
52. HIDESHIMA, T., ANDERSON, K.C., Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma, *Nt Rev Cancer*, **2**, 927-937, 2002.
53. HOLLIDAY, R., GRIGG, G.W., DNA methylation and mutation, *Mutat Res*, **285**, 61-67, 1993.
54. HOULE, C.D., DING, X.Y., FOLEY, J.F., AFSHARI, C.A., BARRETT, J.C., DAVIS, B.J., Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression, *Gynaecol Oncol*, **86** (1), 69-78, 2002.
55. ISSA, J.P., CpG island methylator phenotype in cancer, *Nat Rev Cancer*, **4**, 988-993, 2004.
56. JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M.J., Immunobiology the immune system in health and disease, Churchill livingstone, Garland Science, Taylor and Frances Group, zesde editie, 2005.
57. JONES, P.A., TAYLOR, S.M., Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation, *Cell.*, **20** (1), 85-93, 1980.
58. JONES, P.A., The DNA methylation paradox, *Trends Genet*, **15**, 34-37, 1999.
59. JONES, P.A., BAYLIN, S.B., The fundamental role of epigenetic events in cancer, *Nat Rev Genet*, **3**, 415-428, 2002.
60. JUTTERMANN, R., LI, E., JAENISCH, R., Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA methylation, *Proc Natl Acad Sci USA*, **91** (25), 11797-11801, 1994.
61. KHAN, S.B., MAUDUDI, T., BARTON, K., AYERS, J., ALKAN, S., Analysis of histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FR901228), effect on multiple myeloma, *Br J Haematol*, **125** (2), 156-161, 2004.
62. KEUHL, W.M., BERGSAGEL, P.L., Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions, *Nat Rev Cancer*, **2**, 175-187, 2002.
63. KLIMATCHEVA, E., ROSENBLATT, J.D., PLANELLES, V., Lentiviral vectors and gene therapy, *Frontiers in Bioscience*, **4**, 481-496, 1999.
64. KUBY, J., KINDT, T.J., GOLDSBY, R.A., OSBORNE, B.A., Immunology, Freeman, zesde editie, 2007.
65. LANDOWSKI, T.H., OLASHAW, N.E., AGRAWAL, D., DALTON, W.S., Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells, *Oncogene*, **22** (16), 2417-2421, 2003.

66. LOKHORST, H.M., LAMME, T., DE SMET, M., *et al.*, Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures, *Blood*, **84**, 2269-2277, 1994.
67. MAECKER, H.T., TODD, S.C., LEVY, S., The tetraspanin superfamily: molecular facilitators, *FASEB J.*, **11** (9), 428-442, 1997.
68. MAISO, P., CARVAJAL-VERGARA, X., OCIO, E.M., LOPEZ-PEREZ, R., MATEO, G., GUTIERREZ, N., *et al.*, The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance, *Cancer Res*, **66** (11), 5781-5789, 2006.
69. MARTIN, F., ROTH, D.M., JANS, D.A., POUTON, C.W., PARTRIDGE, L.J., MONK, P.N., *et al.*, Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology?, *J Virol*, **79** (17), 10839-10851, 2005.
70. MATEOS, M.V., GARCIA-SANZ, R., LOPEZ-PEREZ, R., MORO, M.J., OCIO, E., HERNANDEZ, J., *et al.*, Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival, *Br J Haematol*, **118** (4), 1034-1040, 2002.
71. MENU, E., ASOSINGH, K., VAN RIET, I., CROUCHER, P., VAN CAMP, B., VANDERKERKEN, K., Myeloma cells (5TMM) and their interactions with the marrow environment, *Blood Cells Mol Dis*, **33**, 111-119, 2004.
72. MICHALOWSKY, L.A., JONES, P.A., Differential nuclear protein binding to 5-azacytosine-containing DNA as a potential mechanism for 5-aza-2'-deoxycytidine resistance, *Mol Cell Biol*, **7** (9), 3076-3083, 1987.
73. MITSIADES, C.S., MITSIADES, N., MUNSHI, N.C., ANDERSON, K.C., Focus on multiple myeloma, *Cancer Cell*, **6**, 439-444, 2004.
74. MITSIADES, C.S., MITSIADES, N.S., MCMULLAN, C.J., POULAKI, V., SHRINGARPURE, R., HIDESHIMA, T., *et al.*, Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications, *Proc Natl Acad USA*, **101** (2), 540-545, 2004.
75. MIYAKE, M., NAKANO, K., LEKI, Y., ADACHI, M., HUANG, C.L., ITOI, S., *et al.*, Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer, *Cancer Res*, **55** (18), 4127-4131, 1995.
76. MORI, M., MIMORI, K., SHIRAISHI, T., HARAGUCHI, M., UEO, H., BARNARD, G.F., *et al.*, Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression in colon cancer, *Clin Cancer Res*, **4** (6), 1507-1510, 1998.

77. MURAI, M., TOYOTA, M., SATOH, A., SUZUKI, H., AKINO, K., MITA, H., SASAKI, Y., ISHIDA, T., SHEN, L., GARCIA-MANERO, G., ISSA, J.P., HINODA, Y., TOKINO, T., IMAI, K., Abberant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours, *Br J Cancer*, **92** (6), 1165-1172, 2005.
78. NG, M.H., CHUNG, Y.F., LO, K.W., WICKHAM, N.W., LEE, J.C., HUANG, D.P., Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma, *Blood*, **87** (7), 2500-2506, 1997.
79. NG, M.H., TO, K.W., LO, K.W., CHAN, S., TASNG, K.S., CHENG, S.H., *et al.*, Frequent death-associated protein kinase promotor hypermethylation in multiple myeloma, *Clin Cancer Res*, **7** (6), 1724-1729, 2001.
80. NG, M.H., Death associated protein kinase: from regulation of apoptosis to tumor suppressive functions and B cell malignancies, *Apoptosis*, **7** (3), 261-270, 2002.
81. PEI, X.Y., DAI, Y., GRANT, S., Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors, *Clin Cancer Res*, **10** (11), 3839-3852, 2004.
82. PODAR, K., ANDERSON, K.C., The pathophysiological role of VEGF in hematological malignancies: therapeutic implications, *Blood*, **105**, 1383-1395, 2005.
83. POMPEIA, C., HODGE, D.R., PLASS, C, WU, Y.Z., MARQUEZ, V.E., KELLEY, J.A., *et al.*, Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line, *Cancer Res*, **64** (10), 3465-3473, 2004.
84. RADL, J., Multiple myeloma and related disorders. Lessons from an animal model, *Pathol. Biol.*, **47**, 109-114, 1999.
85. RICHARDS, E.J., ELGIN, S.C., Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects, *Cell*, **108**, 489-500, 2002.
86. RISAU, W., Mechanisms of angiogenesis, *Nature*, **386**, 671-674, 1997.
87. ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D., Immunology, Mosby, zesde editie, 2001.
88. RUBINSTEIN, E., BENOIT, P., BILLARD, M., PLAISANCE, S., PRENANT, M., UZAN, G., *et al.*, Organization of the human CD9 gene, *Genomics*, **16** (1), 132-138, 1993.
89. SAHOTA, S.S., GARAND, R., MAHROOF, R., SMITH, A., JUGE-MORINEAU, N., STEVENSON, F.K., BATAILLE R., V<sub>H</sub> gene analysis of IgM-secreting Myeloma indicates an origin from a memory cell undergoing isotype switch events, *Blood*, **94**, 1070-1076, 1999.

90. SANTI, D.V., NORMENT, A., GARRETT, C.E., Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine, *Proc Natl Acad Sci USA*, **81** (22), 6993-6997, 1984.
91. SANTINI, V., KANTARJIAN, H.M., ISSA, J.P., Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications, *Ann Intern Med*, **134** (7), 573-586, 2001.
92. SAUER, G., WINDISCH, J., KURZEDER, C., HEIMANN, V., KREIENBERG, R., DEISSLER, H., Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of CD9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion, *Clin Cancer Res*, **9** (17), 6426-6431, 2003.
93. SERRU, V., *et al.*, Sequence and expression of seven new tetraspans, *Biochim Biophys Acta*, **1478**, 159-163, 2000.
94. SHALLAL, S., KORNBLUTH, J., CD9 expression enhances the susceptibility of myeloma cell lines to cell-mediated cytotoxicity, *Blood*, **96** (1), 224-233, 2000.
95. SI, Z. HERSEY, P., Expression of the neuroendocrine antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversely related to metastatic potential of melanoma, *Int J Cancer*, **54** (1), 37-43, 1993.
96. SINGAL, R., GINDER, G.D., DNA methylation, *Blood*, **93** (12), 4059-4070, 1999.
97. TASAKA, T., ASOU, H., MUNKER, R., SAID, J.W., BERENSON, J., VESCIO, E., HERNANDEZ, J., *et al.*, Methylation of the p16INK4A gene in multiple myeloma, *Br J Haematol*, **101** (3), 558-564, 1998.
98. VACCA, A., RIBATTI, D., RONCALI, L., RANIERI, G., SERIO, G., SILVESTRIS, F., DAMMACCO, F., Bone marrow angiogenesis and progression in Multiple myeloma, *British Journal Haematology*, **87**, 503-508, 1994.
99. VANDERKERKEN, K., DE GREEF C., ASOSINGH, K., ARTETA, B., DE VEERMAN, M., VANDE BROECK, I., VAN RIET, I., KOBAYASHI, M., SMEDSRØD, B., VAN CAMP, B., Selective initial in vivo homing pattern of 5T2 multiple myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse, *British Journal of Cancer*, **82**, 953-959, 2000.
100. VANDERKERKEN, K., ASOSINGH, K., CROUCHER, B., VAN CAMP, B., Multiple myeloma biology: lessons from the 5TMM models, *Immunol Rev*, **194**, 196-206, 2003.
101. VAN SOEST, S., *et al.*, Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view, *Surv Ophthalmol*, **43**, 321-334, 1999.



102. VAN VALCKENBORG, E., DE RAEVE, H., DEVY, L., BLANCHER, S., MUNAUT, C., NOEL, A., VAN MARCK, E., VAN RIET, I., VAN CAMP, B., VANDERKERKEN, K., Murine 5T multiple myeloma cells induce angiogenesis *in vitro* and *in vivo*, *British Journal of Cancer*, **86**, 796-802, 2002.
103. VIGNA, E., NALDINI, L., Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy, *The Journal of Gene Medicine*, **2**, 308-316, 2000.
104. VILLAR-GAREA, A., ESTELLER, M., Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents, *Int. J., Cancer*, **112**, 171-178, 2004.
105. WRIGHT, M.D., MOSELEY, G.W., VAN SPRIEL, A.B., Tetraspanin microdomains in immune cell signaling and malignant disease, *Tissue Antigens*, **64**, 533-542, 2004.
106. YASUI, H., HIDESHIMA, T., RICHARDSON, P.G., ANDERSON, K.C., Novel therapeutic strategies targeting growth factor signalling cascades in multiple myeloma, *Br J Haematol*, **132** (4), 285-397, 2006.
107. YOSHIDA, M., KIJIMA, M., AKITA, M., BEPPU, T., Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A, *J Biol Chem*, **265**, 17174-17179, 1990.
108. ZHONG, S., FIELDS, C.R., Su, N., PAN, Y.X., ROBERTSON, K.D., Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer, *Oncogene*, **26** (18), 2621-2634, 2007.
109. ZHOU, Q., ATADJA, P., DAVIDSON, N., Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 Reactivates Silenced Estrogen Receptor Alpha (ER) Gene Expression without Loss of DNA Hypermethylation, *Cancer Biol Ther*, **6** (1), internetpublicatie in 2007.
110. Website van het “Myeloma Institute for Research and Therapy”, <http://myeloma.uams.edu>.
111. Website van het “Multiple Myeloma Research Foundation” (MMRF), <http://www.multiplemyeloma.org>.
112. Website van het “International Myeloma Foundation”, <http://www.myeloma.org>.
113. Website van het “National Cancer Institute”, <http://www.cancer.gov>, <http://www.cancer.gov/cancerinfo/wyntk/myeloma>.

114. <http://cook.chem.ndsu.nodak.edu/mmp.shtml>
115. Website van het “College of natural sciences and mathematics departement of Biological Science, Cal state Fullerton, Californië, Verenigde Staten, <http://biology.fullerton.edu>.
116. Website van de “Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, School of life sciences, Zwitserland, <http://sv.epfl.ch/IntraLEN/anglais/viral.html>.



# **Bijlagen**

---

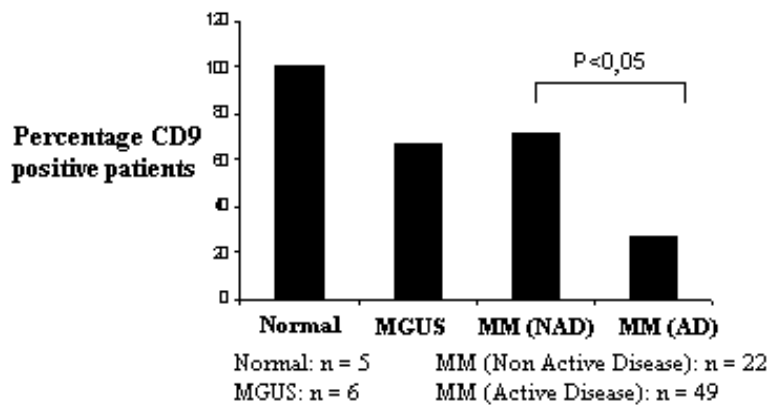
---

## Bijlagen

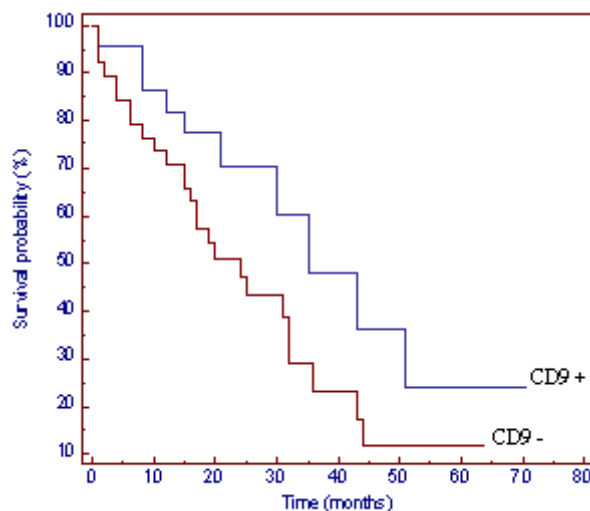
---

---

**Bijlage 1:** Onderzoek naar de membraire CD9 expressie van de beenmerg plasmacellen van patiënten met actieve en niet actieve MM ziekte, patiënten met MGUS en gezonde controle personen.

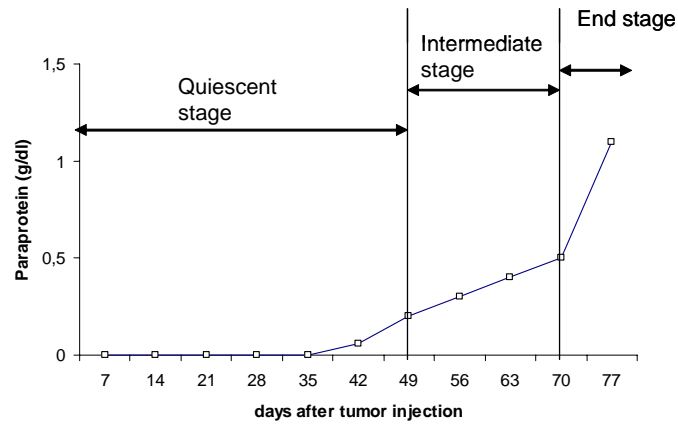


**Bijlage 2:** De Kaplan Meier curve toont de overlevingskans van MM patiënten met CD9 expressie op het moment van diagnose in vergelijking met MM patiënten zonder CD9 expressie. Om beide groepen te vergelijken wordt gebruik gemaakt van de log-rank test. Er werd een klein doch niet statistisch significant verschil ( $p < 0,0967$ ) in overleving tussen de twee groepen waargenomen.



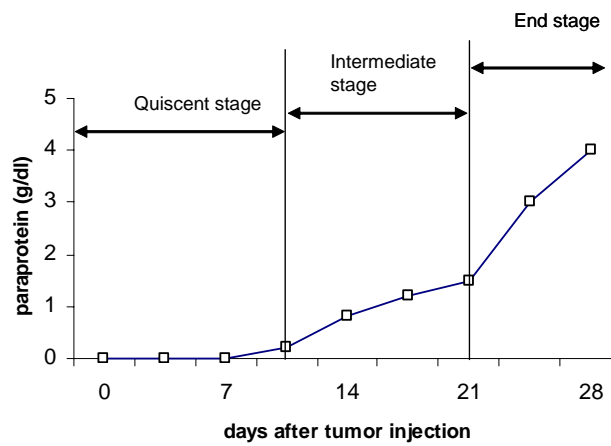
Bijlage 3: Voorstelling van de paraproteïneconcentratie in functie van de tijd na tumor injectie bij respectievelijk het 5T2MM model (a) en het 5T33MM model (b). Op basis hiervan werden de drie stadia gedefinieerd [3].

A



5T2MM

B



5T33MM

Bijlage 4: Downregulatie van de CD9 expressie van de muis 5T2MM en 5T33MM cellen gedurende de MM progressie. Links: flow cytometrische analyse van de 5T2MM positieve cellen gedurende de verschillende ziekte stadia (sluimerend, intermediair en eindstadium). Rechts: flow cytometrische analyse van de 5T33MM positieve cellen gedurende het intermediair en het eind stadium. De celcount wordt uitgezet in functie van de CD9 expressie. De zwart gevulde histogrammen stellen de isotype controle voor, terwijl de grijze lijn verwijst naar de CD9 kleuring.

