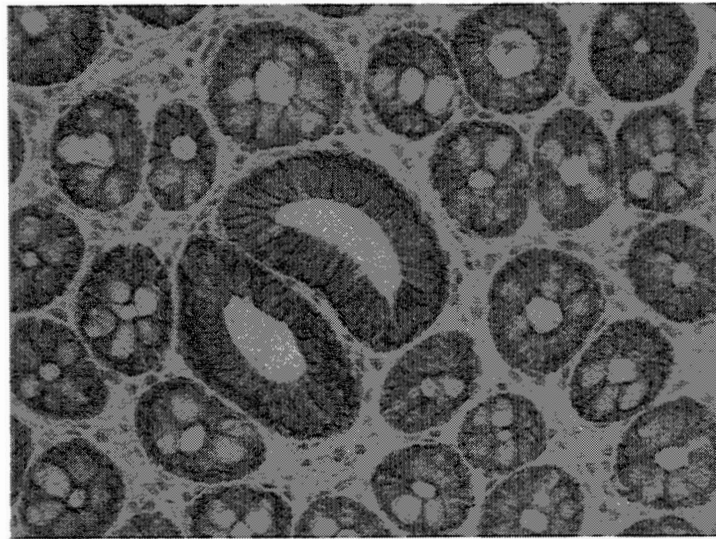


Het effect van bioactieve stoffen op colon epitheel cellen



Een zoektocht naar het vinden van een goede biomarker

Het effect van bioactieve stoffen op colon epitheel cellen

Een zoektocht naar het vinden van een goede biomarker

Naam: Chantal Tilburgs
Instelling: TNO Kwaliteit van Leven
Afdeling: Physiological Sciences
Plaats: Zeist
Stagebegeleiders: Drs. A.A. Dihal
Dr. R.H. Stierum
Dr. C.A.M. Krul
School: Hogeschool Utrecht
Richting: Moleculaire Biologie
Stagebegeleidster: br. Karin van Vliet
Stageperiode: 18-04-2005 tot 31-12-2005

MEDIATHEEK HOGESCHOOL UTRECHT
FACULTEIT NATUURWETENSCAPEN
F.C. DONDERSSTRAAT 65
3572 JE UTRECHT
TEL. 030 - 275 88 61

Voorwoord

Daar is tie dan na 8% maand stage bij het TNO kwaliteit van leven te Zeist is hier mijn afstudeerverslag. Na eerst het MBO medische microbiologie gedaan te hebben en daar opvolgend het HBO, ben ik nu eindelijk klaar en behaal ik straks mijn HBO diploma moleculaire biologie. Maar voor het zover is, wil ik eerst nog een aantal mensen bedanken voor hun hulp tijdens deze afstudeerstage.

Als eerst mijn **stage** begeleiders van de afdeling **Physiological Sciences**: Ashwin A. Dihal, Rob H. Stierum, Cyrille A.M. Krul en Michèlle J.M. van den Wijngaard voor de begeleiding van mijn stage. Van de afdeling **Analytical Sciences**: Angelique P. van Meeteren-Kreikamp, Linda Le Noble-Hendriks en Robert P. Doornbos voor hun hulp en het gebruik van het RT-PCR apparaat. Karin Junker van de afdeling Toxicology and Applied Pharmacology voor haar hulp en het gebruik van de microscoop en de bij behorende camera. En als laatste Karin van Vliet van de Hogeschool Utrecht als mijn stage begeleidster.

Samenvatting

Uit verschillende epidemiologische studies blijkt dat een hoge inname van groenten en fruit een beschermend effect geeft op het ontstaan van kanker. Een mogelijke verklaring hiervoor kan zijn, is dat groenten en fruit, bioactieve stoffen bevatten die voor dit beschermende effect verantwoordelijk zijn. Dit maakt dat onderzoek nodig is naar de werkingmechanismen, de inname, de biobeschikbaarheid, het metabolisme en het gezondheidsbeschermende effect van afzonderlijke bioactieve stoffen. Om het effect van voedingsstoffen te bestuderen op het ontstaan van voorlopers en tumoren in het colon, zijn er dierstudies gedaan naar azoxymethane (AOM) geïnduceerde tumoren in F344 ratten, met quercetine, rutine, wheat bran en curcumine als model stoffen. Tijdens deze afstudeerstage is er gewerkt met materiaal uit 2 dierstudies. Van de eerste dierstudie zijn er ratten darmen gescreend op voorlopers van colorectale kanker (Deel A) en van de tweede dierstudie is er gekeken naar het effect van bioactieve stoffen op de genexpressie van colon epitheel cellen (Deel B).

Deel A Het screenen van ratten darmen op voorlopers van colorectale kanker

Om het effect van quercetine en rutine te bestuderen is er een dierstudie gedaan naar AOM geïnduceerde tumoren in F344 ratten. De stoffen rutine, en quercetine zijn aan het diervoer toegevoegd en de AOM is subcutaan toe gediend. Op twee tijdstippen zijn er dieren geofferd, namelijk 8 weken na de laatste AOM injectie (interim sectie) en na 38 weken (eindsectie). Tijdens de eindsectie is er gebleken dat het aantal tumor dragende dieren afneemt naarmate de concentratie quercetine hoger werd. Van 2 groepen dieren uit de interim sectie zijn de darmen op histologische voorlopers gescreend. De controle groep (alleen AOM) en de groep met de hoogste concentratie quercetine (AOM + 10.000ppm quercetine) zijn gebruikt voor immunohistochemie, omdat bij deze concentratie quercetine, de tumor vorming het meest geremd wordt in de eindsectie. Er wordt verwacht dat de afname in de tumoren bij de eindsectie ook te zien is bij de voorlopers in de interim sectie. Er zijn en face coupes gesneden (van de lumenale zijde naar de spier laag) en deze zijn gekleurd met hematoxyline en eosine (H&E) en met immunologische kleuringen tegen Ki-67 en B-catenine. De colons van de ratten zijn gescreend op voorlopers van colon tumoren: de Abberant crypt foci (ACF), de B-catenine accumulated abberant crypt foci (BCAA) en de β -catenine accumulated crypt (BCAC). Er is gebleken dat in dit model quercetine geen invloed heeft op het ontstaan van de ACF, BCAA, en BCAC. Er is ook gebleken dat de ACF, BCAA en BCAC geen goede biomarkers zijn om colon tumoren te voorspellen in dit model.

Deel B Het effect van bioactieve stoffen op de genexpressie van colon epitheel cellen

Om het effect van rutine, curcumine en wheat bran te bestuderen is er een dierstudie gedaan naar AOM geïnduceerde tumoren in F344 ratten. De stoffen rutine (4.0%), curcumine (0.2%) en wheat bran (10%) zijn aan het diervoer toegevoegd en de AOM is subcutaan toe gediend. Op vier tijdstippen zijn er dieren geofferd, namelijk na 7 weken (sectie 1), na 15 weken (sectie 2), na 26 weken (sectie 3) en na 38 weken (eind sectie). Van de 1^{ste}, 2^{de} en 3^{de} sectie is er uit colon RNA geïsoleerd. Het RNA is gebruikt om met behulp van real time PCR (RT-PCR) te analyseren. Deze genen zijn uitgekozen aan de hand van een soortgelijk experiment en op basis van betrokkenheid bij de vorming van colon tumoren om de genexpressie van deze genen te bestuderen. Uit de RT-PCR is gebleken dat de B-actine en de GAPDH goede huishoudgenen zijn in dit model en dat er een correlatie is in de genexpressie van B-actine en GAPDH $R = 0.98144$. Er is gebleken dat er geen verschil is in expressie van B-catenine en COX-2 tussen de verschillende behandelingsgroepen en sectie tijden, en er is gebleken dat MMP-7 te laag tot expressie komt om door middel van RT-PCR aan te tonen.

Summary

From several epidemiologic studies it becomes clear that a high intake of vegetables and fruit protect against the development of cancer. A possible explanation for this is that vegetables and fruit, contain bio-active substances, which might be responsible for this protecting impact. Research to the functioning mechanisms, the intake, the bioavailability, the metabolism and the health protective impact of the separate bio-active substances is necessary. To study the impact of bio-active substances animal studies were preformed. Tumors were induced with azoxymethane (AOM) in F344 rats. During this traineeship I have been working with material from 5 animal studies. Of the first animal studies rats colon have been screened on precursors of colorectal cancer (part A). From the second animal study the impact of bio-active substances on the gene expression of colon epithelial cells was studied (part B).

Part A Screening of rat colon on precursors of colorectal cancer

At two time points animals were sacrificed, 8 weeks after the last AOM injection (interim section) and after 38 weeks (final section). At the final section the number of animals, which are carrying tumors, were dose related decreased by quercetin. From 2 groups of the study the colons were screened on precursors of colorectal tumors. The control group (only AOM) and the group with the highest concentration quercetin (AOM + 10.000ppm quercetin). It was expected that the decrease in the tumors at the end section would be observed also at the precursor stages of the interim section. The colon was cut *en face* in to tissue slides (from the luminal site to the muscle layer) and the slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and with immunological stainings against Ki-67 and B-catenin. The colons of the rats were screened on precursors of colon tumors namely the aberrant crypt foci (ACF), B-catenin accumulated aberrant crypt foci (BCAA) and IJ-catenin accumulated crypts (BCAC). There was found that quercetin had no influence on the development of the precursor stages ACF, BCAA and BCAC. There was also found and that these precursor stages aren't good biomarkers to predict colorectal tumors in this model

Part B The effect of bioactive substances on the gene expression of colon epithelial cells

To study the effect of rutin, wheat bran and curcumin an animal study was preformed. At four time points animals were sacrificed, after 7 weeks (section 1), after 15 weeks (section 2), after 26 weeks (section 3) and after 38 weeks (final section). RNA was isolated from ~0,5cm colon sections of the 1st, 2nd and 3rd section, this RNA will be analyzed with the affymetrix micro array, but unfortunately there was no authorization for this procedure yet. However, genes were analyzed using real time PCR (RT-PCR). These genes were selected based on a similar experiment with a human colon cell line and on the basis of involvement in the development of colon tumors. From RT-PCR have become clear that B-actin and GAPDH are good housekeeping genes and that there is an correlation between the expression of B-actin and GAPDH. We measured no difference in expression from B-catenin and COX-2 between the several treatment groups and section times. The expression of MMP-7 was too low to measure with RT-PCR

Afkortingen

ACF	Abberant Crypt Foci
ADH	Aanbevolen Dagelijkse Hoeveelheid
AOM	Azoxymethane
BCAA	B-catenine Accumulated Abberant Crypt Foci
BCAC	B-catenine Accumulated Crypt
Bp	Base paren
cDNA	Copy deoxyribonucleïnezuur
COX-2	Cyclooxygenase 2
cRNA	Complementair ribonucleïnezuur
dsDNA	Dubbel strengs DNA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
F344	Fischer 344 rat
Fw	Forward
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase
H&E	Hematoxyline & Eosine
IVC	Individually ventilated Cage
N T	<i>In vitro</i> transcriptie
MMP-7	Matrix metalloproteinase 7
mRNA	Messenger RNA
PBS	Phosphor Buffered Saline
PPM	Parts Per Million
RNA	Ribonucleïnezuur
RT-PCR	Real Time Polymerase chain Reaction
Rv	Reverse
ssDNA	Enkel strengs DNA
VIP	Vacuum infiltration processor

Inhoudsopgave

Algemene inleiding.....	9
Colorectale kanker.....	9
Tumor vorming.....	10
Bioactieve stoffen.....	11
De dierstudies.....	11
Doel van het onderzoek.....	12
 Deel A Het screenen van ratten darmen op voorlopers van colorectale kanker	
1 Inleiding.....	14
1.1 Quercetine.....	14
1.2 Biomarkers	14
1.2.1 β -catenine	15
1.2.2 Ki-67	15
2 Materiaal en methode.....	16
2.1 De dierstudie.....	16
2.2 Immunoscopes.....	17
2.2.1 Bewerking van de rattendarmen voor de kleuringen	17
2.2.2 Hematoxyline & eosine kleuring.....	17
2.2.3 Immuno kleuringen β -catenine en Ki-67.....	18
2.2.4 Immunoscopes.....	19
3 Resultaten.....	20
3.1 Tumor incidentie.....	20
3.3 Foto's abberant crypt foci.....	21
3.4 Foto's β -catenine acumrnulated crypt	22
3.5 Foto's β -catenine acumrnulated abberant crypt foci	23
3.6 Frequentie van ACF + BCAA, ACF, BCAA en de BCAC	24
3.7 De Multipliciteit van de ACF + BCAA, ACF, BCAA en de BCAC	24
3.8 De intensiteit van de B-catenine in de BCAA en de BCAC	25
3.9 De intensiteit van de Ki-67 in de ACF en de BCAA	25
3.10 De proliferatieindex in de Ki-67 van de ACF en de BCAA.....	26
3.11 De multipliciteit versus de intensiteit in de Ki-67 en de β -catenine.....	2 6
3.12 De multipliciteit versus de proliferatie index positieve kernen in de Ki-67	2 6
4 Discussie.....	27
5 Conclusie.....	28
6 Vervolg onderzoek.....	28
 Deel B Het effect van bioactieve stoffen op de genexpressie van colon epitheel cellen	
1 Inleiding.....	30
1.1 Bioactieve stoffen: Wheat bran, curcumine, en rutine	30
1.2 Microarray	31
1.3 Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction	32
1.3.1 Huishoudgenen GAPDH en B-actine	33
1.3.2 B-catenine.....	33
1.3.3 Cyclooxygenase 2.....	33
1.3.4 Matrix metalloproteinase 7.....	33
2. Materiaal en methode.....	3 4
2.1 De dierstudie.....	34
2.2 Optimalisatie RNA isolatie uit het colon.....	34
2.3 RNA isolatie uit het colon	35
2.4 Micro Array.....	35
2.5 Real Time Polymerase Chain Reaction.....	36
2.5.1 Ontwikkeling van nieuwe SYBR Green primer sets m.b.v. Beacon Designer 4.02	36
2.5.2 Ontwikkeling van de standaard voor de RT-PCR reactie.....	36

2.5.3	Temperatuur gradiënt.....	37
2.5.4	Standaardlijn RT-PCR	38
2.5.5	cDNA synthese.....	39
2.5.6	RT-PCR met SYBR green.....	39
2.5.7	RT-PCR met Taqman.....	40
3	Resultaten	41
3.1	ACF aantallen.....	41
3.2	Tumor incidentie.....	41
3.3	Optimalisatie RNA isolatie.....	42
3.4	RNA isolatie uit de monsters.....	43
3.5	Micro Array.....	44
3.6	Opzetten van de RT-PCR.....	44
3.6.1	Temperatuur gradiënt.....	44
3.6.2	Standaard curve	45
3.7	Analyse van de monsters met RT-PCR.....	46
3.7.1	Huishoudgen β -actine	46
3.7.2	huishoudgen GAPDH	46
3.7.3	De expressie van β -catenine in de colon monsters	47
3.7.4	De expressie van COX-2 in de colon monsters.....	48
3.7.5	De expressie van MMP-7 in de colon monsters	48
4	Discussie	49
5	Conclusie	50
6	Vervolg onderzoek	50
	Literatuurlijst	51
	Bijlage	53
1	Resultaten Deel A	53
1.1	De multipliciteit versus de intensiteit in de Ki-67 kleuring.....	53
1.2	De multipliciteit versus de intensiteit in de B-catenine kleuring.....	54
1.3	De multipliciteit versus de proliferatie index in de Ki-67 kleuring.....	55
2	Protocolen Deel B.....	56
2.1	Standaard protocol RNeasy micro kit voor animal tissue	56
2.2	Optimalisatie RNA isolatie uit het colon	60
2.3	Beacon designer 4.01	62
3	Resultaten deel B	63
3.1	Optimalisatie RNA isolatie.....	63
4	Sequenties primers, probe en standaard	64
4.1	Taqman (J-actine.....	64
4.2	Taqman Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH.....	64
4.3	Taqman Prostaglandin-endoperoxide synthase 2.....	65
4.4	SYBR Green Matrix metalloproteinase 7.....	65
4.5	SYBR Green β -catenine.....	66
5	Beacon designer 4.02	66
6	iCycler	67

Algemene inleiding

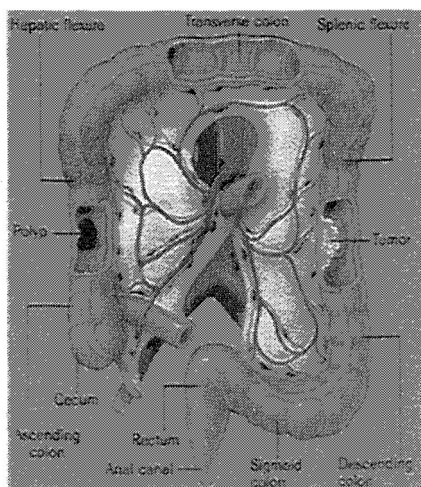
Iets meer dan een kwart van alle sterfgevallen wordt **veroorzaakt** door kanker, dit zijn ongeveer 36.000 personen per jaar. Kanker is na hart- en vaatziekten de **meest** voorkomende medische doodsoorzaak in Nederland [1]. Het aandeel van de **kankersterfte** is in de loop der jaren toegenomen. Dit wordt veroorzaakt door de vergrijzing. Hoe hoger de leeftijd, hoe groter de kans op kanker: van de 100.000 jongeren tot 24 jaar overlijden er vijf aan kanker, **terwijl** dat er per 100.000 85-plussers ongeveer 3.000 zijn [1].

De afgelopen jaren heeft wetenschappelijk onderzoek aangetoond dat er een verband is tussen het ontstaan van kanker en ons eigen gedrag. Al tientallen jaren wordt er wereldwijd onderzoek gedaan naar het verband tussen voeding en het ontstaan van kanker, Maar ook naar de beschermende werking van bioactieve stoffen op het ontstaan van kanker wordt veel onderzoek gedaan.

Colorectale kanker

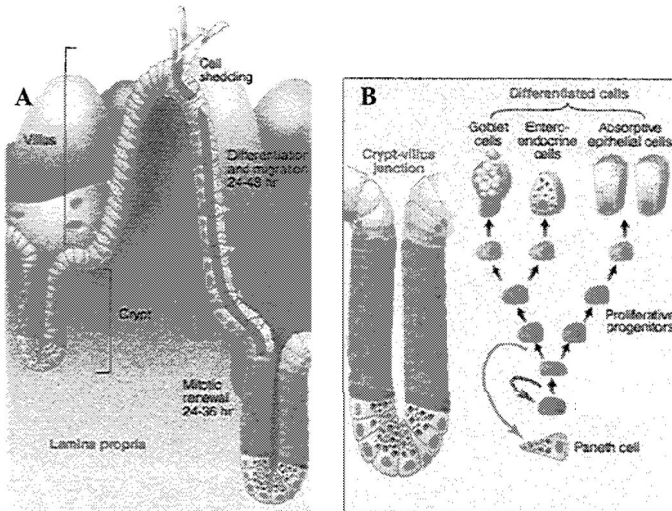
De kanker die in het colon of het rectum voortkomt wordt **colorectale** kanker genoemd. Colorectale kanker is na borst, long en prostaat kanker een van de meest voorkomende vorm van kanker en is een van de meest voorkomende doodsoorzaak in de westerse wereld [2]. Elk jaar komen er in Europa 213.000 **nieuwe gevallen** bij en sterven er 110.000 mensen als gevolg van deze ziekte [3]. In de Verenigde Staten zijn dit respectievelijk 140.000 en 50.000 mensen [4]. Het aantal mensen met colorectale kanker stijgt significant boven de leeftijd van 50 jaar [5]. Ongeveer 5% van de westerse populatie ontwikkelt colorectale tumoren tijdens hun leven [6].

Voedsel wordt na inname verteerd door maagsappen, waarna het in de dunne darm terecht komt. In de dunne darm wordt het voedsel verder verteerd door enzymen die afkomstig zijn uit de **mucosa** en door enzymen uit de pancreas. Voor het overgrote deel worden in de dunne darm de voedingsstoffen uit het voedsel geabsorbeerd. De dikke darm is het laatste deel van het spijsverteringskanaal en bestaat uit het **caecum**, het colon en het rectum. (zie figuur A). Het colon bevat vele populaties aan bacteriën die de **voedselresten**, die niet in de dunne darm zijn verteerd, verder fermenteren. Ook in dit deel van het **spijsverteringskanaal** worden voedingsstoffen opgenomen zoals elektrolyten, sommige vitamine en korte vetzuren maar voor het overgrote deel wordt er water geabsorbeerd [2].



Figuur X Weergave van een humane dikke darm [5].

Hoewel er verschillen zijn in de opbouw van de dunne en de dikke darmwand is de basis opbouw in essentie hetzelfde. Aan de basis van de crypten bevinden zich stamcellen vanwaar prolifererende cellen naar de top van de crypt migreren [6]. Tijdens deze migratie naar boven differentiëren deze stam cellen in vier verschillende typen cellen: goblet cellen (slijmbeker cellen), entero-endocrine cellen, cellen met een absorptie functie en paneth cellen (de paneth cellen komen alleen in de dunne darm en het begin van de dikke darm voor) [7].



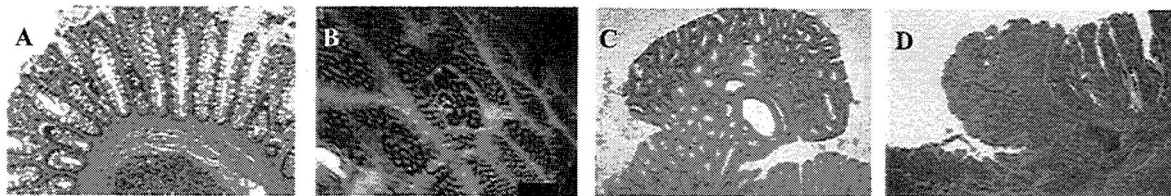
Deze gedifferentieerde cellen blijven naar boven migreren en zullen aan de top van de crypt afgestoten worden in het lumen. Deze cyclus van proliferatie en differentiatie is opmerkelijk actief en in de dunne darm passeert 60% van de crypt cellen deze cyclus elke 12 uur. In 2 tot 3 dagen is een cel van de bodem van de crypt tot boven in de villus gemigreerd [6] (zie figuur B) in het colon is dit ongeveer 4 dagen.

Figuur B De schematische anatomie van de dunne darm [8]

Tumor vorming

Colorectale kanker doet zich voor door een geleidelijke reeks van histologische veranderingen, waaraan een specifieke genetische verandering vooraf gaat. Een intestinale cel moet aan twee essentiële vereisten voldoen om zich tot kanker te kunnen ontwikkelen [7]: 1) de verandering van de cel moet een selectief voordeel hebben voor de uitbreiding van de ontstane cellen en 2) er moet voor veelvoudige veranderingen in andere genen, genetische instabiliteit verworven worden waarbij tumorvoortgang en kwaadaardige transformatie de gevolgen zijn [7].

Abberant crypt foci (ACF) worden beschouwd als voorlopers van colorectale tumoren. De ACF bestaat meestal uit weinig (1-3, soms meer) crypten en kunnen samengesteld zijn uit normale morfologische (nondisplastische) cellen en abnormale morfologische (displastische) cellen. Deze ACF's zijn alleen door middel van methyleen blauw kleuring of door middel van een microscoop in de darm waar te nemen [7] (zie figuur C). ACF's zijn te herkennen door een vergroot lumen van de crypt, een verdikt epitheel en de crypt is verhoogd richting het lumen van de darm [9]. Ook zijn er vaak meer kernen aanwezig en liggen deze onregelmatiger in de crypt. De ACF zal zich naar waarschijnlijkheid ontwikkelen tot een poliep. Echter is er gebleken dat de ACF geen goede biomarker is voor het voorspellen van colon tumoren [2]. Naar waarschijnlijkheid moeten er na het ontstaan van de ACF andere veranderingen plaats vinden om uit de ACF een poliep/ tumor te vormen. Een poliep is een uitstulping of een verdikking van het slijmvlies dat de binnenkant van het colon bekleedt. Poliepen zijn goedaardig, maar sommige kunnen uitgroeien tot kwaadaardige tumoren (kanker). Kwaadaardige tumoren in de darm komen doorgaans voor in het colon of het rectum maar kunnen ook in de dunne darm gevonden worden. De meeste colorectale tumoren, adenoma of carcinoma, zijn opgebouwd uit cellen met een kliervormige bouw [10] (zie figuur C).



Figuur C Microscopische weergaven van de verschillende stadia van colorectale kanker [7] A) normaal epitheel H&E B) een ACF methyleen blauw C) een adenoma H&E, D) een carcinoma H&E.

Bioactieve stoffen

Het is algemeen geaccepteerd dat voeding een belangrijke rol speelt bij het risico van het ontstaan van kanker in het spijsverteringskanaal. Uit verschillende epidemiologische studies blijkt dat een hoge inname **van groenten** en fruit een beschermend effect geeft op het ontstaan van kanker [11,12] en, hoewel **in** mindere mate, van **beroerte** en coronaire hartziekten [13]. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat groenten en fruit, bioactieve stoffen bevatten die voor dit beschermende effect verantwoordelijk zijn [14]. Bioactieve stoffen zijn stoffen die voor de mens een gezondheidsbevorderend effect hebben, maar niet onmisbaar zijn. In die zin wijken deze dus af van de vitamines en mineralen die wel onmisbaar zijn [15]. Het gaat bij deze groep om honderden stoffen en van vele is de exacte werking nog niet eens geheel duidelijk. Dat de gezondheid erbij gebaat is, wordt van een aantal wel bewezen geacht, maar van een groot aantal van deze stoffen is nog niet bekend hoe dat proces precies verloopt [15]. Met **betrekking** tot kanker kunnen bioactieve stoffen het kankerproces op verschillende manieren beïnvloeden: ze kunnen zowel de **initiatiefase** blokkeren als de promotie- en progressiefasen onderdrukken [16]. Het effect kan rechtstreeks gebeuren, onder andere door een antioxidant werking, maar ook indirect via de **inwerking** op enzymen, **hormonen** of het **immuunsysteem**. Flavonoiden kunnen bepaalde **enzymssystemen remmen** of induceren die **zelf betrokken** zijn bij **belangrijke** metabolische processen die de celdeling, de proliferatie, de bloedstolling en de **detoxificatie** van radicalen en afweerprocessen regelen [14]. Echter, het exacte mechanisme is niet bekend en er zijn nog geen moleculaire biomarkers voorhanden die het mogelijke anticarcinogene effect van **bioactieve** stoffen **kunnen** voorspellen.

De dierstudies

Om het effect van bioactieve stoffen te bestuderen zijn er **dierstudies** gedaan naar het ontstaan van Azoxymethane (AOM) geïnduceerde colon tumoren bij F344 ratten. Er zijn jonge dieren voor deze dierstudies gebruikt omdat er meestal op jonge leeftijd DNA schade ontstaat, die op latere leeftijd tot een aandoening kan leiden. De Fischer 344 (F344) rat wordt algemeen gebruikt voor kankeronderzoek, toxicologie en veroudering studies. Deze rat heeft een langere levensduur, een kleinere **lichaamsgrote** en een **lager** spontaan **tumoraantal** dan andere ratten [17]. Er zijn voor deze onderzoeken mannelijke F344 ratten gebruikt. Er worden alleen **mannelijk** dieren gebruikt omdat deze dieren gevoeliger blijken te zijn voor de **ontwikkeling** van **colon tumoren** [18]. Bij de ratten worden colon tumoren geïnduceerd met behulp van AOM. AOM is sterk carcinogeen en veroorzaakt DNA schade waardoor er colorectale tumoren worden gevormd in het colon van de rat of muis. Door op meerdere tijdstippen de dieren op te offeren kan **er** gekeken worden naar de **ontwikkeling** van voorlopers van tumoren en naar tumoren. Na ongeveer 8 weken hebben er in de darm voorlopers van tumoren gevormd en na ongeveer **26** weken zijn er kleine tumoren in de darm te vinden.



Figuur D De Fischer 344 rat [19].

Doel van het onderzoek

Het doel van het onderzoek beschreven in dit verslag is het vinden van **biomarkers** om colorectale tumoren in een vroeg stadium op te kunnen sporen en het onderzoeken of er stoffen zijn die colon kanker kunnen voorkomen. Dit onderzoek is nodig omdat op het moment dat er bij patiënten colon tumoren gevonden worden, dit vaak al te **laat** is om nog een goede behandeling toe te passen. **Wanneer** er tumoren worden gevonden in het colon moet er vaak al een groot gedeelte van de darm verwijderd worden of is men al te laat voor behandeling en overlijdt de patiënt aan deze aandoening.

Tijdens deze stage willen we een antwoord vinden op de vragen:

1. Geven bioactieve stoffen (de model stoffen quercetine, rutine, **curcumine** en wheat bran) een beschermende werking op het ontstaan van voorlopers en tumoren van colorectale kanker?
2. Zijn Abberant crypt foci (ACF), **β -catenine accumulated abberant crypt foci (BCAA)** en B-catenine acurnrnulated crypt (BCAC) goede biomarkers om het ontstaan van colorectale tumoren te voorspellen?
3. Kan je met behulp van gen expressie profielen colon kanker in een vroegtijdig stadium opsporen?

Om deze vragen te **kunnen** beantwoorden zijn er twee dierstudies gedaan.

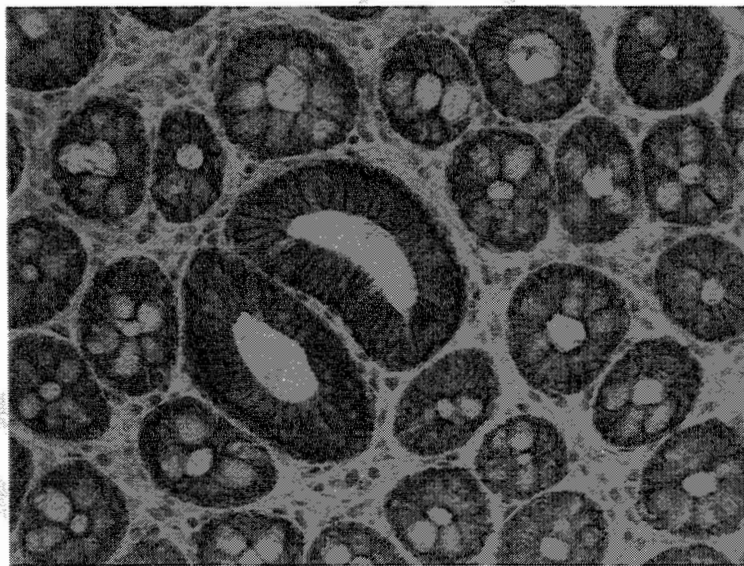
Bij de eerste dierstudie zijn er F344 ratten behandeld met AOM en hebben zij de verschillende concentraties quercetine en rutine aan hun dieet toe gevoegd gekregen. Uit deze dierstudie **willen** we antwoord **krijgen** op de vragen 1 en 2. Bij de tweede dierstudie zijn de dieren behandeld met AOM en hebben zij de stoffen rutine, **curcumine** en wheat bran aan hun dieet toe gevoegd gekregen en willen we antwoord krijgen op de vragen 1 en 3.

De hypothese is als volgt geformuleerd:

- Bioactieve stoffen hebben een modulerend effect op het **ontstaan** van colon kanker en deze ontwikkeling is al in een vroeg stadium op te pikken met behulp van moleculaire en histologische voorlopers.

Deel A

Screenen van ratten darmen op voorlopers van colorectale kanker

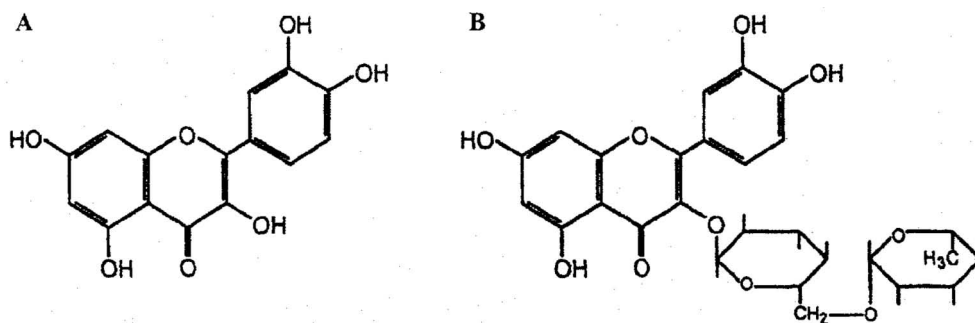


I Inleiding

1.1 Quercetine

Belangrijke bestanddelen van groente en fruit zijn de polyfenolen, flavonoiden en corresponderende glycosiden. Flavonoiden vormen een grote familie van plantaardige stoffen, deze bepalen in groenten en fruit de **grootte** variatie in Meuren, van geel tot rood en **donkerpaars**. Flavonen (Latijnse flavus = geel) hebben hun naam te danken aan plantenstoffen die **gebruikt** werden voor het geel verven van wol en katoen [20]. Flavonoiden worden ook aangeduid als bioflavonoiden en vroeger als vitamine P. Flavonoiden zijn meestal gebonden aan suikermoleculen in de vorm van de zogenaamde glycosiden. Daarnaast kunnen ook verschillende groepen aan de 3 **benzeenringen** worden geconjugeerd, zoals **methoxygroepen** en **sulfaatgroepen**, waardoor nog meer varianten ontstaan. Tot nu toe zijn al meer dan 4000 soorten flavonoiden beschreven [20]. Een van de meest voorkomende flavonoiden is quercetine. Quercetine is een bioflavonoïd die ondermeer in rode wijn, rode appels, grapefruits, uien, zwarte thee, bladgroente en bonen voorkomt. Een van de meest voorkomende vormen van quercetine in de natuur is **rutine** o.a. in thee. Dit is quercetine met daaraan een **ramnose** (suikergroep) gekoppeld (zie figuur 1.1).

Er wordt verwacht dat quercetine een beschermend effect heeft op de **vorming** van darm tumoren. Quercetine is een natuurlijke antioxidant, die o.a. lichaamcellen **beschermt** tegen beschadiging door **vrije** radicalen. Vrije radicalen zijn bijproducten van chemische reacties die in de cel plaats vinden en kunnen de cel en daardoor het lichaam schade toe brengen [21]. Ook is **er** gevonden dat quercetine en rutine het ontstaan van colon **tumoren** **remt** in carcinogene geïnduceerde modellen [22].



Figuur 1.1 De structuur van A) quercetine en B) rutine [22].

1.2 Biomarkers

Om het effect van quercetine op het ontstaan van colon tumoren in ratten aan te tonen worden er **biomarkers** gezocht. Biomarkers zijn o.a. eiwitten die aantonen of er sprake is van een aandoening, in dit geval een colon tumor. Zo kan het zijn dat bij het ontstaan van tumoren een eiwit up of down gereguleerd wordt in een cel. Een dergelijk eiwit kan dan als biomarker gebruikt worden door aan te tonen dat inderdaad dit eiwit up of down gereguleerd wordt bij de **vorming** van tumoren.

Biomarkers kunnen ook op histologisch niveau gevonden worden, zo kunnen afwijkingen in het weefsel ook een voorspellende waarden voor de **vorming** van tumoren geven. In het colon zouden er crypten met een **afwijking** kunnen zijn b.v. de Abberant Crypt Foci (ACF), de β -catenine Accumulated Crypt (BCAC) en de β -catenine Accumulated Abberant Crypt Foci (BCAA) die mogelijk ook een voorspellende waarde geven op het ontstaan van tumoren.

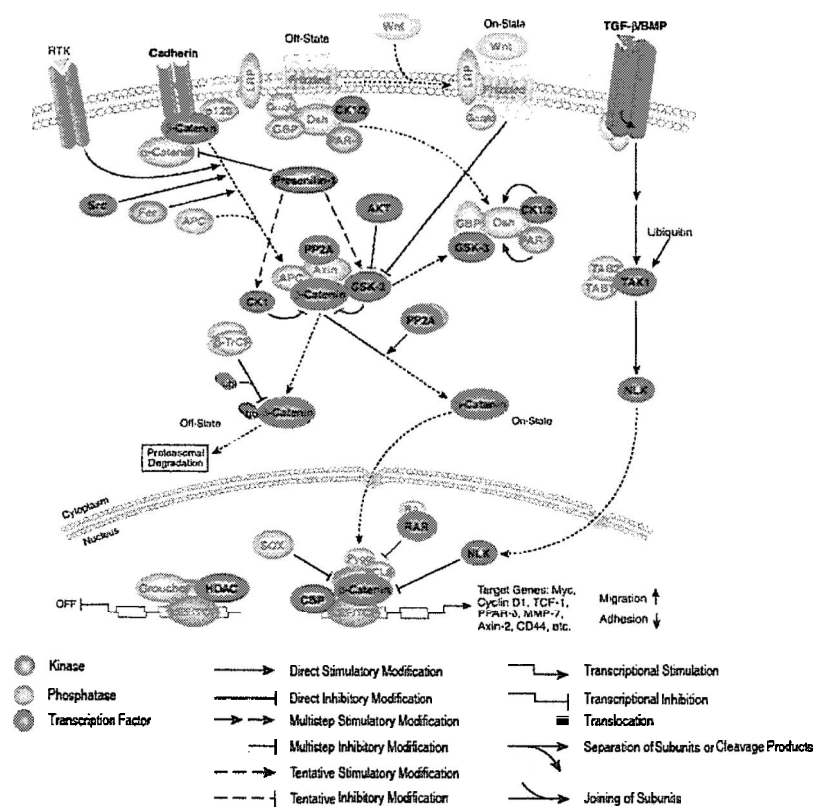
Aan de hand van eerdere publicaties is er gekozen om β -catenine te gebruiken als mogelijke biomarker [24]. De Ki-67 is gekozen omdat deze een rol speelt bij de cel proliferatie. Er word gekeken of dat R-catenine **en** Ki-67 in de ratten **darmen** van dit experiment goede biomarkers zijn om colorectale tumoren te voorspellen.

1.2.1 β -catenine

De WNT signalering is vaak een van de eerste processen die wordt verstoord bij het ontstaan van kanker. De WNT signalering speelt een rol in de gentranscriptie van bepaalde genen zoals MMP-7 en andere genen. MMP-7 kan een rol spelen in de tumor vorming als de WNT signalering niet goed gereguleerd is. Bij verstoring van de WNT signalering wordt het B-catenine niet meer afgebroken zodat deze zich ophoopt in het cytoplasma en uiteindelijk in de kern van de cel. Cytosolaire niveaus van β -catenine zijn strikt gereguleerd in de afwezigheid van WNT signalering. Door middel van een specifiek complex van proteïnen met inbegrip van APC, CIS-1, axin en GSK-3 wordt β -catenine gefosforyleerd, waarna er een ubiquitine molecuul aan het B-catenine wordt gebonden waardoor deze kan worden afgebroken in een proteasome (Zie figuur 1.2) [23].

Tijdens het laatste decennium, is het steeds duidelijker geworden dat het B-catenine WNT cascade met de ontwikkeling van colon kanker wordt geassocieerd. Onlangs, werden de doelgenen van de IJ-catenine pathway bepaald als de groei bevorderende genen, zoals c-myc en cyclin D1, die potentieel oncogen zijn [24]. Talrijke studies

met inbegrip van moleculaire analyse hebben zich op de betekenis van ACF in vroege gebeurtenissen in colon carcinogenese geconcentreerd. De betekenis van de ACF tijdens colon carcinogenese blijft tot dusver onovertuigend [24]. Van B-catenine accumulated crypt (BCAC) wordt verwacht dat deze betere biomarkers zouden zijn dan ACF's om colon tumoren te voorspellen [24]. Een verhoogde accumulatie van β -catenine in een crypt kan o.a. door middel van immunologische Meuringen worden aangetoond. Bij een verhoogde accumulatie van IJ-catenine zal het cytoplasma en van de cellen in de crypt donkerder aankleuren dan de omliggende crypten. Dit komt door dat de cellen van een crypt allemaal zijn ontstaan uit dezelfde cellen (de stamcellen onder in de crypt). Een crypt die een verhoogde expressie van β -catenine heeft wordt een B-catenine accumulated crypt genoemd (BCAC). Het kan ook voor komen dat een ACF een verhoogde expressie van B-catenine heeft deze wordt dan een B-catenine accumulated aberrant crypt foci (BCAA) genoemd.



Figuur 1.2 WNT/ β -catenine patway [25]

1.2.2 Ki-67

Van de Ki-67 wordt verwacht dat deze een goede biomarker zou kunnen zijn voor het voorspellen van de vorming van tumoren, omdat de expressie van het Ki-67 proteïne wordt geassocieerd met celproliferatie. Een verhoogde expressie van het Ki-67 kan worden geassocieerd met een verhoogde proliferatie snelheid wat weer kan duiden op de vorming van tumoren. Tijdens de interfase kan het Ki-67 uitsluitend binnen de kern worden ontdekt. Het Ki-67 eiwit is tijdens alle actieve fasen van de celcyclus (G1, S, G2, en mitose) aanwezig, maar is afwezig in rustende cellen (G0).

De expressie van Ki-67 in kan o.a. door middel van immunologische kleuringen worden aangetoond. Bij een delende cel zal Ki-67 tot expressie komen in de kernen van de crypten. Elke kern uit de crypten zal een expressie van Ki-67 vertonen, maar bij crypten die een verhoogde proliferatie snelheid vertonen zullen ook een verhoogde expressie van Ki-67 hebben waardoor de kernen donkerder aangekleurd zullen worden.

2 Materiaal en methode

2.1 De dierstudie

Deze procedure was al uitgevoerd voordat ik aan deze stage begon. Voor het uitvoeren van de dierstudie zijn er 210 mannelijke F344 ratten gebruikt. Deze ratten waren 4,5 week oud bij aankomst. Na aankomst zijn de ratten in kooien geplaatst (week -6). De ratten hebben na binnenkomst de tijd gekregen om te acclimatiseren. In week -5 zijn de ratten overgegaan op basisvoer 100% RM3. In week -4.5 zijn de ratten overgegaan op het experimentele dieet dat het basisvoer is met daaraan toegevoegd 100ppm Quercetine, 1.000ppm Quercetine, 10.000ppm Quercetine, 40.000ppm Rutine of als negatieve controle alleen het basisvoer (zie tabel 2.1). Dit dieet hebben de ratten tijdens het gehele experiment gekregen. In week -2 zijn de ratten overgebracht naar individueel geventileerde kooien (IVC). De ratten zijn naar de IVC kooien overgebracht omdat er in week -1 subcutaan azoxymethane (AOM) bij de ratten geïnjecteerd wordt. Er is niet bekend of AOM via de luchtwegen uitgescheiden kan worden. Deze IVC kooien zijn er om te zorgen dat de ratten die geen AOM toegeediend hebben gekregen er ook niet mee in aanraking kunnen komen en ook om de dierversorgers te beschermen. In week -1 hebben de ratten een eerste subcutane injectie met AOM van 15mg/kg lichaamsgewicht toegediend gekregen. De dieren die geen AOM behandeling hebben ondergaan hebben subcutaan fysiologisch zout toegediend gekregen (zie tabel 2.1). In week 0 hebben de ratten een tweede subcutane injectie toegediend gekregen die het zelfde is uitgevoerd als de eerste injectie. In week 1 zijn de ratten overgeplaatst naar de gewone kooien omdat verwacht wordt dat de concentratie aan AOM zover gedaald is dat het geen invloed meer heeft op de omgeving. In week 8 zijn er 70 van de 210 ratten op geofferd (interim sectie) en na 38 weken zijn ook de resterende 140 dieren op geofferd (eindsectie) (zie tabel 2.1). Voor de secties zijn de ratten onder narcose gebracht met 5% isoflurane in combinatie met O₂ en N₂O bij 0.6 ml/minuut, waarna het colon is verwijderd en daarna opgeofferd. Tijdens de interim sectie is het colon met methyleen blauw na gekleurd om de ACF in het gehele colon te tellen, hierbij is er nog geen onderscheid gemaakt tussen ACF en BCAA. Tijdens de eindsectie zijn de tumoren zijn uit het colon verwijderd.

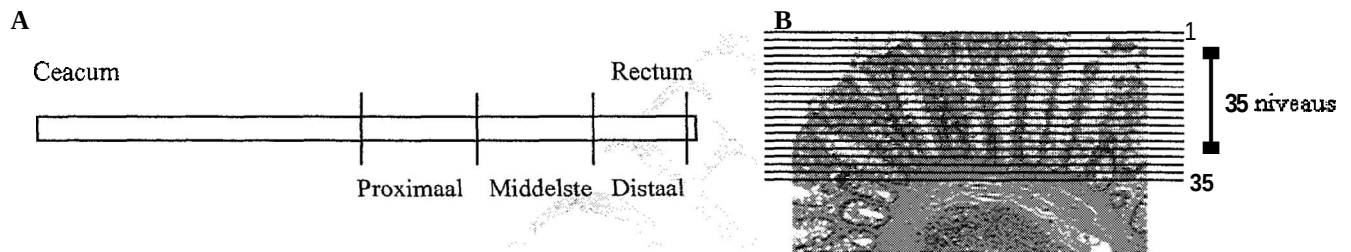
Tabel 2.1 Overzicht van de behandeling van de ratten

	Start dierstudie	Weken na AOM behandeling	
		8 weken interim sectie	38 weken eind sectie
Behandeling	Aantal ratten	Aantal ratten	Aantal ratten
Negatieve controle (basis voer)	12	6	6
Positieve controle (AOM)	30	8	22
100ppm Quercetine	12	6	6
1.000ppm Quercetine	12	6	6
10.000ppm Quercetine	12	6	6
40.000ppm Rutine	12	6	6
AOM + 100ppm Quercetine	30	8	22
AOM + 1.000ppm Quercetine	30	8	22
AOM + 10.000ppm Quercetine	30	8	22
AOM + 40.000ppm Rutine	30	8	22
Totaal	210	70	140

2.2 Immunoscores

2.2.1 Bewerking van de rattendarmen voor de kleuringen

Deze procedure was al uitgevoerd voordat ik aan deze stage begon. Van de dieren uit de interim sectie die behandeld zijn met AOM +10.000ppm quercetine en de corresponderende controle groep (alleen AOM), zijn de colons gebruikt voor de histologische en immunologische kleuringen. Na verwijdering is het colorectum open gesneden langs de longitudinale as (van ceacum naar rectum) en gespoeld met 70% ethanol 4°C. Het colorectum uit AOM behandelde ratten werd gefixeerd tussen filtratiepapier en opgeslagen in 70% ethanol bij 4°C tot de telling van de ACF's met methyleen blauw. Na voltooiing van ACF scores, werd het distale colon dat tussen de visgraat structuur en het rectum is gelegen (2 cm van anus) verwijderd, en verdeeld in 3 gelijke delen verdeeld 1 (proximaal), 5 (middelste) en 3 (distaal) (zie figuur 2.1 A). Deze stukjes colon zijn vervolgens in paraffine ingebed. Het middelste deel (2) van het colon is gebruikt om de kleuringen op uit te voeren aangezien zich hier de meeste ACF's vormen. De monsters zijn machinaal geparaffineerd in de VIP (Vacuum Infiltration Processor) daarna ingebed en gesneden met de microtome op $3 \leq 4\mu\text{m}$. Elke coupe is op een eigen object glaasje opgevangen waarna ze zijn ontwaterd in verschillende concentraties alcohol t/m 96%. Per dier zijn er ongeveer 35 opeenvolgende niveaus enface gesneden (zie figuur 2.1 B). Er worden enface gesneden coupes gebruikt zodat de crypten door de verschillende niveaus gevolgd kunnen worden. Van elke 5 opeenvolgende niveaus, is er per kleuring 1 coupe gebruikt (1, 6, 11, 16, 21, 26 en 31 β -catenine,) (2, 7, 12, 17, 22, 27 en 32 Ki-67) (5, 10, 15, 20, 25, 30 en 35 H&E)



Figuur 2.1 A) Schematische weergave van de verdeling van het colon van de rat. B) Overzicht van het enface snijden van de ratten darmen [7]

2.2.2 Hematoxyline & eosine kleuring

Deze procedure was al uitgevoerd voordat ik aan deze stage begon. De hematoxyline & eosine (H&E) kleuring is geautomatiseerd uitgevoerd waarbij de coupes zijn gedeparaffineerd en gehydrateerd in een aflopende alcohol reeks (xyleen, alcohol 100%, alcohol 96%, Alcohol 70% en dan naar aqua dest). Vervolgens wordt de haemaluin kleuring ingezet (5-10 minuten). De preparaten worden blauw gekleurd met water. Haemaluin geeft in eerste instantie een rode kleur aan de kern, maar door de preparaten in stromend water te houden verandert die kleur naar blauw, deze verandering is het gevolg van verandering van de pH (van licht zuur naar neutraal). Na het blauw Meuren worden de preparaten naar eosine gebracht gedurende 1-2 minuten, vervolgens worden de preparaten gefixeerd in alcohol 70%, waarna verdere ontwatering via alcohol 96% en alcohol 100% plaatsvindt. Uiteindelijk worden de preparaten verder naar xyleen gebracht waarna ze kunnen worden afgedekt met een dekglas m.b.v. een xyleenhoudende lijmsort (xyleen wordt gebruikt omdat de brekingsindex van glas en xyleen nagenoeg hetzelfde zijn)

2.2.3 Immuno kleuringen β -catenine en Ki-67

Deze procedure was al uitgevoerd voordat ik **aan** deze stage begon. Bij de immunologische kleuringen word er een antilichaam gebruikt tegen het eiwit van interesse dit antilichaam wordt met behulp van een tweede antilichaam aangekleurd, aan dit tweede antilichaam zitten peroxidases gebonden. Deze peroxidases kunnen o.a. het ongekleurde NovaRed omzetten in een gekleurde NovaRed waardoor in de coupes alleen de plaatsen worden aangeklemd waar het tweede antilichaam gebonden is.

Om de immuno kleuringen uit te kunnen voeren, zijn de aanwezige endogene peroxidases geblokkeerd m.b.v. een 0.3% (v/v) waterstofperoxide in methanol oplossing gedurende 30 minuten de preparaten zijn nagespoeld in PBS. Om de tertiaire structuur van de eiwitten te herstellen zijn de preparaten verwarmd in een 0,1M EDTA oplossing met een pH van 8.0 gedurende 15 minuten bij een temperatuur tussen de 95 en 98°C en daarna gedurende 20 minuten langzaam afgekoeld. De preparaten zijn nagespoeld met PBS en daarna geïncubeerd in een 25% (v/v) oplossing van normaal geitenserum in PBS om aspecifieke binding te blokkeren. ~~Het~~ serum is afgegoten en daarna geïncubeerd met het eerste antilichaam. Het antilichaam tegen Ki-67 is 1:200 verdund in PBS en heeft 10 min geïncubeerd. Het antilichaam tegen β -catenine is 1:4000 in PBS verdund en gedurende 30 minuten geïncubeerd. De preparaten zijn 3x5 minuten in PBS gespoeld en daarna met Powervision-konijn (het tweede antilichaam) 30 minuten aangekleurd en weer 3x5 minuten in PBS gespoeld. Het powervision-rabbit is een goat-antirabbit antilichaam waaraan peroxidases zijn geconjugeerd. Er is daarna aangeklemd met behulp van NovaRed gedurende 10 minuten. De preparaten zijn gespoeld in kraanwater en tegen gekleurd met haemaluin gedurende 45 seconden. De preparaten zijn ontwaterd met een oplopende alcohol reeks overgaand op xyleen en afgedekt met een dekglas.

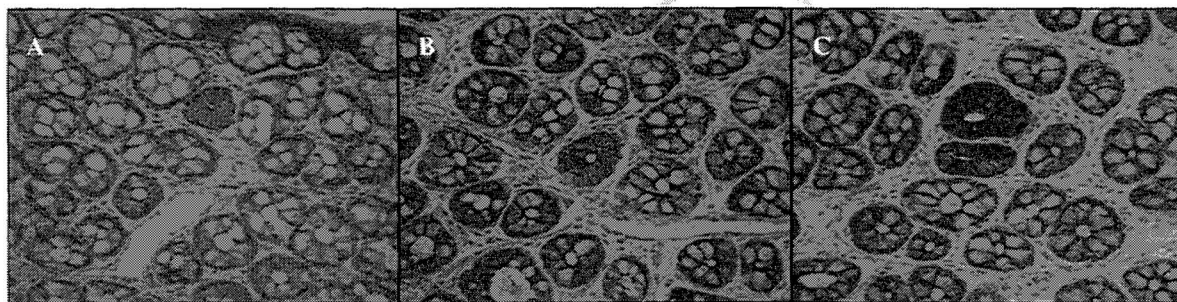
2.2.4 Immunoscores

Van 8 dieren per groep zijn de preparaten gescoord onder de lichtmicroscop op Abberant Crypt Foci (ACF), B-catenine Accumulated Crypt (BCAC) en B-catenine Accumulated Abberant Crypt Foci (BCAA). In het geval van de B-catenine coupes is de multiplicititeit genoteerd (aantal crypten per BCAC), de intensiteit en er is een foto van gemaakt. Bij elk volgend niveau is dezelfde BCAC weer terug gezocht en is er gekeken of er nog andere BCAC's aanwezig waren in de opeenvolgende preparaten. Om de intensiteit te **bepalen** is er een getal tussen 1 en 3 aan de crypt gegeven. Hierbij staat 1 voor een lichte verhoging van de intensiteit van het **cytoplasma** van de cellen in de crypt ten opzichte van de omliggende gezonde crypten, 3 staat voor een zeer verhoogde kleuring van het cytoplasma **van** de cellen in de crypt en 2 zit er tussen in (zie figuur 2.2). De ACF's die in de B-catenine preparaten ook verhoogd aangekleurd zijn (BCAA), is ook de multiplicititeit en de intensiteit gescoord en ook is er een foto van gemaakt.

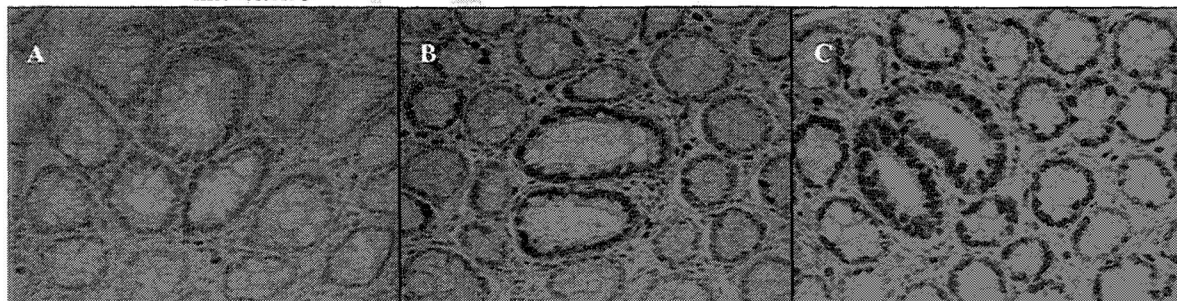
De H&E preparaten zijn gebruikt als **oriëntatie** coupe om ACF's op te spotten. Van deze ACF's is de multiplicititeit bepaald en er is een foto van de ACF gemaakt. Bij elk volgend niveau is dezelfde ACF weer terug gezocht en er is gekeken of er nog andere **ACF's** aanwezig waren in het nieuwe preparaat. Van 5 dieren per **groep** is de Ki-67 **kleuring** beoordeeld. Tijdens het beoordelen van de Ki-67 preparaten is de ACF die gevonden is in de H&E kleuring terug gezocht. Van deze ACF's is genoteerd uit hoeveel crypten deze bestaat, het aantal **positieve** en negatieve kernen zijn geteld (om de proliferatie index te berekenen), de intensiteit bepaald en er is een foto van de ACF gemaakt. De intensiteit is net als bij de β -catenine gescoord van 1 tot 3 alleen gaat het **hier** om de intensiteit van de kernen [zie figuur 2.3]

Berekening proliferatie index:

$$\frac{\text{Positieve kernen}}{(\text{Positieve} + \text{negatieve kernen})} \times 100\%$$



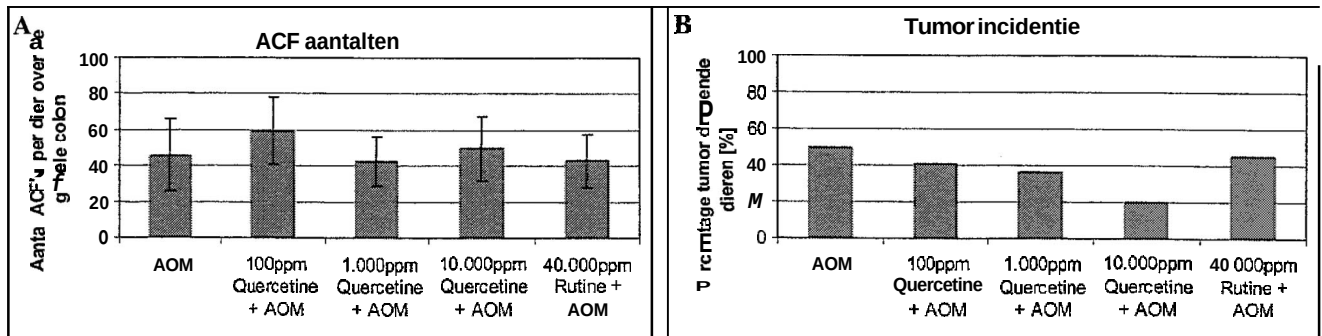
Figuur 2.2 Overzicht intensiteit β -catenine 1, 2 en 3 A) BCAC met intensiteit 1 B) BCAC met intensiteit 2 C) BCAC met intensiteit 3



Figuur 2.3 Overzicht intensiteit Ki-67 1, 2 en 3 A) ACF met intensiteit 1 B) ACF met intensiteit 2 C) ACF met intensiteit 3

3 Resultaten

3.1 Tumor incidentie



Figuur 3.1 A) De aantallen ACF's per dier groep B) Het percentage tumor dragende dieren per groep

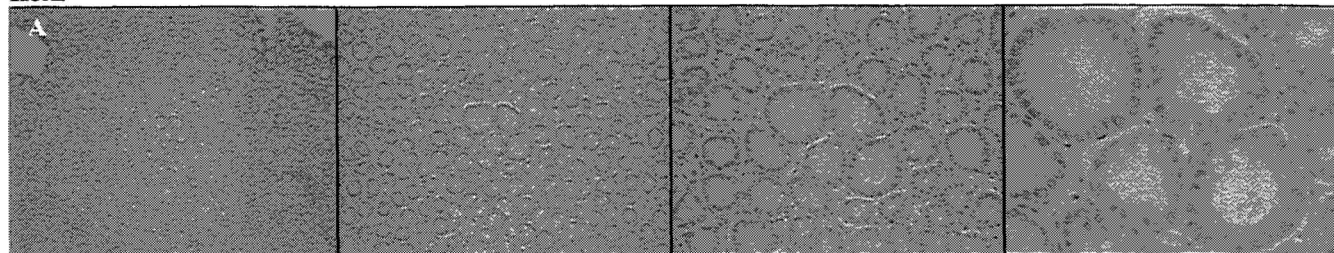
Bovenstaande figuren (figuur 3.1 A en B) geven de resultaten weer van het aantal ACF's en de tumor incidentie die zijn uitgevoerd voor de start van deze stage.

Op het bovenstaande figuur (figuur 3.1 A) is te zien dat er tussen de verschillende behandelingsgroepen geen verschillen zijn opgetreden in het aantal ACF's naarmate de concentratie quercetine hoger werd

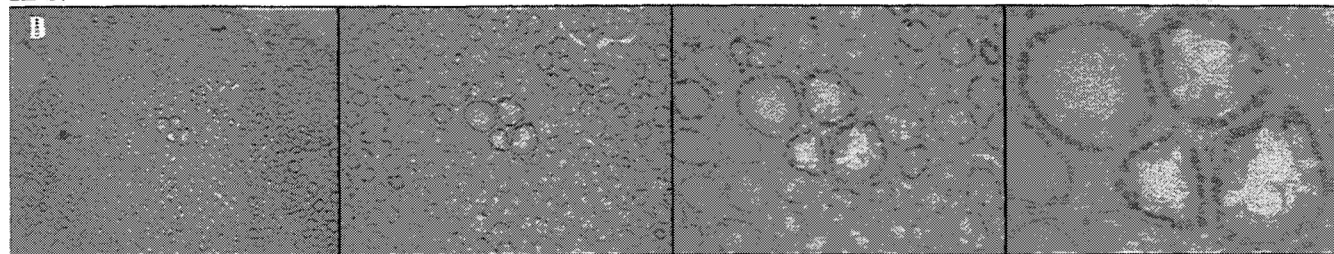
Op het bovenstaande figuur (figuur 3.1 B) is te zien dat de tumor incidentie van de AOM behandelde dieren 50% is, van de AOM + 100ppm quercetine behandelde dieren 40,9%, van de AOM + 1.000ppm quercetine behandelde dieren 36,4% en van de AOM + 10.000ppm behandelde dieren 20,0% is. Van de dieren die met AOM en 40.000ppm rutine behandeld zijn is de tumor incidentie 45,5%. Als er naar de quercetine behandelde groepen wordt gekeken is er een afname te zien in het aantal dieren dat tumor dragend is. Naar de Cochran-Mantel-Haenszel trend analyse test was uitgevoerd bleek deze $P < 0.05$ te zijn. Bij de rutine behandelde groep is te zien dat er geen afname is in het aantal tumoren.

3.3 Foto's abberant crypt foci

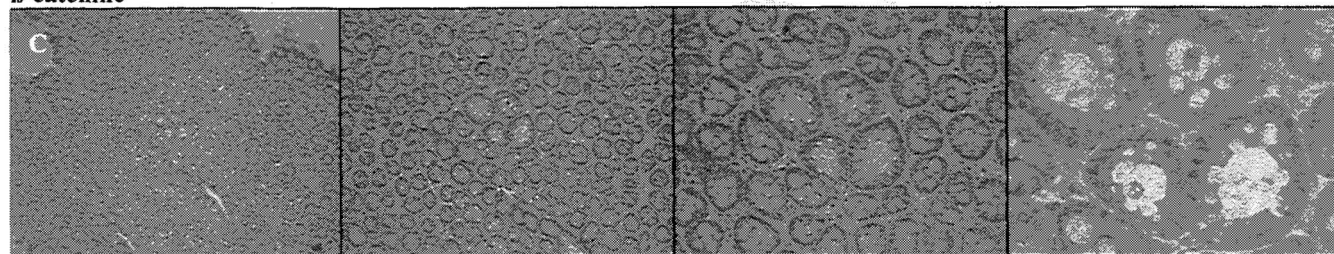
H&E



Ki-67



β -catenine

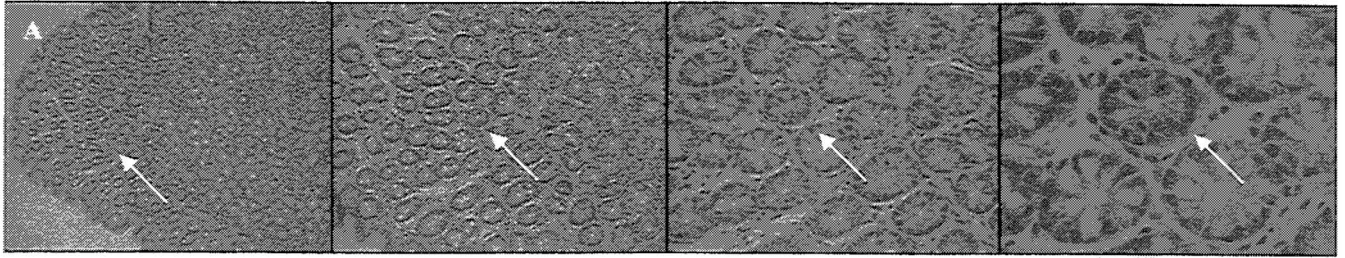


Figuur 3.3 Foto's van een ACF met een multiplicitéit van 4. A) De H&E kleuring, 5x 10x 20x en 40x vergroting. B) De Ki-67 kleuring, 5x 10x 20x en 40x vergroting. C) De β -catenine kleuring, 5x 10x 20x en 40x vergroting.

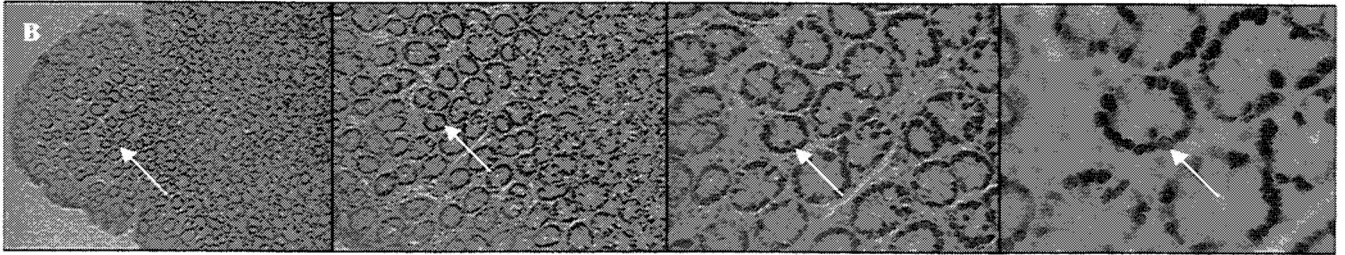
Op de bovenstaande figuren (figuur 3.3) is een ACF te zien met een multiplicitéit van 4 (de multiplicitéit is het aantal crypten waaruit de ACF bestaat). De ACF is in het H&E preparaat gemakkelijk aan te tonen doordat de crypt en het lumen vergroot zijn en er vaak meer kernen in de crypten aanwezig zijn. De kernen zijn vaak niet meer naast elkaar gelegen maar liggen ook vaak in de richting van het lumen (zie figuur 3.3 A). In het Ki-67 preparaat is de ACF te herkennen doordat ook hier de vergrote crypten en lumen te zien zijn. De kernen van de ACF's zijn vaak donkerder aangekleurd dan de omliggende crypten waardoor ze gemakkelijk te vinden zijn. Dat de kernen van de ACF donkerder zijn aangekleurd dan de omliggende cellen kan er op duiden dat deze cellen meer Ki-67 eiwit in hun kernen hebben en waarschijnlijk ook een actievere proliferatie snelheid hebben (zie figuur 3.3 B). Bij de β -catenine kleuring is de ACF te herkennen doordat ook hier de vergrote crypt en lumen te zien zijn, maar het overgrote deel van de ACF's heeft geen verhoogde expressie van β -catenine en zijn de ACF's met dezelfde intensiteit gekleurd als de omliggende crypten (zie figuur 3.3 C).

3.4 Foto's β -catenine accumulated crypt

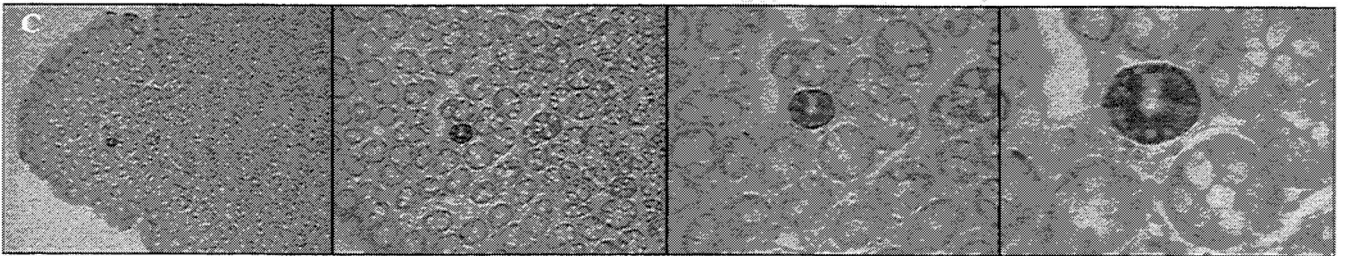
H&E



Ki-67



β -catenine

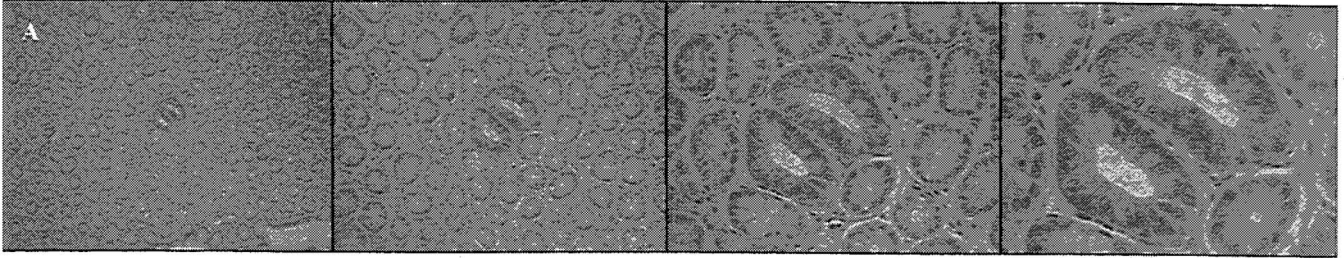


Figuur 3.4 Foto's van een BCAC met een multiplicititeit van 1. A) De H&E kleuring, 5x 10x 20x en 40x vergroting. B) De Ki-67 kleuring, 5x 10x 20x en 40x vergroting. C) De β -catenine kleuring, 5x 10x 20x en 40x vergroting.

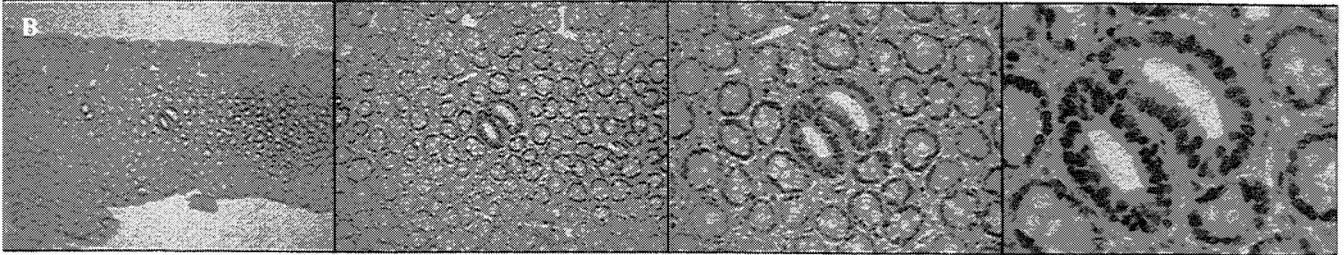
In de bovenstaande figuren (figuur 3.4) is een BCAC met een multiplicititeit van 1 te zien. In het H&E preparaat is er te zien dat er geen onderscheid ~~temaken~~ is tussen de verschillende crypten (zie figuur 3.4 A). In het Ki-67 preparaat is ~~a~~ ook geen verschillen tussen de crypten (**zie** figuur 3.4 B) maar in het β -catenine preparaat is er één crypt te zien die vele malen donkerder is **aangekleurd** dan zijn omliggende crypten (zie figuur 3.4 C). Deze crypt heeft een verhoogde accumulatie van β -catenine in het cytoplasma van de cellen.

3.5 Foto's β -catenine accumulated abberant crypt foci

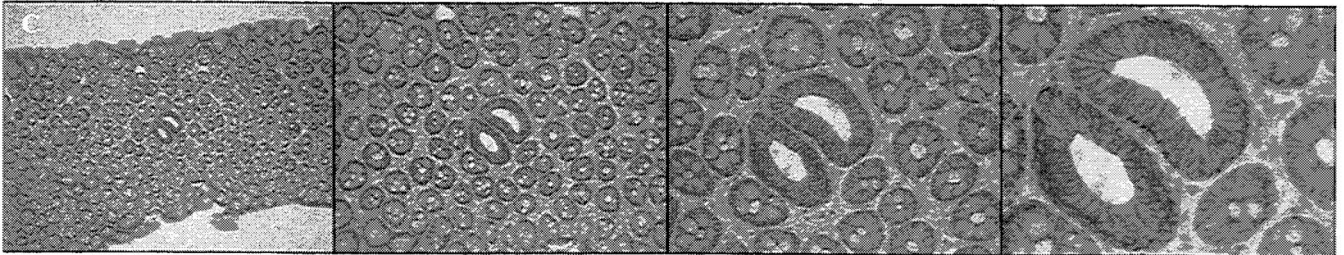
H&E



Ki-67



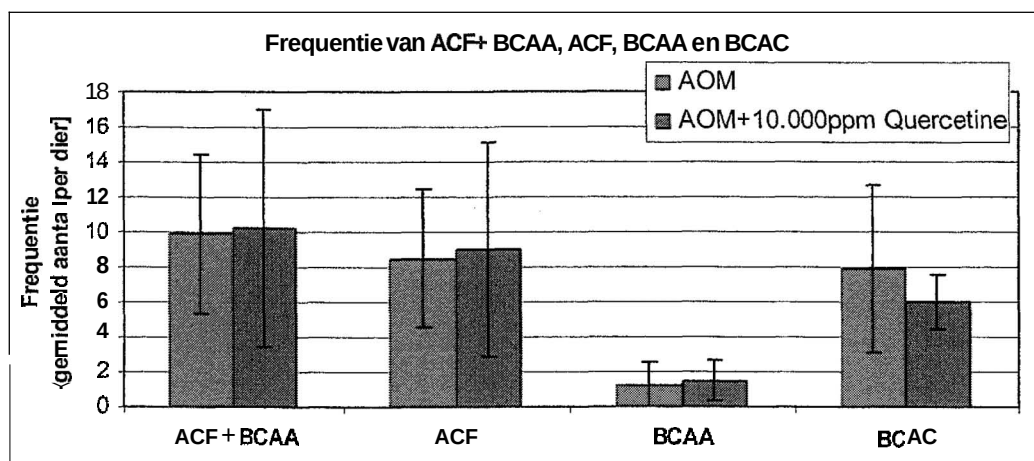
β -catenine



Figuur 3.5 Foto's van een BCAA met een multiplicititeit van 2. A) De H&E kleuring, 5x 10x 20x en 40x vergroting. B) De Ki-67 kleuring, 5x 10x 20x en 40x vergroting. C) De B-catenine kleuring, 5x 10x 20x en 40x vergroting.

Op de bovenstaande figuren (**figuur 3.5**) is een BCAA te zien met een multiplicititeit van 2. In het H&E en het Ki-67 preparaat is deze gewoon te herkennen als een ACF (zie figuur 3.5 A en B). In het O-catenine preparaat is deze ACF echter aan gekleurd als een BCAC en heeft dus donkerder aangeklemd cytoplasma dan de omliggende crypten (zie figuur 3.5 C). Deze donkerdere kleuring van het cytoplasma duidt op een verhoogde accumulatie van β -catenine in deze ACF.

3.6 Frequentie van ACF + BCAA, ACF, BCAA en de BCAC



Figuur 3.6 De frequentie van ACF + BCAA, ACF, BCAA en BCAC n=8.

Tijdens het scoren van de preparaten in de H&E en β -catenine kleuring is er bepaald hoeveel er van de ACF, BCAA's en BCAC's aanwezig waren in elk dier (n=8). In het bovenstaande figuur (figuur 3.6) zijn de ACF + BCAA, ACF, BCAA, en BCAC aantallen gemiddeld over de behandelingsgroepen. Als naar de grafiek wordt gekeken, is er te zien dat er verschillen zijn in aantallen tussen de verschillende ACF + BCAA, ACF, BCAA en BCAC maar dat er geen verschillen zijn tussen de AOM en AOM met 10.000ppm quercetine behandelde groepen.

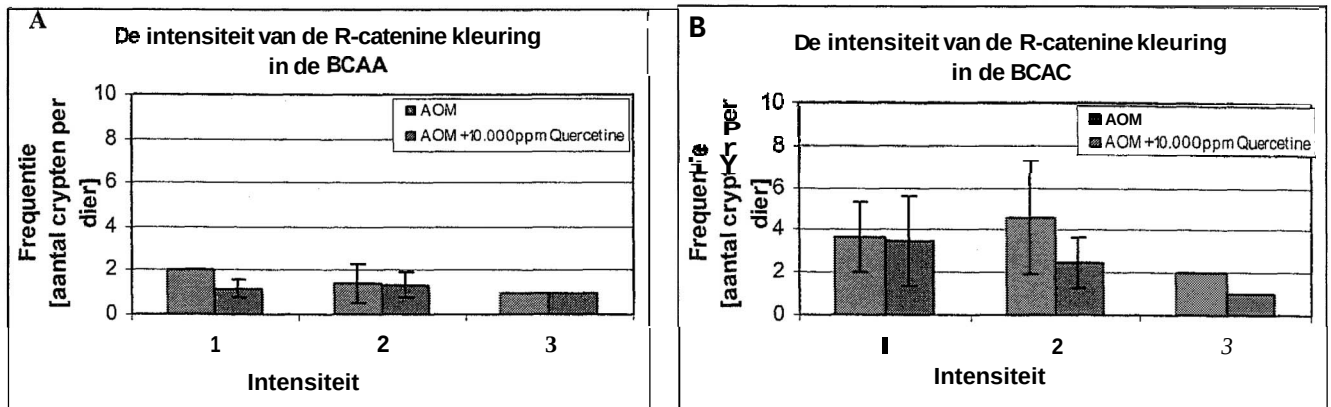
3.7 De Multipliciteit van de ACF + BCAA, ACF, BCAA en de BCAC

Tabel 3.1 De Multipliciteit van de ACF + BCAA, ACF, BCAA en de BCAC (n=8)

	Behandeling	Multipliciteit	1-3	≥4	T-test 1-3	T-test ≥4
ACF + BCAA	AOM	gemiddelde	6,25	4,14	0,897	0,338
		standaarddeviatie	3,41	3,08		
	AOM + Quercetine	gemiddelde	6,00	5,71		
		standaarddeviatie	3,92	2,81		
ACF	AOM	gemiddelde	5,63	3,29	0,548	0,225
		standaarddeviatie	2,83	2,29		
	AOM + Quercetine	gemiddelde	4,63	5,00		
		standaarddeviatie	3,62	2,71		
BCAA	AOM	gemiddelde	0,75	0,50	0,809	0,790
		standaarddeviatie	1,16	1,07		
	AOM + Quercetine	gemiddelde	0,88	0,63		
		standaarddeviatie	0,83	0,74		
BCAC	AOM	gemiddelde	7,43	2,00	0,311	
		standaarddeviatie	4,24	0,00		
	AOM + Quercetine	gemiddelde	5,75	1,00		
		standaarddeviatie	1,49	0,00		

Tijdens het scoren van de preparaten is de multipliciteit van de ACF + BCAA, ACF, BCAA en de BCAC geteld (n=8). Met de multipliciteit wordt het aantal crypten bedoeld waaruit de ACF + BCAA, ACF, BCAA of BCAC bestaat. Er is gebleken dat er geen duidelijke verschillen zijn tussen de AOM en AOM met 10.000ppm quercetine behandelde groepen in multipliciteit van de ACF + BCAA, ACF, BCAA en BCAC. In de bovenstaande tabel (Tabel 3.1) is er gekeken of er verschillen zijn tussen de AOM en AOM met 10.000ppm quercetine behandelde groepen in de hoeveelheid crypten met een lagere multipliciteit (1-3) en crypten met een hogere multipliciteit (≥ 4) (n=8). Ook hier is er geen verschil te zien dat er tussen de AOM en AOM met 10.000ppm quercetine behandelde groepen.

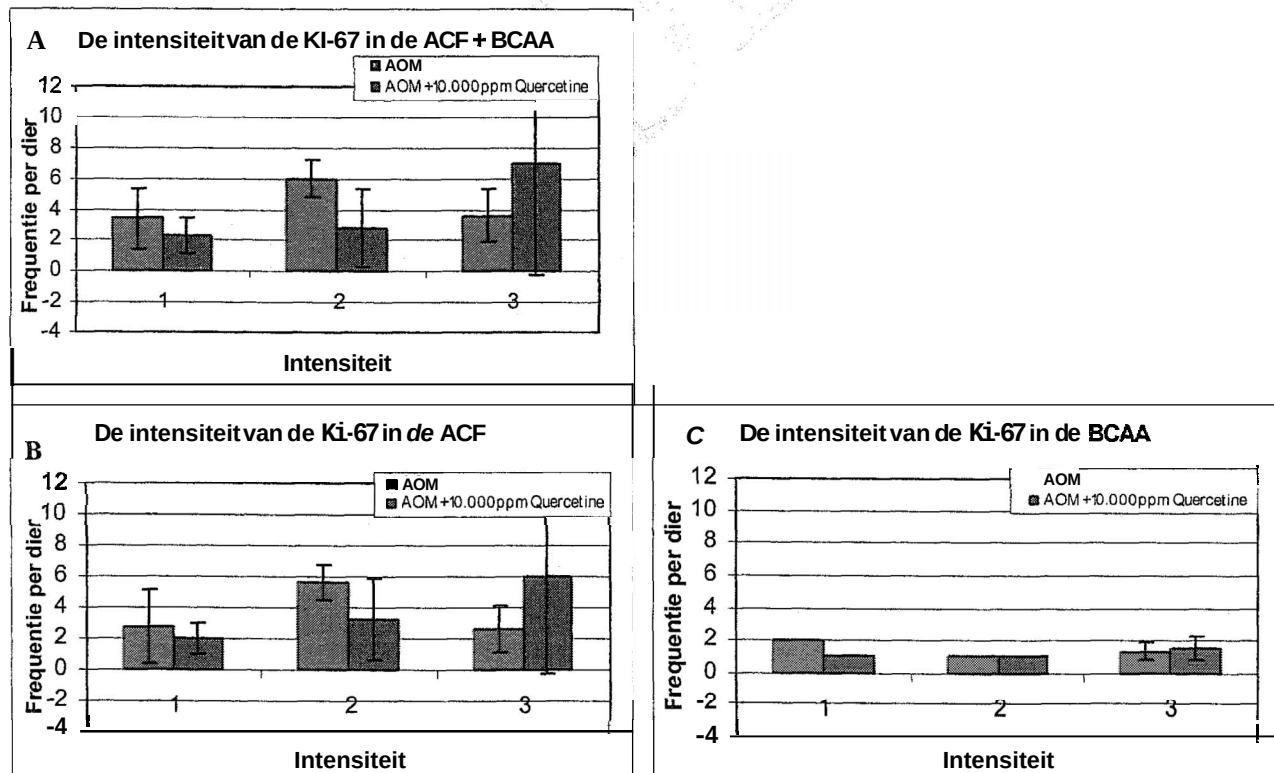
3.8 De intensiteit van de B-catenine in de BCAA en de BCAC



Figuur 3.7 A) De Intensiteit van de B-catenine in de BCAA. B) De Intensiteit van de B-catenine in de BCAC (n=8)

Tijdens het scoren van de BCAA en de BCAC in de B-catenine kleuring is de intensiteit bepaald (n=8). Om de intensiteit te bepalen is er een getal tussen 1 en 3 aan de crypt gegeven. Hierbij staat 1 voor een lichte verhoging van de intensiteit van het cytoplasma van de cellen in de crypt ten opzichte van de omliggende crypten, 3 staat voor een zeer verhoogde kleuring van het cytoplasma van de cellen in de crypt en 2 zit er tussen in. Zoals op de bovenstaande figuren te zien is (figuur 3.7 A en B), is er geen significant verschil te zien tussen de AOM en AOM met 10.000ppm quercetine behandelde groepen in de intensiteit van de ACF + BCAA, ACF, BCAA en BCAC. Alleen bij de BCAC met een intensiteit van 2 is er een bijna significantie gezien tussen de AOM en AOM + 10.000ppm quercetine en is berekend door middel van de t-Test $P=0.066$. Ook is te zien dat de spreiding erg hoog is en dat er dus veel variatie is tussen de verschillende dieren in de intensiteit van de crypten.

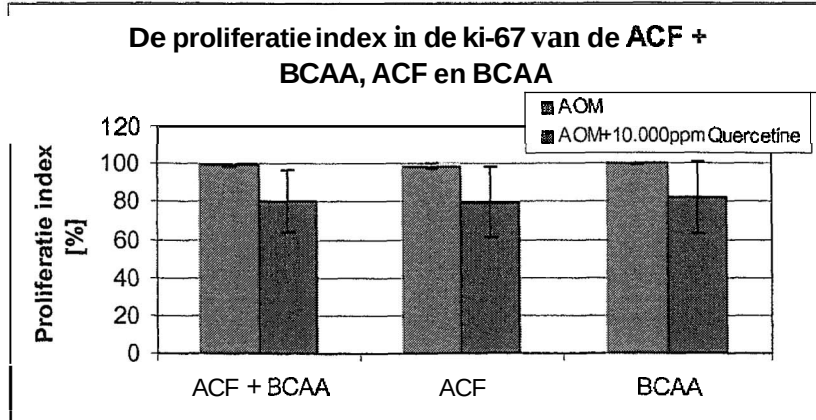
3.9 De intensiteit van de Ki-67 in de ACF en de BCAA



Figuur 3.8 A) De intensiteit van de Ki-67 in de ACF + BCAA. B) De intensiteit van de Ki-67 in de ACF. C) De intensiteit van de Ki-67 in de BCAA (n=5).

Tijdens het scoren van de ACF en de BCAA in de Ki-67 kleuring is de intensiteit bepaald ($n=5$). Om de intensiteit te bepalen is er net zoals bij de β -catenine kleuring een getal tussen 1 en 3 aan de crypt gegeven, alleen gaat het hier om de kernen. Zoals op de bovenstaande figuren te zien is (figuur 3.8 A, B en C), is er geen duidelijke verschil te zien tussen de AOM en AOM met 10.000ppm quercetine behandelde groepen in de intensiteit van de ACF, BCAA en BCAC. Ook is te zien dat de spreiding erg hoog is en dat er dus veel variatie is tussen de verschillende dieren in de intensiteit van de crypten.

3.10 De proliferatie index in de Ki-67 van de ACF en de B C M



Figuur 3.9 De proliferatie index in de groepen ACF + BCAA, ACF en BCAA ($n=5$)

Tijdens het scoren van de ACF en de BCAA in de Ki-67 kleuring is het **aantal** positieve en negatieve kernen geteld ($n=5$). In het bovenstaande figuur (figuur 3.9) is de proliferatie index te zien per behandeling groep voor de ACF + BCAA, ACF en de BCAA. De proliferatie index is het **percentage** van het aantal positieve kernen **als fractie** van het totale aantal kernen dat aanwezig is in de crypten. Er lijkt een **afname** in het percentage positieve kernen te zien tussen de AOM en AOM met 10.000ppm quercetine behandelde groepen. Maar door de grote spreiding tussen de dieren binnen de groep is dit niet significant.

3.11 De multiplicitéit versus de intensiteit in de KC67 en de β -catenine

Om te bepalen of de intensiteit van de Ki-67 kleuring of β -catenine kleuring samen hangt met de multiplicitéit van de crypten, is de multiplicitéit versus de intensiteit uitgezet (β -catenine $n=8$, Ki-67 $n=5$). Er is berekend welke intensiteit er hoort bij een bepaalde multiplicitéit (dit is de gemiddelde intensiteit behorende bij 1 multiplicitéit). Zie grafieken uit bijlage 1 (Figuur 1.1, 1.2 en 1.3) voor de multiplicitéit versus de intensiteit van de Ki-67 kleuring. Zie grafieken uit bijlage 1 (Figuur 1.4 en 1.5) voor de multiplicitéit versus de intensiteit van de β -catenine kleuring. Voor beide kleuringen is gebleken dat de intensiteit niet samenhangt met de multiplicitéit.

3.12 De multiplicitéit versus de proliferatie index positieve kernen in de Ki-67

Om te bepalen of de proliferatie index van de Ki-67 kleuring samenhangt met de multiplicitéit van de crypten, is de multiplicitéit versus de proliferatie index uitgezet ($n=5$). Er is berekend welke proliferatie index er hoort bij een bepaalde multiplicitéit (dit is de gemiddelde proliferatie index behorende bij 1 multiplicitéit). Zie grafieken uit bijlage 1 (Figuur 1.6, 1.7 en 1.8).

4 Discussie

Om het effect van quercetine en rutine te bestuderen is er een **dierstudie** gedaan bij AOM geïnduceerde colorectale tumoren in F344 ratten. Op twee tijd stippen zijn er dieren geofferd, na 8 weken na de laatste AOM injectie (interim sectie) en na **38** weken (eindsectie). Tijdens de eindsectie is er door de Cochran-Mantel-Haenszel trend analyse test uit te voeren een **afname** in de tumoren waargenomen deze bleek $P < 0.05$ te zijn naarmate de concentratie quercetine hoger werd. Bij de dieren die rutine toe gediend hebben gekregen is er geen **afname** van colon tumoren waargenomen. Dat het rutine geen effect lijkt te hebben op het ontstaan van colon tumoren kan komen door dat de **ramnose** groep eerst van de quercetine moet worden afgesplitst, door micro-organismen in het colon, voordat de quercetine kan worden opgenomen. Eerder is ook al gebleken dat rutine geen effect lijkt te hebben op het ontstaan van colon tumoren [2]. Quercetine daarentegen wordt al in de dunne darm opgenomen en **heeft** daardoor meer kans dat er daadwerkelijk ook meer wordt opgenomen. Er is in de literatuur gevonden dat quercetine een beschermende werking heeft op het ontstaan van colon tumoren [28] en zijn er artikelen die vermelden dat quercetine juist een carcinogeen effect **heeft** op colon epitheel cellen [22, 30].

Omdat er een afname is gevonden in de eindsectie van het aantal tumor dragende dieren, naarmate de concentratie quercetine hoger werd, zijn de AOM en de AOM + 10.000ppm quercetine groepen uit de interim sectie uitgekozen om microscopisch te beoordelen op verschillende voorlopers van colorectale tumoren zoals de Abberant Crypt Foci (ACF), 5-catenine Accumulated Crypt (BCAC) en **β -catenine** Accumulated Abberant Crypt Foci (BCAA). **Als** de ACF, BCAA en de BCAC goede **biomarkers** zijn om colon tumoren te voorspellen zouden we ook een **afname** verwachten in deze voorlopers van colorectale tumoren net zoals er is gevonden in het **aantal** tumoren in de eindsectie. Van de ACF is gevonden dat deze geen goede **biomarkers** is om colon tumoren te voorspellen [2], van BCAC is gevonden dat deze een betere biomarkers zou zijn dan de ACF om colon tumoren te voorspellen [24]. De BCAA **is** niet eerder vermeld in de literatuur maar is een ACF die een **β -catenine** accumulatie vertoont net zoals de BCAC. Als de BCAA een goede biomarker is om de vorming van colorectale tumoren te voorspellen zouden we ook hier een **afname** verwachten, als quercetine een beschermend effect heeft op het ontstaan van colorectale tumoren. Bij het scoren van de preparaten uit de interim sectie is er gekeken naar de **frequentie** en de multiplicitéit van de ACF, BCAA en BCAC. Van de BCAC en de BCAA is ook naar de intensiteit van B-catenine accumulatie in de crypten gekeken ($n=8$). Ook is er van een aantal dieren uit beide groepen naar de intensiteit van de ki-67 kleuring gekeken ($n=5$). Er is gebleken dat er geen verschillen zijn in de frequentie, **multiplicitéit** en intensiteit van de **β -catenine** in de ACF, BCAA en BCAC tussen de AOM en AOM + 10.000ppm quercetine behandelde groepen uit de interim sectie. Ook gaf de ki-67 kleuring geen verschillen tussen de AOM en AOM + 10.000ppm quercetine behandelde groepen weer. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat de ACF, BCAA en BCAC geen goede voorlopers zijn om in een vroegtijdig stadium tumor vorming te kunnen voorspellen.

5 Conclusie

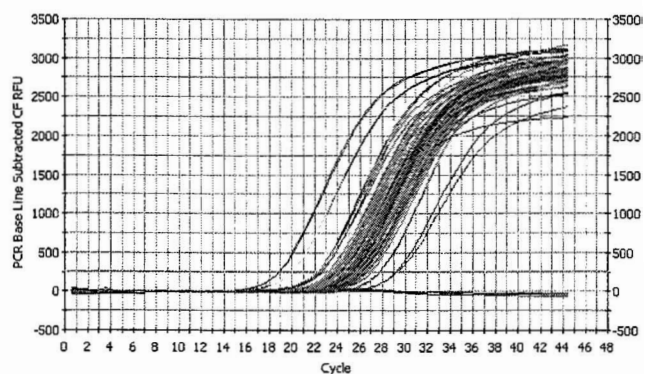
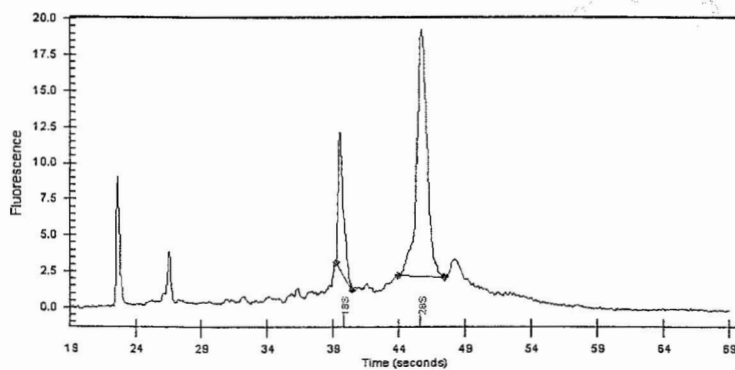
Quercetine remt de vorming colon tumoren bij ratten in dit model. Echter quercetine remt de voorlopers ACF, BCAA en BCAC niet. Van Rutine is gebleken dat dit de vorming van tumoren in dit model niet remt. Er is gebleken dat de ACF, BCAA en BCAC geen goede voorlopers zijn om colon tumoren te voorspellen.

6 Vervolg onderzoek

Om goede biomarkers te vinden is het misschien een mogelijkheid om naar histologische voorlopers en naar gen expressie niveaus te kijken binnen één model. Zo kan er uit mogelijke histologische voorlopers RNA geïsoleerd worden om hier uit andere interessante genen op te sporen. Er zou er begonnen kunnen worden door uit de ACF, BCAA, BCAC en gezond weefsel RNA te isoleren en te kijken of dat er verschillen zijn in gen expressie niveaus. Om te bepalen of dat het verhoogde gen expressie niveau ook is waar te nemen op histologisch niveau kan er tegen het bijbehorende eiwit een antilichamen gebruikt worden. Zo kan er gekeken worden of dat dit eventueel wel goede biomarkers zijn om vroegtijdig colon tumoren te voorspellen.

Deel B

Het effect van bioactieve stoffen op de genexpressie van colon epitheel cellen



1 Inleiding

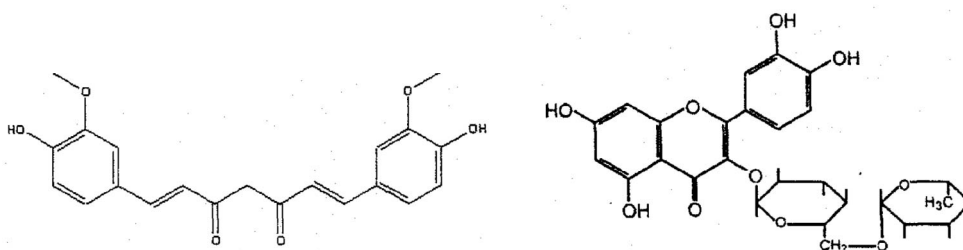
1.1 Bioactieve stoffen: Wheat bran, curcumine, en rutine

Om het effect van voedingsstoffen op colon epitheel cellen te bestuderen is er gewerkt met 3 modelstoffen namelijk wheat bran, curcumine en rutine.

Wheat bran is de gemalen bolster (het omhulsel) van de tarwekorrels en wordt tot de groep van voedingsvezels gerekend. Voedingsvezels passeren onveranderd de dunne darm, en worden in de dikke darm door micro-organismen gefermenteerd, waarbij (o.a.) kort-keten vluchtige vetzuren ontstaan, zoals butyraat, acetaat en propionaat. Wheat bran stimuleert het apoptose mechanisme en controleert de proliferatie tijdens de tumorinitiatie wat de vorming van tumoren remt [32].

Curcumine is een polyfenolverbinding die van nature in planten voorkomt o.a. in de wortels van de *Curcuma Longa* ook wel geel wortel genoemd. Deze wortels zitten in kerrie poeder verwerkt en is verantwoordelijk voor de gele kleur. curcumine wordt gerekend tot de groep van niet-steroïde ontstekingsremmers en is tevens een antioxidant. Curcumin versterkt het groeiremmende effect. Het groeiremmende effect wordt veroorzaakt door een mechanisme dat waarschijnlijk betrekking heeft op de remming van COX-2 en andere niet-COX-2 pathways [33].

Rutine (zie §1.1 deel A).

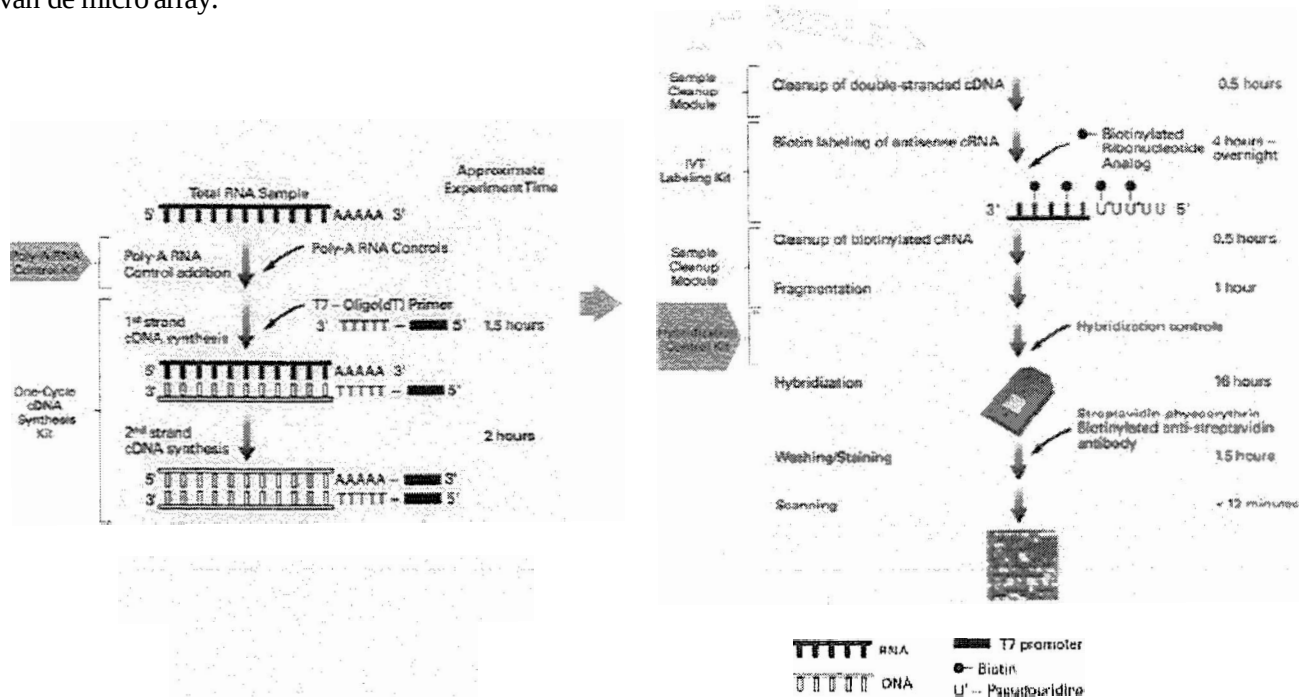


Figuur 1.1 A) Curcumine [34] B) Rutine [35]

1.2 Microarray

Om het effect van rutine, curcumine en wheat bran op voorlopers van colorectale tumoren te kunnen bepalen in colon epitheel kunnen er micro array's gedaan worden. Door middel van deze techniek kan er naar veranderingen in genexpressie gekeken worden en kan het effect van de bioactieve stoffen op colon epitheel cellen worden bestudeerd. Van de micro array kan veel informatie gewonnen worden over de up en down regulatie van genen. Ondanks dat het gebruik van micro array's in het onderzoek redelijk is ingeburgerd, zijn er nog veel beperkingen aan het gebruik ervan. Analyse en interpretatie van de data is een moeilijke en tijdrovende taak, vooral door de grote hoeveelheid data die zelfs binnen 1 experiment gegenereerd wordt [36]. De Affymetrix micro array wijkt af van de standaard gebruikte 2 kleuren array waarbij er 2 fluorescente groepen worden gebruikt. Het basis principe van de affymetrix array is als volgt: 1 tot 15 µg RNA wordt overgeschreven in cDNA gebruik makend van een T7 Oligo (dT) promotor primer voor de first strand syntheses reactie. Die wordt gevolgd door een RNase H behandeling tegelijkertijd met de second strand syntheses. Het nu dubbel strengs cDNA wordt gezuiverd en dient als template voor de in vitro transcriptie (IVT) reactie. De IVT reactie wordt uit gevoerd in de aanwezigheid een T7 RNA polymerase en een gebiotinileerde nucleotide / ribonucleotide mix (een mix van de 4 afzonderlijke ribonucleotiden waar van een deel van de uracil nucleotiden gebiotinileerd is) dit voor complementair RNA (cRNA) amplificatie en biotine labeling. Het gebiotinileerde cRNA wordt gezuiverd, gefragmenteerd en gehybridiseerd aan de GeneChip expression arrays [37]. De GeneChip® Rat expression array 230A bevat 31.000 probe sets, deze analyseert de expressie level van 30.000 transcripten en varianten over 28.000 rat genen [37].

De micro array data kan worden gevalideerd door middel van real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Hiervoor zijn er eerst genen nodig die de moeite waard zijn om te analyseren en kunnen worden gevonden uit de data van de micro array.

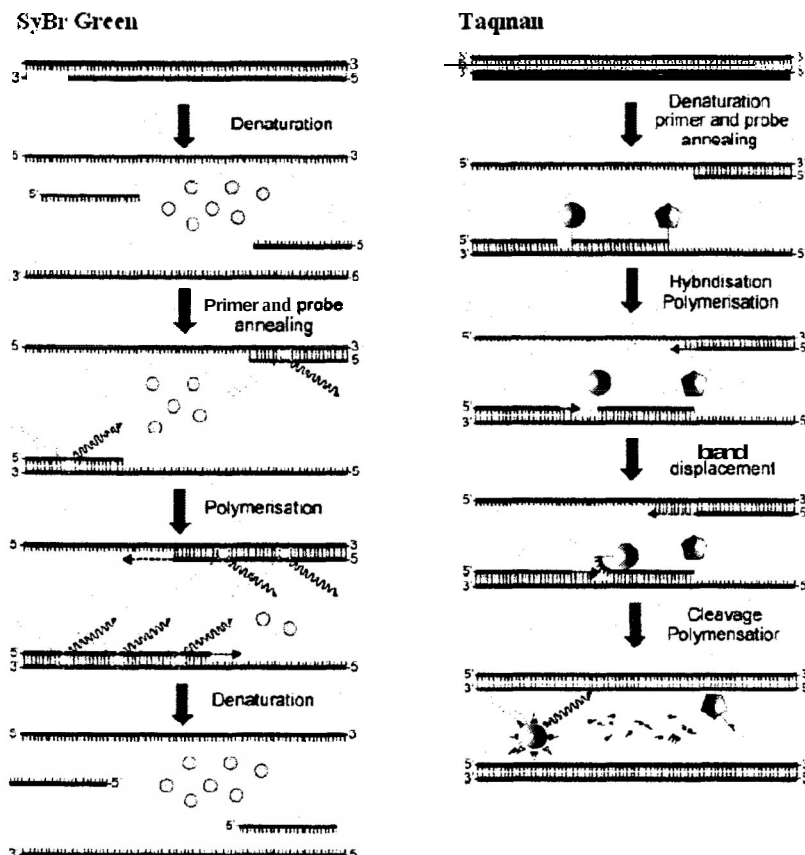


Figuur 1.2 Principe van de Affymetrix micro array [37]

1.3 Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Om de eventuele genexpressie veranderingen door de bioactieve stoffen: curcumine, rutine en wheat bran te bestuderen zijn er voor meerdere genen RT-PCR's uitgevoerd. Helaas hebben we de micro array nog niet kunnen uitvoeren en is het niet mogelijk om hier van af genen te verkrijgen om te analyseren met behulp van de RT-PCR. Er is alvast begonnen met de RT-PCR om een indruk te krijgen wat de invloed van de bioactieve stoffen op de colon epitheel cellen is. Voor de RT-PCR is op een andere manier naar genen gezocht. De genen die geselecteerd zijn uitgekozen aan de hand van een soort gelijk in *vitro* experiment en omdat zij een rol spelen in het ontstaan van de ontwikkeling van tumoren. Voor de RT-PCR worden 2 huishoudgenen gebruikt (β -actine en GAPDH) en de genen MMP-7, β -catenine en COX-2 worden geanalyseerd (zie §1.3.1, 1.3.2 en 1.3.3).

De RT-PCR is gebaseerd op de PCR methode. Door aan de standaard PCR reactiemengsels een fluorescentie reagens toe te voegen, dat sterker emitteert naarmate er door de PCR reactie meer dsDNA voorhanden komt, kan men het verloop van de PCR reactie per cyclus (in real-time) volgen. De geëmitteerde fluorescentie wordt door een fluorimeter geregistreerd. Door de tijd- fluorescentiecurve te analyseren is men in staat om semi-kwantitatief de hoeveelheid expressie van een gen vast te stellen. Dit uitgangsternplate is meestal een cDNA van een RNA monster. De RT-PCR kan met niet specifieke en specifieke detectie methode worden uitgevoerd. Bij de niet specifieke detectie wordt er meestal SYBR green gebruikt als fluorofore. SYBR green bindt tussen dsDNA en fluoresceert als deze met de juiste golflengte wordt aan gestraald (excitatie 497nm en emitting 520nm). Het SYBR green is niet specifiek voor een gen maar zal tussen elk stukje dsDNA hechten en dan fluoresceren [38] (zie figuur 1.3). Om toch een specifieke RT-PCR voor een gen uit te kunnen voeren met SYBR green moeten de primers specifiek gekozen worden zodat deze binnen het organisme alleen op het gen van interesse aangrijpen. De specifieke detectie van genen kan onder andere met de Taqman probe gedaan worden. De Taqman probe is een oligo die complementair is met een van de amplicons die tijdens de PCR reactie wordt gevormd. Aan een kant van de probe zit een fluorofore gebonden en aan de andere kant een quencher. Het meest gebruikte paar is de FRET die gebruik maakt van FAM als fluorofore en TAMRA als quencher. Het principe van de FRET is als volgt: de FAM wordt door de aanwezige licht bron aangestraald en zou als de TAMRA niet aanwezig is fluoresceren. Maar doordat de FAM en de TAMRA aan de oligo gebonden zijn word de energie van de FAM "overgenomen" door de TAMRA waardoor de TAMRA zal fluoresceren. Doordat de fluorescentie van de TAMRA met een andere golf lengte gemeten word dan de FAM is de achtergrond fluorescentie



laag. Wanneer de Taq polymerase de verlenging maakt van de primer die aan het ssDNA gebonden is, word het 5'eind van de probe gefragmenteerd door de 5' → 3' exonuclease activiteit van de Taq polymerase. De afbraak van de probe gaat door tot dat de probe los laat van het amplicon. Dit proces zorgt er voor dat de fluorofore en de quencher gescheiden worden en in oplossing komen. Doordat de FAM en de TAMRA afzonderlijk in oplossing komen zal de energie van de FAM niet meer overgenomen worden door de TAMRA en zal de FAM zelf fluoresceren. Dit leidt er toe dat er per PCR cyclus een irreversibele verhoging van de fluorescentie van de FAM ontstaat en daar door een verlaging van de fluorescentie van de TAMRA (zie figuur 1.3). Door de primers en de probe specifiek te kiezen voor een gen van keuze kan daardoor het voorkomen van een zeer bepaald gen worden aangetoond. Indien dit gebeurt ten opzichten van een referentiewaarde kan er eenvoudig semi-kwantitatieve genregulatie bestudeerd worden [38].

Figuur 13 A) SyBr green principe B) Taqman principe [38]

1.3.1 Huishoudgenen GAPDH en B-actine

Om de RT-PCR uit te voeren word er gebruik gemaakt van twee huishoudgenen. Huishoudgenen worden geacht op een constant niveau tot expressie gebracht te worden om de cellulaire functie van de cel te handhaven. De huishoudgenen worden verondersteld om minimaal de essentiële transcripten te produceren die noodzakelijk zijn voor de normale cellulaire fysiologie. Met de komst van de micro array technologie, is het onlangs mogelijk geworden om de huishoudgenen te identificeren, er zijn tot nu toe al 535 mogelijke kandidaat huishoudgenen geïdentificeerd [39], of een huishoudgen een geschikte kandidaat is zal afhangen van de experimentele condities. De huishoudgenen die in dit experiment gebruikt zijn, zijn: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) en B-actine. Er worden er twee huishoudgenen gebruikt in dit experiment omdat niet zeker is of de gebruikte bioactieve stoffen invloed hebben op de expressie van deze huishoudgenen. Deze twee huishoudgenen worden gebruikt om dat deze de meest gebruikte huishoudgenen zijn.

GAPDH is een belangrijk enzym bij de glycolyse, die een centrale rol speelt in de energie productie. Er is gevonden dat GAPDH een rol in speelt in verschillende biologische functies [40] zoals o.a. nucleair RNA transport [41], DNA replicatie [42] en DNA repair [43].

B-actine is één van de zes verschillende isoformen van actine die geïdentificeerd is en is één van de twee nonmuscle cytoskeletal actines [44]. β -actine is uitgebreid bestudeerd als een cytoplasmatisch cytoskeletal eiwit, die een rol speelt in het intracellulair transport en wordt verbonden aan celmotiliteit, cytokinesis, endocytosis, en celadhesie [44].

1.3.2 B-catenine

(zie §1.2.1 Deel A)

1.3.3 Cyclooxygenase 2

Cyclooxygenase 2 (COX-2) is één van de genen die door middel van RT-PCR geanalyseerd word. COX-2 is één van de twee isoenzymen van COX en wordt met een verhoogde cel proliferatie activiteit en tumor vorming geassocieerd. Over expressie van COX-2 correleert met een slecht klinisch beeld van de patiënt door dat het apoptose verlaagd wordt en de invasiviteit met metastatisch potentieel in gastro-intestinale tumoren verhoogd wordt [45, 46]. Het effect wordt geïnduceerd in de response op groeifactoren en cytokines zoals interleukine 1, tumor necrosis factor en interferon gamma [47]. Over expressie van COX-2 is in colon adenocarcinoma en in colon carcinoma waargenomen [48].

1.3.4 Matrix metalloproteinase 7

Matrix metalloproteinase 7 (MMP-7) is één van de genen die door middel van RT-PCR geanalyseerd word. MMP-7 is een lid van de familie van MMP en heeft een grote verscheidenheid van substratspectrums. De functie van MMP-7 is het afbreken van caseïne, gelatine van types I, III, IV, en V, fibronectin en het activeren procollagenase [39]. Van MMP-7 wordt geacht dat het een belangrijke rol in carcinoom invasie en metastase speelt. β -catenine regelt de expressie van MMP-7 in menselijke colorectale tumoren [49] (zie figuur 1.2 deel A). De meeste colorectale tumoren hebben verlies van de functie van het adenomatosis polyposis coli (APC) tumorsuppressor gen doordat er mutaties in het gen zijn opgetreden. Dit kan leiden tot accumulatie van B-catenine, die samen met DNA bindende proteïne TCF-4 als transcriptionele activator functioneert [49]. MMP-7 komt tot over expressie in 80% van menselijke colorectale tumoren en is bekend als een belangrijke factor voor de vroege tumorgroei, met een potentiële functie voor progressie stappen, zoals invasie en metastase [50].

2. Materiaal en methode

2.1 De dierstudie

200 mannelijke F344 ratten van 4 weken oud zijn in 4 groepen van elk 50 dieren verdeeld. De dieren werden na binnenkomst 2 weken geacclimatiseerd en daarna is het experiment gestart (week 0). Vanaf de start hebben de dieren verschillende soorten voer gekregen. De controle groep (groep A) kreeg ~~het~~ op AIN93 gebaseerde dieet, de andere drie groepen kregen het zelfde dieet met daar aan toegevoegd 10% (w/w) wheat bran voor groep B, 0,2% (w/w) curcumine voor groep C en 4% (w/w) rutine voor groep D. Alle dieren hebben, met tussenpozen van 1 week, 3 AOM injecties gekregen van elk 15mg/kg lichaamsgewicht. De eerste injectie is 1 week na het ~~begin~~ van het experiment gegeven. 7 weken na het begin van de studie zijn 6 dieren per groep opgeofferd (sectie 1). Van 5 dieren is er een colon ring verwijderd (~3mm) uit het midden van de darm, deze is in Tissue-Tek gedoopt en in de vloeibare stikstof bevroren de daarna in de -80°C bewaard. Van het 6^e dier is het hele colon ~~verwijderd~~ en in vieren gedeeld en ~~als~~ swiss rol in de Tissue-Tek bewaard bij -80°C. Na 15 weken vanaf het begin van het experiment zijn ~~er~~ 6 dieren per groep geofferd (sectie 2) en op dezelfde manier behandeld als de dieren uit de eerste sectie. 26 weken na ~~het~~ begin van het experiment zijn 9 dieren per groep opgeofferd (sectie 3) en ook deze zijn het zelfde behandeld als de dieren uit de eerste sectie alleen zijn de 5 dieren waar van een colon ringetje is verwijderd, ~~verhoogt~~ naar 8 dieren. Als er colon tumoren voor kwamen zijn deze verwijderd en bewaard in RNA later of Tissue-Tek in de -80°C. Na 8 maanden (38 weken) na het begin van het experiment zijn de overige dieren (29 per groep) geofferd (eind sectie). ~~Van~~ deze dieren zijn de colons verwijderd, open ~~geknipt~~ en gespoeld met 70% ETOH. De tumoren zijn verwijderd en in Tissue-lek of RNA Later bij -80°C bewaard het overige deel van het colon is als swiss rol in de Tissue-Tek bewaard.

Tabel 2.1 Overzicht van de behandeling van de ratten in de dierstudie

	Start dierstudie	Weken na AOM behandeling			
		7 weken Sectie i	15 weken Sectie 2	26 weken Sectie 3	38 weken eind sectie
Behandeling	Aantal ratten	Aantal ratten	Aantal ratten	Aantal ratten	Aantal ratten
AOM	50	6	6	9	29
AOM + Wheat bran	50	6	6	9	29
AOM + Curcumine	50	6	6	9	29
AOM + Rutine	50	6	6	9	29
Totaal	200	24	24	36	116

2.2 Optimalisatie RNA isolatie uit het colon

Om RNA uit colon ringetjes te kunnen isoleren uit deze dierstudie is er eerst gekeken of dit wel mogelijk was. Er is namelijk gebleken dat de ~~kwali~~teit en kwantiteit uit de colon ringetjes van 0,5cm die behandeld waren met Tissue-Tek en dan gebruikmakend van de standaard methode niet goed was (zie bijlage 2.1). Er is om de micro array uit te voeren 1-2pg RNA van een goede kwaliteit nodig, om dit te bereiken is het protocol voor RNA isolatie geoptimaliseerd. Hier voor zijn er 3 F344 ratten opgeofferd ~~waarvan~~ het colon is verwijderd. De colons zijn in stukken van verschillende lengte ~~geknipt en sommige~~ fragmenten van het colon zijn behandeld met Tissue-Tek. De colon fragmenten zijn in de -80°C opgeslagen. Er is begonnen met isoleren van RNA uit fragmenten van 5cm groot zonder Tissue-Tek vervolgens zijn er steeds ~~kleinere~~ fragmenten gebruikt en ook fragmenten die behandeld zijn met Tissue-Tek om RNA te isoleren, (Zie bijlage 2.2 voor gevolgde werkwijze).

2.3 RNA isolatie uit het colon

Vanuit de **dierstudie** zijn **er** colon ringen gebruikt uit de eerste drie secties. Er is gekozen om de colon ringetjes van de dieren die behandeld zijn met AOM, AOM + wheat bran, AOM + curcumine en AOM + rutine, op de tijdstippen 7 weken, 15 en 26 weken (1e sectie, 2e sectie en 3e sectie) te gebruiken. Uit elke groep en ieder tijdstip zijn 3 dieren random geselecteerd dus in totaal 36 monsters. Van de 3^e sectie zijn er dieren geselecteerd die tumor dragend waren. Er is hier voor gekozen omdat er op deze manier mogelijk meer genen gevonden worden die betrokken zijn bij de vorming van tumoren in het colon. De monsters uit de eindsectie zijn niet meegenomen in dit experiment omdat er uit dit materiaal geen goed RNA verkregen kon worden. Er is gebleken dat het RNA uit de swiss rolls een grote afbraak vertonen op de BioAnalyzer als het geoptimaliseerde protocol gebruikt werd voor RNA isolatie.

Het volgende geoptimaliseerde protocol is gebruikt om het RNA uit de colon ringen te isoleren: De colon ringen zijn uit de vriezer gehaald en op droog ijs gezet. De colon ringen zijn in fysiologisch zout (4°C) oplossing ontdooid en tegelijkertijd is de Tissue-Tek weg gewassen. Het colon ringetje is open geknipt met een stompe schaar (dit om de mucosa niet te beschadigen) en vervolgens zijn de stukjes colon nog 2x gewassen in een petrischaaltje met fysiologisch zout oplossing. Met een steriel object glaasje is vervolgens de mucosa **van** de colon ring geschrapt.

Het RNA is met de RNeasy micro kit (Qiagen) geïsoleerd, en het protocol voor animal tissue is daarvoor aangepast over het algemeen zijn de aanpassingen beter homogeniseren en een grotere hoeveelheid lysis buffer. De volgende punten zijn aangepast in het standaard protocol voor de rest is het **normale** protocol gevolgd (zie voor RNeasy micro kit (Qiagen) het protocol voor animal tissue bijlage 2.1)

- De afgeschraapte mucosa is in 1,5ml RLT buffer opgenomen i.p.v. 0.350ml om de achtergebleven Tissue-Tek te verdunnen (zie resultaten § 3.3)
- Na het opnemen van het weefsel in de RLT buffer is **het** weefsel gehomogeniseerd door **gebruikt** te maken van een 20gauge naald door de oplossing 5x op te zuigen.
- Het weefsel is vervolgens door een QIAshredder kolom (Qiagen) verder gehomogeniseerd, de vloeistof is in ● 2 centrifuge stappen door 1 kolom gecentrifugeerd 2 min 20800xg.
- De hoeveelheid ethanol is **aan** de hoeveelheid RLT buffer aangepast met behoud van de 1:1 verhouding zoals voorgeschreven wordt door Qiagen. (1.5ml RLT +1.5ml ethanol).
- Om het RNA aan 1 kolom te binden is ook dit in meerdere stappen over de kolom gecentrifugeerd (± 4x).
- Voor en na de eerste was stap met RW1 is er een keer extra 30 sec op full speed gecentrifugeerd om het filter droog te krijgen.
- Bij het elueren van het RNA van de kolom is er na het toevoegen van het water (14µl) een extra incubatie stap 2 min bij kamertemperatuur en is er nog 1x met dezelfde elutie vloeistof geëluëerd.

De monsters zijn naar Service XS op gestuurd voor kwantiteit **en** kwaliteit controle met behulp van de Nano drop en de Agilent 2001 Bioanalyzer.

2.4 Micro Array

De Affymetrix micro array wordt uitbesteed aan het bedrijf Service Xs te Leiden. De RNA monsters zijn na isolatie opgestuurd naar Service XS voor: kwantiteit controle **m.b.v.** de Nano Drop, kwaliteit controle met de 2100 Bio Analyzer (Agilent) en voor de Affymetrix micro array.

2.5 Real Time Polymerase Chain Reaction

2.5.1 Ontwikkeling van nieuwe SYBR Green primer sets m.b.v. Beacon Designer 4.02

Voor de RT-PCR zijn er SYBR green en Taqman Assays gedaan. De Taqman sets die gebruikt zijn waren al aanwezig en uit getest en heb ik dus niet zelf ontwikkeld (B-actine, GAPDH en COX-2). Voor de overige genen zijn SYBR green primer sets ontwikkeld (β -catenine en MMP-7) dit om dat deze primersets vele malen goed koper zijn dan de Taqman RT-PCR. Om de RT-PCR reactie met SYBR green uit te voeren zijn er primers nodig en om deze te verkrijgen is het programma Beacon Designer 4.02 gebruikt (zie bijlage 2.2 Voor werk protocol Beacon designer 4.02). Met dit programma zijn er 3 primersets per gen uitgezocht om hier met behulp van een temperatuur gradiënt de beste set uit te kunnen kiezen.

2.5.2 Ontwikkeling van de standaard voor de RT-PCR reactie

De primers voor de standaard die ontwikkeld zijn met het programma Beacon designer 4.02 worden gebruikt om de standaard mee te maken. De standaard wordt gemaakt door een PCR in te zetten op cDNA van het juiste organisme (rat). Reactie mengsel voor een 50 μ l reactie:

- 5 μ l 10x PCR buffer (Invitrogen),
- 1,5 μ l 50mM MgCl₂ (Invitrogen),
- 1 μ l 10mM dNTP's (db Biosciences),
- 1 μ l 10 μ M primerset (Fw en Rv),
- 0,2 μ l 5U/ μ l Platinum Taq polymerase (Invitrogen),
- 39,3 μ l H₂O (Ambion),
- 2 μ l cDNA.

De PCR wordt uitgevoerd met het volgende PCR programma:

- hot start 95°C Cyclus 1: 2 min 94.0°C,
- Cyclus 2: (35X) 30sec 94.0°C, 30 sec 55.0°C, 01 min 72°C,
- Cyclus 3: 10min 72°C, Cyclus 4: ∞ 4°C.

Het PCR product wordt op een 1% Agarose gel met TAE buffer geelectroforeerd. 45 min 120V. De gel wordt m.b.v. UV bekeken. Als de fragmenten overeenkomen met de verwachte grootte dan worden deze m.b.v. de QIAquick gel extraction kit gezuiverd (Qiagen) met het protocol QIAquick Gel Extraxtion kit protocol gebruik makend van de centrifuge methode. Om de concentratie van de standaard te meten wordt er gebruik gemaakt van de Quant-iTTM Pico Green dsDNA assay kit (molecular probes). Van h-DNA is er een standaard gemaakt van 0 tot 200ng in 1x TE. Hiervan is 100 μ l in duplo in een doorzichtige 96 wel plaat met vlakke bodem gepipetteerd. De monsters worden 50x, 100x en 200x verdund in 1xTE ook hiervan is 100 μ l in duplo in de plaat gepipetteerd. Bij alle wells is er 100 μ l pico green in 1x TE per well gepipetteerd (5 μ l pico green + 995 μ l 1x TE). De plaat is 5minuten in het donker gezet en vervolgens is de luminescentie gemeten. Aan de hand van de standaardlijn is de concentratie van de monsters berekend in ng/ml. Met de onderstaande formule is het aantal kopieën per μ l berekend.

Berekeningen:

$$\frac{\text{Conc ng/l} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{Bp fragment} \times 300 \text{ g/mol}} = \text{Aantal kopieën/L}$$

300 g/mol is het gemiddelde gewicht van de nucleotiden .

6.02×10^{23} is het getal van avogadro (aantal deeltjes in 1 Mol stof)

2.5.3 Temperatuur gradiënt

Om de drie primer sets die ontwikkeld zijn met Beacon Designer 4.02 uit te testen wordt er een temperatuur gradiënt gerund. De temperatuur gradiënt is om de juiste anhealings temperatuur voor de primers te kiezen voor de RT-PCR. Er worden 6 master mixen gemaakt met de 3 verschillende primer sets per monster. Per reactie is er nodig:

- 12.5µl iQ SYBR green supermix (BioRad),
- 7.5µl 1µM primermix (primer forward & reverse)
- 5µl H₂O of 5µl 2×10^3 kopieën/µl standaard fragment.

En wordt hiervan 25µl per well uitgevuld in een Optical quality 96-well thin wall PCR plate (BioRad) (voor de plaat indeling zie figuur 2.2). De plaat wordt afgesloten met Optical quality sealing tape (BioRad) en 2 min 1000rpm gecentrifugeerd in een Falcon 6/300 centrifuge met de Rotor 43124-708 BS4402. De 96 well plaat wordt in de iCycler geplaatst en het volgende protocol geselecteerd

- Cyclus 1: 3 min 94°C.
- Cyclus 2 (50x): 30sec 94°C, 30sec Gradiënt van 58°C- 69.0°C en data collection and Real Time analyses enabled, 10 sec 72°C.
- Cyclus 3: 30 sec 54°C.
- Cyclus 4 (80x): 30sec 54°C +0.5°C data collection and Real Time analyses enabled.

Als de procedure is afgerond zijn de monsters uitgekozen die tussen de 20 en 24^{ste} Cyclus zijn opgekomen en waar van het water niet is opgekomen. Deze fragmenten worden op een 1% agarose gel geelectroforeerd om de fragment grootte te controleren. De primer en temperatuur worden gekozen aan de hand van welke combinatie van deze twee het beste is.

		Primer mix 1				Primer mix 2				Primer mix 3			
		Standaard		Water		Standaard		Water		Standaard		Water	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
69.0°C	A												
68.4°C	B												
67.1°C	C												
65.1°C	D												
62.2°C	E												
60.3°C	F												
58.9°C	G												
58.0°C	H												

Figuur 2.2 Plaatindeling voor de smelt curve.

2.5.4 Standaardlijn RT-PCR

Als de smelt temperatuur is bepaald kan er een **standaard** lijn worden **gerund** met de gekozen primer set bij de optimale temperatuur. Er wordt met het standaard fragment een standaard lijn **gemaakt** van $1 \cdot 10^1$, $2 \cdot 10^1$, $1 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^4$ en $1 \cdot 10^5$ kopieën/ μ l. Van deze standaard lijn is er 5 μ l in duplo in een Optical quality 96-wel thin wall PCR plates (BioRad) gepipetteerd, het aantal kopieën is dan $5 \cdot 10^1$, $1 \cdot 10^2$, $5 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$ en $5 \cdot 10^5$. Aan deze standaard wordt 20 μ l master mix toe gevoegd bestaande uit

- 12.5 μ l iQ SYBR green supermix (BioRad) en
- 7.5 μ l 1 μ M primer **mix** forward & reverse.

De plaat is afgesloten met Optical quality sealing tape (BioRad) en 2 minuten bij 1000rpm gecentrifugeerd in een Falcon 6/300 centrifuge met de Rotor 43124-708 BS4402. De 96 well plaat wordt in de iCycler geplaatst en het volgende protocol geselecteerd

- Cyclus 1: 3 min 95°C.
- Cyclus 2 (45x): 15sec 94°C, 30sec (de optimale temperatuur die bij de gradiënt gevonden is) en data collection and Real Time analyses enabled, 20 sec 72°C.
- Cyclus 3: 30 sec 54°C.
- Cyclus 4 (80x): 30sec 54°C +0.5°C data collection and Real Time analyses enabled).

De laatste cyclus is de smelt curve deze wordt gerund om te bepalen of de fragmenten die zijn **gevormd** allemaal van de zelfde grootte **zijn**. Als de procedure is voltooid berekend het programma (iCycler IQ TM optical system software version 3.1.7050) zelf de standaard curve. De waarde van de standaard curve moeten zijn: de correlatie coëfficiënt 0.999 de slope -3.30 en de PCR efficiency 100.92%. Dit zijn echter de **optimale** waarden en mag hier iets van worden afgeweken (zie tabel 2.2). De standaard curve moeten aan deze eisen voldoen **omdat** er tijdens 1 PCR cyclus de hoeveelheid geamplificeerd materiaal wordt verdubbeld (amplificatie= 2). Deze amplificatie wordt met behulp van de slope berekend, de PCR efficiency is de **amplificatie** $-1 \cdot 100\%$ (zie berekeningen), Een slope van -3,3 staat gelijk aan een Amplificatie van 2 en een PCR efficiency van 100%.

Berekeningen:

Exponentiële amplificatie = $10^{(-1/slope)}$

Efficiency (q) = $[10^{(-1/slope)}] - 1 \cdot 100\%$

Tabel 2.2 De waarde voor standaard curve

Slope	Amplificatie	Efficiency [%]	Kwaliteit
-3.60	1.8957	89.57	Slechr
-3.55	1.9129	91.29	Slecht
-3.50	1.9307	93.07	Slecht
-3.45	1.9492	94.92	Goed
-3.40	1.9684	96.84	Goed
-3.35	1.9884	98.84	Goed
-3.30	2.0092	100.92	Optimaal
-3.25	2.0309	103.09	Goed
-3.20	2.0535	105.35	Goed
-3.15	2.0771	107.71	Slecht
-3.10	2.1017	110.17	Slecht

2.5.5 cDNA synthese

De cDNA synthese is uitgevoerd met de iScript cDNA synthese kit (BioRad) er is

- 4µl 5x iScript reactie mix,
- 1µl iScript enzyme mixture,
- 200ng RNA
- Aangevuld tot 20µl met nuclease vrij water.

Er is vervolgens het volgende protocol gewerkt in een thermo cycler:

- 5 min 25°C
- 30 min 42°C
- 5 min 85°C
- ∞ 4°C

Na de cDNA synthese is deze aangevuld tot 100µl met nuclease vrij water (Arnbion)(5x verdunning) hier van is 50µl verder door verdunt tot 100µl (10x verdunning). Het cDNA wordt bewaard bij -20°C tot het gebruikt wordt voor de RT-PCR.

2.5.6 RT-PCR met SYBR green

Om de kwantitatieve hoeveelheid mRNA te meten van een bepaald gen in een monster kan er een RT-PCR met SYBR green uitgevoerd worden. Om de RT-PCR met SYBR green te kunnen uitvoeren wordt er een standaard lijn gemaakt (blanco, $1 \cdot 10^1$, $2 \cdot 10^1$, $1 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^4$ en $1 \cdot 10^5$ kopieën /µl) van de standaard wordt 5µl in de Optical quality 96-well thin wall PCR plates (BioRad) gepipetteerd. Het aantal kopieën is nu $5 \cdot 10^1$, $1 \cdot 10^2$, $5 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$ en $5 \cdot 10^5$ in de wells. Van elk monster wordt eveneens 5µl in de plaat gepipetteerd. Hier bij wordt 20µl mix toe gevoegd bestaande uit

- 12.5µl iQ SYBR green supermix (BioRad), en
- 7.5µl primer 1µM primer mix forward & reverse.

De plaat is afgesloten met Optical quality sealing tape (BioRad) en 2 minuten bij 1000rpm gecentrifugeerd in een Falcon 6/300 centrifuge met de Rotor 43124-708 BS4402. De 96 well plaat wordt in de iCycler geplaatst en het volgende protocol geselecteerd

- Cyclus 1: 3 min 95°C.
- Cyclus 2 (45x): 15sec 94°C, 30sec (de optimale temperatuur die bij de gradiënt gevonden is) en data collection and Real Time analyses enabled, 20 sec 72°C.
- Cyclus 3: 30 sec 54°C.
- Cyclus 4 (80x): 30sec 54°C +0.5°C data collection and Real Time analyses enabled.

Als de procedure is voltooid berekend het programma (iCycler IQ TM optical system software version 3.1.7050) zelf de standaard curve en de concentratie van de onbekende monsters.

2.5.7 RT-PCR met Taqman

Om de kwantitatieve hoeveelheid mRNA te meten van een bepaald gen in een monster kan er een RT-PCR met Taqman probes uitgevoerd worden. Om de RT-PCR met Taqman te kunnen uitvoeren wordt er een standaard lijn gemaakt (blanco, 1×10^1 , 2×10^1 , 1×10^2 , 2×10^2 , 1×10^3 , 2×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 en 1×10^5 kopieën / μ l) van de standaard wordt 5μ l in de Optical quality 96-well thin wall PCR plates (BioRad) gepipetteerd. Het aantal kopieën is nu 5×10^1 , 1×10^2 , 5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 en 5×10^5 in de wells. Van elk monster wordt eveneens 5μ l in de plaat gepipetteerd. Vervolgend wordt er een mastermix gemaakt: per monster is er nodig

- 13.2μ l Taqman universal PCR mastermix (Applied Biosystems),
- 1.13μ l 20μ M primermix (primer forward & reverse),
- 1.0μ l 5μ M probe
- 6.13μ l nuclease-vrij water (Ambion).

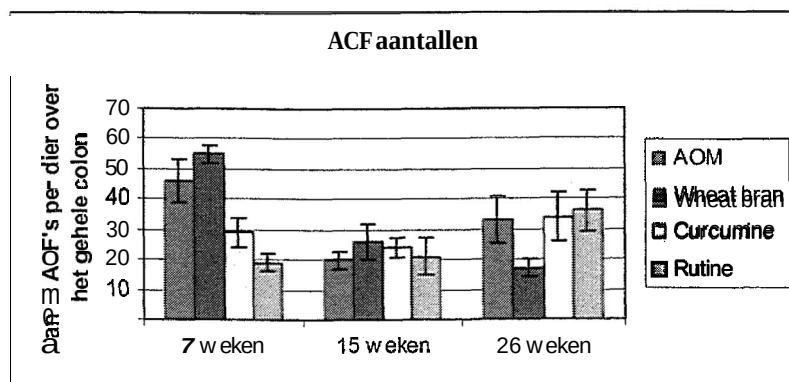
Er wordt van deze mix 20μ l aan elk standaard punt en monster toe gevoegd. De plaat is afgesloten met Optical quality sealing tape (BioRad) en 2 minuten bij 1000rpm gecentrifugeerd in een Falcon 6/300 centrifuge met de Rotor 43124-708 BS4402. Vervolgens is de plaat in de iCycler (BioRad) geplaatst en het volgende protocol geselecteerd

- Cyclus 1: 2 min 50.0°C , 10min 95.0°C ,
- Cyclus 2: (45x) 15 sec 95.0°C data collection enabled, 01 min 60.0°C data collection and Real Time analyses enabled.

De plate setup is ingevoerd en de fluorefore geselecteerd de procedure wordt gestart met 25μ l per monster. Als de procedure is voltooid berekend het programma (iCycler IQ TM optical system software version 3.1.7050) zelf de standaard curve en de concentratie van de onbekende monsters.

3 Resultaten

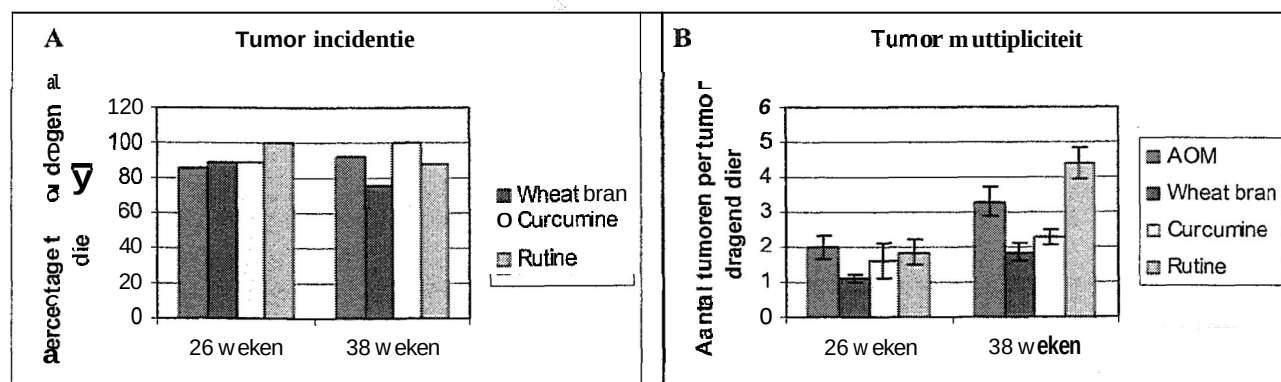
3.1 ACF aantallen



Figuur 3.1 De aantallen ACF's per dier groep [2]

Het bovenstaande figuur (figuur 3.1) geeft de resultaten weer van het aantal ACF's die is uitgevoerd voor de start van deze stage [2]. Op het bovenstaande figuur (figuur 3.1) is te zien dat er bij de sectie op het tijdstip 7 weken een toename van het aantal ACF's te zien is van de wheat bran en een afname van de curcumine en rutine ten opzichte van de AOM behandelde groep. Bij de sectie op het tijdstip van 15 weken zijn er geen verschillen te zien in het aantal ACF's per dier groep. Bij de sectie van 26 weken is er een afname van het aantal ACF's bij de diergroep die behandeld is met wheat bran ten opzichte van de AOM groep en bij de curcumine en rutine behandelde groepen is er geen verschil te zien.

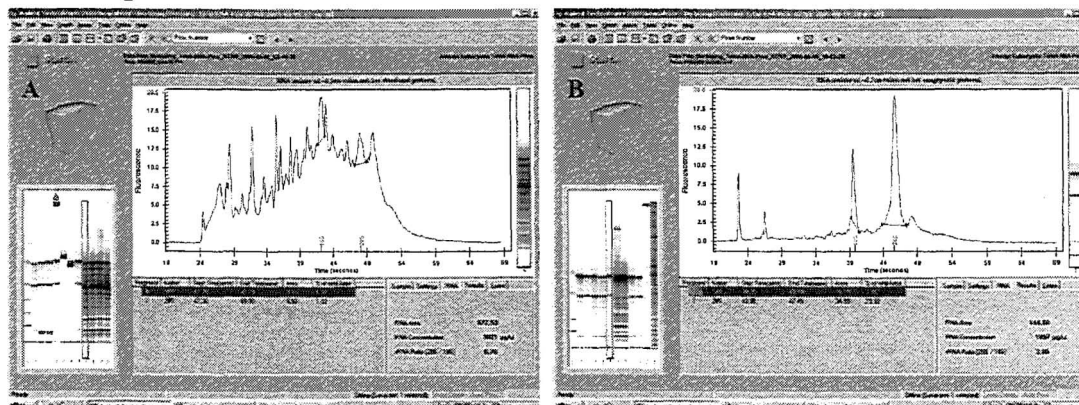
3.2 Tumor incidentie



Figuur 3.2 A) Het percentage tumor dragende dieren per groep B) Het gemiddeld aantal tumoren per tumor dragend dier [2]

Bovenstaande figuren (figuur 3.2 A en B) geven de resultaten weer van de tumor incidentie en de tumor multiplicititeit die zijn uitgevoerd voor de start van deze stage [2]. Op het bovenstaande figuur (figuur 3.2 A) is te zien dat 80-100% van de dieren tumor dragend zijn en bij de eindsectie 75-100%. Bij de wheat bran behandelde groep lijkt het erop of er een afname is in het aantal tumor dragende dieren. Op figuur 3.2 B is het aantal tumoren per tumor dragend dier uitgezet (de tumor multiplicititeit). Er is te zien dat op het tijdstip 26 weken er een afname is in het aantal tumoren per tumor dragend dier bij de wheat bran behandelde groep. Bij de eindsectie (38 weken) is er bij de wheat bran en de curcumine een afname te zien van het aantal tumoren per tumor dragend dier en bij de dieren behandeld met rutine lijkt het erop dat er een toename is, maar deze is niet significant.

3.3 Optimalisatie RNA isolatie



Figuur 3.3 Resultaten van de Agilent 2100 BioAnalyzer. A) RNA isolatie uit colon met het standaard protocol, B) RNA isolatie met het aangepaste protocol

Er is begonnen met RNA isolatie uit een colon ringetje van 0,5 cm groot met het standaard protocol, de kwaliteit is alleen bepaald met de Agilent Bioanalyzer 2100 (zie figuur 3.3 A). De kwaliteit van deze monsters was zodanig slecht dat dit RNA niet gebruikt kan worden voor verdere analyse. Er is op dit figuur te zien dat er veel pieken verschijnen wat betekent dat er veel afbraak is van het RNA, bij RNA van een goede kwaliteit zijn er 2 pieken te zien van de 18S en 28S fragmenten. Om de optimalisatie methode voor de RNA isolatie op te zetten zijn er stukjes colon geschraapt en daarvan is het RNA geïsoleerd, het RNA is op kwantiteit en kwaliteit gecontroleerd door middel van de spectrofotometer, agarose gel electrophorese en door middel van de Agilent 2100 Bioanalyzer.

Om de RNA isolatie methode te optimaliseren is er begonnen met het isoleren van RNA uit 5cm colon die niet behandeld is met Tissue-Tek. Er werd verwacht dat er uit deze hoeveelheid weefsel genoeg RNA geïsoleerd kon worden om aan te kunnen tonen. De concentratie van het RNA die geïsoleerd werd was zodanig laag dat deze alleen met de spectrofotometer is bepaald (zie bijlage 3.1 tabel 3.1 punt 1). Tijdens het isoleren leek het erop dat de kolom verstopt raakte door de hoeveelheid weefsel en daarom is er uit 2,5cm colon RNA geïsoleerd en is het volume RLT buffer vergroot. Er werd al wel meer RNA geïsoleerd maar nog steeds te weinig (zie bijlage 3.1 tabel 3.1 punt 2). Nog steeds leek het er tijdens het isoleren van het RNA dat het filter van de kolom nog steeds verstopt raakte.

Er is opnieuw RNA geïsoleerd uit een stukje colon van 2,5 cm groot en opnieuw is het volume van de RLT buffer vergroot en is er gebruik gemaakt van een Qia Shredder kolom om het weefsel beter te homogeniseren. De hoeveelheid RNA die geïsoleerd werd is van 2,35µg naar 10,96µg gegaan en ook de kwaliteit van de monsters is verbeterd maar nog niet optimaal (zie bijlage 3.1 tabel 3.1 punt 3).

Er is vervolgens van een stukje van 2,5 cm met en zonder Tissue-Tek RNA geïsoleerd de isolatie van het RNA die behandeld was met Tissue-Tek bleek de helft minder opbrengst te hebben als het stukje die niet behandeld was met Tissue-Tek en ook de kwaliteit is erg achter uit gegaan van het stukje die behandeld is met Tissue-Tek (zie bijlage 3.1 tabel 3.1 punt 4). Omdat het er op leek dat de Tissue-Tek invloed heeft op de binding capaciteit van het RNA aan de kolom is er RNA geïsoleerd van 1 cm groot en er zijn een aantal stappen extra toe gevoegd. Nog steeds had het monster die behandeld is met Tissue-Tek een lagere opbrengst als het monster die niet behandeld is met Tissue-Tek (zie bijlage 3.1 tabel 3.1 punt 5).

Er is weer RNA geïsoleerd uit stukjes colon van 1 cm groot maar ook uit stukjes van 0,5cm groot die behandeld zijn met en zonder Tissue-Tek. Het stukje van 1 cm colon die behandeld is met Tissue-Tek had nog steeds een lagere RNA opbrengst dan het stukje zonder Tissue-Tek. Bij de stukjes van 0,5cm was de opbrengst van het RNA met en zonder Tissue-Tek ongeveer gelijk de kwaliteit van beide monsters is nu wel goed (zie figuur 3.3 B en bijlage 3.1 tabel 3.1 punt 6). Er is met het zelfde protocol nogmaals RNA geïsoleerd maar dan van 5 verschillende dieren om te bepalen of er variatie is tussen de verschillende dieren. Er is gebleken dat er wel iets aan dier variatie was maar niet noemenswaardig (zie bijlage 3.1 tabel 3.1 punt 7).

3.4 RNA isolatie uit de monsters

Tabel 3.2 Resultaten RNA isolatie uit de dierstudie.

Groep	Sectie	dier	Conc [ng/μl]	Tot μg RNA	Groep	Sectie	dier	Conc [ng/μl]	Tot μg RNA
AOM	Sectie 1	A4	342	3,42	AOM + Curcumine	Sectie 1	C206	665	6,65
		A6	231	2,31			C214	544	5,44
		A12	660	6,60			C216	530	5,30
	Sectie 2	A14	410	4,10		Sectie 2	C218	535	5,35
		A18	599	5,99			C222	551	5,51
		A20	1364	13,64			C226	442	4,42
	Sectie 3	A28	594	5,94		Sectie 3	C230	153	1,53
		A36	355	3,55			C234	878	8,78
		A42	241	2,41			C246	302	3,02
AOM + Wheat Bran	Sectie 1	B104	295	2,95	AOM + Rutine	Sectie 1	D310	816	8,16
		B106	490	4,90			D312	343	3,43
		B108	319	3,19			D314	1273	12,73
	Sectie 2	B118	188	1,88		Sectie 2	D324	573	5,73
		B120	872	8,72			D326	561	5,61
		B122	264	2,64			D328	364	3,64
	Sectie 3	B132	553	5,53		Sectie 3	D336	229	2,29
		B136	136	1,36			D342	1214	12,14
		B144	436	4,36			D344	577	5,77

Voor de isolatie van het RNA uit de dierstudie is er gebruik gemaakt van het geoptimaliseerde protocol. De kwantiteit en kwaliteit van de monsters is bepaald door het bedrijf Service XS met behulp van de Nano Drop en de Agilent Bioanalyzer 2100.

In tabel 3.2 zijn de concentraties van de verschillende monsters weergegeven. Er is te zien dat er veel variatie is tussen de verschillende monsters. Dit komt door dat er veel verschil was in grootte van de colon ringetjes ($\pm 0,3\text{cm} < 1\text{cm}$). Er is gebleken dat er uit de ringetjes die $\leq 3\text{mm}$ waren er erg weinig RNA geïsoleerd kon worden $< 2\mu\text{g}$. Bij de iets grotere ringetjes $> 5\text{mm}$ kon er genoeg RNA geïsoleerd worden $5\text{-}10\mu\text{g}$, maar als de ringetjes te groot werden ($> 1\text{cm}$) was de hoeveelheid en de kwaliteit van het RNA slecht. De kwaliteit van de monsters die hier boven staan vermeld zijn allemaal goed en vergelijkbaar met figuur 3.3 B.

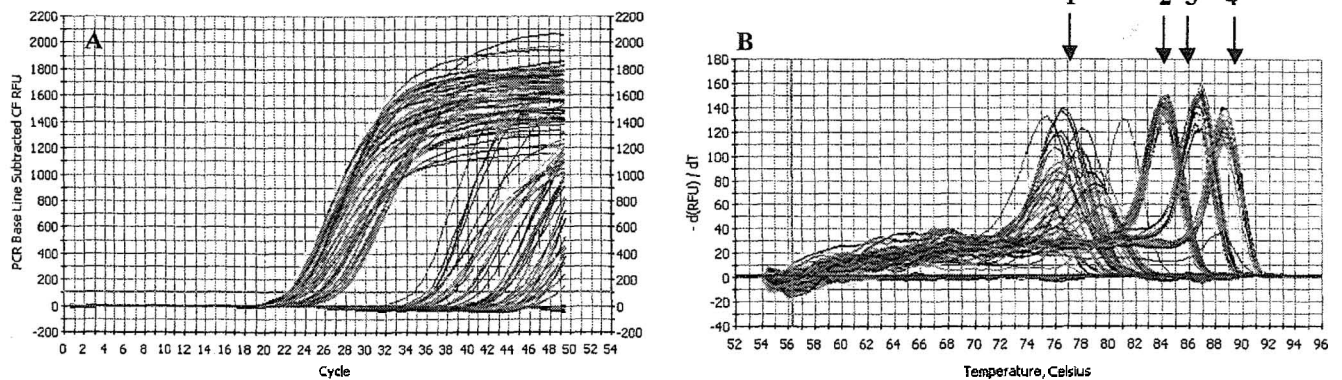
Er is echter van een aantal monsters te weinig RNA geïsoleerd om en de micro array en de RT-PCR uit te voeren (B118, B136 en C153). Om de micro array uit te kunnen voeren is er $2\mu\text{g}$ RNA nodig en voor de RT-PCR 200ng . Er is van deze monsters in overleg met ServiceXS besloten om alleen de micro array uit te voeren. De concentratie van deze monsters is aan de lage kant maar volgens ServiceXS kan ook hier mee de micro array goed worden uitgevoerd.

3.5 Micro Array

Helaas zijn er nog geen resultaten beschikbaar van de micro array's.

3.6 Opzetten van de RT-PCR

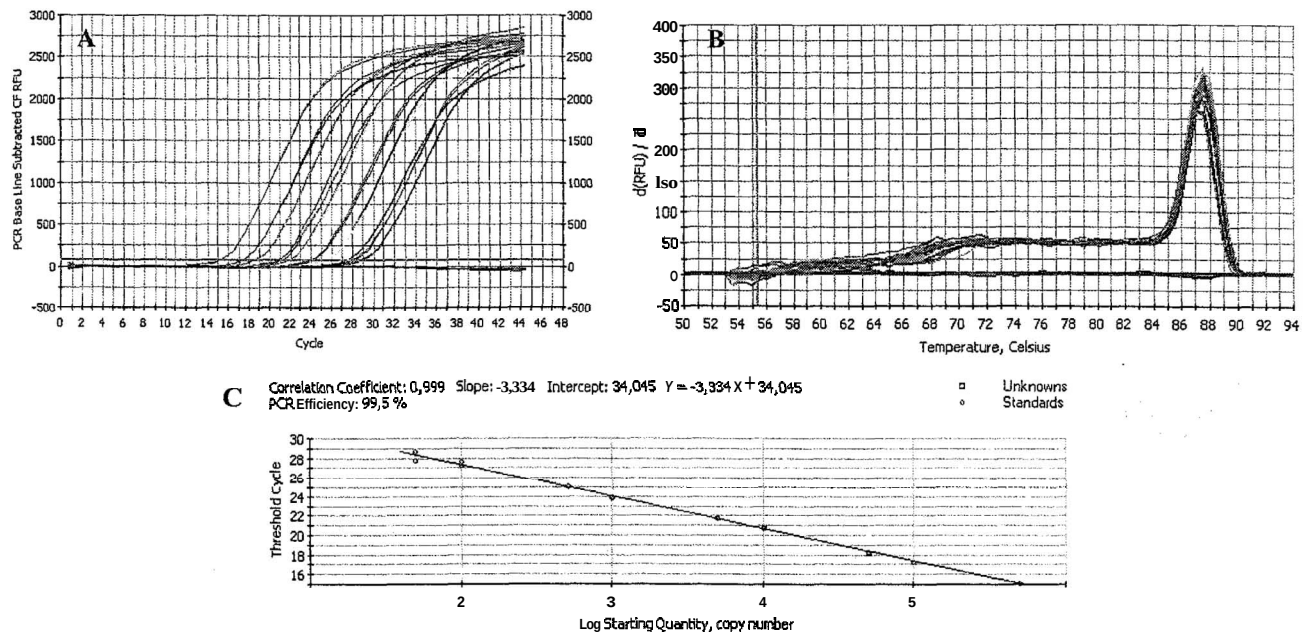
3.6.1 Temperatuur gradiënt



Figuur 3.4 A) Voorbeeld temperatuur gradiënt. B) Voorbeeld smelt curve

Om te bepalen welke primer set bij welke temperatuur gebruikt moet worden is er een temperatuur gradiënt uitgevoerd met daar achteraan een smelt curve. Op figuur 3.4 A is te zien dat er tussen de 22 en de 28 cycli van veel fragmenten de fluorescentie opkomt. Maar ook na de 34 cycli komt er van veel fragmenten de fluorescentie op. Op figuur 3.4 B is te zien dat er 3 nette pieken opkomen tussen de 82 en 91°C (2, 3 en 4) tussen de 70 en de 81°C komen er ook veel pieken op (1). Deze fragmenten hebben een lagere smelt temperatuur dan de fragmenten die bij de drie pieken zijn opgekomen. Deze fragmenten zijn zeer **waarschijnlijk** gevormd door primer **dimers** en deze primer set is dus niet te gebruiken **net** de bijbehorende temperatuur. De temperatuur die gekozen wordt bij een primer set is die temperatuur waarvan het water niet opkomt en waarbij het **standaard fragment** tussen de 20 en 24^{ste} cyclus opkomt.

3.6.2 Standaard curve

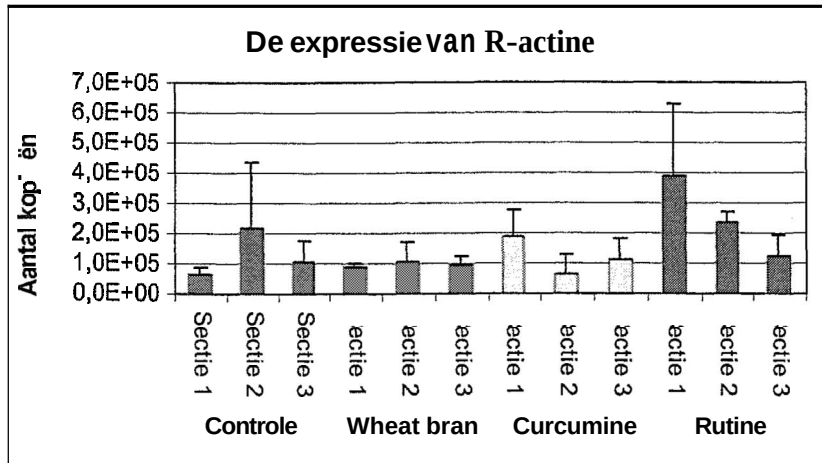


Figuur 35 A) De grafiek van de opkomst van de fluorescentie B) De smelt curve van het product C) Voorbeeld van een goede standaardlijn.

Nadat de temperatuur van de primer sets is bepaald wordt er een standaard curve gerund om te bepalen of de Correlatie coëfficiënt, de slope en de PCR efficiency van de primer set en de daarbij behorende temperatuur goed zijn. Op figuur 3.5 A is de opkomst van de fluorescentie van de verschillende concentraties van de standaard lijn te zien. De wells met de hoogste concentratie standaard fragment komen als eerste op en de wells met de laagste concentratie standaard fragment het laatste. De wells zonder standaard fragment horen niet op te komen (blanco). Op figuur 3.5 B is te zien dat er 1 piek op komt, dit betekent dat er fragmenten zijn gevormd met allemaal dezelfde smelt temperatuur. Op figuur 3.5 C is een standaard curve te zien. De correlatie coëfficiënt moet zodicht mogelijk bij 1 liggen, de slope moet -3,3 zijn en de PCR efficiency 100% hiervan mag iets worden afgeweken (zie tabel 2.1 §2.5.4). Deze primer set met de bij behorende temperatuur kan gebruikt worden voor het analyseren van de monsters met de RT-PCR methode. (Zie bijlage 2 voor de temperaturen van de verschillende SYBR green primer sets)

3.7 Analyse van de monsters met RT-PCR

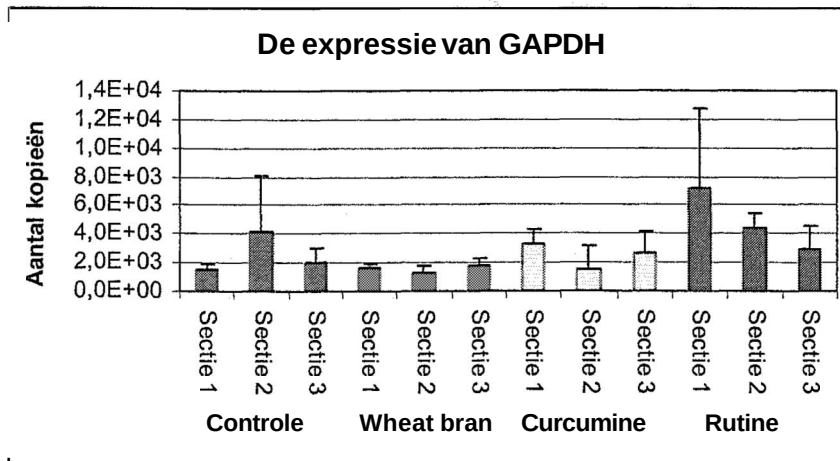
3.7.1 Huishoudgen B-actine



Figuur 3.6 Het aantal kopieën van *B-actine* gemeten met RT-PCR (n=3)

Er is met behulp van RT-PCR de expressie van het huishoudgen B-actine gemeten van de colon monsters. Er is voor alle monsters 200ng RNA als start materiaal gebruikt waardoor er wordt verwacht dat het aantal kopieën van de huishoudgenen constant zou zijn over alle secties en behandelingsgroepen. Zoals te zien is in bovenstaand figuur (figuur 3.6) is de expressie van B-actine ongeveer gelijk bij de controle, wheat bran en curcumine de en kan het als huishoudgen gebruikt kunnen worden. Bij de monsters uit de eerste 1^{ste} sectie van rutine is expressie B-actine hoog en is er een grote spreiding.

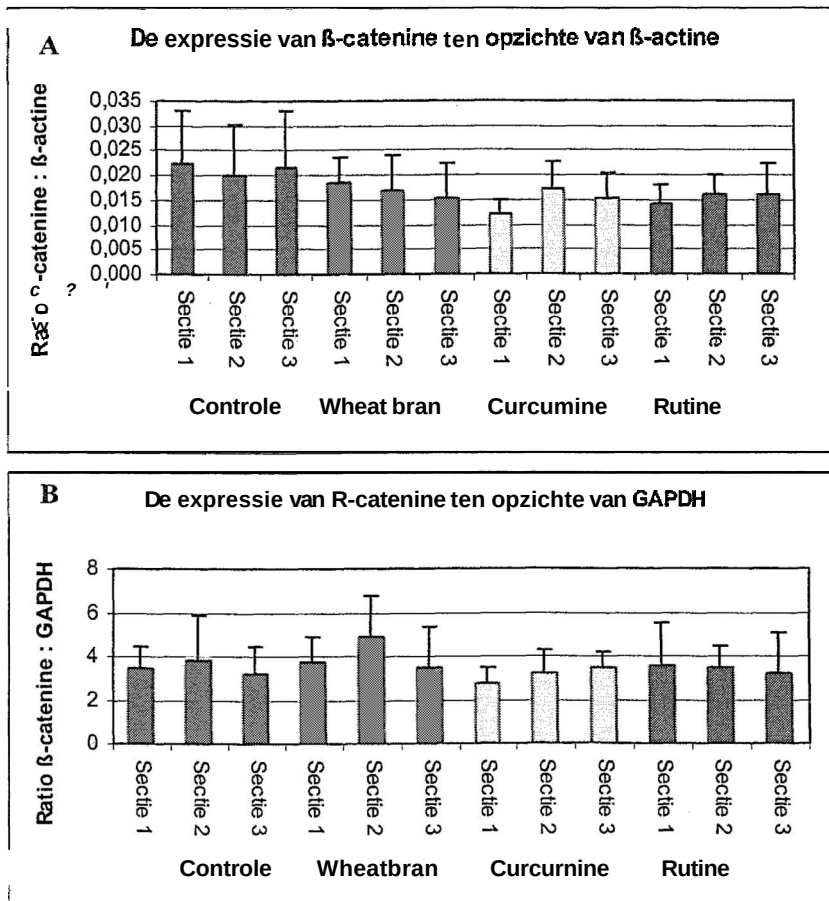
3.7.2 huishoudgen GAPDH



Figuur 3.7 Het aantal kopieën van GAPDH gemeten met RT-PCR (n=3)

Er is met behulp van RT-PCR de expressie van het huishoudgen GAPDH gemeten van de colon monsters. Zoals te zien is in bovenstaand figuur (figuur 3.6) is de expressie van GAPDH ongeveer gelijk bij de controle, wheat bran en curcumine de en kan het als huishoudgen gebruikt worden. Bij de monsters uit de eerste 1^{ste} sectie van rutine is er echter een hoge spreiding in de expressie van GAPDH maar doordat deze is niet significant verschillend is van de andere monsters kan GAPDH ook hier als huishoudgen worden gebruikt. Het expressie patroon van GAPDH komt overeen met het expressie patroon van B-actine. De correlatie tussen GAPDH en β -actine is bepaald door middel van de Pearson-Correlation-Coëfficiënten hier uit is gebleken dat de correlatie $R = 0.98144$ $P = 0.0001$ voor de gemiddelde waarden (zoals in de grafiek te zien zijn) en $R = 0.94161$ en $P = 0.0001$ voor de afzonderlijke waarden. Er is dus een correlatie tussen de expressie van GAPDH en B-actine.

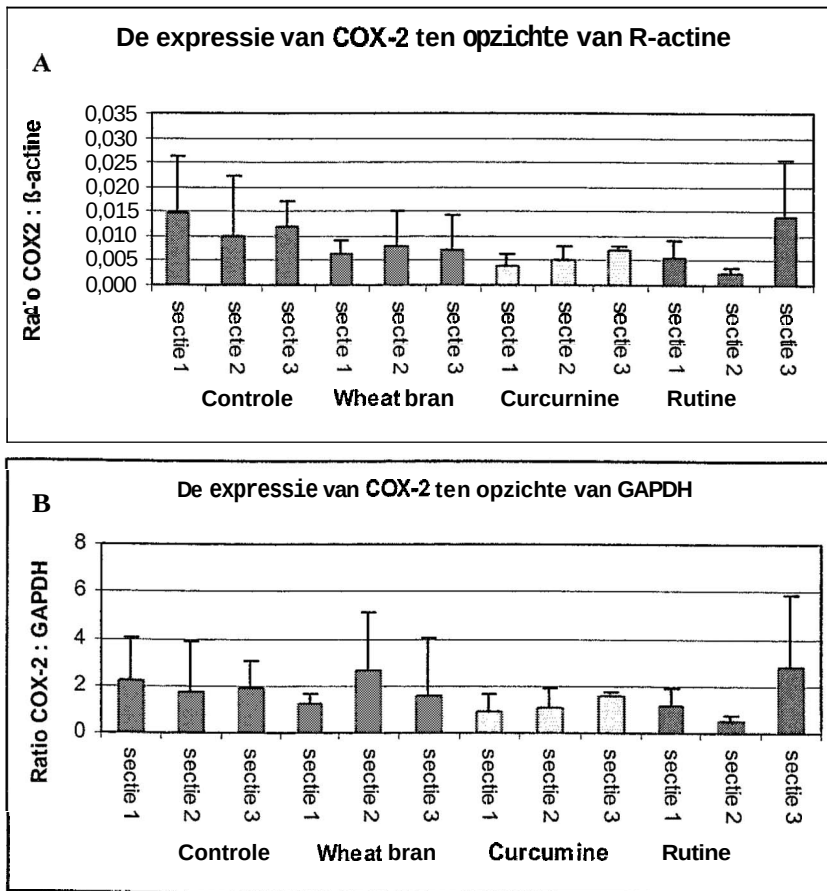
3.7.3 De expressie van B-catenine in de colon monsters



Figuur 3.8 A) De expressie van β -catenine ten opzichte van β -actine B) De expressie van β -catenine ten opzichte van GAPDH (n=3)

Er is met behulp van RT-PCR de expressie van B-catenine gemeten van de colon monsters. De expressie van B-catenine is gecorrigeerd voor beide huishoudgenen, B-actine en GAPDH, door de ratio te bepalen (β -catenine : β -actine of GAPDH). Zoals op de bovenstaande figuren is te zien (figuur 3.8 A en B) **zijn** er geen verschillen tussen de verschillende behandelingsgroepen en sectie tijden in de expressie van β -catenine. Ook maakt het niet uit of GAPDH of B-actine als huishoudgen gebruikt wordt.

3.7.4 De expressie van COX-2 in de colon monsters



Figuur 3.9 A) De expressie van COX-2 ten opzichte van B-actine B) De expressie van COX-2 ten opzichte van GAPDH (n=3)

Er is met behulp van RT-PCR de expressie van COX-2 gemeten van de colon monsters. De expressie van COX-2 is gecorrigeerd voor beide huishoudgenen, B-actine en GAPDH, door de ratio te bepalen (COX-2: B-actine of GAPDH). Zoals op de bovenstaande figuren is te zien (figuur 3.9 A en B) zijn er geen verschillen tussen de verschillende behandelingsgroepen en sectie tijden in de expressie van COX-2. Ook maakt het niet uit of GAPDH of B-actine als huishoudgen gebruikt wordt.

3.7.5 De expressie van MMP-7 in de colon monsters

MMP-7 is te laag tot expressie gekomen in de colon ringen om met behulp van RT-PCR aan te kunnen tonen. De detectie grens van MMP-7 ligt op ± 100 kopieën per 5 μ l cDNA.

4 Discussie

Er is tijdens deze stage **een** RNA isolatie methode **geoptimaliseerd** om RNA uit colon ringetjes te **kunnen** isoleren die behandeld zijn met Tissue-Tek. Nadat de RNA isolatie methode was opgezet is er met behulp van RT-PCR naar de gen expressie van verschillende genen gekeken. Zo zijn **er** aan de hand van een soort gelijke in **vivo** studie en op basis van betrokkenheid bij de ontwikkeling van colon tumoren een aantal genen geselecteerd (**β -catenine**, COX-2 en MMP-7). Om iets over de genexpressie van deze genen te kunnen zeggen zijn er 2 huishoud genen gebruikt (GAPDH en **β -actine**). Met deze huishoudgenen is de ratio bepaald voor de expressie van het gen van interesse en is dus als correctie waarde gebruikt.

Bij het isoleren van **het** RNA is er gebleken dat het standaard protocol van de Qiagen RNeasy Micro kit RNA van slechte kwaliteit oplevert. Na **aan** passing van het protocol is er gebleken dat er wel RNA van een goede kwaliteit geïsoleerd kan worden. Een verklaring hier voor kan zijn dat de Tissue-Tek waarmee de monsters zijn behandeld voordat ze zijn opgeslagen, invloed heeft op de binding van het RNA **aan** de kolom. Tissue-Tek is een viscoze stof welke gebruikt wordt om **weefsel** in te fixeren zodat dit gebruikt kan worden voor histologische analyse. Het toevoegen van extra was stappen van het colon ringetje zorgt er voor dat er een grotere hoeveelheid Tissue-Tek verwijderd wordt. Het gebruik van een grotere hoeveelheid RLT Buffer zorgt **er** voor dat de achter gebleven Tissue-Tek meer verdund wordt zodat het minder invloed heeft op de binding van het RNA aan de kolom. Door dat de Tissue-Tek zo viscoze is kan het in de poriën van de kolom blijven kleven en zo de kolom verstopen. Er is tijdens het optimaliseren gebleken dat het beter is om de colon ringetjes niet met Tissue-Tek te behandelen voor dat ze ingevroren worden als men deze wil gebruiken om er RNA uit te isoleren. Ook is er gebleken dat de detectie grens van het colon ringetje op 5mm ligt zodat **er** >2 μ g RNA geïsoleerd kan worden als dit protocol gebruikt wordt. Een verklaring hiervoor kan zijn dat als de ringetjes te klein zijn, er gewoon te weinig RNA aanwezig is om voldoende te kunnen isoleren. Als de colon ringetjes te groot zijn, **kan** het zijn dat de hoeveelheid schrapel boven de capaciteit van de kolom uit komt wat weer invloed heeft op de binding van het RNA aan de kolom. De maximale capaciteit van de kolom is 5mg weefsel en 45 μ g RNA. Als er meer weefsel op de kolom wordt aan gebracht dan de kolom aan kan, kan de kwantiteit en de kwaliteit van het RNA achteruit gaan door dat het weefsel de binding van het RNA aan de kolom beïnvloed.

De huishoudgenen GAPDH en β -actine zijn goede huishoudgenen gebleken in dit experiment. Er is **wel** een grote spreiding gevonden bij de 1^{ste} sectie van routine in de expressie van β -actine en GAPDH. Ook is er zoals verwacht gebleken dat er een correlatie is tussen GAPDH en β -actine $R=0.98144$. Dat er een **verhoging** van de expressie van de huishoudgenen en een grote spreiding gevonden is bij de eerste sectie van routine kan komen doordat er mogelijk bij een monster toch meer RNA gebruikt is als de 200ng. Het kan ook zijn dat routine een invloed heeft op de expressie van β -actine en GAPDH maar dit is niet heel waarschijnlijk omdat er bij beide genen het zelfde patroon te zien is. Zeer waarschijnlijk is deze verhoging van de β -actine en GAPDH gekomen door een technische fout. Dit omdat als de ratio van β -catenine en COX-2 bepaald wordt ten opzichte van de huishoudgenen deze trend niet meer is waar te nemen. Als Routine een effect **zou** hebben op de expressie van een van de huishoudgenen dan zou als de ratio bepaald wordt met COX-2 of β -catenine de expressie van deze genen omlaag gaan (gen van interesse wordt gedeeld door het huishoudgen). Dit is echter niet waargenomen, de expressie van **β -catenine** en COX-2 in de eerste sectie van routine zijn gelijk ten opzichte van de andere behandelingsgroepen.

β -catenine en COX-2 zijn tot expressie gekomen in de colon ringen wat ook te verwachten was. Er zijn voor zowel β -catenine als COX-2 geen verschillen in expressie waargenomen tussen de verschillende behandelingsgroepen en sectie tijden. MMP-7 is zeer laag tot expressie gekomen en de monsters zaten net onder de detectie grens (detectie grens is ± 100 kopieën). MMP-7 komt in "gezond" epitheel **normaal** niet tot expressie maar is wel in colon tumoren aangetoond. Dat MMP-7 onder de detectie grens tot expressie komt en er weinig verschillen zijn waargenomen in de expressie **van** β -catenine en COX-2 tussen de verschillende behandelingsgroepen en de secties kan komen doordat, er een colon ringetje is uit gesneden uit de darm van de rat. Het colon ringetje zal **voornamelijk** bestaan uit "gezond" epitheel en een aantal voorlopers van colorectale tumoren. Het RNA dat is gebruikt voor de RT-PCR zal **voornamelijk** bestaan uit RNA van "gezond" epitheel met daar tussen RNA uit de voorlopers. Waarschijnlijk is de concentratie van het RNA uit de voorlopers te laag ten opzichten van het RNA uit het gezonde weefsel waardoor het effect niet goed te meten is.

5 Conclusie

Er is gebleken dat de tumor afname in de laatste interim sectie en de eindsectie **niet** terug te vinden is in het aantal ACF's in de interim secties en dat de ACF's dus geen goede biomarkers zijn om colon tumoren **vroegtijdig** te voorspellen [2].

Er is met succes een methode opgezet om RNA te isoleren uit colon ringetjes van 0,5cm groot behandeld met Tissue-Tek. Hiervoor is het standaard protocol voor animal tissue van de RNeasy micro kit (Qiagen) aangepast door het weefsel vaker te wassen en meer RLT buffer te gebruiken.

De RT-PCR methode zijn met succes opgezet voor de genen 13-actine, GAPDH, COX-2, β -catenine en MMP-7. Er is gebleken dat B-actine en GAPDH goede **huishoudgenen** zijn in dit model **en** dat er een correlatie tussen deze twee genen is. B-catenine en COX-2 zijn tot expressie gekomen maar er is geen af of toename in de expressie van deze genen waargenomen bij de verschillende behandelingsgroepen en de verschillende sectie tijden. **MMP-7** is te **laag** tot expressie gekomen in de colon ringetjes om te kunnen bepalen of de modelstoffen een invloed hebben op de genexpressie van deze genen.

6 Vervolg onderzoek

Voor het vervolg onderzoek zijn er meerdere opties om te bestuderen. Eén er van **is** de **micro** array uit te voeren volgens het oorspronkelijke plan om te bestuderen of er genen **zijn** die up of down gereguleerd zijn in de colon ringetjes en deze dan als nog te valideren met behulp van RT-PCR. Er zou door middel van de micro array andere genen gevonden kunnen worden die mogelijk interessant zijn om de vorming van tumoren te kunnen voorspellen.

Een andere optie zou zijn om uit voorlopers RNA isolatie methode op te zetten om hiermee **micro** array's uit te voeren om in deze specifieke stadia's de genexpressie te bestuderen (zie vervolg onderzoek Deel A).

Literatuurlijst

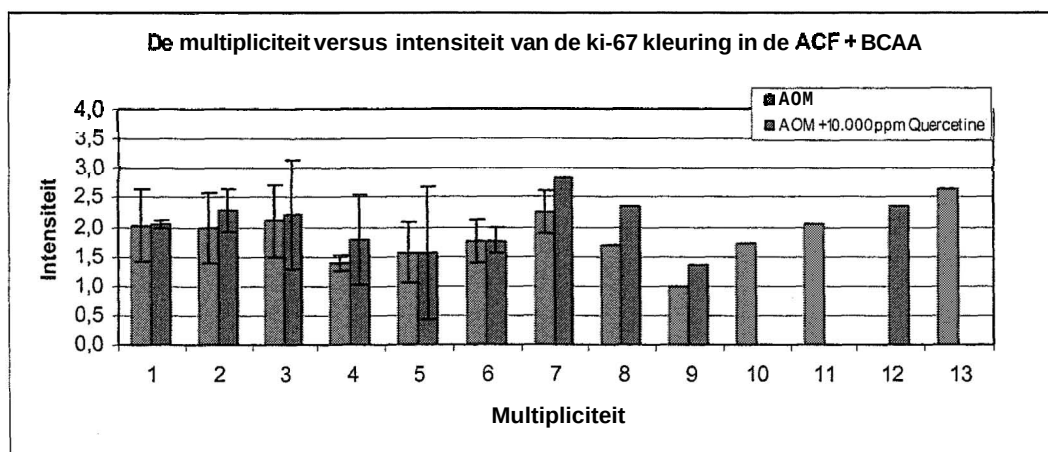
1. <http://www.nrc.nl/W2/LabffrofiVKanker/ststieh> 08-2005
2. Wijnands M., Proefschrift. Effects of dietary fibre and fat on colorectal carcinogenesis. 2003 ISBN 90-393-3444-7, blz10-12 en H6
3. Pisani, P., Parkin, D.M., Bray, F & Ferly, J. Estimates of the world wide mortality from 25 cancers in 1990. Int. J. cancer 83 18-29 (1999)
4. Greenlee, r.t., Murray, T., Bolden, S & Wingo, p.a. Cancer statistics, 2000. AC cancer J.Clin. 50 7-33 (2000)
5. <http://www.oncologychannel.com/co1oncancer> 05-2005
6. Bienz M, Clevers H. Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. Cell 2000 Vol 103, 311-320
7. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer Nat Rev Cancer 2001 volume 1 oktober 2001 blz 55-67.
8. Radtke F, clevers H. Self-Renewal and Cancer of the Gut Two Sides of a Coin Science 2005 volume 307 1904-1909
9. Bird, R.P. good, c.k. the significance af aberrant crypt foci in understanding the pathogeneisi of colon cancer. Toxicology letters. 112-113 (2000) 395-402.
10. Tytgat GNJ, Groote J de, Tongeren JHM van, Vantrappen G (red.). Leerboek maag, ~~darm~~ en leverziekten. Utrecht Bohn, Scheltema & Holkema, 1985
11. Block G, Patterson B en Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of epidemiological evidence. Nutrition and Cancer 1992; 18, 1-29
12. Steinmetz K.A, Potter JD. Vegetables, fruit and cancer. I. Epidemiology. Cancer Causes and control 1991; 2: 325-357
13. Ness AR., Powles JW. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. International Journal of Epidemiology 1997; 26: 1-13
14. <http://www.nice-info.be/html/FROF/NUTRINEWSONLINEiNnffavoIN.htm> 06-2005
15. http://www.globetrotter.nl/metaal_bioactieve.html 08-2008
16. Wattenberg, LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. Cancer Research 1992; 52 (Suppl), 2085S-2091S
17. <http://www.taconic.com/anmodels/F344.htm> 06-2005
18. Bernman JJ, Rice JM, Wenk ML and Roller PP intestinal tumors induced by a single intraperitoneal injection of methyl(acetoxymethyl)nitrosaminen in three strains of rats. Cancer Res 1979 39, 1462-1466
19. <http://www.clea-japan.com/animals/b6-top.htm> 06-2005
20. http://www.natuurlijkerwijs.com/planten_stoffen.htm#flavono_den 08-2005
21. <http://www.gezondvgz.nl/%7Be325c181-bd57-41f4-b90e-2b723f565d5d%7D/%7B9d49f1b9-ed2f-439b-8dc6-5297a3bf1efd%7D> 08-2005
22. Mahmood N. Plantphenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous poliposis Carcinogenesis 2000 vol 21 pp921-927
23. <http://www.onderzoekinformatie.nl/nl/oi/nod/onderzoek/OND1302719/> 08-2005
24. Yamada Y. Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents a new concept Carcinogenesis Vol 24, No6, pp1015-1019, 2003
25. <http://i/www.cellsignal.com/> 10-2005
26. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000 Mar; 182 (3): 311-22.
27. Endl E, Gerdes J. Department of Immunology and Cell Biology, Research Center Borstel, D-23845, Germany. Elzevier 2000 Jun 15; 257(2):231-7.
28. Deschner E E, Ruperto J, Wong G, Newmark. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. Carcinogenesis vol 12, no.7, pp.1193-1196, 1991
29. Yang K, Lamprecht S.A, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, leung D, Newmark H, steele V. E, kelloff G.J, Lipkin M. Chemoprevention stuidies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. Carcinogenesis vol 21, no9, pp1655-1660, 2000.
30. Pereira M.A, Grubbs C.J., Barnes L.H, Li H. Olson G.R, Eto I, e.a. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats. Carcinogenesis vol 17 no 6 pp1305-1311, 1996.

31. Yamada Y, B-Catenin mutation is selected during malignant transformation in colon carcinogenesis carcinogenesis vol 24, no 1 pp, 91-97,2003
32. Compher CW, Frankel WL, Tazelaar J, Lawson JA, McKinney S, Segall S, Kinoshita BP, Williams NN, Rombeau JL. Wheat bran decreases aberrant crypt foci, preserves normal proliferation, and increases intraluminal butyrate levels in experimental colon cancer. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1999 Sep-Oct;23(5):269-77; discussion 277-8.
33. Lev-Ari S, Strier L, Kazanov D, Madar-Shapiro L, Dvory-Sobol H, Pinchuk I, Marian B, Lichtenberg D, Arber N. Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. Clin Cancer Res. 2005 Sep 15;11(18):6738-44.
34. <http://www.devlamindapan.nl/index.html?e-nummers/100-199/bw100.htm>
35. Mahmood NN, Carothers AM, Grunberger D, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, Newmark HL, Bertagnolli MM. Carcinogenesis 2000 Plantphenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis
36. Erk, M.J.van. Proefschrift. Role of phytochemicals in colon cancer prevention a nutrigenomics approach. 2004 blz 14-15
37. GeneChip expression analysis Technical manual 701021 Rev 5. 1999-2004 Affymetrix
38. Eurogentech, your one-stop-shop real-time PCR supplier 2004
39. Butte A.J. further defining housekeeping or "maintenance" genes Focus on "Acompendium of gene expression in normal human tissues" physiol. Genomics 7:95-96, 2001
40. M.A. Sirover, Biochim. Biophys. Acta 1432 (1999), pp. 159-184.
41. W.Q. Zang, A.M. Fieno, R.A. Grant and T.S. Yen, Virology 248 (1998), pp. 46-52.
42. M.A. Sirover, J. Cell Biol. 66 (1997), pp. 133-140.
43. K. Meyer-Sigler, D.J. Mauro, G. Seal, J. Wurzer, J.K. deRiel and M.A. Sirover, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), pp. 8460-8464.
44. Ping Hu, Si Wu and Nouria Hernandez A role for B-actin in RNA polymerase III transcription Genes & Development 18:3010-3015, 2004
45. T. Yamauchi, M. Watanabe, T. Kubota, H. Hasegawa, Y. Ishii and T. Endo et al., Cyclo-oxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer, Dis. Colon Rectum 45 (2002), pp. 98-103.
46. K.P. Nugent, K.C. Farmer, A.D. Spigelman, C.B. Williams and R.K. Phillips, Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis, Br. J. Surg. 80 (1993), pp. 1618-1619.
47. D.A. Jones, D.P. Carlton, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman and S.M. Prescott, Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines, J. Biol. Chem. 268 (1993), pp. 9049-9054
48. K.C. Zimmermann, M. Sarbia, A.A. Weber, F. Borchard, H.E. Gabbert and K. Schror, Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma, Cancer Res. 59 (1999), pp. 198-2W.
49. Am J Pathol. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. Medline 1999 Oct;155(4):1033-8.
50. Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 1996, 87:159-170

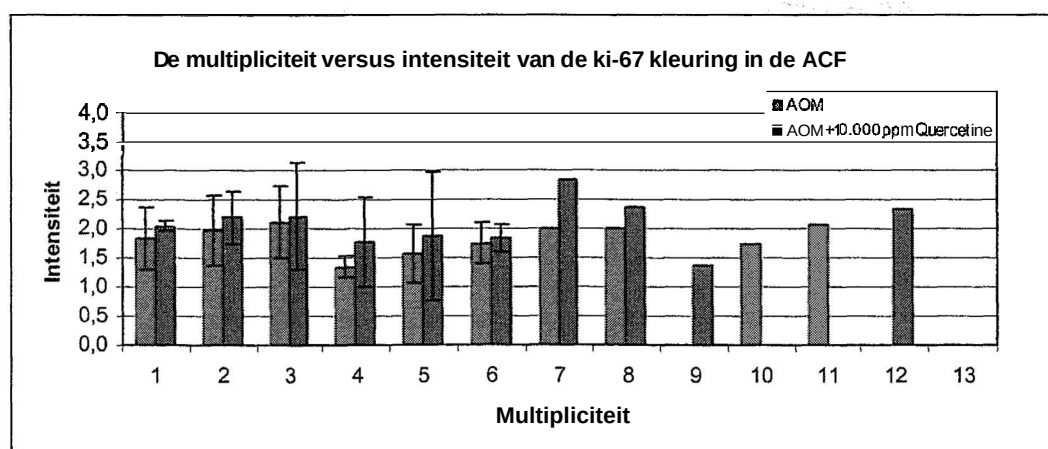
Bijlage

i Resultaten Deel A

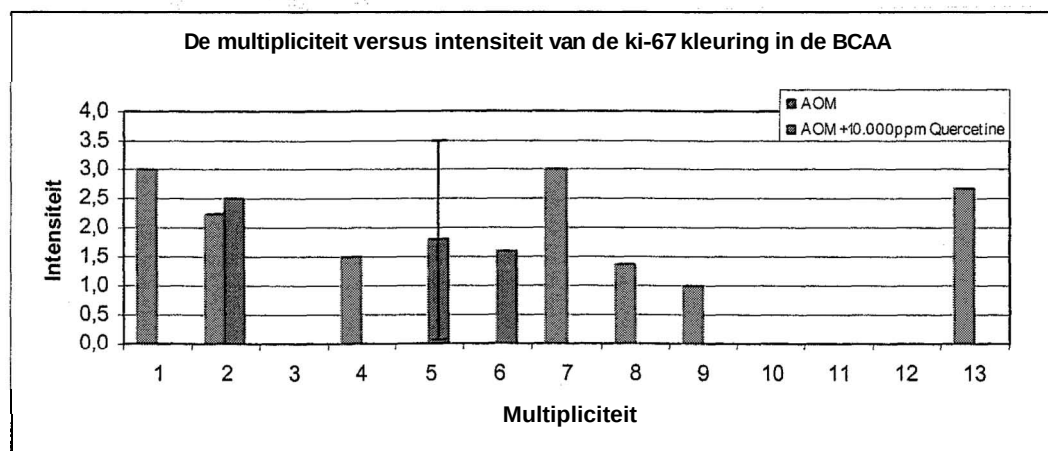
1.1 De multiplicitéit versus de intensiteit in de Ki-67 kleuring



Figuur 1.1 De multiplicitéit versus de intensiteit in de Ki-67 van de ACF + BCAA (n=5)

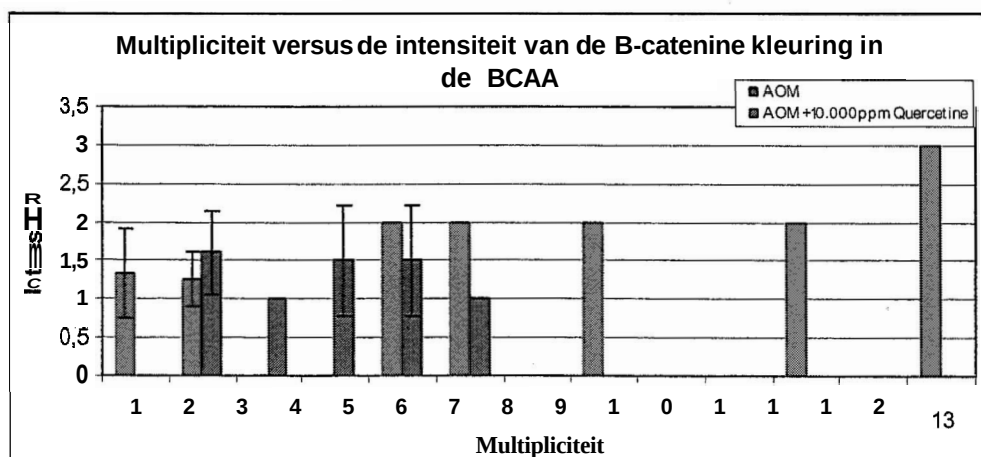


Figuur 1.2 De multiplicitéit versus de intensiteit in de Ki-67 van de ACF (n=5)

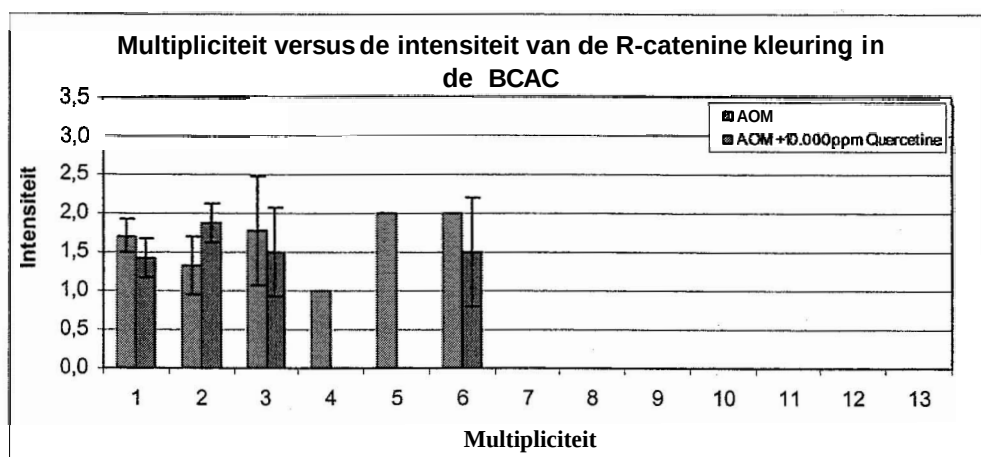


Figuur 1.3 De multiplicitéit versus de intensiteit in de Ki-67 van de BCAA (n=5)

1.2 De multiplicititeit versus de intensiteit in de B-catenine kleuring

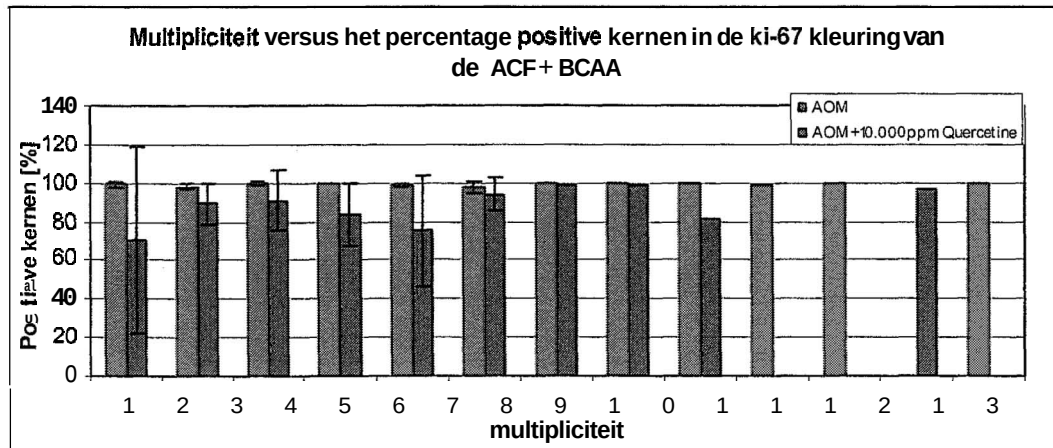


Figuur 1.4 De multipliciteit versus de intensiteit in de B-catenine van de BCAA (n=8)

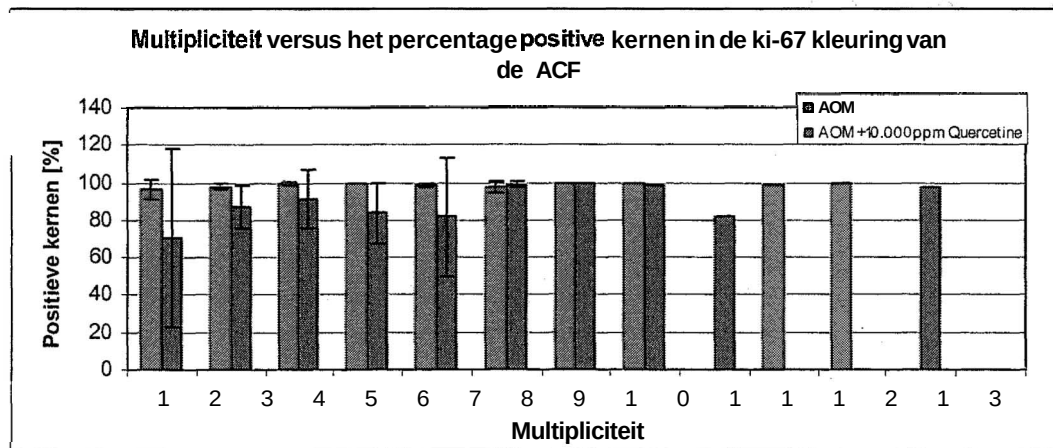


Figuur 1.5 De multipliciteit versus de intensiteit in de B-catenine van de BCAC (n=8)

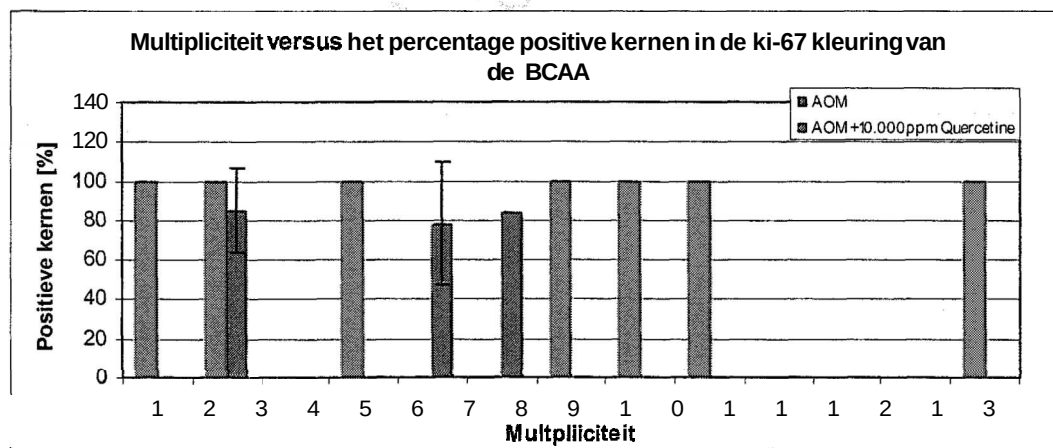
1.3 De multiplicititeit versus de proliferatie index in de Ki-67 kleuring



Figuur 1.6 Multiplicititeit versus het percentage positieve kernen van de Ki-67 van de ACF + BCAA (n=5)



Figuur 1.7 Multiplicititeit versus het percentage positieve kernen van de Ki-67 van de ACF (n=5)



Figuur 1.8 Multiplicititeit versus het percentage positieve kernen van de Ki-67 van de BCAA (n=5)

2 Protocolen Deel B

2.1 Standaardprotocol RNeasy micro kit voor animal tissue

Procedure

- I. Determine the amount of tissue. Do not use more than 5 mg. Proceed immediately with step 2.

Weighting tissue is the most accurate way to determine the amount. See page 11 for guidelines to determine the amount of starting material.

RNA in tissues is not protected after harvesting until the sample is treated with RNA later RNA Stabilization Reagent, flash frozen, or disrupted and homogenized in protocol step 2. Frozen animal tissue should not be allowed to thaw during handling. The relevant procedures should be carried out as quickly as possible.

2. Disrupt tissue and homogenize lysate in Buffer RLT according to steps 2a, 2b, or 2c. (Do not use more than 5 mg tissue.)

Disruption and homogenization of animal tissue can be performed by one of three methods. See pages 14–17 for a more detailed description of disruption and homogenization methods.

Note: When processing <10 µg tissue, add 20 ng of carrier RNA (5 µl of a 4 ng/µl solution) to the lysate before homogenization. Prepare a dilution of the carrier RNA provided, as described in "Things to do before starting".

Note: Incomplete homogenization will lead to significantly reduced yields and can cause clogging of the RNeasy MinElute Spin Column. Homogenization with rotor–stator homogenizers or the Mixer Mill MM 300 generally results in higher total RNA yields than with other homogenization methods.

- 2a. Rotor–stator homogenization:

Place the weighed (fresh, frozen, or RNA later stabilized) tissue in a suitably sized vessel for the homogenizer. Add 350 µl Buffer RLT. Homogenize immediately using a conventional rotor–stator homogenizer until the sample is uniformly homogeneous (usually 20–40 s). Continue the protocol with step 3.

Rotor–stator homogenization simultaneously disrupts and homogenizes the sample.

Note: Ensure that β-ME is added to Buffer RLT before use (see "Things to do before starting").

2b. Mixer Mill MM 300:

See "Appendix D: Disruption and Homogenization / Tissues Using the Mixer Mill MM 300" (page 67) for guidelines.

The Mixer Mill MM 300 simultaneously disrupts and homogenizes the sample.

Note: Ensure that β -ME is added to Buffer RLT before use (see "Things to do before starting").

2c. Mortar and pestle with QIAshredder or needle-and-syringe homogenization:

Immediately place the weighed (fresh, frozen, or RNAlater stabilized) tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid-nitrogen-cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw.

Add 350 μ l Buffer RLT. Pipet the lysate directly onto a QIAshredder Spin Column (not supplied; see page 71 for ordering information) placed in 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at maximum speed to homogenize. Alternatively, homogenize by passing lysate at least 5 times through a 20-gauge needle fitted to an RNase-free syringe. Continue the protocol with step 3.

Grinding the sample using a mortar and pestle will disrupt the sample, but it will not homogenize it. Homogenization is carried out by centrifugation through the QIAshredder Spin Column or by passage through the 20-gauge needle.

Note: Ensure that β -ME is added to Buffer RLT before use (see "Things to do before starting").

3. Centrifuge the tissue lysate for 3 min at maximum speed in a microcentrifuge. Carefully transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube (not supplied) by pipetting. Use only this supernatant (lysate) in subsequent steps.

In some preparations, very small amounts of insoluble material will be present, making the pellet invisible.

4. Add 1 volume (350 μ l) of 70% ethanol to the homogenized lysate, and mix well by pipetting. Do not centrifuge. Continue immediately with step 5.

If some lysate is lost during homogenization, reduce the volume of 70% ethanol accordingly.

A precipitate may form after the addition of ethanol, but this will not affect the RNeasy procedure.

5. Apply the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy MinElute Spin Column in a 2 ml collection tube (supplied). Close the tube gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Discard the flow-through.*

Reuse the collection tube in step 6.

* Flowthrough contains Buffer RLT or Buffer RW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 5 for safety information.

6. Add 350 µl Buffer RW1 to the RNeasy MinElute Spin Column. Close the tube gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\approx 10,000$ rpm) to wash the column. Discard the flow-through.*

Reuse the collection tube in step 8.

Optional: If on-column DNase treatment using the RNase-free DNase and Buffer RDD is not desired, increase the amount of Buffer RW1. In this step ≈ 700 µl, centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ to wash, and discard flow-through and collection tube.* Continue the protocol with step 10.

7. Add 10 µl DNase I stock solution to 70 µl Buffer RDD. Mix by gently inverting the tube.

Note: DNase I is especially sensitive to physical denaturation. Mixing should only be carried out by gently inverting the tube. Do not vortex.

8. Pipet the DNase I incubation mix (80 µl) directly onto the RNeasy MinElute silica-gel membrane, and place on the benchtop at room temperature for 15 min.

Note: Make sure to pipet the DNase I incubation mix directly onto the RNeasy MinElute silica-gel membrane. DNase digestion will be incomplete if part of the mix sticks to the walls or the O-ring of the RNeasy MinElute Spin Column.

9. Pipet 350 µl Buffer RW1 into the RNeasy MinElute Spin Column, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard flow-through* and collection tube.

10. Transfer the RNeasy MinElute Spin Column into a new 2 ml collection tube (supplied). Pipet 500 µl Buffer RPE onto the RNeasy MinElute Spin Column. Close the tube gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\approx 10,000$ rpm) to wash the column. Discard the flow-through.

Reuse the collection tube in step 11.

Note: Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see "Things to do before starting").

11. Add 500 µl of 80% ethanol to the RNeasy MinElute Spin Column. Close the tube gently, and centrifuge for 2 min at $\geq 8000 \times g$ ($\approx 10,000$ rpm) to dry the silica-gel membrane. Discard the flow-through and collection tube.

Prepare the 80% ethanol with ethanol (96–100%) and the RNase-free water supplied with the kit.

Note: Following the centrifugation, remove the RNeasy MinElute Spin Column from the collection tube carefully so the column does not come into contact with the flow-through as this will result in carryover of ethanol.

* Flow-through contains Buffer RLT or Buffer RW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 5 for safety information.

12. Transfer the RNeasy MinElute Spin Column into a new 2 ml collection tube (supplied). Open the cap of the spin column, and centrifuge in a microcentrifuge at full speed for 5 min. Discard the flow-through and collection tube.

To avoid damage to the caps, place the columns into the centrifuge with at least one empty position between each column. Place the caps so that they point in the opposite direction to the rotation of the rotor (i.e., if the rotor rotates in a clockwise direction, orient the caps in a counter-clockwise direction).

It is important to dry the silica-gel membrane since residual ethanol may interfere with downstream reactions. Centrifuging with the caps open ensures that no ethanol is carried over during elution.

13. To elute, transfer the spin column to a new 1.5 ml collection tube (supplied). Pipet 14 µl RNase-free water directly onto the center of the silica-gel membrane. Close the tube gently, and centrifuge for 1 min at maximum speed to elute.

Smaller volumes of RNase-free water can be used to obtain a higher total RNA concentration, but this will influence the overall yield. The yield will be approximately 20% less when using 10 µl RNase-free water for elution. Elution with less than 10 µl may not be enough to sufficiently hydrate the silica-gel membrane and is therefore not recommended.

The dead volume of the RNeasy MinElute Spin Column is 2 µl; elution with 14 µl of RNase-free water results in an eluate with a volume of 12 µl.

Note: When performing IET-KR with RNA isolated using this procedure we recommend using the QIAGEN OneStep RT-PCR Kit. This kit contains a specially formulated blend of Omniscript Reverse Transcriptase, designed for RNA amounts greater than 50 ng, and Sensiscript Reverse Transcriptase, for very small amounts of RNA (<50 ng). See page *M* for ordering information. For quantitative real-time RT-PCR we recommend QIAGEN QuantiTect RT-PCR Kits.

22 Optimalisatie RNA isolatie uit het colon

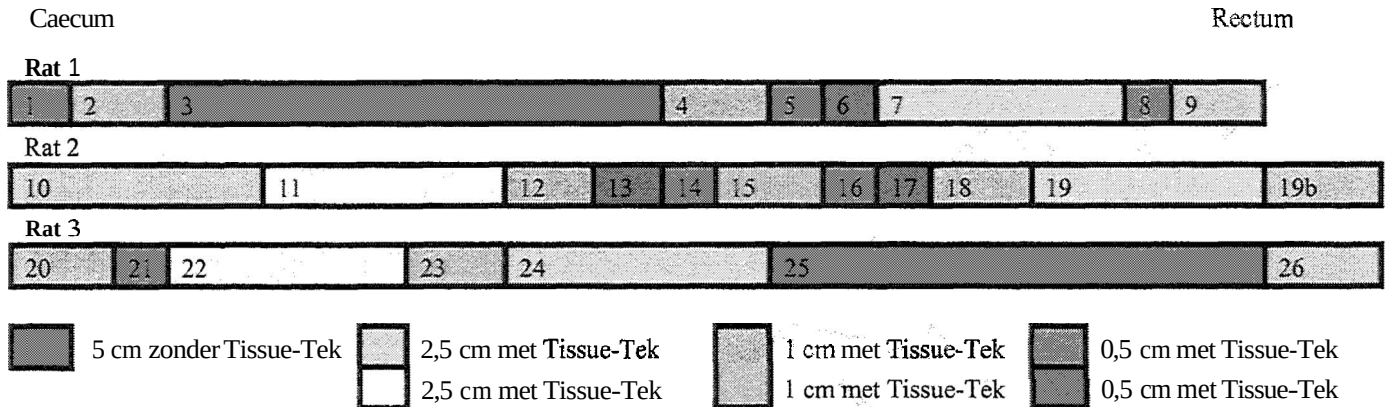
Om RNA uit colon ringetjes te kunnen isoleren uit de dierstudie is er eerst gekeken of dit wel mogelijk was. Er was namelijk gebleken dat er niet genoeg en niet van goede kwaliteit RNA uit colon ringetjes van 0,5 cm geïsoleerd kon worden die behandeld waren met Tissue-Tek en dan gebruikmakend van de standaard methode (zie 1). Om de RNA isolatie te optimaliseren zijn er 3 F344 ratten opgeofferd en waarvan het colon is verwijderd. De colons zijn in stukken van verschillende grootte gehipt **en** sommige fragmenten van het colon zijn behandeld met Tissue-Tek (zie figuur 2.1). De colon fragmenten zijn in de -80°C opgeslagen.

1. Er is begonnen met het isoleren van RNA uit 5cm colon zonder Tissue-Tek omdat we verwachten dat **hierin** zeker genoeg RNA zit om te kunnen isoleren.
 - Het stukje colon is uit de -80°C gehaald
 - 1x gespoeld in fysiologisch zout oplossing
 - De colon ring is open geknipt
 - Met een object glaasje is de mucosa van het colon geschraapt en opgenomen in RTL buffer volgens het protocol voor **animal** tissue van de RNeasy micro kit (Qiagen).
 - Het RNA is geïsoleerd met het protocol voor **animal** tissue van de RNeasy micro kit (Qiagen) Het weefsel is gehomogeniseerd door het 5x met een naald (20-gauge) op te zuigen.
 - De hoeveelheid van het RNA is bepaald door middel **van** de spectrofotometerEr was een **zeerlage** opbrengst van de hoeveelheid RNA
2. Er is opnieuw RNA geïsoleerd uit een stukje colon van 2,5cm zonder Tissue-Tek Het RNA is met de zelfde methode geïsoleerd als bij 1 maar dan met de volgende aanpassingen.
 - Er is 1,200 ml RLT buffer gebruikt om de mucosa in op **tenemen**.
 - Er is een extra **celtrifuge** stap toegevoegd na de eerste was stap met RW1 omdat het filter niet droog was.
 - De hoeveelheid van het RNA is bepaald door middel van de spectrofotometer en de kwaliteit met behulp van een agarose gel.De opbrengst van het RNA was nog steeds **erg** laag
3. Opnieuw is er RNA geïsoleerd uit **2,5** cm colon zonder Tissue-Tek. Het RNA is met de zelfde methode geïsoleerd als bij 2 maar dan met de volgende aanpassingen.
 - Er is 1,800 ml RLT buffer **gebruikt** om de mucosa in op te nemen.
 - Er is gebruik gemaakt van de 20-gauge **naald** en de Qia Shredder kolom (Qiagen) om het weefsel te homogeniseren.
 - De hoeveelheid van het RNA is bepaald door middel van de spectrofotometer en de kwaliteit met behulp **van** een agarose gel en de 2100 BioAnalyzer (Agilent)De opbrengst van het RNA is hier door zeer verbeterd.
4. Er is gekeken of er RNA geïsoleerd kon worden uit weefsel dat behandeld is met Tissue-Tek. Het RNA is met de zelfde methode geïsoleerd als bij 3 maar dan met de volgende aanpassingen.
 - Er is 2ml RLT buffer gebruikt (dit vanwege de Tissue-Tek)Er is een zelfde hoeveelheid RNA geïsoleerd bij de samples zonder Tissue-Tek als bij 3 maar het sample met Tissue-Tek heeft een zeer lage concentratie.
5. Er is opnieuw RNA geïsoleerd uit **2,5cm** colon met Tissue-Tek en uit 1 cm met en zonde Tissue-Tek. Het RNA is met de zelfde methode geïsoleerd als bij 4 maar dan met de volgende aanpassingen.
 - De stukjes colon zijn 1x gespoeld in **Fysiologisch** zout daarna open **geknipt** en vervolgens nog 2x gespoeld in een fysiologisch zout oplossing.
 - Er is 2,5 ml RLT buffer gebruikt.De opbrengst van het RNA van de colon ringen die behandeld zijn met Tissue-Tek was nog steeds minder als bij de samples die niet behandeld zijn met Tissue-Tek.
6. Er is opnieuw RNA geïsoleerd ui 1 en 0,5 cm colon met en zonder Tissue-Tek Het RNA is met de zelfde methode geïsoleerd als bij 5 maar dan met de volgende **aanpassingen**.

- De stukjes colon van 1cm zijn opgenomen in 2ml RLT
- Destukjes colon van 0,5cm zijn opgenomen in 1.5ml RLT.

De opbrengst van het RNA van de colon ringen van 1cm die behandeld zijn met Tissue-Tek was nog steeds minder als bij de samples die niet behandeld zijn met Tissue-Tek. De opbrengst van het RNA van de colon ringen van 0,5cm die behandeld zijn met Tissue-Tek was echter ongeveer gelijk aan de hoeveelheid RNA dat geïsoleerd was uit de colon ringen zonder Tissue-Tek. Dus deze methode lijkt te werken.

7. Er is uit 5 colon ringetjes van 0,5cm behandeld met Tissue-Tek en 1 ringetje zonder Tissue-Tek RNA geïsoleerd. Er is met behulp van het zelfde protocol als bij 6 opnieuw RNA geïsoleerd dit om te bepalen of er ook dier variatie is die eventueel van grote invloed kan zijn.



Figuur 2.1 Overzicht verdeling ratten darmen

2.3 Beacon designer 4.01

Het programma werkt op de volgende manier: te beginnen met het invoeren van een nieuwe sequentie:

- File → open → sequence → from entrez → NM nummer van het juiste gen invoeren. → ok. Selecteer de juiste primer soort → options → SYBR Green Design.

De template van het gen wordt gecontroleerd om hairpins en selfdimers te voorkomen.

- Template search: Analyze → template structure search → avoid cross homology uitzetten. Het hierdoor geopende window kan gesloten worden.

Tijdens de Template Structure search kunnen er maar 1200bp gescreend worden bestaat het gen echter uit meer bp dan kan er eerst in het eerste deel naar primers gezocht worden als hier geen goede primers uit komen dan kan er opnieuw een Template Structure search gedaan worden in een ander deel van het gen vervolgens kan er dan op dit gedeelte van het gen naar primers gezocht worden.

Om de primers te zoeken wordt er een Primer search gedaan:

- Analyze → primer search. De Instellingen voor de Primer Search:
 - o Target Ta 55.0 °C +/- 5 °C,
 - o Length range 18 tot 24bp,
 - o Amplicon lengte voor SYBR green primers 75-200bp en voor de standaard 450 -1500bp. Het beste is om het amplicon voor de standaard rond de 500bp te kiezen kan dit echter niet dan mag deze ook langer zijn zodat alle 3 de sets van de SYBR green primers op de standaard hechten.

De instellingen van de primer search: :

- Advanced Search parameters Advanced primer parameters:
 - o Hairpin Maximum AG (3'end): 2.0 kcal/mol
 - o Hairpin maximum ΔG(internal): 3.0 kcal/mol
 - o 3' end maximum AG: 4.0 kcal/mol
 - o Self dimer Maximum AG (3' end) 3.0 kcal/mol
 - o Self dimer Maximum AG (internal) 3.0 kcal/mol
 - o Run/repeat (dinucleotide) maximum length 3bp
 - o G/C clamp – target consecutive G/C at 3' end 1
- Advanced primer pair parameters Advanced search parameters
 - o Maximum Ambiguous base amplicon 0
 - o Maximum primer pair Tm mismatch:3
 - o Cross Dimer Maximum AG (3' end) 3 kcal/mol
 - o Cross Dimer Maximum AG (3' internal) 3 kcal/mol
- Ok → search

De beste set primers is nu gevonden voor de SYBR Green assay deze primers moeten dan worden geblast om er voor te zorgen dat deze alleen het juiste gen amplificeren tijdens de RT-PCR.

- Analyze → blast → blast primer pair → het juiste organisme invoeren (Rat) → ok

De primers worden nu geblast er wordt zo gekeken waar deze primers in het genoom van het organisme aangrijpen. Als het goed is worden er twee sequenties weer gegeven waar de primers aangrijpen. Dit is de plaats waar de primers zijn uit gezocht. Als er meerdere sequenties worden weergegeven dan grijpen deze primers in meerdere delen van het genoom aan en kunnen dan ook niet gebruikt worden. Om een goede RT-PCR op te zetten moeten er 3 verschillende primer sets worden ontwikkeld. Om een volgend primer paar te kunnen bekijken gebruikt men de Alternate primers knop er worden dan andere primer paren getoond met de 1 na beste boven aan. Hier kan er een andere set uit gekozen worden en met de knop replace wordt de geselecteerde primer set gekozen ook deze moet dan weer geblast worden om te controleren of deze primers alleen op het juiste gen aangrijpen. Zo wordt ook de 3^e set uit gekozen. Met behulp van dit programma met dezelfde instellingen zijn ook de primers voor de standaard ontwikkeld. Alleen de fragment grootte is aangepast ongeveer rond de >450bp (dit is afhankelijk van hoever de verschillende primer sets uit elkaar liggen). De primers voor de standaard worden zo uitgezocht dat de primers voor de SYBR Green assay binnen deze twee primers vallen. De primer sets die met dit programma zijn ontwikkeld zijn bij Biolegio te Nijmegen besteld. (Zie bijlage 1 voor de sequenties van de ontwikkelde primers) (Zie bijlage 2 voor de print screen's van het programma). Met dit programma kunnen ook de primers voor de Taqman assay ontworpen worden hiervoor moet in de werkbalk de → Taqman design worden gekozen.

3 Resultaten deel B

3.1 Optimalisatie RNA isolatie

Tabel 3.1 Resultaten optimalisatie RNA isolatie

Protocol voor isolatie	lengte [cm]	Tissue-Tek	Spectrofotometer				Bioanalyzer
			conc ng/μl	Totaal μg	260/230	260/280	Tototaal μg
1	5		37	0,44	0,51	2,47	Te laag
	5	-	52	0,62	0,20	1,37	Te laag
2	2,5	-	196	2,35	0,75	2,06	Te laag
3	2,5	-	913	10,96	0,63	2,08	13,77
4	2,5	-	1084	13,01	1,65	2,01	14,84
	2,5	+	330	3,96	0,28	1,95	5,20
5	2,5	+	669	8,03	1,51	1,85	11,04
	1	-	506	6,07	1,41	1,83	6,73
	1	+	315	3,78	1,23	1,78	7,63
6	1	-	1214	14,57	1,43	0,75	14,52
	1	+	668	8,02	0,67	1,97	9,88
	0,5	-	672	8,06	1,95	1,81	7,42
	0,5	+	583	7,00	1,65	1,87	7,39
7	0,5	+	656	7,87	2,15	1,81	4,64
	0,5	+	839	10,07	0,94	1,90	5,91
	0,5	-	654	7,85	1,58	1,83	4,68
	0,5	+	547	6,56	1,65	1,79	3,93
	0,5	+	774	9,29	2,07	1,85	6,71
	0,5	+	558	6,70	0,74	1,91	5,16

4 Sequenties primers, probe en standaard

4.1 Taqman B-actine

Forward primer 5' TTC AAC ACC CCA GCC ATG T 3'
 Reverse primer 5' GTG GTA CGA CCA GAG GCA TAC A 3'
 Probe: 5' CGT AGC CAT CCA GGC TGT GTT GTC C 3'

Forward primer standaard 5' GGC ATC CTG ACC CTG AAG TA 3'
 Reverse primer standaard 5' GCC ATC TCT TGC TCG AAG TC 3'

Product: 5' GGC ATC CTG ACC CTG AAG TAC CCC ATT GAA CAC GGC ATT GTC ACC AAC TGG GAC
 GAT ATG GAG AAG ATT TGG CAC CAC ACT TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG GCC CCT GAG
 GAG CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG ECC CCT CTG AAC CCT AAG GCC AAC CGT GAA
AAG ATG ACC CAG ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG TAC GTA GCC
 ATC CAG GCT GTG TTG TCC CTG TAT GCC TCT GGT CGT ACC ACT GGC ATT GTG ATG
 GAC TCC GGA GAC GGG GTC ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAT GAG GGT TAC GCG CTC
 CCT CAT GCC ATC CTG CGT CTG GAC CTG GCT GGC CGG GAC CTG ACA GAC TAC CTC
 ATG AAG ATC CTG ACC GAG CGT GGC TAC AGC TTC ACC ACC ACA GCT GAG AGG GAA
 ATC GTG CGT GAC ATT AAA GAG AAG CTG TGC TAT GTT GCC CTA GAC TTC GAG CAA
GAG ATG GC 3'

Fragment grootte standaard 497bp
 Fragment grootte Taqman product 68bp

4.2 Taqman Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH

Forward primer 5' AGC CTC AAG ATC ATC AGC AAT G 3'
 Reverse primer 5' ACT GTG GTC ATG AGT CCT TCC A 3'
 Probe: 5' CAC CCC TGG CCA AGG TCA TCC A 3'

Forward primer standaard 5' CAA CGA TTC TTC TGT AAG TCA AGC 3'
 Reverse primer standaard 5' TGG AAA TGG ATT GTC TCT TTA GGG 3'

Product 5' TCC CTC AAG ATT GTC AGC AAT GCA TCC TGC ACC ACC AAC TGC TTA GCC CCC CTG
GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC TTT GGC ATC GTG GAA GGG CTC ATG ACC ACA 3'

Fragment grootte standaard 106bp
 Fragment grootte Taqman product 106bp

Opmerking:

De primers om het standaard fragment te maken zijn de forward en reverse primer van de Taqman set. Er is geen aparte primer set ontworpen om het standaard fragment te kunnen maken omdat tijdens het blasten naar voren kwam dat deze in meerdere genen aangrepen.

4.3 Taqman Cyclooxygenase 2 = Prostaglandin-endoperoxidase synthase 2, COX-2

Forward primer 5' TCC CTT CGC CTC TTT CAA TG 3'
 Reverse primer 5' GGA GGC ACT TGC GTT GAT 3'
 Probe: 5' AAG ACC CGC AGG CTA CCA AGA CAG C 3'

Forward primer standaard 5' GCT GTA CAA GCA GTG GCA AA 3'
 Reverse primer standaard 5' CAG CTC AGT TGA ACG CCT TT 3'

Product: 5' GCT GTA CAA GCA GTG GCA NAG GCC TCC ATT GAC CAG AGC AGA GAG ATG AAA TAC
 CAG TCT CTC AAT GAG TAC CGC AAA CGC TTC TCC CTG AAA CCT TAC ACA TCG TTT
 GAA GAA CTT ACA GGA GAG AAA GAA ATG GCT GCA GAG TTG AAA GCC CTC TAC CAT
 GAC ATC GAT GCC ATG GAA CTG TAT CCC GCC CTG CTG GTG GAA AAG CCT CGN CCA
 GAT GCT ATC TTT GGG GAG ACC ATG GTA GAA CTT GGA GCT CCA TTC TCC TTG AAA
 GGC CTT ATG GGT AAT CCC ATC TGT TCT CCT CAA TAC TGG AAA CCT AGC ACC TTC
 GGA GGA GAA GTG GGG TTT AGG ATC ATC AAC ACT GCC TCA ATT CAG TCT CTC ATC
TGC AAT AAT GTG AAA GGG TGT CCC TTC GCC TCT TTC AAT GTG CAA GAC CCG CAG
GCT ACC AAG ACA GCC ACC ATC AAC GCA AGT GCC TCC CAC TCC AGA CTA GAT GAC
 ATT AAC CCT ACA GTA CTA ATC AAA AGG CGT TCA ACT GAG CTG 3'

Fragment grootte 528bp
 Fragment grootte Taqman product 68bp

4.4 SYBR Green Matrix metalloproteinase 7

Forward primer 5' ATA ATT GGC TTC GCA AGG 3'
 Reverse primer 5' ATG AGT GGC AAC AAA CAG 3'

Reverse primer standaard 5' GCT CTC AGX ATG TGG AGT ATG 3'
 Forward primer standaard 5' AGG AGT AAG TGT GGC TCA G 3'

Product: 5' GCT CTC AGA ATG TGG AGT ATG CAA ATC CCA CTG AAC TTC AAG AGG GTT AGT TGG
 GGG ACT GCA GAC ATC ATA ATT GGC TTC GCA AGG GGA GAT CAC GGA GAC AAC TTC
 CCA TTT GAT GGG CCA GGA AAC ACT CTA GGC CAT GCC TTT GCA CCG GGG CCA GGC
 CTC GGC GGA GAT GCT CAC TTT GAC AAG GAT GAG TAC TGG ACG GAT GGT GAG GAC
 TCA GGA GTG AAC TTC CTG TTT GTT GCC ACT CAT GAA CTT GGC CAC TCT CSG GGT
 CTG GGT CAC TCT TCT GTT CCC AGT TCT GTA TGT ACC CTA CCT ATC AAG GAG ATC
 ATT CAG AAG ACT TCA GTC TTA CAA AGG ACG ACA TTG CAG GCA TCC AGA AGS TAT
 ATG GAA AGA GGA ACA AGC TGT GAT AGA TGC AGA CAG TTT CTG GAA TGA GCA AAC
 GCC CTT CCT GAG CCA CAC TTA CTC CT 3'

Fragment grootte 458bp
 Fragment grootte SYBR green product 180bp
 Annealing temperatuur Tm 60°C



4.5 SYBR Green 8-catenine

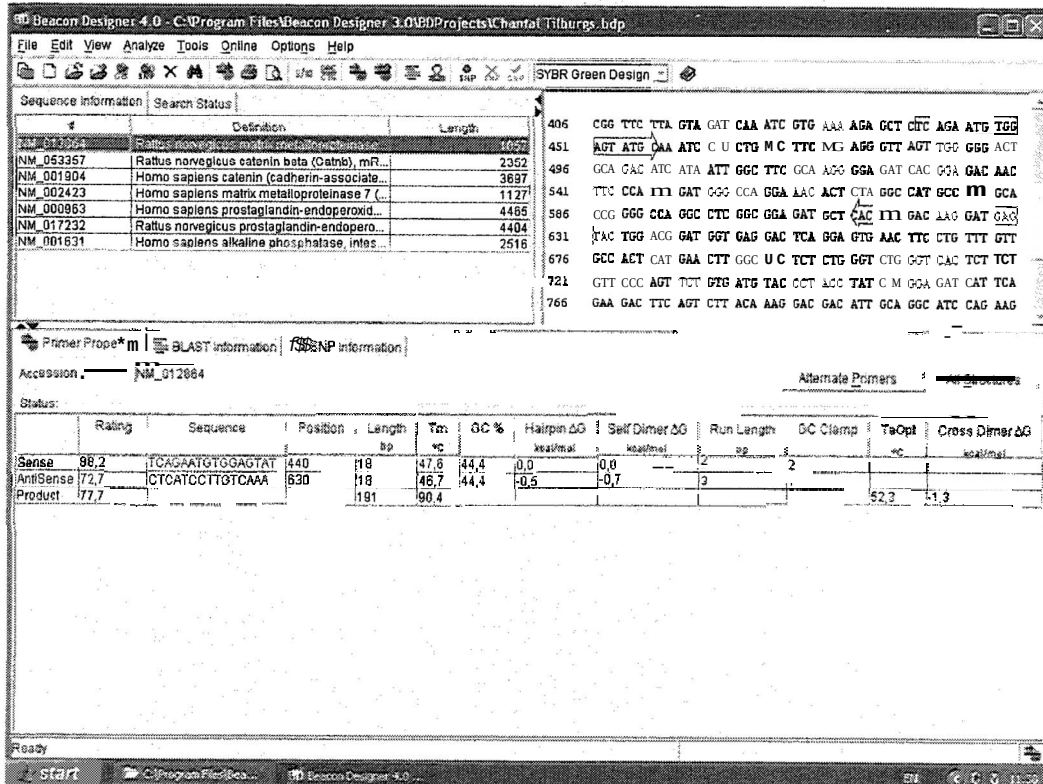
Forward primer 5'GCC GTT CGC CTT CAT TAT G 3'
Reverse primer 5'TCC TGA TGT GCT CGT ACA AG 3'

Forward primer standard 5'ATT CTC TCT AAC CTC ACT TG 3'
Reverse primer standard 5'GCA CCC TTC AAC TAT CTC 3'

Product: 5'ATT CTC TCT AAC CTC ACT TGC AAT AAT TAC AAA AAC AAG ATG ATG GTG TGC CAA
GTG GGT GGC ATA GAG GCT CTT GTC CGC ACT GTC CTT CGT GCT GGT GAC AGG GAG
GAC ATT ACC GAG CCT GCC ATC TGT GCT CTT CGT CAT CTG ACC AGC CGA CAT CAG
GAA GCT GAG ATG GCC CAG AAT GCC GTT CGC CTT CAT TAT GGA CTA CCT GTT GTG
GTT AAA CTC CTG CAC CCA CCA TCC CAC TGG CCT CTG ATA AAG GCA ACT GTT GGA
TTG ATC CGA AAC CTT GCC CTT TGC CCA AAT CAT CGC CCT TTG CGG GAA CAG
GGT GCG ATC CCA CGA CTA GTT CAG CTG CTT GTA CGA GCA CAT CAG GAC ACC CAG
CGG CGC ACG TCC ATG GGT GGA ACA CAG CAG CAG TTC GTG GAG GGC GTC CGC ATG
GAG GAG ATA GTT GAA GGG TGC 3'

Fragment grootte standaard 453bp
Fragment grootte SYBR green product 189bp
Annealing temperatuur Tm 63°C

5 Beacon designer 4.02



Figuur 5.1 Print screen van het programma Beacon designer 4.02

6 iCycler

