

Academiejaar 2011 - 2012

De rol van tumor-geassocieerd vetweefsel bij borstkankerprogressie.

Evelyne LECOUTERE

Promotor: Prof. Dr. Apr. Olivier De Wever
Co-promotor: Dr. Lore Lapeire

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding
MASTER IN DE GENEESKUNDE

Academiejaar 2011 - 2012

De rol van tumor-geassocieerd vetweefsel bij borstkankerprogressie.

Evelyne LECOUTERE

Promotor: Prof. Dr. Apr. Olivier De Wever
Co-promotor: Dr. Lore Lapeire

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding
MASTER IN DE GENEESKUNDE

Inhoudstabel

Abstract	1
Hoofdstuk 1: Achtergrond	2
1. Kanker	2
1.1 Ontwikkeling van een tumor	2
1.2 De moleculaire basis van kanker	2
1.3 Tumorstroma	5
2. Borstkanker	7
2.1 Epidemiologie	7
2.2 Risicofactoren.....	7
2.3 Karakteristieken van borstkanker	7
3. Obesitas	9
3.1 Epidemiologie	9
3.2 Vetweefsel	9
3.3 Obesitas en borstkanker.....	10
Hoofdstuk 2: Doelstelling	17
Hoofdstuk 3: Materiaal en methoden	18
1. In vitro materiaal	18
1.1 Cellijnen	18
1.2 Groeimedium.....	18
1.3 Geconditioneerd medium (CM)	19
1.4 Controle medium (CON).....	19
2. Celcultuur	20
2.1 Materiaal.....	20
2.2 Ontdooien van cellen.....	21
2.3 Verversen van cellen	21
2.4 Splitsen van cellen.....	21
2.5 Cellen tellen.....	22

3.	Morfologie test	23
3.1	Principe.....	23
3.2	Materiaal.....	23
3.3	Methode.....	23
4.	MTT-test.....	24
4.1	Principe.....	24
4.2	Materiaal.....	24
4.3	Methode.....	25
5.	Proliferatietest	26
5.1	Principe.....	26
5.2	Materiaal.....	26
5.3	Methode.....	26
6.	Western Blot.....	27
6.1	Principe.....	27
6.2	Materiaal.....	29
6.3	Methode.....	31
7.	Single cell collageen type I invasie test (SC-CIT)	34
7.1	Principe.....	34
7.2	Materiaal.....	35
7.3	Methode.....	35
8.	Transwell collageen type I invasie test (TW-CIT)	37
8.1	Principe.....	37
8.2	Materiaal.....	37
8.3	Methode.....	38
Hoofdstuk 4: Resultaten		39
1.	Invloed van oplosbare factoren vrijgesteld door tumor-geassocieerd vetweefsel op de morfologie van borstkankercellen	39
1.1	Morfologie test bij T47D.....	39
1.2	Morfologie test bij MDA MB 231.....	41

2.	Invloed van oplosbare factoren vrijgesteld door tumor-geassocieerd vetweefsel op de proliferatie van borstkankercellen	42
2.1	MTT-test bij T47D	42
2.2	Proliferatietest bij T47D	43
2.3	Western Blot bij T47D	44
2.4	MTT-test bij MDA MB 231	47
2.5	Proliferatietest bij MDA MB 231	48
2.6	Western Blot bij MDA MB 231	50
3.	Invloed van oplosbare factoren vrijgesteld door tumor-geassocieerd vetweefsel op de invasie van borstkankercellen.....	51
3.1	Single cell collageen type I invasie test (SC-CIT) bij T47D.....	51
3.2	Transwell collageen type I invasie test (TW-CIT) bij T47D.....	52
3.3	Single cell collageen type I invasie test (SC-CIT) bij MDA MB 231.....	53
3.4	Transwell collageen type I invasie test (TW-CIT) bij MDA MB 231.....	54
	Discussie	55
	Referentielijst	59

Abstract

Achtergrond

Obesitas is een belangrijke risicofactor voor het ontstaan van borstkanker bij postmenopauzale vrouwen en daarenboven heeft het ook een negatieve invloed op de prognose bij zowel pre- als postmenopauzale vrouwen met borstkanker. Gezien bij borstkanker het vetweefsel in nauw contact staat met de borstkankercellen wordt vermoed dat factoren die door het vetweefsel worden vrijgesteld, ook adipokines genoemd, hierbij een rol spelen.

Doelstelling

Het doel van deze scriptie is nagaan wat de rol is van de factoren die door het vetweefsel in het tumorstroma worden vrijgesteld bij de verschillende aspecten van borstkankerprogressie, meer bepaald de morfologie, proliferatie en invasie van borstkankercellen in vitro.

Materiaal en methoden

Er werd vetweefsel geïsoleerd uit borsten die werden geamputeerd omwille van een borsttumor. Dit tumor-geassocieerde vetweefsel werd gedurende 24 uur geïncubeerd onder specifieke cultuur condities. Het medium waarin het vetweefsel geïncubeerd werd, bevat hierdoor de factoren die het vetweefsel gedurende 24 uur vrijstelde. Dit medium wordt als geconditioneerd medium gebruikt voor in vitro onderzoek bij T47D en MDA MB 231 borstkankercellen. Om de rol van de factoren in het geconditioneerd medium na te gaan bij borstkankerprogressie werden bij beide celtypes verschillende testen uitgevoerd, meer bepaald een morfologie test, MTT-test, proliferatietest, Western Blot, single cell collageen invasie test en transwell collageen invasie test.

Resultaten

Aan de hand van de morfologie test kon worden aangetoond dat het geconditioneerd medium, in tegenstelling tot het controle medium, factoren bevat die de normale werking van de T47D en MDA MB 231 cellen ten goede komen. De MTT-test, de proliferatietest en de Western Blot konden overigens aantonen dat het geconditioneerd medium ook factoren bevat die zowel bij T47D als bij MDA MB 231 de proliferatie stimuleren door een verhoogde expressie van cycline A en cycline E. Tot slot werd ook aan het licht gebracht dat bepaalde factoren in het geconditioneerd medium een stimulerend effect hebben op de invasiviteit van MDA MB 231 cellen.

Conclusie

Het tumor-geassocieerde vetweefsel stelt factoren vrij die verschillende kenmerken van borstkankerprogressie, zoals proliferatie en invasie, stimuleren. Verder onderzoek zal nodig zijn om de onderliggende mechanismen hiervan te ontrafelen.

Hoofdstuk 1: Achtergrond

1. Kanker

Kanker is een kwaadaardige ziekte gekenmerkt door ongecontroleerde celgroei en verstoorde celdifferentiatie. De kwaadaardigheid van kanker uit zich in de mogelijkheid om het omliggend weefsel te invaderen en uit te zaaien naar verder gelegen organen. De tumor zelf bestaat uit kankercellen en uit tumor-geassocieerde gastheercellen die het ecosysteem voor de kankercellen vormen (1).

1.1 Ontwikkeling van een tumor

De transformatie van een normale cel naar een kankercel is een evolutief proces. In een eerste stadium ontstaat er een abnormale groei of hyperplasie, die aanleiding geeft tot een goedaardige tumor. Het volgende stadium wordt gekenmerkt door de dedifferentiatie van de cellen en dit leidt tot een carcinoma in situ. Hoewel men dit stadium reeds als ‘kanker’ benoemt, is een carcinoma in situ niet invasief en bijgevolg ook niet kwaadaardig. Het vormt echter wel de overgang tussen goedaardige en kwaadaardige tumoren. In een derde stadium treedt invasie op. De kankercellen verlaten dan hun weefsel-specifieke biotoop om zich zo lokaal te verspreiden of te metastaseren naar organen op afstand (1).

1.2 De moleculaire basis van kanker

Kanker is in essentie een genetische aandoening. Wijzigingen in het DNA zijn de primaire oorzaak van het ontstaan van kanker. Deze wijzigingen kunnen ontstaan door erfelijke mutaties, door verworven mutaties of door methylering van het DNA. Bij erfelijke mutaties kan de mutatie in een specifiek gen via de geslachtscellen worden doorgegeven aan het nageslacht. Bijgevolg zullen vaak vele familieleden getroffen worden door een bepaalde kanker. Verworven mutaties zijn daarentegen het gevolg van mutagene factoren in het leefmilieu, zoals infecties, fysische factoren en chemische stoffen. Bij methylering van het DNA hechten methylgroepen zich aan de cystineresidu's in de promotors van bepaalde genen. Genen worden op deze manier geïnactiveerd zonder dat iets wordt veranderd aan de nucleotide sequentie van die genen. Er is met andere woorden geen sprake van een somatische mutatie van een gen, maar toch kan de DNA methylering worden doorgegeven aan de dochtercellen (2).

De bovengenoemde genetische wijzigingen dienen genen te treffen die betrokken zijn bij het reguleren en controleren van de celdeling. Hierbij kunnen de volgende genen worden onderscheiden: de proto-oncogenen, de tumorsuppressorgenen, genen betrokken bij apoptose en genen betrokken bij DNA herstelmechanismen (2,3).

Proto-oncogenen zijn groeibevorderende genen die coderen voor eiwitten die de normale celdeling stimuleren. Deze eiwitten zijn bijvoorbeeld groeifactoren, groeifactor receptoren, proteïne kinasen, signaaltransducers, nucleaire fosfoproteïnen of transcriptiefactoren. Wanneer een verhoogde activiteit optreedt van de proto-oncogenen, als gevolg van een mutatie of overexpressie, spreekt men van oncogenen.

Tumorsuppressorgenen zijn daarentegen genen die coderen voor eiwitten die de celgroei afremmen. Inactivatie van deze genen door een mutatie, deletie of methylering van de promotorregio, bevordert de tumorontwikkeling doordat de celdeling niet langer wordt afgeremd en ongecontroleerde groei kan plaatsvinden. Een voorbeeld van een tumorsuppressorgen is p53.

Apoptose genen coderen voor eiwitten die instaan voor het fysiologisch mechanisme van gecontroleerde en geprogrammeerde celdood. Bij een verlaagde expressie of inactivatie van de apoptose genen zullen cellen als het ware onsterfelijk worden. Hierdoor zal het evenwicht tussen celproliferatie en celdood worden verstoord met een accumulatie aan cellen als gevolg.

Eiwitten gecodeerd door DNA herstel genen zullen (beperkte) DNA-schade herstellen door proofreading, mismatch repair, methylatie en andere mechanismen. Wanneer de DNA herstel genen niet meer functioneel zijn, zullen de fouten in het genoom onvoldoende worden gerepareerd. Zo kunnen mutaties gemakkelijk opstapelen en doorgegeven worden aan dochtercellen.

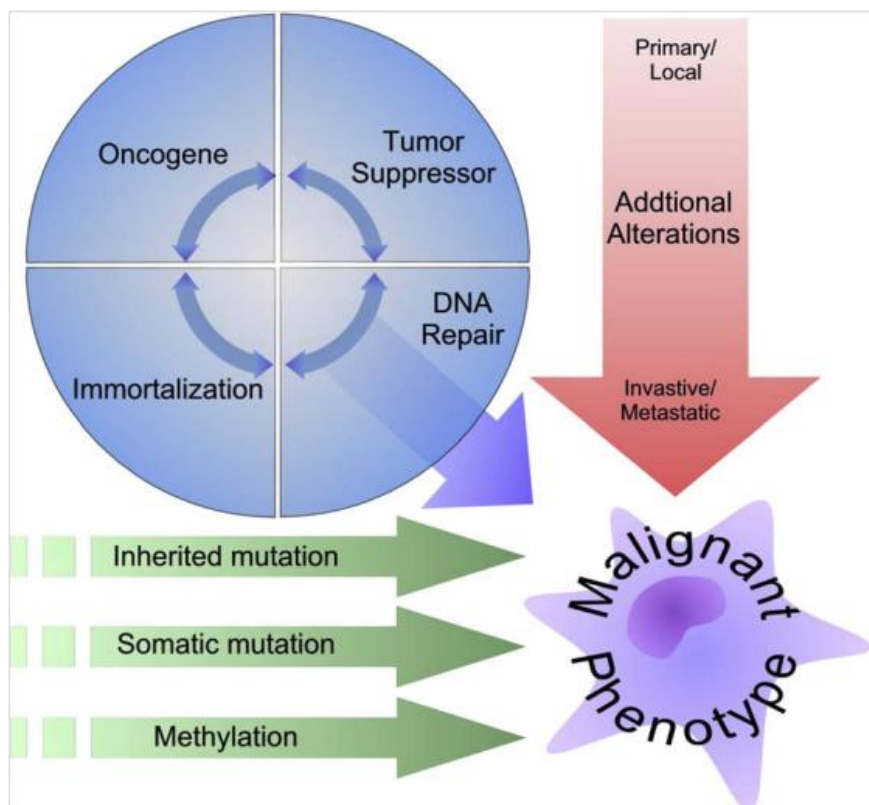
Naast de hierboven beschreven mutaties, dient de kankercel nog drie andere eigenschappen te verwerven: onbeperkte delingscapaciteit, nieuwvorming van bloedvaten en tot slot de capaciteit om te invaderen en metastaseren (2,3).

Telomeren, de gespecialiseerde uiteinden van het DNA, verkorten bij elke celdeling en zullen zo het totaal aantal celdelingen beperken. Wanneer de telomeren verdwenen zijn, na ongeveer 60 delingen, zullen de chromosomale uiteinden zich aan elkaar hechten en hierdoor zal genomische instabiliteit optreden. Het gevolg van deze instabiliteit is dat cellen afsterven of in een rusttoestand komen waarbij ze definitief stoppen met delen. Kankercellen zijn echter in staat om de genomische instabiliteit te ontwijken doordat zij over een zeer actief telomerase enzym beschikken dat de uiteinden van de chromosomen onbeperkt kan herstellen. Hierdoor verwerven de kankercellen een onbeperkte delingscapaciteit en worden ze als het ware onsterfelijk.

Een tumor zal slechts kunnen overleven wanneer er adequate bloedvoorziening is. Men neemt aan dat een tumor groter dan 1 à 2 mm enkel kan overleven wanneer ze in staat is om nieuwe bloedvaten aan te maken zodat de voedselvoorziening niet in het gedrang komt (4). De nieuwvorming van bloedvaten is daarenboven ook noodzakelijk voor communicatie tussen de primaire tumor en de metastasen (5). De kankercellen moeten bijgevolg ook de eigenschap verwerven om angiogenese te stimuleren.

De cellen moeten tot slot ook in staat zijn om het omringende weefsel te invaderen. Men spreekt van invasie wanneer kankercellen de basale membraan doorbreken. De kankercellen verlaten zo het weefsel-specifieke territorium waaruit zij zijn ontstaan. Kankercellen zijn vervolgens ook in staat om te metastaseren, wat betekent dat zij zich verspreiden naar lokale of regionale lymfeklieren en/of naar andere organen.

Samenvattend kan gesteld worden dat cellen verschillende mechanismen moeten verwerven of obstakels moeten omzeilen alvorens het invasieve kankercellen worden. Hiervoor zijn dus meerdere mutaties nodig in verschillende genen (figuur 1). De volgorde waarin deze mutaties plaatsvinden is niet vastgelegd.



Figuur 1: De stapsgewijze evolutie naar een maligne fenotype (3).

1.3 Tumorstroma

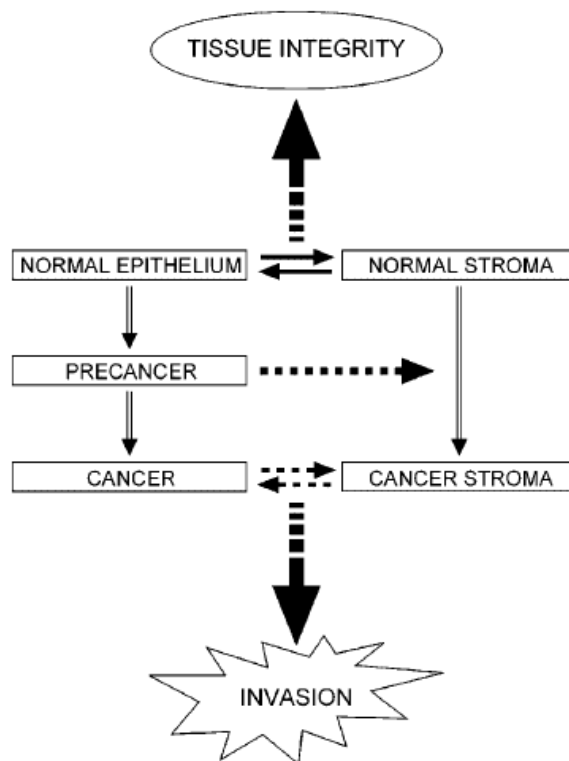
De laatste jaren werd duidelijk dat een kankermodel niet louter uit een primaire tumor bestaat. Elk tumor ecosysteem bestaat naast de maligne kankercellen immers ook uit het stroma dat gelegen is rond de tumor, ook ‘tumorstroma’ of ‘reactief stroma’ genoemd. Dit tumorstroma bestaat uit de extracellulaire matrix (ECM) en uit verschillende niet maligne tumor-geassocieerde gastheercellen, waarbij fibroblasten, myofibroblasten, immuuncellen, inflammatoire cellen en endotheelcellen de belangrijkste zijn (4,6,7). Ook adipocyten, osteoblasten, osteoclasten, myoepitheliale cellen, zenuwcellen en mesenchymale stamcellen behoren tot het tumorstroma. De cellen in het tumorstroma variëren naargelang het tumor type en naargelang de verschillende lokalisaties (8).

Reeds geruime tijd werd vermoed dat het tumorstroma met diens tumor-geassocieerde gastheercellen actieve deelnemers zijn bij kankerinitiatie, -progressie en metastasering (9). Wetenschappelijk onderzoek van de afgelopen 10 jaar heeft keer op keer bevestigd dat de gastheercellen in het stroma rond de tumor inderdaad een belangrijk aandeel hebben bij de tumorigenese en tumorprogressie (10). Telkens is gebleken dat normaal stroma tumorvorming inhibeert of vertraagt, terwijl een tumorstroma net de tumorigenese en de tumorprogressie promoot (10,11). Het onderliggende moleculaire mechanisme hiervan is echter nog niet volledig opgeklaard (10).

De huidige hypothese stelt dat kankercellen met behulp van groeifactoren (zoals ‘basic fibroblast growth factor’ (bFGF), ‘vascular endothelial growth factor’ (VEGF), ‘platelet-derived growth factor’ (PDGF), ‘transforming growth factor β ’ (TGF β), interleukines (IL), etc.) en proteolytische enzymen hun stromale omgeving aanpassen en zo een supportief reactief tumorstroma creëren (4,5,11). De stromale reactie hierop omvat veranderingen van de ECM en aanpassingen van de cellulaire samenstelling van het stroma (4,5,8,11). De proteolytische enzymen veroorzaken namelijk een remodellering van de ECM en de basale membraan, die de migratie en invasie van de kankercellen vergemakkelijkt. Anderzijds induceren de groeifactoren angiogenese en inflammatie. Tevens zullen deze groeifactoren bepaalde stromale celtypes, zoals fibroblasten en adipocyten, activeren waardoor deze op hun beurt ook groeifactoren en proteolytische enzymen vrijstellen (4).

Morfologisch uit de stromale reactie zich in een weefselstructuur die ‘desmoplasie’ wordt genoemd (11). Kenmerkend voor desmoplasie is het verhoogde aantal fibroblasten, de aanwezigheid van myofibroblasten en bepaalde ECM componenten, de degradatie van de basale membraan, de influx van inflammatoire cellen en immuuncellen en de nieuwvorming van bloedvaten en lymfgevaten (4,5,8,11). Vaak wordt desmoplasie vergeleken met het stroma dat men aantreft bij wondheling (8,12).

Functioneel gezien ontstaat er een bidirectionele crosstalk tussen de kankercellen en het omliggende stromale weefsel (4,5,13) (figuur 2). Deze crosstalk gebeurt enerzijds door direct cel-cel contact, maar kan ook op paracriene wijze door gesecreteerde moleculen zoals groeifactoren, cytokines, chemokines, ECM proteïnen, proteïnase, proteïnase inhibitors en lipidenproducten (5,9). Deze communicatie tussen de kankercellen en de tumoromgeving heeft een groot aandeel bij de kankerprogressie. Zo zou het tumorstroma een rol spelen bij de invasiviteit en therapieresistentie van de kankercellen (4,12,13). Voorts hebben de stromale cellen hun aandeel bij metastasering doordat zij op voorhand niches op afstand voorbereiden op de komst van de kankercellen (9). De stromale cellen in de tumor omgeving kunnen tevens de kankercellen voorzien van factoren die hun overleving garanderen. Dit gebeurt bijvoorbeeld door het promoten van anti-apoptische pathways en telomerase activiteit (13). Samenvattend kan gesteld worden dat de gen expressie van het stroma een handtekening is met een klinisch prognostisch voorspellende waarde bij kanker (13,14).



Figuur 2: Het wederzijdse contact tussen normale epitheelcellen en normaal stroma (dunne volle horizontale pijlen) bewaart de integriteit van het epitheliaal weefsel (dikke omhoog wijzende pijl). Tijdens epitheliale carcinogenese is er een veranderde signalisatie vanuit de epitheelcellen (gestreepte horizontale pijl) dewelke kanker-geassocieerde veranderingen veroorzaakt in het stroma. Het wederzijds contact tussen de kankercellen en het tumorstroma (gestreepte horizontale pijlen) stimuleren invasie (dikke naar omlaag wijzende pijl) (5).

2. Borstkanker

2.1 Epidemiologie

Sinds een paar jaar beschikt België over een kankerregister met bij benadering volledige incidentiecijfers van borstkanker (en alle andere kankers) in het hele land. Volgens de cijfers in dit kankerregister (15), waren er in 2008 in België 9697 vrouwen bij wie de diagnose van borstkanker werd gesteld. Een vrouw in België loopt een cumulatief risico van 11,3% om tijdens haar leven borstkanker te ontwikkelen. Haar risico om te overlijden aan de gevolgen van borstkanker wordt geschat op 3,5% (16). Borstkanker is hiermee de meest frequente kwaadaardige tumor bij vrouwen in België. Ook is borstkanker de grootste oorzaak van kankersterfte bij Belgische vrouwen. Hetzelfde geldt bij Europese vrouwen. In 2008 maakte borstkanker respectievelijk 35,3% en 28,2% uit van alle kankers bij Belgische en Europese vrouwen. In datzelfde jaar waren respectievelijk 20,2% en 17% van de kankerdoden bij Belgische en Europese vrouwen te wijten aan borstkanker (15,17).

2.2 Risicofactoren

Er zijn een aantal risicofactoren voor het ontwikkelen van borstkanker (18-20). De belangrijkste risicofactoren zijn een hoge leeftijd en het vrouwelijke geslacht. Borstkanker treft immers vooral vrouwen en dan voornamelijk postmenopauzale vrouwen. Er zijn ook een aantal hormonale risicofactoren zoals een jonge leeftijd bij de eerste menarche, nullipariteit of een late eerste zwangerschap, een late menopauze en een hoge 'lifetime' blootstelling aan oestrogeen. Ook het familiaal voorkomen van kanker ter hoogte van de borst, het ovarium of het endometrium en de aanwezigheid van een mutatie in het BRCA1 of BRCA2 gen zijn negatieve factoren. Voorts zijn goedaardige borstaandoeningen of bestraling ter hoogte van de borst risicofactoren voor het ontwikkelen van borstkanker. Ook levensstijlfactoren, zoals een vetrijk dieet of alcoholgebruik, worden in verband gebracht met borstkanker. Bij postmenopauzale vrouwen is overgewicht een extra risicofactor die de kans op borstkanker met 30 tot 50% zou verhogen (19).

2.3 Karakteristieken van borstkanker

Er bestaan verschillende histologische types borstkanker (16,21). De frequentste is het ductale carcinoma (50-80%). Hierbij ontstaat de tumor in de melkgangen van de borst. Minder frequent is het lobulaire carcinoma (5-15%), waarbij de melkklieren zelf zijn aangetast. De overige types zijn enkele meer zeldzame tumoren zoals het tubulaire carcinoma, het medullaire carcinoma en het mucoïde carcinoma. Wanneer de letsels nog 'in situ' zijn, spreekt men van het ductaal carcinoma in situ (DCIS) en het lobulaire carcinoma in situ (LCIS).

Een borsttumor kan ook immunohistochemisch getypeerd worden (22). Hierbij controleert men enerzijds de aanwezigheid van hormoonreceptoren, meer bepaald de oestrogenreceptoren (ER) en progesteronreceptoren (PR). Anderzijds gaat men na of er sprake is van een overexpressie van het ‘human epidermal growth factor receptor 2’ (Her2 of Neu). Op deze manier bekomt men verschillende subtypes borsttumoren. Wanneer een tumor ER- en PR-negatief is en geen Her2 overexpressie vertoont, spreken we van het ‘triple negatieve’ subtype. Dit subtype heeft de slechtste prognose (22,23).

ER- en/of PR-positiviteit (23) betekent dat de groei van de kankercellen beïnvloed wordt door de desbetreffende hormonen. ER- en PR-positieve tumoren zijn met andere woorden hormoongedreven. Ze hebben een betere prognose doordat ze meestal vrij traag evolutief zijn en goed reageren op antihormonale medicatie en chemotherapie. Her2 overexpressie (of Her2-positiviteit) (23) betekent dat de tumorcellen een uitgesproken invloed zullen ondervinden van het binden van welbepaalde groeifactoren op de Her2 receptor die in overmaat aanwezig is op de borstkankercellen. Hierdoor zal een tumor die Her2-positief is sneller groeien dan tumoren zonder Her2 overexpressie. Op zich is de prognose van een Her2-positieve tumor slechter dan van een Her2-negatieve tumor, maar een behandeling met het monoclonaal antilichaam ‘trastuzumab’¹ kan de prognose bijna gelijk stellen aan deze van de Her2 negatieve tumoren.

Triple negatieve tumoren (23) zijn niet hormoongedreven. Doorgaans ontstaan ze door genetische afwijkingen, bijvoorbeeld door mutaties in proto-oncogenen, tumorsuppressorgenen, genen betrokken bij apoptose of genen betrokken bij DNA herstelmechanismen. Hun prognose is slecht doordat ze meestal agressief zijn van aard en niet goed reageren op chemotherapie. Overigens kan antihormonale therapie noch trastuzumab bij dit type tumoren worden aangewend.

Naast de bovenstaande indeling volgens histologisch en immunohistochemisch type, kan een borsttumor ook worden gekarakteriseerd naargelang de inname van de lymfeklieren ter hoogte van de oksel (N+), de tumorgrootte, het nucleaire pleomorfisme en de DNA ploïdie².

¹ Trastuzumab is een gehumaniseerd monoclonaal antilichaam dat gericht is tegen het extracellulair domein van de Her2-receptor. Het kan als extra therapeutisch middel worden aangewend bij Her2/Neu-positieve tumoren.

² De DNA ploïdie wordt gecontroleerd door met behulp van een microscoop het aantal mitosen te tellen bij een welbepaalde veld diameter.

3. Obesitas

Obesitas, ook adipositas genoemd, wordt gekenmerkt door een overmatige vetophoping die ontstaat doordat de energie inname gedurende een lange tijd groter is dan het energieverbruik (24). De meest gebruikte maat om obesitas uit te drukken, is de 'body mass index'³ (BMI). De WHO beschouwt een BMI tussen 18,5 kg/m² en 24,9 kg/m² als normaal. Een BMI van 25 kg/m² of meer wordt als overgewicht aanzien. Binnen deze categorie zijn er verschillende gradaties: pre-obees (25-29,9 kg/m²), obees klasse I (30-34,9 kg/m²), obees klasse II (35-39,9 kg/m²) en obees klasse III (> 40 kg/m²) (25).

3.1 Epidemiologie

In verschillende delen van de wereld kan obesitas als een epidemie worden beschouwd. De prevalentie zou wereldwijd ruim verdubbeld zijn sinds 1980 (25). In de Verenigde Staten is 31% van de volwassenen obees (26). In Europa varieert de prevalentie van obesitas tussen 8 en 27% van de volwassen bevolking. De cijfers voor België (27) tonen dat 10,7% en 10,2% van respectievelijk de volwassen mannen en vrouwen een BMI heeft hoger dan 30 kg/m² en bijgevolg als obees kan worden beschouwd. 52,1% van de Belgische mannen en 40% van de Belgische vrouwen heeft een BMI hoger dan 25 kg/m², wat duidt op (minstens) overgewicht.

3.2 Vetweefsel

Vetweefsel is een losmazig bindweefsel dat voor 90% uit adipocyten bestaat. Adipocyten zijn cellen die gespecialiseerd zijn in het stockeren van energie in de vorm van triglyceriden⁴. Vetweefsel bestaat echter niet enkel uit adipocyten. Het stroma bevat immers ook macrofagen, fibroblasten, pericyten, bloedcellen, endotheelcellen en mesenchymale stamcellen (28).

Tot voor enkele jaren werd vetweefsel enkel aanzien als een opslagplaats voor overtollige energie (29,30). Recent werd echter aangetoond dat het vetweefsel ook een actief endocrien orgaan is. Zo zou het vetweefsel hormonen en adipokines⁵ produceren en vrijstellen (29-32). Deze stoffen kunnen betrokken zijn bij fysiologische processen, zoals de voortplanting, het hongergevoel of de normale ontwikkeling van de mammaire ducti, maar ze kunnen ook een rol spelen bij het ontstaan en de progressie van bepaalde ziekten, waaronder kanker (30,31).

³ De BMI wordt berekend door het lichaamsgewicht (in kg) te delen door de lengte (in m) in het kwadraat.

⁴ Triglyceriden zijn vrije vetzuren die veresterd zijn met glycerol.

⁵ Adipokines zijn een diverse groep proteïnen die gesynthetiseerd en vrijgesteld worden door het vetweefsel.

3.3 Obesitas en borstkanker

Al sinds de jaren 1970 werd op basis van epidemiologische studies een verband vermoed tussen obesitas en borstkanker (33). Het was epidemiologen namelijk opgevallen dat obese vrouwen in vergelijking met niet-obese vrouwen vaker borstkanker ontwikkelden en daarenboven meer kans hadden op een slechte prognose. Wetenschappelijk onderzoek heeft dit verband tussen obesitas en borstkanker bevestigd. Er werd immers een sterke positieve correlatie aangetoond tussen de BMI en het ontstaan van borstkanker bij postmenopauzale vrouwen⁶ (30,34-36). Het risico verhogend effect van obesitas bij postmenopauzale vrouwen wordt geschat op 30 tot 50% (19). Uit onderzoek is overigens ook gebleken dat obesitas zowel bij pre- als postmenopauzale vrouwen met borstkanker een negatieve invloed heeft op de prognose (37). Hiervoor worden een aantal argumenten aangehaald. Ten eerste is de BMI gecorreleerd met een meer vergevorderd stadium van de tumor bij diagnose. Meer concreet heeft een obese vrouw bij de diagnose in meer gevallen een tumor die groter is dan 2 cm en ook is er vaker reeds inname van de lymfeklieren (38). Ten tweede zijn de borsttumoren bij obese vrouwen vaak agressiever dan bij niet-obese vrouwen (38). Tot slot is de BMI ook geassocieerd met een grotere kans op herval (34,36). Uit de voorgaande negatieve prognostische factoren volgt dat de mortaliteit van obese vrouwen met borstkanker verhoogd is (36). Een zwaarlijvige vrouw met borstkanker heeft in vergelijking met een slanke vrouw 2,5 keer meer kans om binnen de 5 jaar na de diagnose te overlijden (35). Ook na correctie voor het stadium bij diagnose en het type behandeling is de overleving bij obese vrouwen lager dan bij niet-obese vrouwen (36,38).

Wanneer recent onderzoek onthulde dat het vetweefsel in staat is om hormonen en adipokines vrij te stellen (zie § 3.2), werd vermoed dat deze factoren de link vormen tussen obesitas en borstkanker. De vetdepots in het ganse lichaam zijn hierdoor immers in staat om op endocriene wijze tumorigenese en tumorprogressie te bevorderen. Directe interacties tussen de epitheelcellen in de borst en de cellen in het nabijgelegen vetweefsel van de borst kunnen ook op paracriene wijze een rol spelen bij het ontstaan, de groei en de uitzaaiing van een borsttumor (29).

Tot vandaag is het mechanisme echter nog niet volledig opgehelderd. Wel werden er reeds een aantal hypothesen naar voor geschoven. Zo zou obesitas gerelateerd zijn aan veranderingen in het metabolisme van bepaalde hormonen, zoals de oestrogenen en insuline, waardoor het normale evenwicht tussen celproliferatie, celdifferentiatie en apoptose wordt ontregeld. Voorts werden ook reeds een aantal adipokines, waaronder leptine, adiponecine, hepatocyte growth factor (HGF), tumor necrosis factor α (TNF- α) en interleukine 6 (IL-6) in verband gebracht met zowel obesitas als met borstkanker. Deze hypothesen worden hieronder besproken.

⁶ Bij premenopauzale vrouwen kon de correlatie tussen obesitas en het risico op borstkanker niet worden aangetoond (38,41).

Veranderingen in het metabolisme van oestrogenen

De oestrogenen⁷ stimuleren de celdeling van de epitheelcellen in de borst en zijn bijgevolg belangrijk bij de normale borstontwikkeling. Ze hebben echter ook een rol bij de inductie en de groei van borstkanker (38). Het effect op de inductie van borstkanker kan verklaard worden doordat de cellen tijdens de DNA replicatie meer vatbaar zijn voor genetische fouten die, indien ze niet gecorrigeerd worden, kunnen leiden tot een maligne fenotype (38). Door de oestrogenen zijn het aantal celdelingen van de borstepitheelcellen verhoogd en bijgevolg zijn er ook meer DNA replicaties. Hierdoor is de kans op ontarding groter. Het verklaart ook waarom een hoge 'lifetime' blootstelling aan oestrogenen een risicofactor is voor het ontstaan van borstkanker (zie ook § 2.2). Het effect van de oestrogenen op de groei van borsttumoren wordt verklaard doordat de oestrogenen ook de celdeling stimuleren van borstkankercellen, op voorwaarde dat deze oestrogeenreceptoren bezitten (29). Het gevolg is dat de borstkankercellen meer prolifereren en bijgevolg zal de tumor sneller groeien.

Obesitas beïnvloedt de synthese en biologische beschikbaarheid van de oestrogenen. Zo zal bij obesitas de productie van oestrogenen verhoogd zijn en tevens zal er een verhoogde biologische beschikbaarheid zijn van de oestrogenen.

Oestrogenen worden geproduceerd door conversie van androgenen. Het aromatase enzyme zet het androstenedione om in estron (E1) dewelke vervolgens door het 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase kan worden omgezet in estradiol (E2). Bij premenopauzale vrouwen zijn de ovariële granulosa cellen de belangrijkste bron van het aromatase. Het aromatase komt echter ook voor in het vetweefsel, de spieren en de lever. Bij postmenopauzale vrouwen zijn de ovaria niet langer in staat om oestrogenen te produceren. Het aromatase in het vetweefsel is vanaf dan de belangrijkste bron van de oestrogenen. Het zijn voornamelijk de ongedifferentieerde pre-adipocyten in het vetweefsel die de expressie van aromatase stimuleren. Ook het 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase komt voor in het vetweefsel. Het vetweefsel is met andere woorden volledig uitgerust om estron en estradiol te produceren. Hoe hoger het totale lichaamsvet, des te meer oestrogeen er kan worden geproduceerd (29,35,36,39-41).

Obesitas heeft niet enkel invloed op de productie, maar ook op de biologische beschikbaarheid van oestrogenen. Obesitas is namelijk omgekeerd gecorreleerd aan het serum gehalte van 'sex hormone binding globulins' (SHBGs). De SHBGs binden (onder andere) aan de oestrogenen, waardoor deze niet op de ER kunnen binden. SHBGs kunnen daarenboven ook de estradiol geïnduceerde proliferatie van borstkanker inhiberen en hebben op die manier een anti-proliferatieve functie (29). Wanneer het SHBGs gehalte gedaald is, wat het geval is bij obesitas, zal er meer functioneel oestrogeen beschikbaar zijn en is minder anti-proliferatieve regulatie (29,37,38).

⁷ Er bestaan verschillende types oestrogenen. De belangrijkste natuurlijke oestrogenen zijn estron (E1), estradiol (E2) en estriol (E3). Estradiol is het oestrogeen met de sterkste werking.

Veranderingen in het metabolisme van insuline en IGF-I

Insuline is een hormoon met een belangrijke rol in de normale glucose regeling. Het zorgt er enerzijds voor dat de glucose uit het bloed wordt opgenomen in de spieren en andere weefsels, waar het vervolgens wordt omgezet in energie of wordt opgeslagen als glycogeen. Anderzijds remt het ook de gluconeogenese in de lever. Insuline heeft naast zijn rol bij de glucose regeling echter ook een anti-apoptotisch en mitogeen effect op verschillende celtypen, waaronder ook de epitheliale cellen in de borst (41). Deze tumorbevorderende werking wordt op verschillende manieren bekomen.

Ten eerste kan insuline binden op de insuline receptoren van (pre-)neoplastische doelwitcellen, hetgeen zal leiden tot fosforylatie van 'insuline receptor substraat' (IRS) eiwitten. Deze gefosforyleerde IRS eiwitten zullen op hun beurt verschillende cascades activeren, waaronder de 'phosphatidyl-inositol 3 kinase' (PI3K) en 'mitogen activated protein kinase' (MAPK) signaalcascade (29,42). Via deze cascades krijgen de maligne of pre-maligne cellen mitogene en anti-apoptotische signalen.

De tumorigene effecten kunnen echter ook ontstaan doordat insuline de expressie van SHBGs en de 'insuline like growth factor binding proteins' (IGFBPs) verlaagt (43), waardoor de biologische beschikbaarheid van zowel oestrogeen als 'insuline like growth factor I' (IGF-I) verhoogt (29,39,41). De effecten van oestrogeen op borstkanker werden hierboven reeds besproken. IGF-I heeft net als insuline een mitogeen en anti-apoptotisch effect op de epitheelcellen in de borst (29,34). Wanneer IGF-I bindt op de IGF-I receptoren, zal via fosforylatie van IRS eiwitten uiteindelijk de PI3K en MAPK signaalcascades geactiveerd worden (29,42). IGF-I kan overigens synergistisch samenwerken met andere groeifactoren om zo tumorgroei en angiogenese te bevorderen (29,42).

Tot slot kan insuline ook op synergistische wijze interageren met de mitogene pathways van oestrogeen. Hetzelfde geldt overigens ook voor IGF-I. Onderzoek heeft namelijk aangetoond dat de mitogene activiteit van estradiol in vitro hoger is wanneer ook insuline of IGF-I aanwezig is (29,37).

Onderzoek kon een verband aantonen tussen borstkanker en het nuchtere insuline gehalte in het serum. Een hoger insuline gehalte bleek namelijk gecorreleerd met een verhoogd risico op borstkanker en ook met een slechtere prognose (34,40). Daarenboven kon worden aangetoond dat maligne of premaligne cellen vaker een overexpressie vertonen van insuline receptoren (44). Ook de betrokkenheid van IGF-I bij borstkanker werd bekrachtigd. Onderzoek toonde immers aan dat bij de meeste kankers, waaronder ook postmenopauzale borstkanker, er een toegenomen concentratie was van circulerend IGF-I (45). Een andere studie kon aantonen dat bij ongeveer de helft van alle primaire borsttumoren de kankercellen een overexpressie vertonen van IGF-I receptoren. Bij inactivatie van deze IGF-I receptoren kon de tumorgroei en metastasering in vivo worden afgeremd (29).

Obesitas gaat vaak gepaard met insuline resistentie⁸ en hyperinsulinemie (29,38,44). Meer insuline (en hierdoor ook meer IGF-I) betekent een groter mitogeen en anti-apoptotisch potentieel. Bijgevolg kan de hyperinsulinemie bij obesitas een verklaring zijn voor de betrokkenheid van obesitas bij het ontstaan en de prognose van borstkanker.

Veranderingen in adipokine productie

Adipokines bestaan uit een diverse groep proteïnen, zoals signaalmoleculen en cytokines, die gesynthetiseerd en vrijgesteld worden door het vetweefsel (zie § 3.2) (40,44). Celis et al. identificeerden 359 proteïnen die door het vetweefsel van de borst worden vrijgesteld (35,40,46). De adipokines worden voornamelijk geproduceerd door de adipocyten, maar ook de andere celtypen in het vetweefsel kunnen adipokines produceren (29,40). De productie en secretie van bepaalde adipokines staan duidelijk in relatie tot de BMI (40). Zo stijgt de serumconcentratie van leptine, HGF, TNF- α en IL-6 naargelang de BMI stijgt, terwijl de serumconcentratie van adiponectine gedaald is bij een hogere BMI (29,40). Onderzoek heeft aangetoond dat de verschillende adipokines een rol spelen bij borstkanker. Ze kunnen immers op endocriene of paracriene wijze invloed uitoefenen op de tumorcellen (40).

Leptine

Het eerste adipokine dat werd onderzocht is leptine. Het is een neuro-endocriene proteïne die voornamelijk door adipocyten wordt geproduceerd. De leptine productie is evenredig met de BMI (29) en hierdoor is obesitas gecorreleerd met hyperleptinemie (29,47).

Leptine heeft een ruim scala aan biologische activiteiten (36,40). Zo speelt het een rol bij de fysiologische regulatie van eetlust, botaanmaak, reproductieve functies en angiogenese (29,48,49). Onderzoek toonde echter ook een verband aan tussen leptine en het ontstaan, de proliferatie en de prognose van borsttumoren (34,36,37,48). Volgens een aantal studies is een verhoogd leptine gehalte in het bloed gecorreleerd met een hoger borstkankerrisico (40). Uit een ander onderzoek bleek dat het leptine gehalte in het bloed bij vrouwen met borstkanker hoger is dan bij gezonde vrouwen (29). Ook kon worden aangetoond dat de mRNA expressie van leptine in het vetweefsel rondom de tumor verhoogd is (49). Borsttumoren met leptine receptoren waarbij ook een verhoogde expressie is van leptine hebben volgens onderzoekers meer kans op uitzaaiing en ze zijn bovendien vaak slechter gedifferentieerd (36,40,50).

⁸ Bij insuline resistentie wordt de insuline nog steeds aangemaakt, maar de doelweefsels zijn minder gevoelig geworden. Het gevolg is dat de glucose onvoldoende in de cellen wordt opgenomen en het glucosegehalte in het bloed toeneemt. Het lichaam probeert dit te compenseren door een hogere productie van insuline door de pancreas, met hyperinsulinemie als gevolg.

Het effect van leptine bij borstkanker is voornamelijk gebaseerd op het ondersteunen van de signaalcascades van oestrogeen (29,35,37,40,42,44). Volgens onderzoek verhoogt leptine de hoeveelheid en ook de werking van aromatase, waardoor het oestradiolgehalte in het serum stijgt. Daarenboven stimuleert leptine ook de expressie van de oestrogeenreceptoren.

In vitro onderzoek heeft ook een direct proliferatief effect aangetoond van leptine bij ER-negatieve cellijnen. Wanneer leptine bindt op een leptine receptor, zullen bepaalde mitogene signaalcascades, zoals de PI3K en MAPK cascade, geactiveerd worden (35,40,49). Daarenboven zullen de apoptotische signaalcascades onderdrukt worden (35,40). Leptine stimuleert overigens de angiogenese op synergistische wijze met VEGF (34-37,40,44,47,48). Voorts interfereert leptine ook met de insuline gevoeligheid (29,44).

Adiponectine

Een ander adipokine dat reeds werd onderzocht is het adiponectine. Dit adipokine wordt uitsluitend door adipocyten geproduceerd. De synthese van adiponectine door de adipocyten wordt geïnhibeerd bij toename van de vetconcentratie in de adipocyten (29,40). Er is met andere woorden een negatieve correlatie tussen de BMI en de adiponectine productie (29). Bij obesen is het serumgehalte bijgevolg lager dan bij niet-obesen (29).

De fysiologische functies van adiponectine zijn van velerlei aard. Zo zorgt adiponectine voor een verbeterde insuline gevoeligheid (40,44,47,50). Het verlaagt namelijk de gluconeogenese in de lever en het verhoogt de glucose opname in de spieren (29,47). Voorts heeft het een inhiberend effect op inflammatoire processen doordat het de TNF- α productie door de macrofagen verlaagt (29,40,44). Onderzoek toonde ook een omgekeerd verband aan tussen adiponectine en het risico op het ontwikkelen van borstkanker (40,51). Ook de prognose van borsttumoren is invers gecorreleerd met het adiponectine serumgehalte (29,51).

Het omgekeerde verband tussen adiponectine en borstkanker kan worden verklaard door een aantal mechanismen. In de eerste plaats interageert adiponectine met de oestrogeen geïnduceerde initiatie en groeistimulatie van borstkanker (35,40). Een hoog adiponectine serumgehalte is bijvoorbeeld gecorreleerd met een verlaagde hoeveelheid aromatase en oestrogeenreceptoren (35).

Het anti-proliferatieve effect van adiponectine komt in vitro echter zowel bij ER-positieve als bij ER-negatieve borstkankercellen voor. Dit suggereert dat de invloed van adiponectine niet enkel kan verklaard worden aan de hand van het onderdrukken van de oestrogeen signaalcascades (35). Adiponectine heeft namelijk ook een anti-proliferatief effect doordat na binding met de adiponectine

receptoren de anti-proliferatieve signaalcascades, 'AMP⁹-activated proteïne kinase' (AMPK) en 'peroxisome proliferator-activated receptor γ ' (PPAR γ), geactiveerd worden (29,44). Op deze manier onderdrukt adiponectine eveneens de proliferatie van de vasculaire endotheliale cellen met een verminderde neoangiogenese als gevolg (40,50,51). De PPAR γ signaalcascade heeft bovendien ook een positieve invloed op de DNA herstelmechanismen. Dit verklaart mogelijks waarom een laag adiponectine gecorreleerd is met een hoger risico op het ontstaan van borstkanker. Tot slot stimuleert adiponectine ook de apoptose van verschillende celtypes (40).

Hepatocyte growth factor

Ook HGF is een adipokine, aangezien het voornamelijk wordt geproduceerd in de adipocyten en fibroblasten van het vetweefsel (29,40). De productie ervan is recht evenredig met de BMI (29,40) en bijgevolg is het HGF serumgehalte hoger bij obesen in vergelijking met niet-obesen.

Het HGF is van belang bij de embryonale orgaanontwikkeling, de regeneratie van organen en de wondheling. Dit komt doordat het HGF mitogenese, celmotiliteit en matrixinvasie kan stimuleren. Hierdoor speelt het echter ook een rol bij tumorigenese.

De migratie van tumorcellen in vitro wordt bevorderd door HGF. In vitro stimuleert HGF tevens de proliferatie van de vasculaire endotheelcellen waardoor de angiogenese van de tumor toeneemt (29,40). Er is bovendien een significant verband aangetoond tussen een hoog HGF serumgehalte en een vergevorderd stadium van de borsttumor (29,40).

Tumor necrosis factor α

TNF- α was het eerste inflammatoire cytokine dat als adipokine werd geïdentificeerd. Het wordt geproduceerd door de adipocyten en macrofagen in het vetweefsel (40). Ook in fysiologische omstandigheden wordt TNF- α in grote hoeveelheden geproduceerd. De productie is positief gecorreleerd met obesitas (29). Naarmate de BMI stijgt, worden er immers meer TNF- α producerende macrofagen gerecruteerd in het vetweefsel (40).

TNF- α heeft een rol bij normale apoptose en bij de synthese van bepaalde cytokines, waaronder IL-6. Het is echter ook betrokken bij tumorigenese, enerzijds door stimulatie van aromatase expressie in het vetweefsel, waardoor de oestrogeenproductie stijgt (29,40), en anderzijds door inhibitie van de insuline receptor signaalcascade, waardoor de ontwikkeling van insulineresistentie wordt bevorderd (29).

⁹ AMP is de afkorting van 'adenosine monofosfaat'. Het AMP bestaat uit een fosfaat-, een ribose- en adeninemolecule.

Interleukine 6

IL-6 is net als TNF- α een inflammatoir cytokine en het wordt eveneens geproduceerd door de adipocyten en macrofagen in het vetweefsel (29). Bij obesitas en bij insulineresistentie zijn zowel het serumgehalte als de expressie van IL-6 in het vetweefsel verhoogd (29).

IL-6 heeft een belangrijke rol bij de normale immuunrespons (29). Er zijn echter ook argumenten om aan te nemen dat IL-6 betrokken is bij het ontstaan en de progressie van borstkanker. Onderzoekers konden namelijk een verhoogde IL-6 expressie aantonen in het vetweefsel rondom een borsttumor (29). Een andere studie kon een correlatie aantonen tussen een verhoogd IL-6 serumgehalte en een meer agressief borstcarcinoom (29,50). Daarnaast bleek ook dat IL-6 een pro-invasief effect heeft op de borstkankercellen in vitro (29,30).

Het effect van IL-6 op borstkanker is grotendeels gebaseerd op de inductie van de aromatase activiteit waardoor de oestrogeen synthese wordt gestimuleerd (29). IL-6 stimuleert echter ook migratie via activatie van de MAPK signaalcascade (29). Tevens kan IL-6 anti-apoptotische cascades activeren (29). Tot slot verhoogt een IL-6 gemedieerde chronische systemische inflammatie op zich ook het risico op herval (29).

Hoofdstuk 2: Doelstelling

Borstkanker kent een hoog voorkomen in Westerse landen. In België loopt een vrouw een cumulatief risico van 11,3% om tijdens haar leven borstkanker te ontwikkelen.

Ook obesitas kent in onze streken een hoge prevalentie. Het is een aandoening die wordt gekenmerkt door een overmatige vetophoping in het lichaam. Onderzoek heeft uitgewezen dat de excessieve hoeveelheid lichaamsvet bij obesitas op verschillende manieren bijdraagt tot tumorigenese en tumorprogressie van borstkanker. Enerzijds is obesitas gelinkt aan een verhoogde productie van oestrogenen en insuline, maar daarnaast produceert het vetweefsel ook een groot aantal adipokines die allen potentieel een invloed kunnen uitoefenen op borstkanker. Dit maakt obesitas tot een belangrijke risicofactor voor het ontstaan van borstkanker bij postmenopauzale vrouwen. Daarenboven heeft het ook een negatieve invloed op de prognose bij zowel pre- als postmenopauzale vrouwen met borstkanker.

Kanker bestaat niet louter uit een primaire tumor maar het vormt een tumor-ecosysteem dat opgebouwd is uit maligne kankercellen enerzijds en het stroma dat gelegen is rond de tumor anderzijds. Ter hoogte van de borst is er een unieke situatie waarbij het borstepitheel volledig omgeven is door een vetweefsel stroma. Uit het onderzoek naar de invloed van obesitas op borstkanker is gebleken dat het vetweefsel in staat is om verschillende adipokines te secreteren. Hierdoor kan het vetweefsel van de borst op paracrine wijze communiceren met de nabijgelegen borstkankercellen. Er kan bijgevolg vermoed worden dat het vetweefsel in de borst, ongeacht of er ook sprake is van obesitas, eveneens een rol speelt bij de verschillende stadia van borstkanker.

Het doel van deze scriptie is nagaan wat het effect is van de verschillende factoren die door het tumor-geassocieerde vetweefsel van de borst worden vrijgesteld op enkele aspecten van borstkankerprogressie. Meer concreet is het de bedoeling om te onderzoeken welke invloed deze factoren hebben op de morfologie, de proliferatie en de invasie van borstkankercellen in vitro.

Hoofdstuk 3: Materiaal en methoden

1. In vitro materiaal

1.1 Cellijnen

Er werd gebruik gemaakt van twee verschillende borstkankercellijnen, meer bepaald T47D en MDA MB 231.

De T47D cellen (52,53) zijn epitheliale borstkankercellen die in 1979 geïsoleerd werden uit het pleurale vocht van een geïnfiltrerd ductaal borstcarcinoom bij een 54 jarige vrouw. De cellen hebben een epitheliale morfologie en in cultuur vormen ze een monolaag. Het zijn goed gedifferentieerde cellen en ze worden beschouwd als niet-invasief. Ze zijn positief voor zowel ER als PR. Daarnaast bezitten ze ook receptoren voor een aantal andere steroïden en calcitonine.

De MDA MB 231 cellijn (54,55) werd in 1973 geïsoleerd uit het pleurale vocht van een geïnfiltrerd ductaal borstcarcinoom bij een 51 jarige vrouw. Hoewel het epitheliale cellen zijn, hebben ze fenotypisch ook mesenchymale kenmerken. Morfologisch zijn ze gekenmerkt door een langwerpige vorm. Anders dan de T47D cellen zijn de MDA MB 231 cellen slecht gedifferentieerd en worden ze beschouwd als een invasieve cellijn. Ook in tegenstelling tot de T47D cellijn zijn ze ER- en PR-negatief. Ze bezitten daarentegen wel receptoren voor groeifactoren die tumorigenese bevorderen, meer bepaald 'epidermal growth factor receptor' (EGFR) en 'transforming growth factor α receptor' (TGFR α).

1.2 Groeimedium

In het groeimedium zitten alle voedingsstoffen die de cellen nodig hebben om te kunnen overleven en prolifereren. Deze voedingsstoffen zijn bijvoorbeeld essentiële en niet-essentiële aminozuren, vitaminen, zouten, nucleïnezuren, etc. Aan het groeimedium wordt ook een pH indicator, meer bepaald fenolrood, toegevoegd. Deze pH indicator maakt het mogelijk om visueel na te gaan wanneer de voedingsstoffen in het groeimedium zijn opgebruikt. Bij een pH hoger dan 7 kleurt het medium paars. Bij een neutrale pH verandert de kleur van het medium in oranje en bij een pH lager dan 7, wat duidt op uitputting van het groeimedium, kleurt het medium geel.

Het groeimedium dat wordt gebruikt, is het serumhoudend DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) (Gibco, Life Technologies, Gent, België). Dit bestaat uit DMEM aangevuld met 10% Fetal Calf Serum (FCS). Hieraan wordt ook een antibiotica-mengsel toegevoegd, meer bepaald 1% Penicilline-Streptomycine-Fungizone (PSF).

1.3 Geconditioneerd medium (CM)

Er wordt vetweefsel geïsoleerd uit borsten die werden geamputeerd omwille van een borsttumor. Het geïsoleerde vetweefsel wordt 3 maal gewassen in steriele PBS D-. Zichtbare bloedvaten en stukken bindweefsel worden verwijderd. Het vetweefsel wordt in kleine stukjes versneden en per well van een 6-well plaat wordt 0,5 g vetweefsel toegevoegd aan 2 ml medium, meer bepaald DMEM F12 met 0,5% Bovine Serum Albumin (BSA). Dit medium bestaat uit een 1:1 verhouding van het klassieke DMEM medium en de Ham's F-12 nutrient mix (Gibco, Life Technologies, Gent, België). Hieraan werd 0,5% BSA (Life Technologies, Gent, België) toegevoegd. De 6-well plaat wordt gedurende 24 uur op een shaker geplaatst bij 37 °C en 5% CO₂. Vervolgens wordt het medium uit de wells overgebracht in tubes van 50 ml. Dit medium bevat nu de factoren die het vetweefsel gedurende 24 uur vrijstelde. De tubes met het medium worden gedurende 15 minuten gecentrifugeerd aan 1.000 toeren per minuut. Hierdoor zal het medium zich in 3 fasen verdelen. De bovenste laag vetdruppels wordt verwijderd. De middelste laag is het geconditioneerd medium (CM). De onderste laag bevat celdebris. Tot slot wordt het geconditioneerd medium gefilterd (0,2 µm) en per 1,5 ml in steriele eppjes overgebracht. Deze eppjes worden bewaard bij -80 °C.

1.4 Controle medium (CON)

Als controle medium wordt gebruik gemaakt van DMEM F12 met 0,5% BSA. Dit is immers ook het medium dat als basis diende voor de aanmaak van het geconditioneerd medium (zie § 1.3).

2. Celcultuur

Alle handelingen worden uitgevoerd onder een laminar air flow (LAF) -kast. Voorts wordt ook telkens gebruik gemaakt van steriel materiaal. De sterilisatie duurt 2 uur en gebeurt bij 120 °C.

2.1 Materiaal

- Moscona (1 l): 8 g NaCl + 0,3 g KCl + 0,05 g Na₂HPO₄·H₂O + 0,025 g KH₂PO₄ + 1 g NaHCO₃ + 2 g D(+) glucose + aanlengen tot 1 liter met aqua dest + op pH 7,0 - 7,4 brengen met 1 M HCl.

- Trypsine/EDTA oplossing (1 l): 0,5 g trypsin + 0,2 g Na₄EDTA + aanlengen tot 1 liter met CMF-HBSS (Ca²⁺ and Mg²⁺ free Hank's buffered salt solution).

- CMF-HBSS (Ca²⁺ and Mg²⁺ free Hank's buffered salt solution) (1 l): 8 g NaCl + 0,4 g KCl + 0,06 g KH₂PO₄ + 0,112 g Na₂HPO₄·12H₂O + 0,35 g NaHCO₃ + aanlengen tot 1 liter met aqua dest + op pH 7,4 brengen met 2 M NaOH.

- LAF kast: Laminar air flow Gelaire, Gelman Laboratories, Milaan, Italië.

- Sterilisator: Memmert SFB500, Schwabach, Duitsland.

- Cultuurflessen: Sarstedt, Essen, België.

- Incubator 10% CO₂: Forma Scientific, Life Sciences International, Zellik, België.

- Incubator 5% CO₂: Binder C150, Binder GmbH, Tuttlingen, Duitsland.

- Centrifuge: Sorvall RT 6000D, Goffin-Meyvis A&M systems, Hoeilaert, België.

- Lichtmicroscop: Wild Heerbrugg, Leitz, Zwitserland.

- Fase-contrast-microscop: Leica DMI 3000B, Leica Microsystems, Groot-Bijgaarden, België.

- Software: Axiovision 4.5, Zeiss, Zaventem, België.

- Software: Leica application software (LAS) v3.80, Leica, Groot-Bijgaarden, België.

- Waterstraalpompe: Vacuboy, Integra biosciences, Chur, Zwitserland.

- Cell counter, chamber slides en trypaan blauw (0,4%): Countess, Life Technologies, Gent, België.

- Bürker telkamer: Brand GmbH, Wertheim, Duitsland.

2.2 Ontdooien van cellen

Een reserve aan cellen wordt in ampoules bewaard in vloeibare stikstof (bij $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Om de cellijn opnieuw in cultuur te brengen, wordt de gewenste ampoule ontdooid op kamertemperatuur. Zodra de inhoud van de ampoule ontdooid is, wordt deze opgezogen en toegevoegd aan een tube die groeimedium bevat. Vervolgens wordt deze tube gedurende 5 minuten gecentrifugeerd aan 1.000 toeren per minuut. Het bovenstaande medium wordt met de waterstraalpompe afgezogen tot net boven de cellen die onderaan de tube liggen. Er wordt 5 ml groeimedium toegevoegd. De bekomen celsuspensie wordt verdeeld in 2 plasticen falcons (ook wel cultuurflessen genoemd) met elk een oppervlakte van 25 cm^2 . De ene falcon krijgt 1 ml (1:5) en de andere falcon 4 ml (4:5). Beiden worden daarna aangelengd met groeimedium tot iedere falcon 5 ml celsuspensie bevat. De falcons worden bewaard in een incubator bij een temperatuur van $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en een CO_2 -gehalte van 5% of 10%. De vochtigheidsgraad in de incubator is 100%. Daags na het ontdooien wordt de toestand van de cellen gecontroleerd.

2.3 Verversen van cellen

Bij het verversen van het medium worden de dode cellen verwijderd met de waterstraalpompe en worden de cellen voorzien van nieuw groeimedium. Daarna worden de cellen opnieuw in de incubator geplaatst bij $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 5% of 10% CO_2 . Het groeimedium wordt best om de 2 tot 3 dagen ververs.

2.4 Splitsen van cellen

Wanneer de kankercellen een confluyente monolaag hebben gevormd over het volledige oppervlakte van de falcon zullen ze elkaar verdringen. Om een goede groei toe te laten moeten de cellen worden gesplitst zodat de densiteit per falcon opnieuw lager is. Bij het splitsen van de cellen worden de cellen losgemaakt van de bodem en van elkaar om daarna in nieuwe falcons te worden verdeeld. Het verbreken van de cel-cel contacten verloopt in 2 stappen. In een eerste stap worden de cellen behandeld met moscona, een fysiologische zoutoplossing zonder Ca^{2+} . Moscona verwijdert enerzijds het overgebleven serum, maar anderzijds onttrekt het ook Ca^{2+} uit de cel-cel verbindingen. Aangezien Ca^{2+} een cofactor is die de integriteit bestendigt van de extracellulaire domeinen van een aantal belangrijke proteïnen die instaan voor de cel-cel adhesie, zal behandeling van de cellen met moscona resulteren in een verzwakte cel-cel adhesie. In tweede instantie worden de cellen gedurende 10 seconden behandeld met het protease trypsine/EDTA (ethyleen diamine tetra-azijnzuur). Het gevolg is een terminatie van de cel-cel en cel-matrix contacten door afbraak van de extracellulaire domeinen van de adhesieproteïnen. De trypsine wordt zo goed als volledig afgezogen en de cellen worden vervolgens gedurende een korte tijd geïncubeerd bij $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Regelmatig wordt met behulp van de microscoop gecontroleerd of de cellen reeds zijn losgekomen van het substraat. Wanneer dit het geval

is, wordt 5 ml serumhoudend groeimedium aan de falcon toegevoegd. In het serumhoudend medium zijn intrinsieke factoren aanwezig die de proteasewerking van trypsine inhiberen. Een te langdurige behandeling met trypsine is immers schadelijk voor de cellen. Vervolgens worden de cellen gesuspenseerd tot een homogene celsuspensie wordt bekomen. Deze celsuspensie wordt verdeeld in nieuwe falcons die telkens met groeimedium worden aangelengd tot 5 ml.

2.5 Cellen tellen

Een Bürker telkamer wordt bereid door een dekglasje te bevochtigen en het op de glazen telkamer aan te brengen. Het verschijnen van Newtonringen betekent dat het dekglasje correct is aangebracht. In de Bürker telkamer wordt 2 maal 5 μ l celsuspensie gebracht. Onder de lichtmicroscopie wordt vervolgens het aantal cellen geteld per 25 telvakjes van de Bürker telkamer. Om het aantal cellen per ml te bekomen dient het aantal cellen per 25 telvakjes vermenigvuldigd te worden met 10^4 .

Cellen kunnen ook geteld worden met behulp van de 'cell counter', een toestel dat de cellen automatisch telt. Op een 'chamber slide', een plastieken telkamer, wordt een mengsel van 10 μ l celsuspensie en 10 μ l trypaan blauw toegevoegd. Vervolgens wordt de chamber slide in het toestel gebracht. Eerst wordt ingezoomd en scherp gesteld op de cellen en vervolgens kan het toestel de cellen tellen. Een belangrijk voordeel van deze methode is dat ook het aantal levende cellen kan worden weergegeven. Het nadeel van dit toestel is dat een accuraat resultaat pas gegarandeerd is vanaf 100.000 cellen per ml.

3. Morfologie test

3.1 Principe

Aan de hand van de morfologie van de cellen kan worden afgeleid hoe de cellen zich voelen in hun milieu. De vorm van de cellen is ook een indicatie voor de agressiviteit van de cellen. Door de morfologie te vergelijken tussen kankercellen die werden behandeld met verschillende media, kan men nagaan in welk medium de cellen het beste aarden. Men kan ook nagaan of een bepaalde behandeling morfologische veranderingen teweegbrengt bij de cellen in vergelijking met een controle medium.

3.2 Materiaal

Naast het geconditioneerd medium, het controle medium en het nodige materiaal voor celcultuur (zie § 2.1) zijn geen andere producten vereist.

3.3 Methode

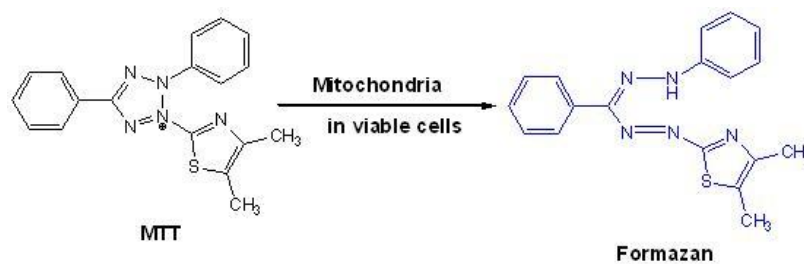
De cellen worden op dezelfde manier losgemaakt als bij het splitsen van cellen (zie § 2.4). Een celsuspensie in serumhoudend DMEM PSF wordt vervolgens uitgezaaid in 3 verschillende falcons van 25 cm². Wanneer de cellen zich de volgende dag op de bodem van de falcon hebben vastgehecht, worden de cellen 3 maal gewassen met serumvrij DMEM PSF. Vervolgens worden ze behandeld¹⁰; 1 falcon (CON) met 4 ml controle medium en 1 falcon (CM) met een mengsel van 2 ml geconditioneerd medium en 2 ml controle medium. Na 2 dagen worden de cellen bekeken onder de fase-contrast-microscop om (eventuele) morfologische veranderingen vast te stellen.

¹⁰ In alle testen wordt de CM-groep behandeld met het CM dat voor de helft werd aangelengd met controle medium. De CON-groep wordt enkel met controle medium behandeld.

4. MTT-test

4.1 Principe

De MTT-test is een colorimetrische test waarbij de celactiviteit gemeten wordt. Geel gekleurd MTT reagens, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromide, wordt door de mitochondriale reductasen in metabool actieve cellen gereduceerd tot paarse formazankristallen (figuur 3). Het oplosmiddel dimethylsulfoxide (DMSO) laat toe de formazankristallen op te lossen. De optische densiteit van de ontstane kleur wordt gemeten met de spectrofotometer bij 570 nm.



Figuur 3: Omzetting van MTT-reagens tot formazan door het mitochondriale reductase in de cellen (56).

Aangezien de reductie van het gele MTT reagens tot de paarse formazankristallen enkel kan plaatsvinden door actieve mitochondriale reductase enzymen, zal de gemeten kleurintensiteit evenredig zijn met de metabole activiteit van de mitochondriën van de cellen. Hiermee is de gevormde hoeveelheid formazan ook een indirecte indicatie van het aantal levende cellen.

Door de hoeveelheid formazan geproduceerd door de cellen die behandeld werden met controle medium te vergelijken met de hoeveelheid formazan geproduceerd door de cellen die behandeld werden met geconditioneerd medium, kan de eventuele invloed van het geconditioneerd medium op de proliferatie van de cellen worden afgeleid. Een hogere optische densiteit betekent immers dat de metabole activiteit ook hoger is en dit is een indirecte indicatie voor een hoger aantal cellen.

4.2 Materiaal

- MTT oplossing (100 ml): 500 mg MTT kleurstof (Sigma-Aldrich, Bornem, België) wordt opgelost in 100 ml PBS D+ (zie § 6.2) en dit wordt gefilterd (0,2 µm).
- DMSO: Acros Organics, Geel, België.
- 96-well platen: Nunc, VWR, Heverlee, België.
- Spectrofotometer: Paradigm detection platform, Beckman Coulter, Life Technologies, Gent, België.
- Software: Multimode detection software, Beckman Coulter, Life Technologies, Gent, België.

4.3 Methode

Voor het uitzaaien in een 96-well plaat worden de cellen op dezelfde manier losgemaakt als bij het splitsen van cellen (zie § 2.4). Met behulp van de cell counter wordt het aantal levende cellen per ml medium bepaald. Per well wordt een suspensie uitgezaaid van 5.000 cellen in 200 µl serumhoudend DMEM PSF. Wanneer de cellen zich de volgende dag op de bodem van de wells hebben vastgehecht, worden de ze 3 maal gewassen met serumvrij DMEM PSF. Vervolgens worden de cellen behandeld; 5 wells (CON) met controle medium en 5 wells (CM) met geconditioneerd medium. De dag waarop de cellen voor het eerst worden behandeld is 'dag 0'. Drie dagen erna, op 'dag 3', worden beide reeksen (CON en CM) opnieuw behandeld.

Op 'dag 7' wordt de 96-well plaat uitgelezen. Hiervoor wordt aan elke well 40 µl MTT oplossing toegevoegd. Vervolgens wordt de 96-well plaat in aluminiumpapier gewikkeld en gedurende 2 uur in de incubator geplaatst bij 37 °C en 10% CO₂. Daarna wordt het medium met de MTT oplossing verwijderd. De gevormde paarse formazankristallen op de bodem van de wells worden opgelost in 200 µl DMSO. Tenslotte wordt de absorptie van het gevormde formazan gemeten bij 570 nm met behulp van de spectrofotometer. De resultaten kunnen met behulp van Excel in een grafiek worden weergegeven.

5. Proliferatietest

5.1 Principe

Met behulp van een proliferatietest kan worden nagegaan in welke mate de cellen in aantal toenemen over een verloop van meerdere dagen. Hierbij kan de proliferatie bij een controle groep worden vergeleken met de proliferatie bij een behandelde groep. Indien zou blijken dat de proliferatie in sterkere mate is toegenomen of afgenomen bij een behandelde groep, kan hieruit worden afgeleid dat de desbetreffende behandeling respectievelijk proliferatie stimulerende of afremmende agentia bevat.

5.2 Materiaal

Naast het geconditioneerd medium, het controle medium en het nodige materiaal voor celcultuur (zie § 2.1) zijn geen andere producten vereist.

5.3 Methode

De cellen worden op dezelfde manier losgemaakt als bij het splitsen van cellen (zie § 2.4). Vervolgens wordt met behulp van de cell counter het aantal levende cellen per ml medium bepaald. Er worden 6 falcons aangemaakt met elk 100.000 levende cellen in 4 ml groeimedium. Wanneer de cellen zich de volgende dag op de bodem van de falcons hebben vastgehecht, worden de cellen 3 maal gewassen met serumvrij DMEM PSF. Vervolgens worden ze behandeld; 3 falcons (CON) met controle medium en 3 falcons (CM) met geconditioneerd medium. De dag waarop de cellen voor het eerst worden behandeld is 'dag 0'. Drie dagen erna, op 'dag 3', wordt uit beide reeksen (CON en CM) 1 falcon uitgelezen, wat betekent dat het aantal cellen in beide falcons wordt geteld. De resterende falcons worden opnieuw behandeld zoals op dag 0. Op dag 6 wordt dezelfde procedure herhaald. Op dag 9 worden de laatste 2 falcons uitgelezen. Het aantal cellen op dag 0, dag 3, dag 6 en dag 9 kan vervolgens met behulp van Excel in een grafiek worden weergegeven.

6. Western Blot

6.1 Principe

Met behulp van de Western Blot techniek kan een specifiek cellulair eiwit worden gedetecteerd en gekwantificeerd. Hierdoor is het mogelijk om een kwantitatieve vergelijking te maken van bepaalde cellulaire eiwitten bij cellen die op een verschillende manier werden behandeld.

Cellysaten

Om cellulaire eiwitten te kunnen detecteren, worden de cellulaire eiwitten eerst uit de cellen geëxtraheerd. Dit gebeurt door een lysebuffer, meer bepaald een Laemmli buffer met sodiumdodecylsulfaat (SDS). SDS destabiliseert de celmembraan waardoor de cellulaire inhoud naar buiten lekt. Daarenboven zorgt SDS voor het breken van de eiwit-eiwit interacties. Om ook de membraangebonden proteïnen vrij te stellen, wordt het lysaat daarna gesonificeerd. Vervolgens worden de proteïnen met behulp van de centrifuge gescheiden van het cellulaire debris.

Na het extraheren van cellulaire eiwitten uit de cellen, wordt de eiwitconcentratie bepaald. Dit laat toe om bij verdere analyses een gelijke hoeveelheid proteïnen te gebruiken. Hierdoor wordt het mogelijk om de cellulaire eiwitten uit cellen die een verschillende behandeling kregen kwantitatief te vergelijken met elkaar. De gebruikte reactie steunt op het Lowry principe en bestaat uit 2 stappen. In een eerste stap wordt een Cu^{2+} -zout aan de eiwitoplossing toegevoegd. Het Cu^{2+} vormt een complex met de eiwitten en wordt gereduceerd naar Cu^+ . Bij de tweede stap wordt het folin-fenol reagens toegevoegd. Dit wordt door het Cu^+ -proteïnencomplex gereduceerd en vormt bij pH 10 een blauwe kleur. Na 15 minuten is de intensiteit het hoogst. Met een spectrofotometer wordt de absorptie gemeten. Dit is gecorreleerd met de concentratie van proteïnen in de oplossing.

SDS-PAGE

Van het bekomen cellysaat met gekende proteïnenconcentratie worden de eiwitten van elkaar gescheiden op basis van hun moleculair gewicht. Dit gebeurt met behulp van de sodiumdodecylsulfaat-polyacrylamide gelelectroforese (SDS-PAGE) techniek.

Aan het cellysaat wordt SDS en β -mercapto-ethanol toegevoegd. SDS zorgt voor denaturatie van de eiwitten en β -mercapto-ethanol verbreekt de zwavelbruggen tussen de eiwitketens. SDS bezorgt de eiwitten ook een negatieve lading. Wanneer de negatief geladen eiwitten in een polyacrylamide gel geladen worden en daarna ook blootgesteld worden aan een elektrisch veld, zullen ze naar de positieve pool migreren. De snelheid van deze migratie wordt bepaald door hun grootte. Grotere moleculen ondervinden meer weerstand in de gel en migreren bijgevolg trager. Na verloop van tijd zullen de

kleinste eiwitten zich helemaal onderaan de gel bevinden, terwijl grotere eiwitten zich meer bovenaan zullen bevinden. Er loopt telkens een proteïnenmengsel mee van eiwitten met gekende moleculaire gewichten, ook de 'moleculaire ladder' genoemd.

Western Blot

Vervolgens worden de eiwitten, die met behulp van SDS-PAGE gescheiden zijn op grootte, overgebracht vanuit de polyacrylamide gel naar een vaste drager. Een nitrocellulosemembraan is hiervoor de meest geschikte membraan, doordat het een zeer goede bindingscapaciteit heeft. De eiwittransfer gebeurt net als SDS-PAGE onder invloed van een elektrisch veld. De nitrocellulosemembraan wordt met behulp van een klemsysteem tussen de gel en de positieve pool geplaatst. De eiwitten hebben een negatieve lading en migreren naar de positieve pool, maar worden onderweg niet-covalent gebonden aan de nitrocellulosemembraan. Zo zal het proteïnenpatroon van de polyacrylamide gel op de membraan gekopieerd worden.

De polyacrylamide gel en de nitrocellulosemembraan worden loodrecht op het elektrisch veld geplaatst, zodat een relatief grote weerstand ontstaat. Dit gaat gepaard met warmte-ontwikkeling. Om oververhitting te voorkomen, wordt het systeem gekoeld met ijs. Bovendien wordt ook warmte van het systeem onttrokken door de methanol in de blot buffer. De verdamping van methanol zal tevens ook zorgen voor een verbeterde proteïnentransfer.

Om te zien of de blot gelukt is, wordt de membraan na het blotten ondergedompeld in Ponceau kleurstof. Dit is een oplossing met natriumzout van een diazokleurstof dat snel en reversibel bindt met eiwitten en deze rood kleurt. Op deze manier worden alle proteïnen op de membraan, inclusief de moleculaire ladder, zichtbaar. De kleurstof kan nadien gemakkelijk gewegassen worden met water, zodat het niet interfereert bij de immunokleuring.

Immunokleuring

Met behulp van specifieke antilichamen kunnen vervolgens eiwitten naar keuze worden gedetecteerd. Het primair antilichaam herkent het antigeen, zijnde een specifiek eiwit. De nitrocellulosemembraan bindt echter ook op aspecifieke manier proteïnen. Daarom worden de aspecifieke bindingsplaatsen van de membraan voor de eigenlijke immunokleuring eerst geblokkeerd met een oplossing van melkpoeder. Het secundair antilichaam herkent vervolgens het primaire antilichaam. De uiteindelijke kleuring komt tot stand via het 'horse radish peroxidase' (HRP) dat gekoppeld is aan het secundaire antilichaam. Het HRP is een enzym dat licht produceert wanneer het in aanraking komt met de 'enhanced chemiluminescence' vloeistof (ECL). Deze ECL bestaat uit 2 belangrijke componenten: H_2O_2 en luminol. Wanneer HRP in contact komt met H_2O_2 wordt het HRP in zijn actieve toestand omgezet. Deze actieve vorm van het HRP-enzym oxideert luminol, waardoor deze laatste in een

geëxciteerde toestand wordt gebracht. Het luminol zal vervolgens zijn extra energie uitzenden als licht (430 nm). Dit licht kan gedetecteerd worden met een lichtgevoelige film.

6.2 Materiaal

- PBS D+ buffer (1 l): 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 0,1 g CaCl₂ + 0,1 g MgCl₂.6H₂O + 0,2 g KH₂PO₄ + 1,15 Na₂PO₄.2H₂O + aanlengen tot 1 liter met aqua dest + op pH 7,4 brengen + filtreren + bewaar bij 4 °C.

- PBS D- buffer (1 l): 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 0,2 g KH₂PO₄ + 1,15 Na₂PO₄.2H₂O + aanlengen tot 1 liter met aqua dest + op pH 7,4 brengen + filtreren + bewaar bij 4 °C.

- Laemmli buffer 1x: 50 ml Tris-HCl + 10 ml glycerol + 2,3% SDS + 40 ml aqua dest.

- Laemmli buffer 1,5x: 75 ml Tris-HCl + 15 ml glycerol + 3,45% SDS + 10 ml aqua dest.

- Denaturatie buffer: 1 ml Laemmli 1,5x + 50 µl β-mercaptanol + 50 µl bromofenolblauw.

- Separating gel 16% (10 ml): 5,3 ml acrylamide + 2,5 ml separating buffer + 2,2 ml aqua dest + 50 µl APS 10% + 5 µl TEMED.

- Separating gel 12% (10 ml): 4 ml acrylamide + 2,5 ml separating buffer + 3,5 ml aqua dest + 50 µl APS 10% + 5 µl TEMED.

- Separating gel 6% (10 ml): 2 ml acrylamide + 2,5 ml separating buffer + 5,5 ml aqua dest + 50 µl APS 10% + 5 µl TEMED.

- Stacking gel (10 ml): 1,5 ml acrylamide + 2,5 ml stacking buffer + 6 ml aqua dest + 100 µl APS 10% + 10 µl TEMED.

- Running buffer 10x (5 l): 760,6 g glycine + 151,4 g tris + 5 l aqua dest.

- Running buffer 1x (1 l): 100 ml running buffer 10x + 900 ml aqua dest + 1 g SDS.

- Blot buffer 10x (5 l): 760,6 g glycine + 151,4 g tris + 5 l aqua dest.

- Blot buffer 1x (1 l): 100 ml blot buffer 10x + 200 ml methanol + 700 ml aqua dest + 50 mg SDS.

- Blokkeerbuffer (0,5 l): 500 ml PBS D- + 25 g melkpoeder + 2,5 ml Tween-20.

- Wasoplossing (0,5 l): 500 ml PBS D- + 2,5 ml Tween-20.

- Sonicator: Vibracell, Sonics & Materials, Danburg, USA.

- Cell scraper: TPP, Novolab, Groot-Bijgaarden, België.

- Centrifuge: centrifuge 5417C, Eppendorf, Erembodegem, België.
- Vortex: Cenco instrumenten n.v., Breda, Nederland.
- Eppendorf tubes (1,5 ml): Eppendorf, Erembodegem, België.
- Reagens S, reagens A en reagens B: Bio-Rad Dc Protein Assay, Bio-Rad, Nazareth, België.
- Spectrofotometer: Ultrospec 1100 pro Plus, Amersham biosciences, VWR, Heverlee, België.
- Cuvette: Novolab, Groot-Bijgaarden, België.
- Materiaal voor de aanmaak van gels en blotten: Bio-Rad, Nazareth, België.
- Electrophoresis System: Power Pac HC, Bio-Rad, Nazareth, België.
- Moleculaire ladder: SDS-PAGE Moleculair Weight Standards, Bio-Rad, Nazareth, België.
- Verwarmtoestel: thermomixer 5436, Eppendorf, Erembodegem, België.
- Nitrocellulosemembraan: Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, Bio-Rad, Nazareth, België.
- Whatman papier: Whatman 3 MM, Whatman international Ltd., Novolab, Groot-Bijgaarden, België.
- Ponceau kleurstof: Ponceau S solution, Sigma-Aldrich, Bornem, België.
- Schudtoestel: Wave Polymax 2040, Heidolph Instruments, Schwabach, Duitsland.
- Detectie oplossing: Pierce ECL Western Blotting substrate, Perbio, Erembodegem, België.
- Transparant: 3M Transparency Film for Copiers, 3M, Diegem, België.
- Cassette: Siemens, Munich, Duitsland.
- Autoradiografische film: Hyperfilm ECL, Amersham biosciences, VWR, Heverlee, België.
- Ontwikkelingstoestel: Kodak, Carestream Health, Zaventem, België.
- Primaire antilichamen: zie tabel 1.
- Secundaire antilichamen: zie tabel 2.

6.3 Methode

Cellysaten

De cellen waarvan de cellulaire eiwitten zullen onderzocht worden, bevinden zich in plasticen falcons van 25cm² oppervlakte. Ze worden 3 maal kort gewassen met PBS D+. Nadien wordt zo droog mogelijk geaspireerd. Vanaf dan wordt op ijs gewerkt. Er wordt 200 µl koude Laemmli 1x toegevoegd per volle falcon. Vrijwel onmiddellijk daarna worden de cellen losgeschrapt met een 'cell scraper'. Vervolgens wordt de suspensie overgebracht in een 1,5 ml eppendorf tube. De tube wordt gesoniceerd gedurende 10 seconden bij 30 Hz. Daarna wordt de tube gedurende 5 minuten gecentrifugeerd aan 14.000 toeren per minuut bij 4 °C. Het supernatans wordt overgebracht in een nieuwe eppendorf tube.

Reagens A' wordt klaargemaakt door 20 µl reagens S toe te voegen aan 980 ml reagens A. De nodige stalen worden klaargemaakt in propere en droge proefbuizen. Het blanco staal bevat 50 µl H₂O, 250 µl reagens A' en 2 ml reagens B. De andere stalen bevatten telkens 10 µl cellysaat, 40 µl H₂O, 250 µl reagens A' en 2 ml reagens B. De gemaakte stalen worden gevortexed. Alle stalen behalve het blanco staal zullen blauw worden. Daarna worden de stalen overgebracht in cuvetten. Vervolgens wordt met behulp van de spectrofotometer de absorptie gemeten bij een golflengte van 750 nm. Het blanco staal wordt hierbij als referentie gebruikt. Het resultaat van de spectrofotometer (in ng/µl) moet worden vermenigvuldigd met 5, gezien de verdunningsfactor. Vervolgens wordt het ook omgezet in µg/µl door te delen door 1000. Het bekomen resultaat is de proteïnenconcentratie in µg/µl. De gewenste concentratie is echter 1 µg/µl. Om deze concentratie te bekomen, wordt het eiwitmengsel verdund met denaturatie buffer. Het eiwitmengsel met denaturatie buffer wordt gedurende 5 minuten op 95 °C gedenateerd in de thermomixer.

SDS-PAGE

Eerst wordt de polyacrylamide gel gemaakt. De gewenste dichtheid van de gel hangt af van de grootte van de eiwitten die men wil detecteren. Zo gebruikt men voor kleine eiwitten beter een gel met een hogere dichtheid (bijvoorbeeld 16%) zodat de regio van het gewenste eiwit wordt 'uitgerokken'. Een polyacrylamide gel bestaat uit een laag 'separating gel', waar de eiwitten doorheen zullen migreren, en een laag 'stacking gel', waarin de laantjes worden gestekt met behulp van een kam. Om de gels te kunnen gieten, moet een constructie worden gemaakt van 2 glaasjes en een houder. De ingrediënten van de separating gel worden in een tube samengevoegd. Vervolgens wordt 5 ml van dit mengsel tussen de 2 glaasjes in de houder gebracht. Bovenop de gel wordt gedestilleerd water gegoten. De gel moet 45 minuten stijven. Vervolgens wordt het gedestilleerd water afgegoten. De ingrediënten van de stacking gel worden samen gebracht en het mengsel wordt bovenop de gestolde separating gel gegoten.

De kam wordt op de stacking gel geplaatst. Na 30 minuten zal ook de stacking gel gesteven zijn en mag de kam uit de stacking gel worden gehaald.

De gelplaten worden gemonteerd in de elektroforesetank die gevuld is met running buffer. De stalen en de ladders worden in de laantjes van de gel gebracht. Vervolgens wordt de elektroforesetank gedurende ongeveer 90 minuten blootgesteld aan elektrische stroom (150 V). Terwijl de stalen en ladders nog aan het lopen zijn, wordt de blot buffer bereid. De stroombron wordt uitgezet wanneer het blauwe front, afkomstig van het bromofenolblauw dat aan de stalen werd toegevoegd, zich op ongeveer 1 mm van de onderkant van de gel bevindt.

Western Blot

De stacking gel wordt verwijderd. De gel, de nitrocellulosemembraan (8 x 10 cm), 6 vellen Whatman papier (8 x 10 cm) en 2 sponzen worden in blot buffer ondergedompeld. Vervolgens wordt een klemsysteem klaargelegd met de zwarte zijde onderaan. Achtereenvolgens worden hierop een spons, 3 Whatman papiertjes, de gel, de nitrocellulosemembraan, 3 Whatman papiertjes en een spons gelegd. De nitrocellulosemembraan bevindt zich met andere woorden aan de rode zijde van het klemsysteem. Tussen de verschillende lagen mogen geen luchtballen aanwezig zijn, want dit zou het blotten kunnen verstoren. Het klemsysteem wordt gesloten en in de buffertank gemonteerd met de zwarte zijde van het klemsysteem gericht naar de zwarte zijde van de buffertank. Vervolgens wordt de buffertank gevuld met blot buffer. Ook een koelement wordt aangebracht. Het deksel wordt op de buffertank geplaatst en de tank wordt gedurende 1 uur blootgesteld aan elektrische stroom (100 V). Wanneer het blotten klaar is, wordt de opstelling gedemonteerd. De nitrocellulosemembraan wordt ondergedompeld in een recipiënt gevuld met Ponceau kleurstof en gedurende enkele minuten op een schudtoestel geplaatst. De membraan wordt versneden volgens de gewenste grootte en het rechterbovenhoekje wordt afgesneden ter oriëntatie. Nadien wordt de membraan 3 maal gewassen met gedestilleerd water en gedurende 30 minuten in een recipiënt met blokkeerbuffer op het schudtoestel geplaatst. Na 30 minuten wordt de blokkeerbuffer verwijderd.

Immunokleuring

Voor de eigenlijke immunokleuring wordt gebruik gemaakt van primaire en secundaire antilichamen. Deze worden respectievelijk in tabel 1 en 2 weergegeven. Het primair antilichaam (verdund in blokkeerbuffer) wordt toegevoegd aan het recipiënt met de membraan en dit wordt gedurende minstens 90 minuten bij kamertemperatuur op het schudtoestel geplaatst. Daarna wordt het primair antilichaam verwijderd en wordt de membraan 3 maal gewassen met blokkeerbuffer gedurende telkens 5 minuten. Vervolgens wordt het HRP gemerkte secundair antilichaam (verdund in blokkeerbuffer) toegevoegd en wordt het recipiënt met de nitrocellulosemembraan gedurende 1 uur op het schudtoestel

geplaatst. Ondertussen wordt een wasbuffer gemaakt. Wanneer de membraan 1 uur blootgesteld werd aan het secundair antilichaam, wordt deze 3 maal gewassen met blokkeerbuffer gedurende telkens 5 minuten. Daarna wordt er ook 3 maal 5 minuten gewassen met wasbuffer.

De filmcassette wordt geprepareerd door een transparant aan te brengen. De detectie-oplossing (ECL) wordt bereid. Vervolgens wordt de membraan op de transparant gelegd en wordt de ECL op de membraan gedruppeld. Op de membraan wordt een tweede transparant gelegd. Luchtbellen worden verwijderd en de filmcassette wordt gesloten. In de ontwikkelingskamer wordt een autoradiografische film op de membraan gelegd gedurende de noodzakelijke tijd. Het ontwikkelingstoestel zal de film ontwikkelen.

Antilichaam	Species	Type	Firma
Anti-alfa-tubuline	muis	monoklonaal	Sigma Aldrich, Bornem, België.
Anti-P21	konijn	monoklonaal	Santa Cruz, Tebu-bio, Boechout, België.
Anti-P27	konijn	monoklonaal	Santa Cruz, Tebu-bio, Boechout, België.
Anti-cycline A	muis	monoklonaal	Life Technologies, Gent, België.
Anti-cycline E	muis	monoklonaal	Life Technologies, Gent, België.
Anti-PARP	muis	monoklonaal	BD Pharmingen, Erembodegem, België.
Anti-Bcl-XL	muis	monoklonaal	Santa Cruz, Tebu-bio, Boechout, België.

Tabel 1: De gebruikte primaire antilichamen.

Antilichaam	Species	Firma
ECL anti-konijn IgG, HRP gemerkt	geit	GE Healthcare UK ltd, Diegem, België.
ECL anti-muis IgG, HRP gemerkt	schaap	GE Healthcare UK ltd, Diegem, België.

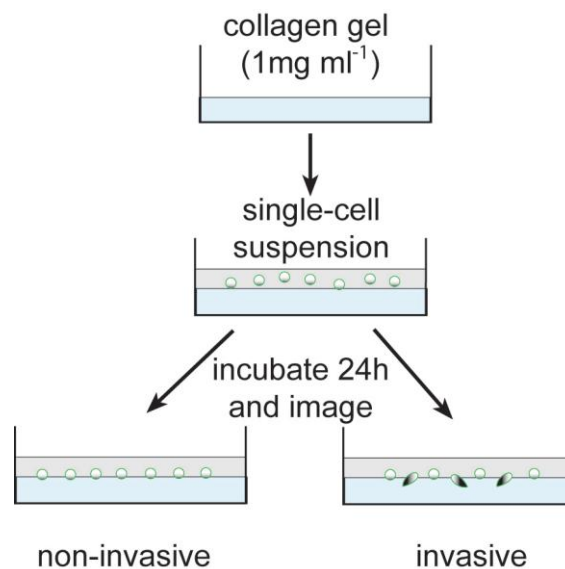
Tabel 2: De gebruikte secundaire antilichamen.

7. Single cell collageen type I invasie test (SC-CIT)

7.1 Principe

Met behulp van de ‘single cell collageen invasie test’ (SC-CIT) kan de invasie van kankercellen *in vitro* worden bestudeerd (figuur 4). Hierbij wordt in een 6-well plaat een celsuspensie uitgezaaid op een matrix van collageen type I (1 mg/ml). Na 24 uur wordt de invasie van de cellen gevisualiseerd met een microscoop waarmee de verschillende dieptes van de collageen matrix in focus kunnen worden gebracht. Niet-invasieve epitheliale cellen blijven op het collageen type I gel liggen. Invasieve cellen secreteren proteasen waardoor ze in staat zijn de type I collageen draden te breken en in de matrix te dringen.

De invasiviteit van de cellen kan vervolgens gescoord worden op basis van de vorm van de cellen en het al of niet aanwezig zijn van uitlopers. Een gepolariseerde vorm, in tegenstelling tot een ronde vorm, wijst op invasie. Ook de aanwezigheid van uitlopers is een teken van invasie.



Figuur 4: Schematische voorstelling van de SC-CIT (57).

7.2 Materiaal

- Collageen type I rat tail (100 mg/28,65 ml): Becton Dickinson Biosciences, Erembodegem, België.
- CMF-HBSS (Ca²⁺ and Mg²⁺ free Hank's buffered salt solution): Sigma-Aldrich, Bornem, België.
- Minimal essential medium (MEM) (10x): Life Technologies, Gent, België.
- Natrium bicarbonaat (NaHCO₃): Sigma-Aldrich, Bornem, België.
- Natrium hydroxide (NaOH): Sigma-Aldrich, Bornem, België.

7.3 Methode

In aanloop van de SC-CIT worden er cellen in serumhoudend DMEM PSF uitgezaaid in 2 verschillende falcons van 25 cm². Voor het uitzaaien in de falcons worden de cellen eerst op dezelfde manier losgemaakt als bij het splitsen van cellen (zie § 2.4). Wanneer de cellen zich de volgende dag op de bodem van de falcon hebben vastgehecht, worden de cellen 3 maal gewassen met serumvrij DMEM PSF. Vervolgens worden ze behandeld; 1 falcon (CON) met controle medium en 1 falcon (CM) met geconditioneerd medium. Na twee dagen worden deze cellen gebruikt voor de SC-CIT.

De nodige hoeveelheid collageen type I oplossing wordt aangemaakt. Hierbij wordt op ijs gewerkt om vroegtijdige stolling van de oplossing te verhinderen. Per 1250 µl collageen type I oplossing, dit is de nodige hoeveelheid voor 1 gel, worden de volgende ingrediënten¹¹ achtereenvolgens in een tube gebracht: 360 µl collageen type I¹² + 445 µl CMF-HBSS + 90 µl MEM (10x) + 90 µl NaHCO₃ 0,25M + 25 µl NaOH 1M + 250 µl serumhoudend DMEM PSF. Zodra NaOH wordt toegevoegd, zal de kleur van de oplossing paars worden. Dit komt doordat NaOH het mengsel buffert van een zure pH tot een neutrale pH. Vervolgens wordt in 2 wells (CON en CM) van een 6-well plaat telkens 1250 µl van de collageen type I oplossing aangebracht. Opdat de oplossing zich homogeen zou verspreiden over de well, wordt de 6-well plaat bewogen in voor-achterwaarts en zijwaarts vlak. Luchtbellen worden vermeden. Wanneer de oplossing zich in iedere well homogeen heeft verspreid, wordt de 6-well plaat gedurende 1 uur in de incubator gebracht bij 37 °C en 10% CO₂. Bij deze temperatuur zal de oplossing stollen.

Terwijl de collageen type I oplossing stolt, wordt het medium bereid waarmee de cellen behandeld zullen worden. Per well is 1500 µl medium nodig. Er wordt een tube (CON) gemaakt met controle medium en een tube (CM) met geconditioneerd medium.

¹¹ Alle ingrediënten worden bewaard bij 4 °C.

¹² De concentratie van dit collageen type I is 100 mg per 28,65 ml. Hiervan wordt 360 µl gebruikt per 1250 µl oplossing. De finale concentratie is bijgevolg 1 mg/ml.

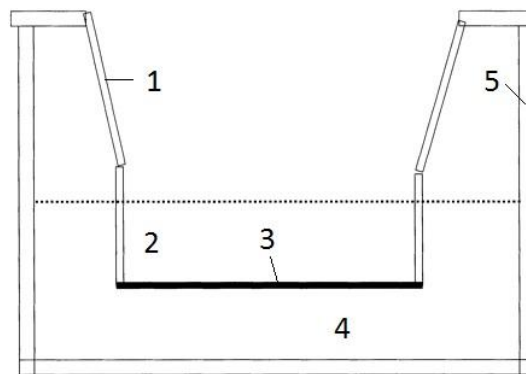
Vervolgens wordt ook de celsuspensie aangemaakt. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de cellen die reeds 2 dagen voorbehandeld werden met CM of CON. Deze cellen worden eerst op dezelfde manier losgemaakt als bij het splitsen van cellen (zie § 2.4). Om de werking van trypsine/EDTA te blokkeren wordt 5 ml serumhoudend DMEM PSF aan de falcons toegevoegd. Er wordt goed gesuspendeerd, want het is belangrijk dat de cellen na het splitsen allemaal 'single cells' zijn. Vervolgens worden de cellen geteld met behulp van een Bürker telkamer. Uit beide cultuurflessen worden telkens 25.000 cellen genomen en in kleine tubes overgebracht. Deze tubes worden gedurende 5 minuten gecentrifugeerd aan 1.000 toeren per minuut. Het bovenstaande groeimedium wordt afgezogen en het correcte medium (CON of CM) wordt toegevoegd. Op deze manier krijgen we 2 tubes met elk 25.000 cellen (voorbehandeld met CON of CM) in 1500 µl medium (CON of CM).

Wanneer de collageen type I oplossing gestold is, worden de celsuspensies voorzichtig overgebracht in de wells die gecoat zijn met de collageen type I gel. De cellen worden vervolgens geïncubeerd bij 37 °C en 10% CO₂. Na 24 uur worden de cellen met behulp van de microscoop geanalyseerd.

8. Transwell collageen type I invasie test (TW-CIT)

8.1 Principe

Met behulp van de 'transwell collageen type I invasie test' (TW-CIT) kan de invasie en migratie van cellen in vitro gedurende een langere periode worden nagegaan. Hiervoor wordt een 24-well plaat met transwell inserts gebruikt (figuur 5). De onderzijde van de inserts bestaat uit een polycarbonaat membraan met poriën van een welbepaalde grootte (8,0 μm). In de insert wordt een matrix van collageen type I (1 mg/ml) aangebracht. Op deze matrix worden cellen in serumvrij DMEM PSF uitgezaaid. Onder de insert wordt het medium aangebracht. Op regelmatige basis wordt het onderstaande medium ververs. Na 2 weken worden de cellen gefixeerd en in coupes gesneden. Er wordt vervolgens ook een kleuring uitgevoerd. Daarna kunnen de coupes onder de microscoop worden bekeken. Indien de cellen geen invasieve en migrerende eigenschappen bezitten, zullen de cellen zich nog steeds op de collageen type I matrix bevinden. Wanneer de cellen daarentegen invasieve en migrerende eigenschappen bezitten, zullen ze gemigreerd zijn doorheen de collageen type I matrix.



Figuur 5: Doorsnede van een transwell opstelling: (1) de transwell insert, (2) het bovenste reservoir waarin de collageen matrix en de celsuspensie worden aangebracht, (3) de membraan met microporiën, (4) het onderste reservoir waarin het medium wordt aangebracht, (5) wand van 1 well van de 24-well plaat.

8.2 Materiaal

- Ingrediënten collageen matrix: zie § 7.2.
- Transwell plaat: Costar Transwell Permeable Supports, Life Sciences, Amsterdam, Nederland.

8.3 Methode

Er wordt een collageen type I oplossing gemaakt op dezelfde wijze als beschreven in § 7.3. In 2 inserts wordt telkens 90 µl van de oplossing aangebracht. Vervolgens wordt de transwell plaat gedurende 1 uur in de incubator gebracht bij 37 °C en 10% CO₂.

Terwijl de collageen type I oplossing stolt, wordt het medium bereid dat onder de insert zal worden aangebracht. Per well is 800 µl medium nodig. Er wordt een tube (CON) gemaakt met controle medium en een tube (CM) met geconditioneerd medium.

Vervolgens wordt ook een celsuspensie aangemaakt. De cellen worden eerst op dezelfde manier losgemaakt als bij het splitsen van cellen (zie § 2.4). Om de werking van trypsine/EDTA te blokkeren wordt 5 ml serumhoudend DMEM PSF aan de falcons toegevoegd. Vervolgens worden de cellen geteld met behulp van een Bürker telkamer. Per transwell zijn er 50.000 cellen nodig. Voor 2 inserts worden er bijgevolg 100.000 cellen uit de falcon gehaald en in een tube gebracht. Deze tube wordt gedurende 5 minuten gecentrifugeerd aan 1.000 toeren per minuut. Het bovenstaande groeimedium wordt afgezogen en er wordt 600 µl serumvrij DMEM PSF aan de tube toegevoegd. Op deze manier krijgen we 2 maal 50.000 cellen in telkens 300 µl serumvrij DMEM PSF.

Wanneer de collageen type I oplossing in de inserts gestold is, wordt de celsuspensie voorzichtig hierop aangebracht. In de ruimte onder insert worden de media (CON en CM) aangebracht. De cellen worden vervolgens geïncubeerd bij 37 °C en 10% CO₂.

Op regelmatige basis wordt het medium (CON en CM) ververs. Ook het serumvrije DMEM PSF wordt aangevuld, opdat de cellen nooit droog komen te liggen. Op dag 15 worden de gels met de cellen gefixeerd. Hiervoor worden de gels gedurende 2 uur in formaldehyde gebracht. Daarna worden ze 3 maal gewassen met gedestilleerd water. Vervolgens worden ze 2 uur in het gedestilleerd water gehouden. Tot slot worden ze in 70% alcohol gebracht.

Nadat de gels gefixeerd werden, worden ze ingebed in paraffine. Daarna wordt de gel in coupes gesneden. Vervolgens kunnen kleuringen, zoals een hematoxiline-eosine (H&E) kleuring¹³ en een zilverreticuline (ZR) kleuring¹⁴, worden uitgevoerd op deze coupes.

¹³ De H&E-kleuring is de meest gebruikte kleuring in de histologie. Hematoxiline kleurt zure stoffen, zoals het nucleïnezuur in de celkern, paars. Eosine zal daarentegen basische stoffen, zoals het cytoplasma, roze kleuren. De H&E-kleuring is nuttig om weefsels te herkennen en om morfologische veranderingen van cellen te kunnen zien.

¹⁴ Niet alle structuren kleuren aan met een H&E-kleuring. Wanneer men de basale membraan wenst aan te kleuren, kan een ZR-kleuring gebruikt worden. Zilver kleurt namelijk reticuline vezels in de basale membraan bruin.

Hoofdstuk 4: Resultaten

Alle verkregen resultaten werden bevestigd bij herhaling van de testen.

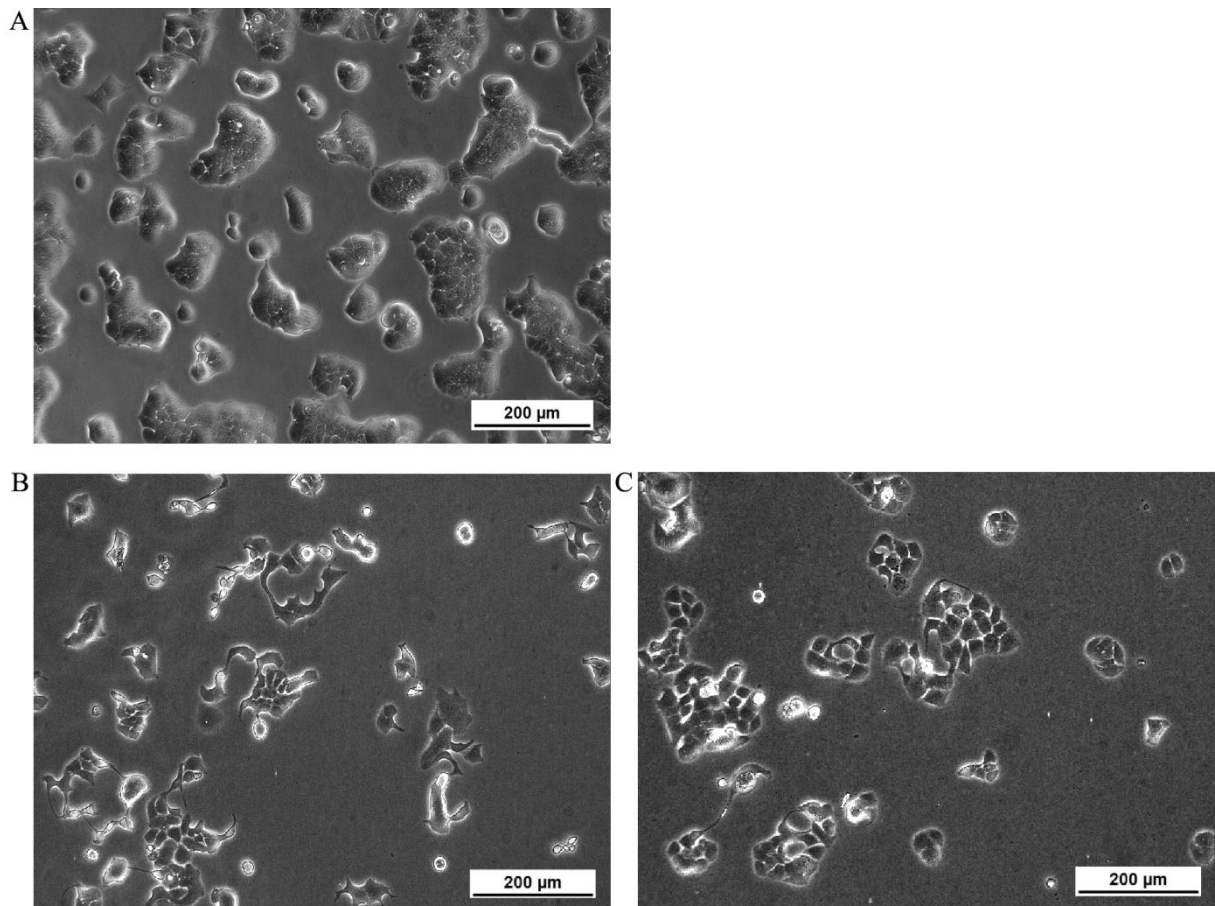
1. Invloed van oplosbare factoren vrijgesteld door tumor-geassocieerd vetweefsel op de morfologie van borstkankercellen

De morfologie van borstkankercellen zegt in veel gevallen iets over de agressiviteit van de cellen. Zo hebben rustige cellen een ronde vorm, terwijl agressieve cellen langwerpig zijn en uitlopers vertonen. Daarnaast kan de morfologie ook een indicatie zijn over hoe de cellen zich aarden. Om na te gaan of er in het geconditioneerd medium van het tumor-geassocieerde vetweefsel factoren aanwezig zijn die de vorm van de cellen beïnvloeden, werd de morfologie vergeleken van T47D en MDA MB 231 cellen die elk door 3 verschillende media, meer bepaald hun normale groeimedium, het controle medium of het geconditioneerd medium, werden behandeld.

1.1 Morfologie test bij T47D

T47D cellen die werden gecultiveerd met hun normale groeimedium vertonen voornamelijk een ronde morfologie (figuur 6). Wanneer de cellen prolifereren, vormen ze eilanden waarbij de cellen vaak niet meer van elkaar onderscheiden kunnen worden. Dit lijkt op de 'kasseien' morfologie bij normale epitheliale borstcellen.

Nadat de cellen behandeld werden met het controle medium (CON) of het geconditioneerd medium (CM), is de morfologie van de cellen grondig gewijzigd (figuur 6). De cellen uit de CON-groep zijn niet langer overwegend rond van vorm. Ze zijn daarentegen langwerpig en ze vertonen fijne uitlopers. Er zijn nog steeds eilanden van cellen, maar de cellen zijn hier afzonderlijk zichtbaar. De cel-cel contacten zijn minder dicht. De cellen uit de CM-groep vertonen vrij gelijkaardige morfologische wijzigingen. Ook hier zijn de cellen afzonderlijk zichtbaar. De cellen vertonen eveneens uitlopers, maar dan wel minder dan bij de CON-groep. Desalniettemin lijken ze qua morfologie meer op de T47D cellen die gecultiveerd werden met het normale groeimedium. De cellen zijn immers niet langwerpig, in tegenstelling tot de cellen uit de CON-groep.



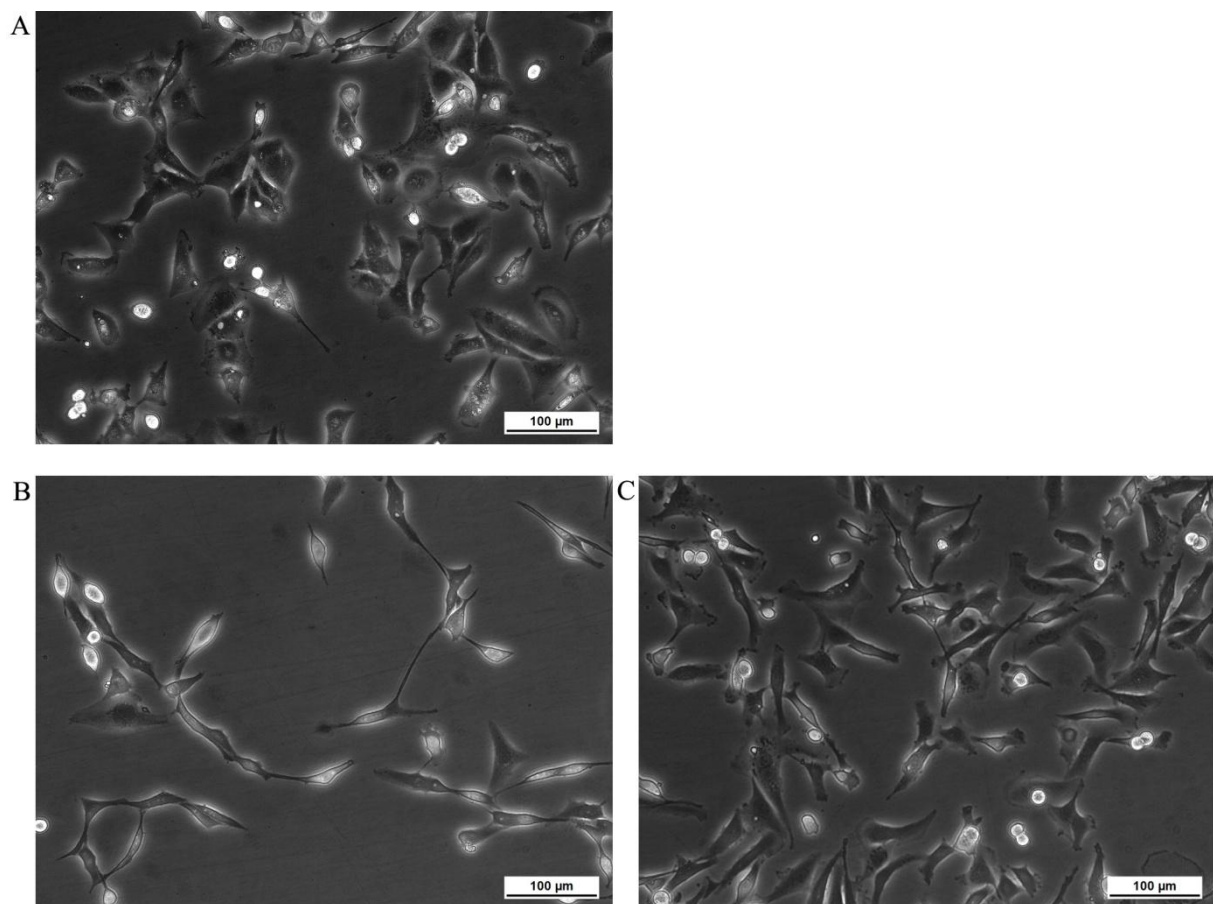
Figuur 6: Morfologie van T47D cellen: behandeld met hun normaal groeimedium (A), behandeld met CON (B) en behandeld met CM (C).

1.2 Morfologie test bij MDA MB 231

MDA MB 231 cellen die groeiden met hun normaal groeimedum vertonen voornamelijk een langwerpige morfologie (figuur 7).

De cellen die gedurende 2 dagen behandeld werden met controle medium (CON) zijn dunner en meer uitgestrekt in vergelijking met de cellen die behandeld werden met groeimedum (figuur 7).

De morfologie van de cellen die behandeld werden met het geconditioneerd medium (CM) zijn ook wat uitgestrekter, maar lijken qua morfologie wel nog op de cellen uitgezaaid in groeimedum (figuur 7).



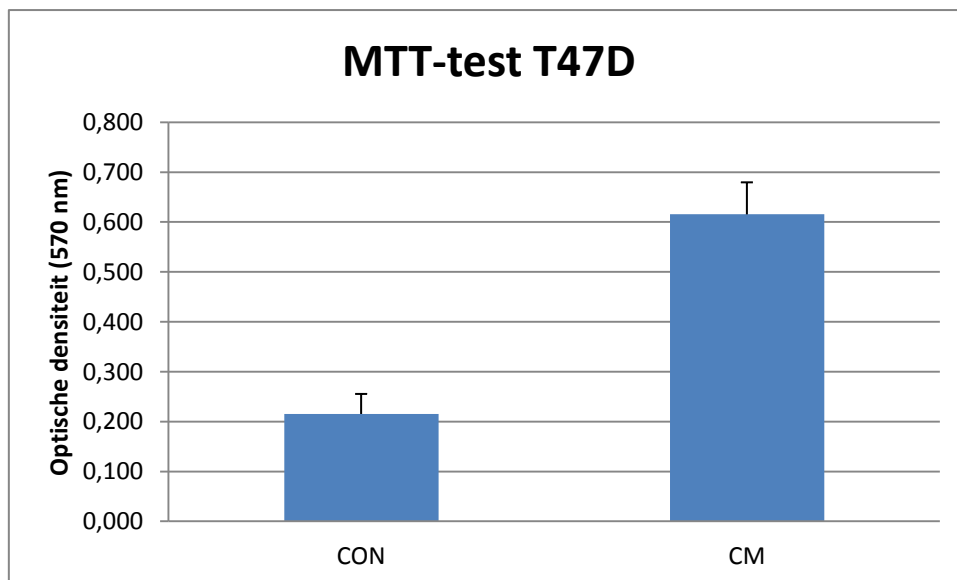
Figuur 7: Morfologie van MDA MB 231 cellen: behandeld met hun normaal groeimedum (A), behandeld met CON (B) en behandeld met CM (C).

2. Invloed van oplosbare factoren vrijgesteld door tumor-geassocieerd vetweefsel op de proliferatie van borstkankercellen

Een kenmerk van kankercellen is dat ze snel prolifereren. Hoe sneller deze proliferatie gebeurt, hoe sneller een tumor in omvang toeneemt. Dit maakt een versnelde proliferatie tot een negatief prognostisch kenmerk. Het is bijgevolg nuttig om na te gaan of de factoren in het geconditioneerd medium het tempo van de proliferatie al dan niet beïnvloeden. Dit wordt in de eerste plaats onderzocht aan de hand van een MTT-test, die de metabole activiteit van de cellen nagaat. Een verhoogde metabole activiteit kan mogelijk verklaard worden doordat de cellen in aantal zijn toegenomen. Een andere manier om de proliferatie te onderzoeken is het uitvoeren van een proliferatietest, waarbij over een verloop van meerdere dagen wordt nagegaan of de cellen in aantal toenemen en in welke mate. De bekomen resultaten van de MTT-test en de proliferatietest kunnen vervolgens bevestigd worden door via Western Blot een verhoogde of verlaagde expressie op te sporen van eiwitten die betrokken zijn bij de regulatie van de celcyclus of de apoptose.

2.1 MTT-test bij T47D

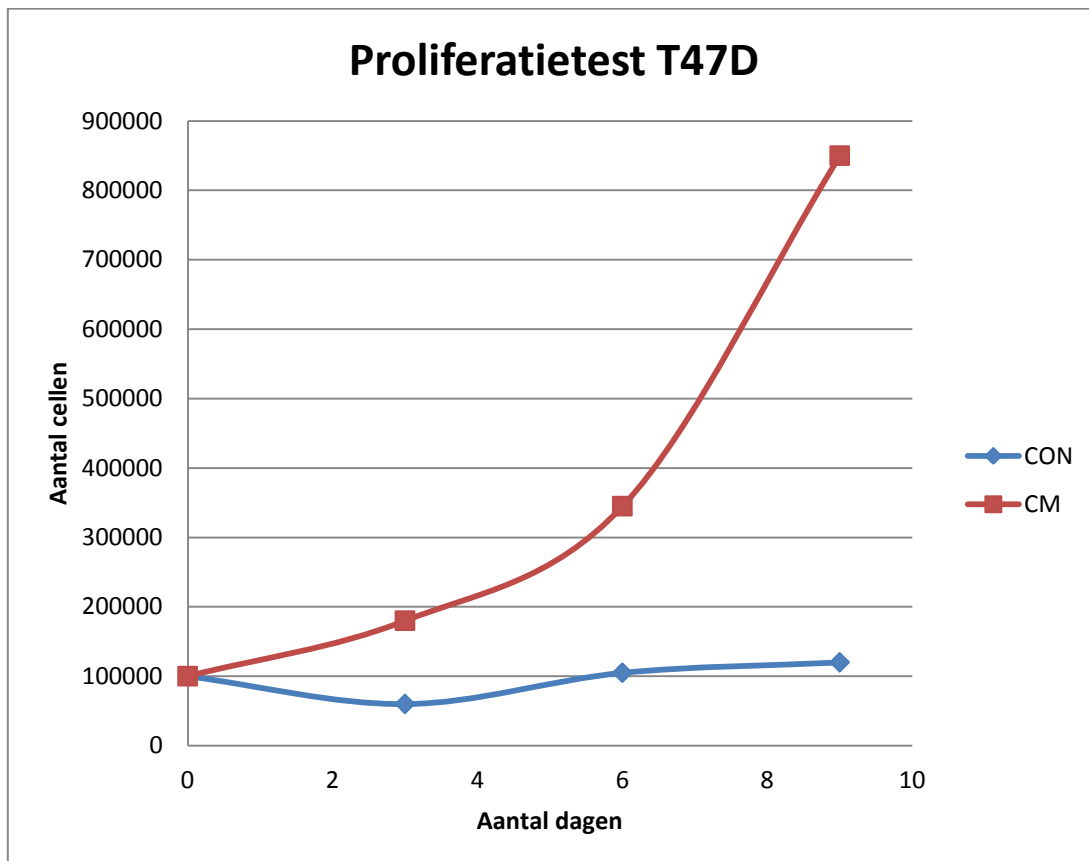
De gemiddelde optische densiteit bij de CON-groep is 0,215 en de standaarddeviatie bedraagt 0,031. De CM-groep heeft een gemiddelde optische densiteit van 0,615 met een standaarddeviatie van 0,057.



Figuur 8: Resultaat van de MTT-test bij T47D cellen.

2.2 Proliferatietest bij T47D

Er werd gestart met 100.000 levende cellen per falcon. Op dag 3 werden 60.000 cellen geteld bij de CON-groep en 180.000 cellen bij de CM-groep. 3 dagen later waren er 105.000 cellen bij de CON-groep en 345.000 cellen bij de CM-groep. Op dag 9 telde de falcon van de CON-groep 120.000 cellen en de falcon van de CM-groep 850.000 cellen.

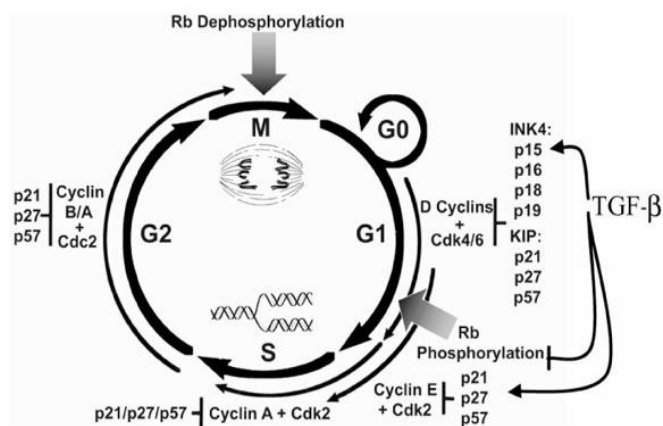


Figuur 9: Het resultaat van de proliferatietest bij T47D cellen.

2.3 Western Blot bij T47D

Uit de MTT-test is gebleken dat er een verhoogde metabole activiteit is bij de T47D cellen in de CM-groep en de proliferatietest kon aantonen dat de CM-groep telkens meer cellen bevat dan de CON-groep. Om na te gaan of dit wijten is aan verminderde celdood of eerder aan verhoogde proliferatie, werd via Western Blot gezocht naar een eventuele verhoogde of verlaagde expressie van eiwitten die betrokken zijn bij de celcyclus of apoptose. De volgende eiwitten, die allen betrokken zijn bij de celdeling of de apoptose, werden onderzocht: cycline A, cycline E, p21, p27, Bcl-XL en PARP. De hoeveelheid van deze eiwitten wordt vergeleken tussen de CON-groep, de CM-groep en een reverse groep¹⁵. Tevens wordt telkens ook bij wijze van interne controle de hoeveelheid tubuline¹⁶ nagegaan.

De celcyclus bestaat uit 4 stadia (figuur 10): de synthese (S) fase waarin de DNA replicatie gebeurt, de mitose (M) fase waarin de zusterchromatiden uit elkaar wijken en 2 gap (G) fasen, meer bepaald gap fase 1 (G1) en gap fase 2 (G2), tijdens dewelke de cel zich voorbereidt op respectievelijk de S- en de M-fase. De retinoblastoma eiwitten (Rb1) spelen een cruciale rol bij de progressie van de celcyclus. Deze eiwitten worden gereguleerd via fosforylatie door cycline-dependente-kinasen (CDK's) die actief worden na complexvorming met cyclines. Hierdoor zijn cycline A en E allebei positieve regulatoren van de celcyclus, meer specifiek ter hoogte van respectievelijk de S-fase en de late G1-fase. De eiwitten p21 en p27, beide CDK-inhibitoren, zijn daarentegen negatieve regulatoren van de celcyclus. Ze binden immers op de cycline-CDK complexen en inhiberen zo de katalytische activiteit van het CDK om zo een celcyclus arrest te veroorzaken.

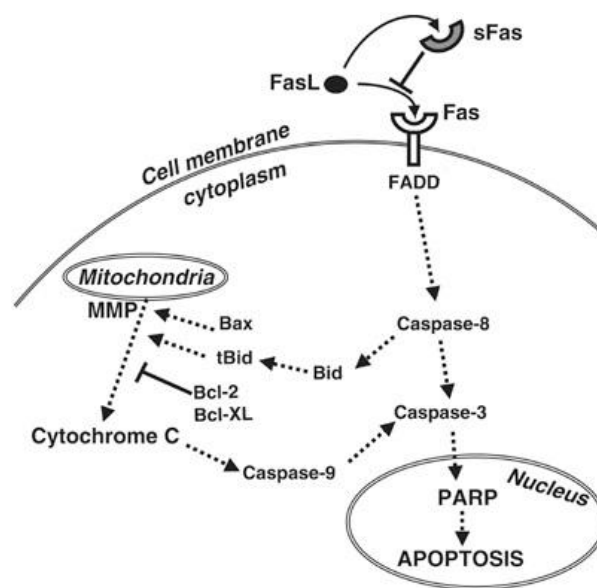


Figuur 10: De celcyclus progressie wordt gestuurd door cycline-dependente-kinasen waarvan de activiteit gereguleerd wordt door cyclines en CDK-inhibitoren (58).

¹⁵ De reverse groep wordt eerst met CM behandeld en wordt nadien terug op controle medium gezet. Het nut hiervan is om na te gaan of veranderingen in de cellulaire eiwitten door het CM reversibel zijn.

¹⁶ Het tubuline eiwit is altijd in dezelfde hoeveelheid aanwezig in de cel waardoor de hoeveelheid tubuline steeds gelijk moet zijn bij de verschillende stalen. Indien dit niet zo is, wijst dit op een fout bij het laden van de cellysaten in de gel. Mogelijks werd van een staal dan meer of minder cellysaat geladen.

De fysiologische en structurele veranderingen in de apoptotische cel worden tot uitvoer gebracht door caspasen 3, 8 en 9 (figuur 11). Deze caspasen kunnen via een extrinsieke of intrinsieke apoptotische signaalweg geactiveerd worden. De extrinsieke signaalweg wordt in gang gezet via receptoren van de 'tumor necrosis factor receptor' (TNFR) superfamilie, zoals de Fas receptor, die zich op de celmembraan bevinden. Bij de intrinsieke apoptotische pathway zullen diverse signalen, zoals DNA schade of oxidatieve stress, leiden tot veranderingen ter hoogte van het mitochondriale membraan. Hierdoor zullen de mitochondrieën pro-apoptotische eiwitten zoals cytochroom c vrijstellen. De Bcl-2 en Bcl-XL eiwitten inhiberen de vrijstelling van het cytochroom c waardoor ze een anti-apoptotische werking hebben. De Bax en tBid eiwitten stimuleren de vrijstelling van het cytochroom c en hebben bijgevolg een pro-apoptotisch effect. Het PARP eiwit (59), een proteïne die DNA schade detecteert en herstelt, is een substraat van het caspase 3. Tijdens de apoptose zal het PARP eiwit van 116 kDa door caspase 3 gesplitst worden in een deel van 89 kDa en een deel van 24 kDa. Dit gesplitste PARP is niet langer in staat om DNA te herstellen. Het PARP eiwit van 116 kDa heeft met andere woorden een anti-apoptotische werking, maar het gekleefde PARP is daarentegen een maat voor de apoptose.



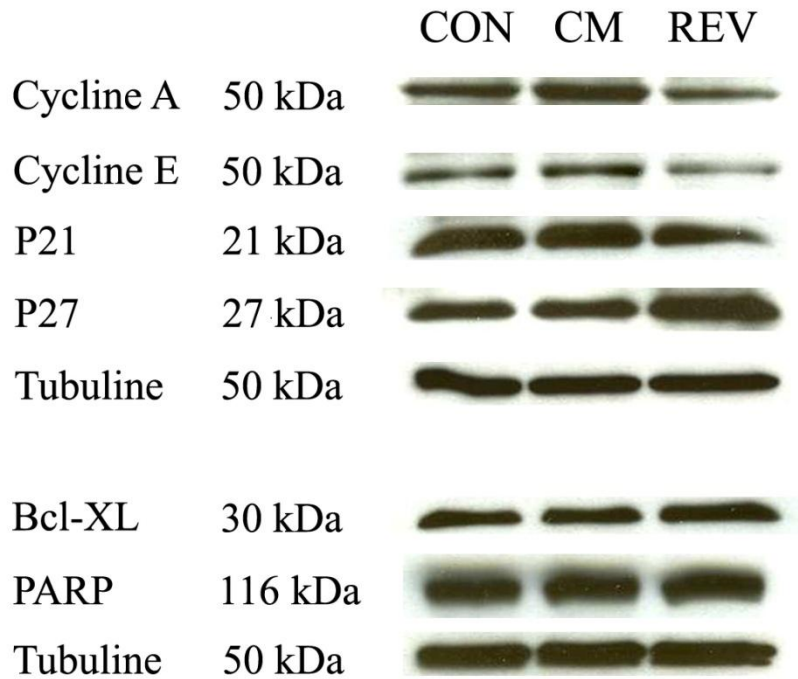
Figuur 11: De extrinsieke en intrinsieke apoptotische signaalweg (60).

Uit de resultaten van de Western Blot voor cycline A, cycline E, p21, p27, Bcl-XL en PARP kan het volgende worden afgeleid (figuur 12):

Bij de CM-groep zijn zowel de hoeveelheid cycline A en cycline E verhoogd, al is het verschil bij cycline E wel subtieler. Bij de reverse groep is de hoeveelheid cycline A en E opnieuw lager.

De hoeveelheid p21 en p27 is niet verschillend bij de CON-groep en de CM-groep. Bij de reverse groep is echter een overexpressie van p27 merkbaar.

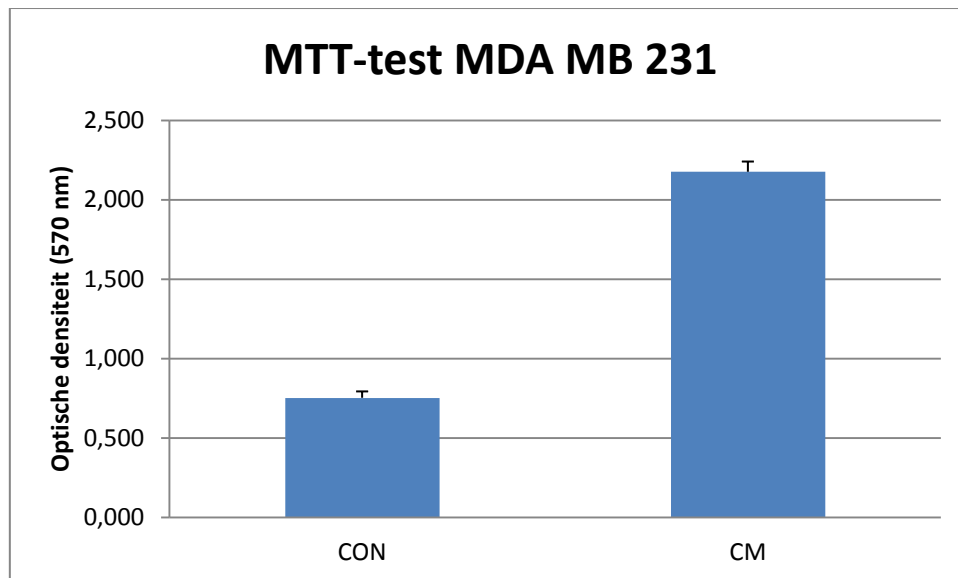
Er is geen verschil tussen de CON-groep, de CM-groep en de reverse groep wat de hoeveelheid Bcl-XL en PARP betreft.



Figuur 12: De resultaten van de Western Blot bij T47D cellen.

2.4 MTT-test bij MDA MB 231

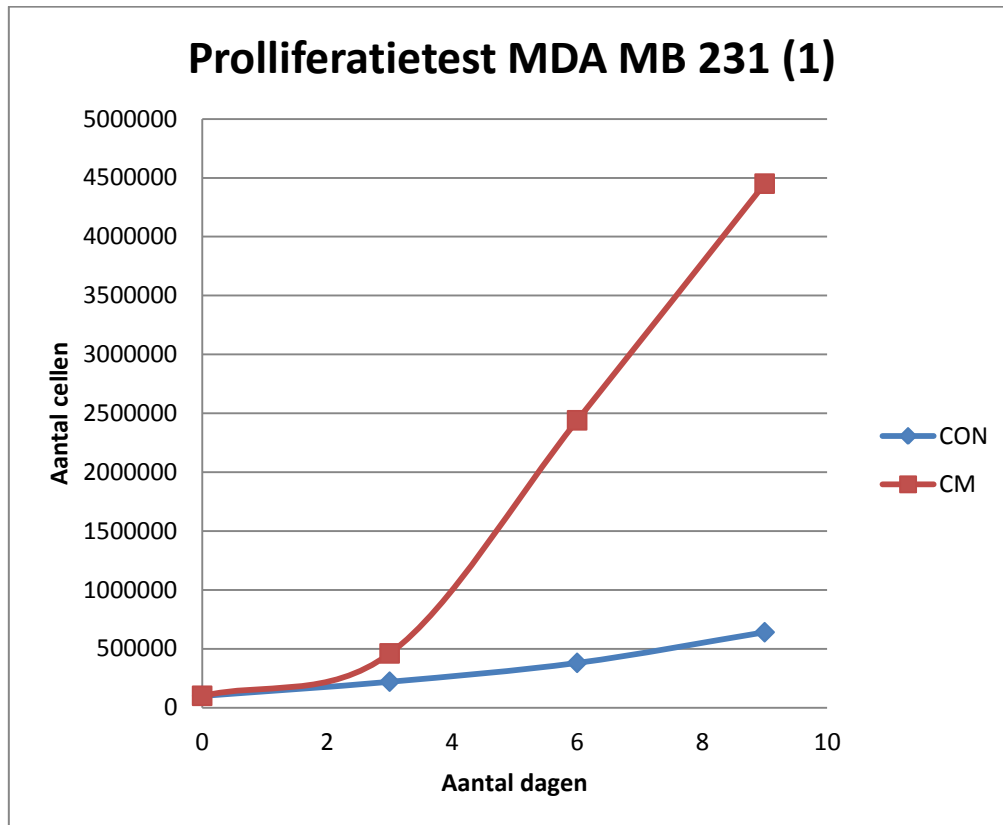
De gemiddelde optische densiteit bij de CON-groep bedraagt 0,753 met een standaarddeviatie van 0,040. Bij de CM-groep is de gemiddelde optische densiteit 2,176 en de standaarddeviatie bedraagt 0,064.



Figuur 13: Resultaat van de MTT-test bij MDA MB 231 cellen.

2.5 Proliferatietest bij MDA MB 231

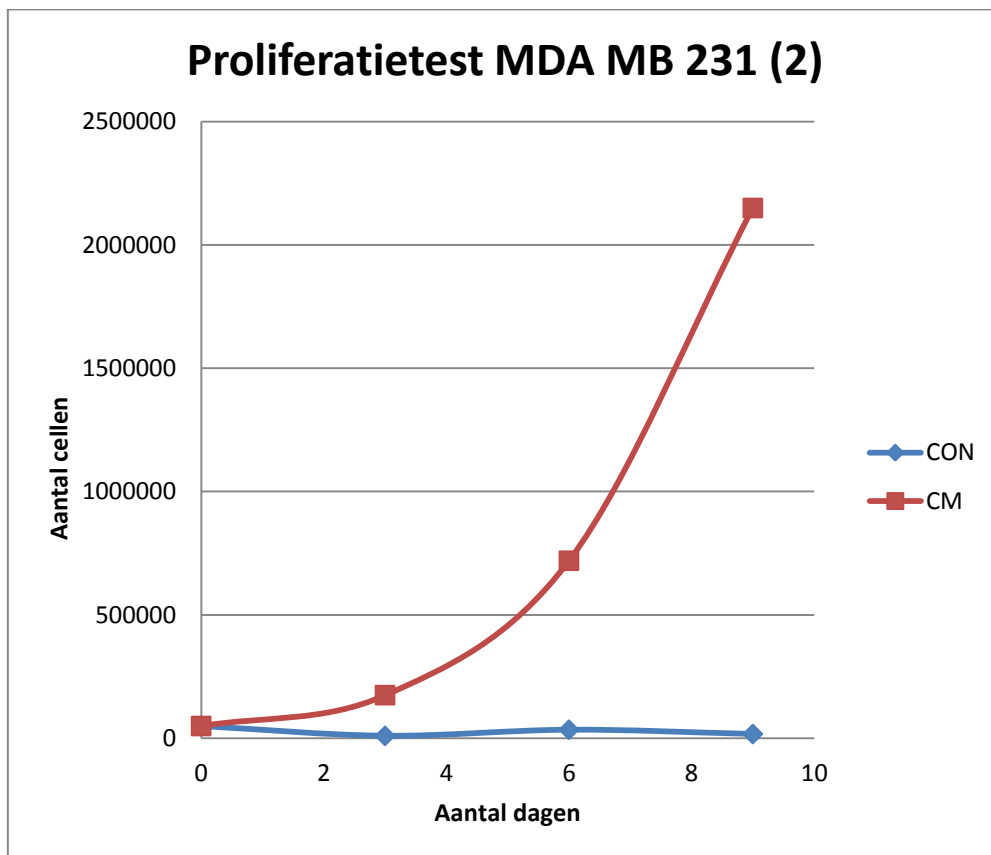
Bij aanvang waren er 100.000 levende cellen per falcon. Op dag 3 werden 220.000 cellen geteld bij de CON-groep en 460.000 cellen bij de CM-groep. 3 dagen later waren er 380.000 cellen bij de CON-groep en 2.440.000 cellen bij de CM-groep. Op dag 9 telde de falcon van de CON-groep 640.000 cellen en de falcon van de CM-groep 4.450.000 cellen.



Figuur 14: Het resultaat van de proliferatietest bij MDA MB 231 cellen met 100.000 cellen bij aanvang.

De toename van kankercellen gebeurt normaal gezien volgens een exponentiële curve. Aangezien de falcons vanaf dag 6 overvol waren, konden de cellen hierdoor niet langer exponentieel toenemen. Daarom werd de test herhaald met slechts 50.000 cellen in plaats van 100.000 cellen.

Bij herhaling werden 50.000 cellen uitgezaaid per falcon. Op dag 3 waren er 10.000 cellen bij de CON-groep en 175.000 cellen bij de CM-groep. 3 dagen later werden er 35.000 cellen geteld bij de CON-groep en 720.000 cellen bij de CM-groep. Op dag 9 telde de falcon van de CON-groep 17.500 cellen en de falcon van de CM-groep 2.150.000 cellen.



Figuur 15: Het resultaat van de proliferatietest bij MDA MB 231 cellen met 50.000 cellen bij aanvang.

2.6 Western Blot bij MDA MB 231

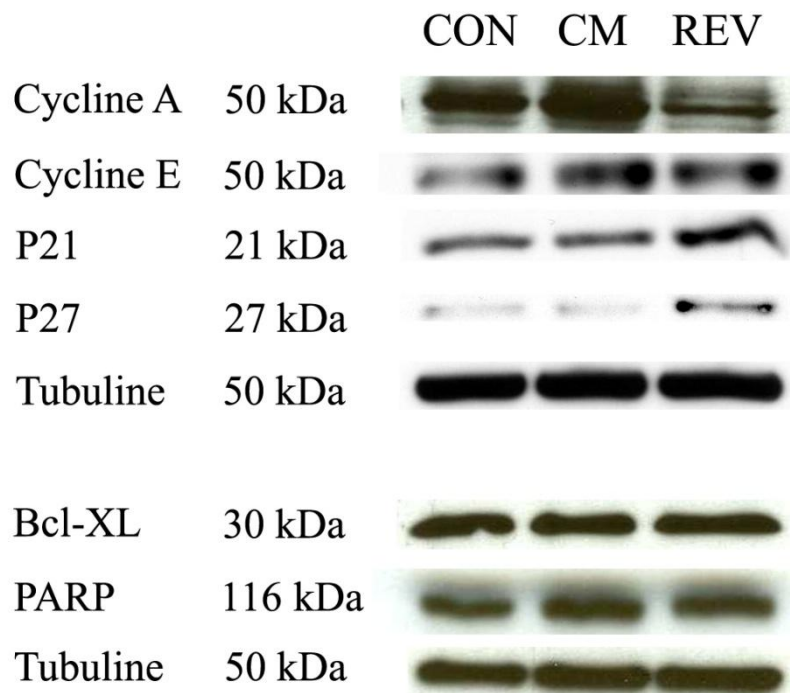
De MTT-test kon aantonen dat er een verhoogde metabole activiteit is bij de MDA MB 231 cellen in de CM-groep in vergelijking met de CON-groep. Uit de proliferatietest is vervolgens gebleken dat CM-groep telkens meer cellen bevat dan de CON-groep. Om na te gaan of dit wijten is aan verminderde celdood of eerder aan verhoogde proliferatie, werd via Western Blot gezocht naar eventuele overexpressie of onderexpressie van eiwitten die betrokken zijn bij de celcyclus of apoptose. Net als bij de T47D cellijn werden de volgende eiwitten onderzocht: cycline A, cycline E, p21, p27, Bcl-XL en PARP. Als interne controle werd eveneens de hoeveelheid tubuline nagegaan.

Uit de resultaten van de Western Blot voor cycline A, cycline E, p21, p27, Bcl-XL en PARP kan het volgende worden afgeleid (figuur 16):

De hoeveelheid cycline A en cycline E is verhoogd bij de CM-groep in vergelijking met de CON-groep en de reverse-groep.

Er is geen verschil tussen de CM-groep en de CON-groep wat de hoeveelheid p21 en p27 betreft. Van beide eiwitten is er wel een overexpressie bij de reverse-groep.

De hoeveelheid Bcl-XL en PARP is niet verschillend bij de CM-groep, de CON-groep en reverse groep.



Figuur 16: De resultaten van de Western Blot bij MDA MB 231 cellen.

3. Invloed van oplosbare factoren vrijgesteld door tumor-geassocieerd vetweefsel op de invasie van borstkankercellen

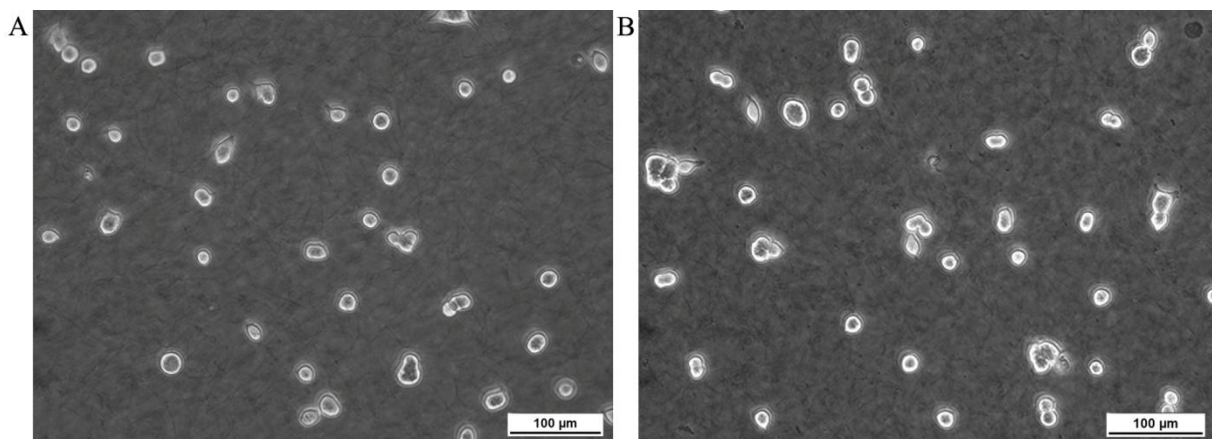
Om te kunnen spreken van een maligne tumor, moeten de kankercellen hun weefsel-specifieke biotoop hebben verlaten. Hiervoor dienen zij de basale membraan te doorbreken. Interactie tussen de kankercellen en de extracellulaire matrix (ECM) in het tumorstroma is hierbij van cruciaal belang.

De invasie is met andere woorden een essentieel aspect bij de tumorprogressie. Daarom is het nuttig om na te gaan of de factoren in het vetweefsel de invasiviteit bij borstkankercellen al dan niet stimuleren. De invasie van de epitheliale borstkankercellen T47D en MDA MB 231 in vitro kan bestudeerd worden met behulp van een matrix van collageen type I gel. Dit collageen type I is immers de belangrijkste component van de ECM rond de ducti¹⁷ (61). Collageen type I is daarenboven ook de belangrijkste component van de stromale omgeving bij vaste tumoren (57).

Met de single cell collageen type I invasie test kan de invasiviteit op korte termijn, meer bepaald 24 uur, worden nagegaan. Daarenboven is het ook nuttig om aan de hand van een transwell collageen type I invasie test de invasie van de cellen op langere termijn, namelijk 14 dagen, na te gaan.

3.1 Single cell collageen type I invasie test (SC-CIT) bij T47D

De T47D cellen in de CON-groep hebben een ronde vorm en vertonen geen uitlopers. Ook de cellen in de CM-groep vertonen dezelfde kenmerken.



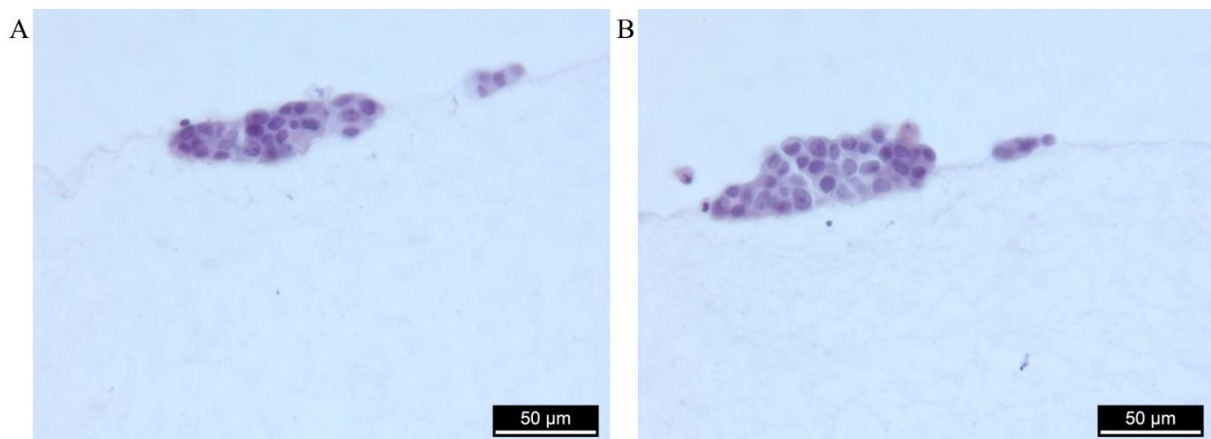
Figuur 17: Het resultaat van de SC-CIT bij T47D cellen: CON (A) en CM (B).

¹⁷ In de ECM rond de acini zijn laminine en collageen type IV, andere componenten van de ECM in een borst, meer abundant.

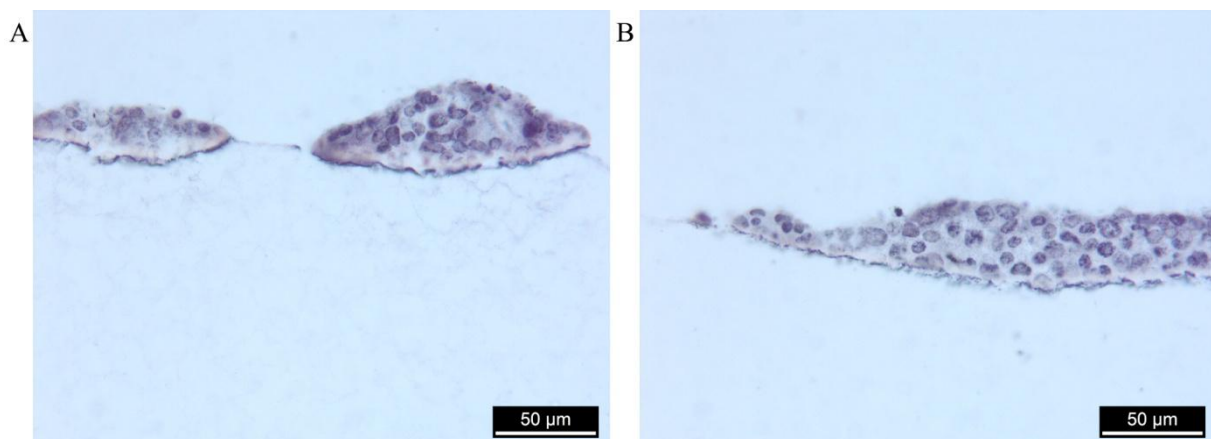
3.2 Transwell collageen type I invasie test (TW-CIT) bij T47D

Na een H&E-kleuring is de zure celkern paars gekleurd en het basische cytoplasma roze. De cellen van zowel de CON-groep als de CM-groep bevinden zich allemaal op de collageen gel (figuur 18).

Bij de ZR-kleuring worden de reticuline vezels in de basale membraan bruin gekleurd. Er is een verschil in aankleuring van het reticuline bij de CON-groep en de CM-groep (figuur 19). Bij de groep die behandeld werd met het geconditioneerd medium is de bruine lijn minder dik dan bij de groep die met controle medium werd behandeld. Daarenboven is de lijn op verschillende plaatsen onderbroken.



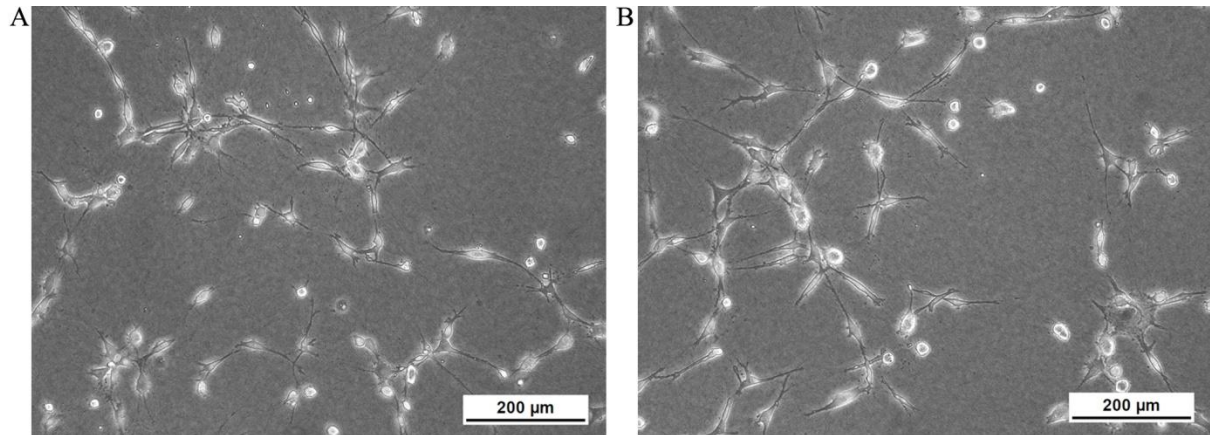
Figuur 18: TW-CIT bij T47D cellen met H&E-kleuring: CON (A) en CM (B).



Figuur 19: TW-CIT bij T47D cellen met ZR-kleuring: CON (A) en CM (B).

3.3 Single cell collageen type I invasie test (SC-CIT) bij MDA MB 231

Zowel de cellen in de CON-groep als in de CM-groep zijn gepolariseerd en vertonen lange fijne uitlopers.

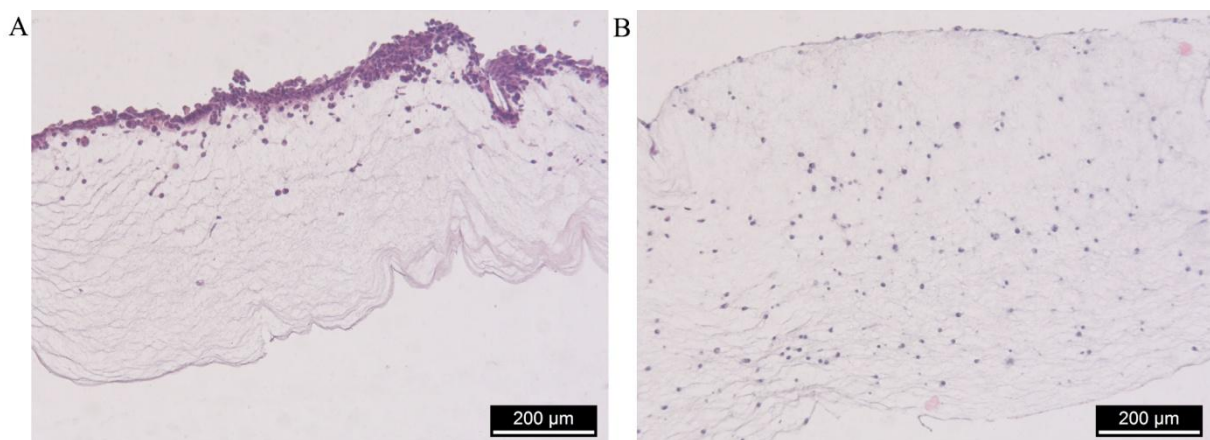


Figuur 20: Het resultaat van de SC-CIT bij MDA MB 231 cellen: CON (A) en CM (B).

3.4 Transwell collageen type I invasie test (TW-CIT) bij MDA MB 231

Na de H&E-kleuring zijn de zure celkernen paars gekleurd. Dit maakt het mogelijk om de lokalisatie van de cellen na te gaan in de collageengel.

De cellen van de CON-groep en de CM-groep hebben allebei de collageen gel geïnvadeerd (figuur 21). Toch is er een duidelijk verschil merkbaar tussen beide groepen. Bij de CON-groep ligt een groot aantal cellen nog op de gel, terwijl slechts een deel van de cellen invaderen tot ongeveer halverwege de gel. Bij de CM groep zijn zo goed als alle cellen geïnvadeerd en worden er cellen aangetroffen over de ganse dikte van de gel. Hierdoor is het zelfs niet meer duidelijk wat de bovenkant en onderkant van de gel is.



Figuur 21: TW-CIT bij MDA MB 231 cellen met H&E-kleuring: CON (A) en CM (B).

Discussie

Obesitas is een belangrijke risicofactor voor het ontstaan van borstkanker bij postmenopauzale vrouwen en daarenboven heeft het ook een negatieve invloed op de prognose bij zowel pre- als postmenopauzale vrouwen met borstkanker. Onderzoek heeft uitgewezen dat het vetweefsel hierbij een belangrijke rol heeft. Daarom werd de vraag gesteld of het vetweefsel in de borst, ongeacht of er ook sprake is van obesitas, eveneens een rol heeft bij borstkanker. Meer concreet werd nagegaan welke invloed het geconditioneerd medium van het tumor-geassocieerde vetweefsel heeft op de morfologie, de proliferatie en de invasie van borstkankercellen in vitro.

In de eerste plaats kon met behulp van een morfologie test worden aangetoond dat er morfologische verschillen zijn tussen de borstkankercellen die werden behandeld met groeimedium, controle medium of geconditioneerd medium van het vetweefsel.

T47D is geen agressieve borstkankercellijn en dit strookt met de morfologie van de cellen die werden gecultiveerd met hun normale groeimedium; de cellen zijn rond en vertonen geen uitlopers. MDA MB 231 is daarentegen wel een agressieve borstkankercellijn, wat ook blijkt uit de langwerpige morfologie van de cellen die werden uitgezaaid in groeimedium. Zowel bij T47D als bij MDA MB 231 ontstaan er morfologische veranderingen wanneer de cellen behandeld worden met controle medium (CON) of geconditioneerd medium van het vetweefsel (CM). De cellen in de CON-groep zijn langwerpiger en vertonen meer uitlopers in vergelijking met de cellen die werden gecultiveerd met groeimedium. Deze morfologische verschillen zijn te verklaren door serumdeprivatie. Het groeimedium bevat namelijk 10% FCS, terwijl het controle medium slechts 0,5% BSA bevat. De cellen in de CM-groep vertonen ook morfologische veranderingen; bij de T47D cellen zijn de cel-cel contacten minder sterk en de MDA MB 231 cellen zijn langwerpiger. Desalniettemin lijken ze qua morfologie meer op de cellen in het groeimedium. Hieruit kan worden afgeleid dat het geconditioneerd medium, in tegenstelling tot het controle medium, factoren bevat die de normale werking van de cellen ten goede komen.

Vervolgens hebben de MTT-test, proliferatietest en Western Blot uitgewezen dat het geconditioneerd medium van het vetweefsel in staat is om de proliferatie van borstkankercellen in vitro te stimuleren.

De gemeten kleurintensiteit bij de MTT-test is zowel bij de T47D cellen als bij de MDA MB 231 cellen hoger bij de CM-groep in vergelijking met de CON-groep. Bij de CM-groep is de metabole activiteit met andere woorden hoger. Deze verhoogde metabole activiteit kan op 2 manieren verklaard worden; ofwel is het metabolisme van de cellen verhoogd zonder dat de cellen in aantal zijn toegenomen, ofwel is het metabolisme van de cellen gelijk gebleven, maar is het aantal cellen toegenomen.

De proliferatietest kon aantonen dat de verhoogde metabole activiteit bij CM-groep te wijten is aan een verhoogd aantal cellen. Na 9 dagen was zowel voor de T47D als de MDA MB 231 cellijn het aantal cellen immers duidelijk hoger bij de CM-groep in vergelijking met de CON-groep. Bij de MDA MB 231 cellen was de falcon van de CM-groep zelfs overvol waardoor de cellen niet langer exponentieel konden toenemen. Dit verklaart waarom de grafiek van de CM-groep vanaf dag 6 is afgevlakt. Om dit te vermijden werd de proliferatietest herhaald met bij aanvang slechts 50.000 cellen in plaats van 100.000 cellen. Opnieuw valt op dat er veel meer cellen zijn bij de CM-groep. Aangezien de falcon niet langer overvol was, konden de cellen in de CM-groep wel exponentieel blijven toenemen en bijgevolg is de grafiek niet langer afgevlakt. Het valt echter ook op dat er na 9 dagen nauwelijks cellen overblijven bij de CON-groep. Wanneer de test werd uitgevoerd met weinig cellen bij aanvang, slagen de cellen in de CON-groep er blijkbaar niet in om te prolifereren. Behalve de conclusie dat het geconditioneerd medium ervoor zorgt dat het aantal cellen stijgt, kan er bijgevolg ook gesteld worden dat het controle medium te weinig factoren bevat voor een normale groei van de MDA MB 231 cellen.

Met behulp van de Western Blot kon worden aangetoond dat de hoeveelheid cycline A en cycline E, allebei eiwitten die de celcyclus stimuleren, zowel bij T47D als bij MDA MB 231 verhoogd zijn bij de cellen uit de CM-groep. Dit betekent dat de toegenomen metabole activiteit bij de MTT-test en het toegenomen aantal cellen bij de proliferatietest te wijten zijn aan een verhoogde proliferatie. Er kan met andere woorden gesteld worden dat het geconditioneerd medium één of meer proliferatie-stimulerende agentia bevat. De Western Blot kon verder nog uitwijzen dat de hoeveelheid p21 en p27, allebei eiwitten die de celcyclus afremmen, niet verschillend is tussen de CON- en de CM-groep. p27 is bij beide celtypes wel verhoogd bij de reverse-groep. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de falcons overvol waren op het moment dat de cellysaten werden gemaakt. Hierdoor kan door contactinhibitie een mechanisme zijn aangezet om de celcyclus af te remmen. Wellicht om dezelfde reden was er ook bij p21 upregulatie bij de reverse-groep van de MDA MB 231 cellijn. Via Western Blot zijn er noch bij T47D als bij MDA MB 231 aanwijzingen gevonden dat het toegenomen aantal cellen ook te wijten is aan een verminderde celdood. Bij beide celtypes is de hoeveelheid Bcl-XL en PARP, allebei merkers voor apoptose, immers niet verschillend bij de CON-, CM- of reverse-groep.

In de literatuur zijn geen studies te vinden over de invloed van het tumor-geassocieerde vetweefsel op de proliferatie van MDA MB 231 of T47D cellen. Onderzoek van Chamras et. al (62) toonden wel aan dat een co-cultuur van pre-adipocyten (3T3-L1) en MDA MB 231 cellen de groei van MDA MB 231 cellen met 43% verhogen. Dit resultaat is in overeenstemming met de resultaten in deze scriptie. De pre-adipocyten in het onderzoek van Chamras et. al zijn echter van murine oorsprong en daarenboven zijn ze ook niet afkomstig uit het vetweefsel rondom een tumor. Bijgevolg kunnen deze resultaten niet zomaar vergeleken worden met de resultaten in deze scriptie.

Tot slot werden ook testen uitgevoerd om de invasie van de borstkankercellen na te gaan, meer bepaald de SC-CIT en de TW-CIT. Hieruit bleek dat het geconditioneerd medium van het tumor-geassocieerde vetweefsel de invasie van MDA MB 231 cellen stimuleert.

Bij de SC-CIT, een test om de invasie op korte termijn te onderzoeken, hebben de T47D cellen in de CON-groep een ronde vorm en vertonen ze geen uitlopers. Dit strookt met het feit dat T47D cellen gekend zijn voor hun niet-invasieve eigenschappen. Ook de T47D cellen in de CM-groep vertonen geen tekenen van invasiviteit. Er kan met andere woorden niet gesteld worden dat het geconditioneerd medium bij dit celtype de invasiviteit op korte termijn bevordert. Bij het MDA MB 231 celtype vertonen zowel de cellen in CON-groep als de CM-groep invasieve kenmerken bij de SC-CIT; ze zijn gepolariseerd en hebben lange fijne uitlopers. Dit strookt met het feit dat MDA MB 231, in tegenstelling tot T47D, een invasieve cellijn is. Gezien er reeds invasiviteit is bij de CON-groep, is de SC-CIT echter niet bruikbaar om de invloed van het geconditioneerd medium bij invasiviteit op korte termijn te evalueren.

Er werd vervolgens ook een TW-CIT uitgevoerd om de invasie op lange termijn te onderzoeken. Bij de T47D cellen is er na de H&E-kleuring geen verschil zichtbaar tussen de CON-groep en de CM-groep. De cellen uit beide groepen bevinden zich immers allemaal op de collageen gel. Dit betekent dat ook na 14 dagen de T47D cellen niet invasief zijn en dat het geconditioneerd medium binnen deze termijn bij dit celtype geen invasiviteit kon induceren. Na een ZR-kleuring is er daarentegen wel een verschil merkbaar tussen de T47D cellen van de CON- en CM-groep. Bij de groep die behandeld werd met het geconditioneerd medium is de bruine lijn van de reticuline vezels namelijk minder dik dan bij de groep die met controle medium werd behandeld. Daarenboven is de bruine lijn op verschillende plaatsen onderbroken. Aangezien het reticuline een onderdeel is van de basale membraan, betekent dit mogelijk dat onder invloed van het geconditioneerd medium de basale membraan door proteolytische enzymen wordt afgebroken. Het lijkt bijgevolg nuttig om de TW-CIT bij T47D cellen te herhalen, maar dan voor een periode langer dan 14 dagen. Mogelijks zal de basale membraan dan volledig afgebroken zijn. Daarom kan een stimulerend effect van het geconditioneerd medium op de invasie van T47D cellen nog niet volledig worden uitgesloten. Bij de MDA MB 231 cellen blijkt na de H&E-kleuring dat cellen van zowel de CON-groep als de CM-groep de collageen gel hebben geïnvadeerd. Dit is in overeenstemming met de resultaten van SC-CIT. In tegenstelling tot de resultaten van de SC-CIT was er bij de TW-CIT wel een duidelijk verschil merkbaar tussen de 2 groepen. Bij de CON-groep ligt een groot deel van de cellen nog op de gel en slechts een deel van de cellen invaderen de gel tot ongeveer halverwege. Bij de CM-groep zijn daarentegen quasi alle cellen geïnvadeerd en worden ze aangetroffen doorheen de gehele gel. Dit betekent dat na 14 dagen er duidelijk een stimulerend effect is van het geconditioneerd medium op de invasiviteit van MDA MB 231 cellen.

In de literatuur zijn er weinig andere onderzoeken te vinden die het effect van het tumor-geassocieerde vetweefsel op de invasie van borstkankercellen in vitro bestuderen. Een onderzoek van Queen et al. (63) heeft wel een correlatie aangetoond tussen de neutrofielen in het tumorstroma (en bijgevolg ook in het vetweefsel van het tumorstroma bij borstkanker) en de invasiviteit van MDA MB 231 en T47D cellen. Queen et al. toonden immers aan dat de neutrofielen in het tumorstroma in staat zijn om grote hoeveelheden oncostatine M te produceren, op voorwaarde dat de neutrofielen samen met MDA MB 231 of T47D borstkankercellen in cultuur worden gebracht. Het oncostatine M dat door de neutrofielen in het tumorstroma wordt geproduceerd, veroorzaakt vervolgens inductie van de 'vascular endothelial growth factor' (VEGF) en het promoot daarenboven ook de invasiviteit van de kankercellen.

Over de invloed van normaal vetweefsel en/of normale adipocyten op de invasie van MDA MB 231 cellen werden al meer studies gepubliceerd. Walter et al. (30) ontdekten bijvoorbeeld dat de stromale cellen uit het vetweefsel van kankervrije patiënten de migratie en invasie promoten van ER-positieve MCF-7 en ER-negatieve MDA MB 231 cellen in vitro. Hetzelfde onderzoek wees ook uit dat cofilin-1 afhankelijke signaal cascades hierbij betrokken zijn. De hypothese van Walter et al. is dat de cofilin-1 cascade geactiveerd wordt door de vrijstelling van IL-6 uit het vetweefsel. Kun-Yong Kim et al. (64) konden aantonen dat een geconditioneerd medium van adipocyten, maar niet van pre-adipocyten, de invasie van MDA MB 231 stimuleren door verhoogde productie van TNF- α in de MDA MB 231 cellen waardoor de 'CC chemokine ligand 20' (CCL20) expressie gestimuleerd wordt. Dit CCL20 bleek in staat om de migratie en invasie van MDA MB 231 cellen te bevorderen. CCL20 had daarentegen geen effect op de proliferatie van de cellen. Tot slot toonden Arihiro et al. (65) aan dat de adipokines HGF, IL-6, IL-11 en IL-8 een dosisafhankelijke invloed hebben op de migratie van MDA MB 231 cellen. Dergelijk effect kon niet worden aangetoond bij T47D cellen.

Als conclusie kan gesteld worden dat de oplosbare factoren uit het tumor-geassocieerde vetweefsel in de borst volgens dit onderzoek effectief een rol kunnen spelen bij de progressie van borstkanker. Om de onderliggende mechanismen hiervan te ontrafelen, kan enerzijds een 'protein array' worden uitgevoerd om zo de verschillende factoren in het geconditioneerd medium te identificeren en anderzijds kan met behulp van een 'gene array' worden nagegaan welke signaal cascades geactiveerd of geïnhibeerd worden bij de cellen die met het geconditioneerd medium van het tumor-geassocieerde vetweefsel werden behandeld. Het ultieme doel is dan om via een therapeutische interventie in te grijpen ter hoogte van de signaal cascade die verantwoordelijk is voor de geobserveerde effecten, om zo de tumorprogressie te blokkeren.

Referentielijst

1. Mareel M, Vermeulen S, Bracke M. Moleculaire mechanismen van kankeruitzaaiing: adhesie moleculen en netwerken van signaaltransductie. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1997;59(4):327-51.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
3. Riley LB, Desai DC. The molecular basis of cancer and the development of targeted therapy. *Surg Clin North Am* 2009;89(1):1-15, vii.
4. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4(11):839-49.
5. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003;200(4):429-47.
6. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 2002;8(9):2912-23.
7. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 2010;18(6):884-901.
8. Angeli F, Koumakis G, Chen MC, Kumar S, Delinassios JG. Role of stromal fibroblasts in cancer: promoting or impeding? *Tumour Biol* 2009;30(3):109-20.
9. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18(1):27-34.
10. Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet* 2009;25(1):30-8.
11. Kim JB, Stein R, O'Hare MJ. Tumour-stromal interactions in breast cancer: the role of stroma in tumourigenesis. *Tumour Biol* 2005;26(4):173-85.
12. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 2008;123(10):2229-38.
13. Denys H, Braems G, Lambein K, Pauwels P, Hendrix A, De Boeck A, et al. The extracellular matrix regulates cancer progression and therapy response: implications for prognosis and treatment. *Curr Pharm Des* 2009;15(12):1373-84.
14. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 2008;14(5):518-27.
15. Belgian Cancer Registry. Cancer incidence in Belgium 2008. Online 2011. Opgehaald op 14 april 2012, van <http://www.kankerregister.org/media/docs/ib/large.html>
16. Dhont M, Devroey P, Gerris J, Jacquemyn Y, Vergote I, Braems G, et al. Senologie - Gynaecologische oncologie. In: *Handboek Gynaecologie*, Dhont M, editor. Acco, Leuven, 2009; 223-44.

17. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46(4):765-81.
18. Carter JC, Church FC. Obesity and Breast Cancer: The Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma and Plasminogen Activator Inhibitor-1. *PPAR Res* 2009;1-13. doi:10.1155/2009/345320.
19. Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene* 2004;23(38):6365-78.
20. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj* 2000;321(7261):624-8.
21. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* 2008;216(2):141-50.
22. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res* 2009; 7(1-2):4-13.
23. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 2007;109(9):1721-8.
24. Fair AM, Montgomery K. Energy balance, physical activity, and cancer risk. *Methods Mol Biol* 2009;472:57-88.
25. World Health Organization. Fact sheet 311: obesity and overweight. Online 2011. Opgehaald op 16 april 2012, van <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
26. Power C, Miller SK, Alpert PT. Promising new causal explanations for obesity and obesity-related diseases. *Biol Res Nurs* 2007;8(3):223-33.
27. European Association for the study of Obesity. Obesity in European Adults. Online 2010. Opgehaald op 19 april 2012, van <http://www.easo.org/documents/AdultEU27September2010.pdf>
28. Fruhbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Mol Biol* 2008;456:1-22.
29. Maccio A, Madeddu C. Obesity, inflammation, and postmenopausal breast cancer: therapeutic implications. *ScientificWorldJournal* 2011;11:2020-36. doi:10.1100/2011/806787.
30. Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R. Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 2009;28(30):2745-55.
31. Schaffler A, Scholmerich J, Buechler C. The role of 'adipotropins' and the clinical importance of a potential hypothalamic-pituitary-adipose axis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2(7):374-83.
32. Korner A, Pazaitou-Panayiotou K, Kelesidis T, Kelesidis I, Williams CJ, Kaprara A, et al. Total and high-molecular-weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(3):1041-8.
33. Stephenson GD, Rose DP. Breast cancer and obesity: an update. *Nutr Cancer* 2003;45(1):1-16.

34. Protani M, Coory M, Martin JH. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123(3):627-35.
35. Jarde T, Perrier S, Vasson MP, Caldefie-Chezet F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *Eur J Cancer* 2011;47(1):33-43.
36. Dawood S, Broglio K, Gonzalez-Angulo AM, Kau SW, Islam R, Hortobagyi GN, et al. Prognostic value of body mass index in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(6):1718-25.
37. Carmichael AR. Obesity as a risk factor for development and poor prognosis of breast cancer. *BJOG* 2006;113(10):1160-6.
38. Carmichael AR, Bates T. Obesity and breast cancer: a review of the literature. *Breast* 2004;13(2):85-92.
39. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004;4(8):579-91.
40. Vona-Davis L, Rose DP. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer* 2007;14(2):189-206.
41. Harvie M, Hooper L, Howell AH. Central obesity and breast cancer risk: a systematic review. *Obes Rev* 2003;4(3):157-73.
42. Ray A, Cleary MP. Obesity and breast cancer: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem* 2012;45(3):189-97.
43. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(18):1472-89.
44. Godsland IF. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. *Clin Sci* 2010;118(5):315-32.
45. LeRoith D, Helman L. The new kid on the block(ade) of the IGF-1 receptor. *Cancer Cell* 2004;5(3):201-2.
46. Celis JE, Moreira JM, Cabezon T, Gromov P, Friis E, Rank F, et al. Identification of extracellular and intracellular signaling components of the mammary adipose tissue and its interstitial fluid in high risk breast cancer patients: toward dissecting the molecular circuitry of epithelial-adipocyte stromal cell interactions. *Mol Cell Proteomics* 2005;4(4):492-522.
47. Ailhaud G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol* 2006;329(8):570-7.
48. Housa D, Housova J, Vernerova Z, Haluzik M. Adipocytokines and cancer. *Physiol Res* 2006;55(3):233-44.
49. Caldefie-Chezet F, Damez M, de Latour M, Konska G, Mishellani F, Fusillier C, et al. Leptin: a proliferative factor for breast cancer? Study on human ductal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334(3):737-41.
50. Rose DP, Komninou D, Stephenson GD. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obes Rev* 2004;5(3):153-65.
51. Harvie M, Howell A. Energy balance adiposity and breast cancer - energy restriction strategies for breast cancer prevention. *Obes Rev* 2006;7(1):33-47.

52. American Type Culture Collection. Cell Line Designation: T-47D. Opgehaald op 18 februari 2012, van <http://www.atcc.org/attachments/17436.pdf>
53. Cell Biolabs Inc. Product data sheet: T47D/GFP Cell Line. Opgehaald op 18 februari 2012, van <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-208-gfp-t47d-cell-line.pdf>
54. Active Motif. Technical data sheet: MDA-MB-231 nuclear extract. Opgehaald op 18 februari 2012, van <http://www.activemotif.com/documents/tds/36080.pdf>
55. American Type Culture Collection. Cell Line Designation: MDA-MB-231. Opgehaald op 1 mei 2012, van <http://www.atcc.org/attachments/17400.pdf>
56. Biotek. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. Online 2009. Opgehaald op 14 maart 2012, van <http://www.biotek.com/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html>
57. De Wever O, Hendrix A, De Boeck A, Westbroek W, Braems G, Emami S, et al. Modeling and quantification of cancer cell invasion through collagen type I matrices. *Int J Dev Biol* 2010;54(5):887-96.
58. Donovan J, Slingerland J. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Cell cycle arrest by transforming growth factor-beta and its disruption in cancer. *Breast Cancer Res* 2000;2(2):116-24.
59. Mullen P. PARP Cleavage as a Means of Assessing Apoptosis. In: *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Langdon SP, editor. Humana Press Inc., Totawa, 2003;171-81.
60. Chun KH, Pfahl M, Lotan R. Induction of apoptosis by the synthetic retinoid MX3350-1 through extrinsic and intrinsic pathways in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2005;24(22):3669-77.
61. Wozniak MA, Keely PJ. Use of three-dimensional collagen gels to study mechanotransduction in T47D breast epithelial cells. *Biol Proced Online* 2005;7(1):144-61. doi:10.1251/bpo112.
62. Chamras H, Bagga D, Elstner E, Setoodeh K, Koeffler HP, Heber D. Preadipocytes stimulate breast cancer cell growth. *Nutr Cancer* 1998;32(2):59-63.
63. Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck CR, Jorcyk CL. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res* 2005;65(19):8896-904.
64. Kim KY, Baek A, Park YS, Park MY, Kim JH, Lim JS, et al. Adipocyte culture medium stimulates invasiveness of MDA-MB-231 cell via CCL20 production. *Oncology Rep* 2009; 22(6):1497-504.
65. Arihiro K, Oda H, Kaneko M, Inai K. Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast cancer* 2000;7(3):221-30.