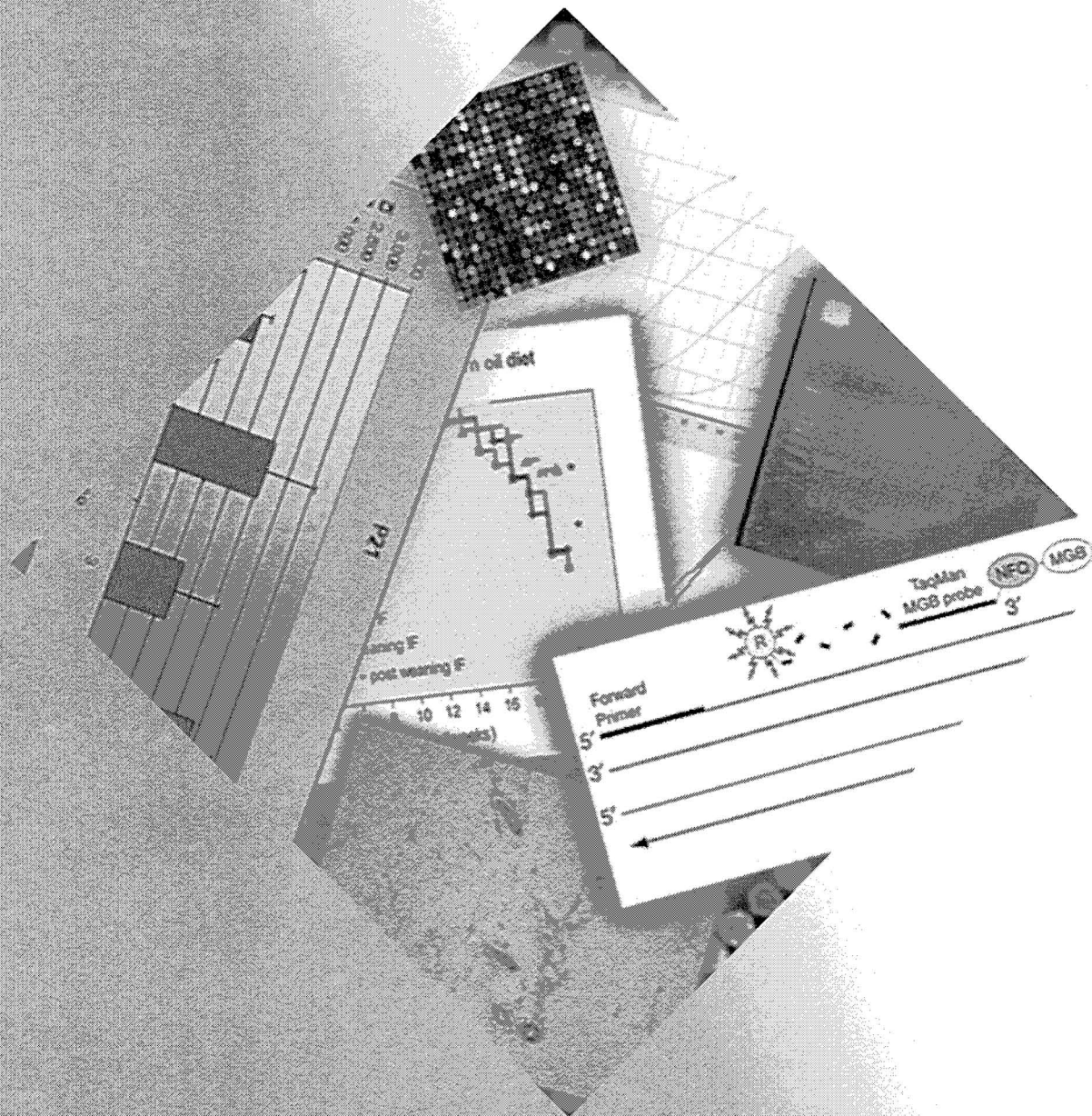


De effecten van isoflavonen op het ontstaan van borstkanker



Ferdi van der Horst
RijksInstituut voor Volksgezondheid en Milieu
Afdeling: Toxicologie, Pathologie en Genetica (TOX)
Bilthoven, Mei 2005

MEDIATHEEK HOGESCHOOL VAN UTRECHT
FACULTEIT NATUUR EN TECHNIEK
P.O. DONDERSTRAAT 65
3572 JE UTRECHT
030 - 275 88 61

I. Voorwoord

Dit verslag is geschreven in het kader van de afstudeerperiode van de studie Lifesciences and Chemistry die ik gevolgd heb aan de Hogeschool van Utrecht.

Ik heb 9 maanden stage gelopen bij het RijksInstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) te Bilthoven op de afdeling Toxicologie, Pathologie en Genetica (TOX).

Voordat ik aan deze stage begon was mijn belangstelling voor het kankeronderzoek al aanwezig, maar **dankzij** deze stage is die interesse alleen maar groter geworden. En ben ik ook van plan mijn opgedane kennis in dit type research te verbreden.

In het bijzonder wil ik nog een paar mensen bedanken, als eerst mijn stage begeleider Mirjam Luijten voor de vriendelijke en goede manier van begeleiding tijdens mijn stage, Anja Westerman voor de praktische uitleg van de microarrays en de realtime PCR, Jeroen Pennings voor het analyseren van de microarrays, Ewoud Speksnijder voor de praktische begeleiding van de Immunohistochemische kleuringen. En iedereen voor het beantwoorden van al mijn vragen. Als laatst wil ik Anja ter Avest en Peter **Koppert** bedanken voor de begeleiding vanuit school.

Ferdi van der Horst,

Mediatheek HvU



0300 522 8868

2. Inhoudsopgave

1	Voorwoord.....	2
2	Inhoudsopgave.....	3
3	Samenvatting.....	4
	3.1 Summary.....	5
4	Afkortingenlijst.....	6
5	Inleiding.....	7
	5.1 Borstkanker.....	7
	5.1.1 Algemeen.....	7
	5.1.2 Oestrogenen.....	7
	5.1.3 Borstkanker targets.....	7
	5.1.4 Borstkanker incidentie.....	9
	5.2 Fyto-oestrogenen.....	9
	5.3 Muismodel.....	10
	5.4 Microarray.....	10
	5.5 Real-Time PCR.....	11
	5.5.1 Één staps Real-Time PCR.....	11
	5.5.2 Twee staps Real-Time PCR.....	12
6	Materialen en methoden.....	13
	6.1 Muizen experiment.....	13
	6.2 RNA isolaties.....	14
	6.2.1 Bioanalyzer.....	15
	6.3 RNA precipitaties.....	15
	6.4 RNA amplificatie & labeling.....	15
	6.4.1 RNA amplificatie.....	16
	6.4.2 aRNA labeling.....	17
	6.5 Hybridisatie.....	18
	6.6 Real-Time PCR.....	19
	6.6.1 Één staps Real-Time PCR.....	20
	6.6.2 Twee staps Real-Time PCR.....	21
	6.7 Immunohistochemische kleuringen.....	22
7	Resultaten.....	24
	7.1 Muizen experiment.....	24
	7.2 RNA isolaties & precipitaties.....	24
	7.3 Referentiepool.....	25
	7.4 RNA amplificatie & labeling.....	25
	7.5 Microarray analyse.....	27
	7.5.1 Arrayvision.....	27
	7.5.2 Excel.....	28
	7.6 Real-Time PCR.....	30
	7.6.1 Één staps Real-Time PCR.....	30
	7.6.2 Twee staps Real-Time PCR.....	32
	7.7 Immunohistochemische kleuringen.....	35
8	Discussie & Conclusies.....	36
	8.1 Discussie.....	36
	8.2 Conclusies.....	38
9	Literatuurlijst.....	40
	Bijlagen	

3. Samenvatting

De incidentie van borstkanker varieert wereldwijd tot wel 5 keer, met de laagste waarden in Oost Aziatische en de hoogste in Westerse landen. Uit immigratie studies is gebleken dat niet de genetische achtergrond voor dit verschil van belang was, maar de consumptie van soja hierbij een belangrijke rol speelde. Soja bevat zogenaamde fyto-oestrogenen. Dit zijn stoffen die oestrogene en antioestrogene effecten kunnen hebben in verschillende weefsels. De twee belangrijkste klassen fyto-oestrogenen zijn isoflavonoiden en lignanen. Het meest belangrijke isoflavon is genistein dat vooral veel voorkomt in soja.

In dit onderzoek is het effect van isoflavonen in combinatie met een hoogvet dieet op het ontstaan van borstkanker in FVB/N[Tg]c-neu muizen onderzocht. De muizen waren verdeeld in 4 behandelingsgroepen waarin alleen de periode van blootstelling aan isoflavonen verschilde. In het microarray experiment is geprobeerd gen expressie verschillen te vinden in geïsoleerd RNA uit borstklieren van 5 weken oude pups. Bij een foldratio van 1,5 en een P-waarde van 0,01 werden 18 genen gevonden waarbij de expressie significant verschilde, waaronder p21, Dbp en Dlx1 en een aantal genen betrokken bij de vetzuursynthese. Met behulp van Real-Time PCR is voor sommige genen uit het microarray experiment het expressieverschil bevestigd. Ook zijn er genen geanalyseerd die niet significant verschilde op de array maar wel interessant waren voor het onderzoek waaronder p53, Estrogen Receptor α en BRCA1. Er is ook een Immunohistochemische kleuring gedaan van Estrogen Receptor α op borstklieren en borsttumoren van volwassen muizen. De borstklieren werden sterk positief bevonden terwijl de borsttumoren sterk negatief waren voor deze kleuring. Het is erg opmerkelijk dat wanneer er een tumor ontstaan is er geen eiwit expressie meer is van Estrogen Receptor α . Er kon echter met deze methode geen expressie verschil worden gevonden tussen de verschillende behandelingsgroepen.

Uit het microarray experiment kan geconcludeerd worden dat: In deze muizen na perinatale, postnatale en/of levenslange blootstelling aan isoflavonen bij 5 weken oude pups een significant effect te zien is in de genexpressie van verschillende genen. P21 en Dbp verschilden in de behandelingsgroepen 2 en 4 waarbij p21 verhoogde en Dbp verlaagde expressie vertoonde. Met de qPCR is het resultaat van de microarray's bevestigd wat betreft p21 en Dbp. De qPCR laat hier zelfs een nog sterker effect zien. De qPCR laat hetzelfde patroon zien tussen de groepen. Ook is met de qPCR een verlaagde expressie van Estrogen Receptor α aangetoond bij een levenslange blootstelling aan genistein. Met de Estrogen Receptor α kleuringen is aangetoond dat de borstklieren positief en de borsttumoren negatief zijn voor deze kleuring. Er kon geen onderscheid worden gemaakt tussen de verschillende behandelingsgroepen. Dus na het ontstaan van de tumor is er in deze tumor geen eiwitexpressie meer van Estrogen Receptor α .

3.1 Summary

Breast cancer incidence rates vary by about fivefold worldwide, with the lowest rates in East Asia and the highest in Western countries. Migration studies indicate that soy consumption, rather than genetic differences between populations, may be responsible for increased breast cancer risk. Soy contains so called phyto-estrogens which can give estrogenic and antiestrogenic effects in different tissues. The two most important classes of phyto-estrogens are isoflavones and lignans. Genistein is the most important isoflavone and is mainly present in soy.

The present study investigated the effects of isoflavones in combination with a high-fat diet on breast cancer development in FVB/N[Tg]c-neu mice. The mice were divided to four groups. The only difference between the groups was the timing period of exposure to isoflavones. Using microarrays we identified differences in gene expression in mammary glands from 5 week old mice. With a folds-ratio of 1,5 and a P value of 0,01 we found that the gene expression was significantly changed in 18 genes. Among these genes were p21, Dbp and Dlx1 and some genes involved in fatty acid synthesis. Gene expression differences found in our microarray experiment were confirmed with Real-time PCR. In addition, we determined gene expression levels with Real-Time PCR of genes whose expression did not significantly change on the Microarray, but that are still interesting in their relation to breast cancer. These genes included p53, ER α , BRCA1. Furthermore, we performed an immunohistochemical staining for Estrogen Receptor α on mammary glands and mammary tumors of adult mice. With this staining we showed the presence of the Estrogen Receptor Alpha. The mammary tumors were all negative while all the mammary glands were positive for this staining. It's interesting that when a tumor is formed inside the mammary gland this tumor doesn't have any protein expression of Estrogen Receptor α . With this method we did not find any differences in Estrogen Receptor α expression between our exposure groups.

From the microarray experiment we can conclude that: After perinatal, post weaning and/or lifelong exposure to isoflavones we observed a significant effect in gene expression in different genes in these mice. P21 en Dbp showed an expression change in treatment groups 2 and 4 which was increased for p21 and decreased for Dbp. The qPCR confirmed these results for p21 en Dbp and showed an even greater expression change. We also observed the same pattern between the groups. The qPCR also showed a decreased expression of Estrogen Receptor α after lifelong exposure to genistein. With the immunohistochemical staining we showed that the mammary glands were all positive and the mammary tumors were all negative for Estrogen Receptor α protein. We did not observe differences in protein expression of Estrogen Receptor α between our exposure groups. So after the tumor is formed there is no more protein expression of Estrogen Receptor α in the tumor cells.

4. Afkortingenlijst

ABC	Peroxidase gelabeld streptavidine
ANOVA	ANalysis Of VAriance tussen groepen
aRNA	Antisense Ribonucleic Acid
bp	BaseParen
BRCA1	Breast tumor suppressor gene 1
Cav1	Caveolae protein 1
CDK	Cyclin Dependent Kinase
cDNA	Copy DeoxyriboNucleic Acid
CYP	Cytochroom P-450
DAB	3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride
Dbp	D site albumin promoter Binding Protein
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
dNTP	Oplossing van dATP, dGTP, dCTP, dTTP
ErbB2	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (mens)
ER- α	Estrogen Receptor Alpha
ER- β	Estrogen Receptor Beta
EtOH	Ethanol
Fasn	Fatty Acid Synthase
FOS	FBJ osteosarcoma oncogene
GaR	Goat anti Rabbit
Hprt	Hypoxanthine guanine Phosphoribosyl Transferase 1
Hras1	Harvey rat sarcoma virus oncogene 1
IF	IsoFlavonen
KT	Kamer Temperatuur
Mapk1	Mitogen activated protein kinase 1
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
mRNA	Messenger RiboNucleic Acid
NaAc	Natrium Acetaat
Neu	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (muis)
NTC	No Template Control
P21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
P53	Transformation related protein 53
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Polr2a	RNA polymerase II polypeptide A
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide Synthase 2
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA	RiboNucleic Acid
RP	ReferentiePool
Rpm	Rounds Per Minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRC	Rous sarcoma oncogene

5. Inleiding

5.1 Borstkanker

5.1.1 Algemeen

Borstkanker is de meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen. In Nederland krijgt 1 op de 9 vrouwen te maken met de ziekte, en sterven er jaarlijks 3300 vrouwen aan de gevolgen van borstkanker^[1]. Borstkanker ontstaat meestal in de borstkliegangen (ductaalcarcinoom) waaruit 1 tumor ontstaat. Bij sommige vrouwen ontstaat borstkanker in de borstklieren (lobulair carcinoom). Het lobulair carcinoom groeit meer verspreid over de borst en wordt vaak in een later stadium ontdekt. Dankzij bevolkingsonderzoeken, waarbij vrouwen tussen de 50 en 75 een borstsonderzoek laten doen, wordt borstkanker vaak veel sneller ontdekt en is de kans op genezing groter. Als borstkanker eenmaal is vastgesteld zijn er een aantal behandelingen mogelijk, afhankelijk van de situatie. Er kan gekozen worden voor een borstsparende operatie met bestraling, of in sommige gevallen een borstamputatie wat veel sociale problemen met zich mee zou kunnen brengen. Naast een operatie kan er ook worden gekozen voor een chemotherapie of hormonale behandeling. Tegenwoordig krijgen vrouwen bij wie borstkanker is geconstateerd vaak adjuvante behandeling, wat inhoudt dat verschillende behandelingen samen worden gevoegd. Dit is mogelijk doordat de kennis over de behandelingen is toegenomen. Dankzij de vele behandelingen is het percentage van alle patiënten dat na 5 jaar nog in leven is 80%^[2].

5.1.2 Oestrogenen

Er is al meer dan 100 jaar bekend dat oestrogenen in relatie staan met borstkanker, sinds George Beatson demonstreerde dat het verwijderen van de eierstokken een verlagend risico voor borstkanker met zich meebracht^[3]. Het exacte mechanisme moet nog opgehelderd worden, maar het **alkyleren** van cellulaire moleculen en het maken van actieve radicalen die het DNA beschadigen^[4,5], samen met de genotoxiciteit van oestrogenen en zijn metabolieten, worden gesuggereerd.

Dat de duur van blootstelling aan oestrogenen van groot belang is blijkt uit het indirecte bewijs dat het borstkanker risico wordt verhoogd indien vrouwen vroeg in het leven ongesteld worden, op latere leeftijd voor het eerst zwanger worden of laat in de overgang gaan. En op een vroege leeftijd in de overgang gaan is geassocieerd met een verlaagd borstkanker risico^[6,7].

Oestrogenen worden voor het grootste gedeelte door de eierstokken geproduceerd en in het serum uitgescheiden. De 2 cytochromen **CYP17** en **CYP19** uit de P-450 familie spelen een rol bij de synthese van oestrogenen. Er zijn enkele Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's) bekend in **CYP17** die een verhoogd estradiol serum concentratie tot gevolg hebben. Deze SNP's konden niet gerelateerd worden met een verhoogd borstkanker risico^[8,9].

5.1.3 Borstkanker targets

Naast de effecten van oestrogenen zijn er ook een aantal genen ontdekt die een belangrijke rol spelen bij het ontstaan van borstkanker:

1. Estrogen Receptor Alpha (ER- α)

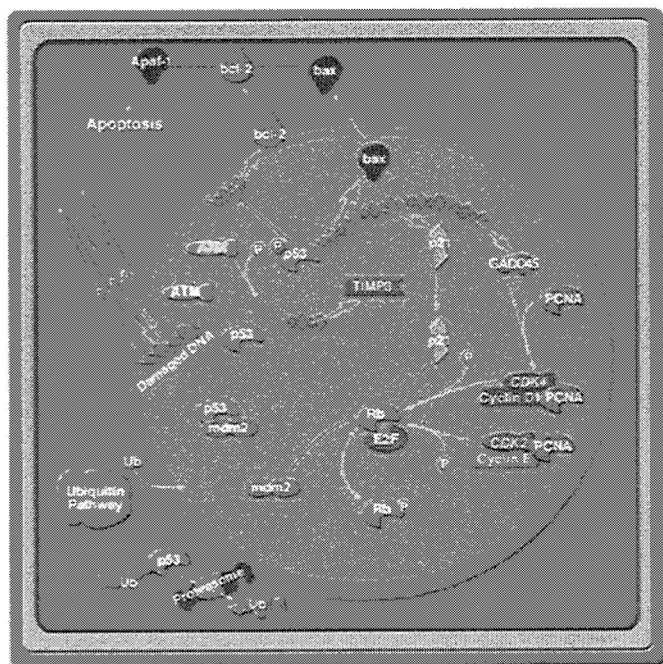
Dit is een belangrijke receptor voor oestrogenen en komt voor in diverse organen waaronder borstweefsel. Het is tevens een belangrijke regulator van de celgroei, differentiatie en kwaadaardige tumor transformatie. Na binding van oestrogeen bindt dit complex (oestrogeen-ER α) aan de promotors van verschillende transcriptie factoren zoals Jun en Fos^[10].

2. Breast tumor suppressor gene 1 (BRCA1)

BRCA1 is een tumor onderdrukkend gen. En is vaak betrokken bij erfelijke vormen van borstkanker. Uit studies blijkt dat vrouwen met een bepaalde mutatie in BRCA1 vaker sterven dan vrouwen met sporadische borstkanker[11].

3. Transformation related protein 53 (P53)

P53 is het gen wat het meest gemuteerd wordt gevonden in humane tumoren. Echter bij borstkanker wordt het een stuk minder frequent gevonden, hoewel gemuteerd p53 wel geassocieerd wordt met een slechte prognose^[12]. In figuur 1 is een deel van de p53 pathway weergegeven.



Figuur 1: Schematisch weergave van een deel van de p53 pathway^[13].

4. Erythroblastic leukemia viral oncogene homolon 2 (ErbB2)

ErbB2 is lid van een grote EGF receptor familie en komt in 30% van menselijke borstkanker gevallen geamplificeerd en tot overexpressie voor. ErbB2 target therapie met het Herceptin antilichaam is in veel gevallen effectief gebleken^[14]. ErbB2 is het menselijke homoloog voor neu.

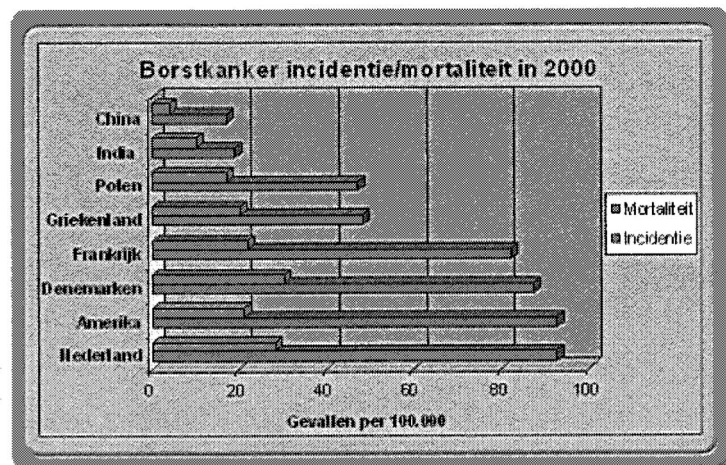
5. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)

P21 is een regulator in de celcyclus doordat het de Cyclin Dependent Kinases (CDK's) 2 en 4 remt. Een verhoogde expressie van p21 liet in muizen zien dat de tumorgroei werd verlaagd^[15].

Bij menselijke tumoren wordt vaak een verlaagde expressie van p21 gevonden. De p21 levels verhogen doormiddel van gentherapie zou een methode kunnen zijn om tumorgroei tegen te gaan. Tevens wordt p21 gereguleerd door p53 (zie figuur 1).

5.1.4 Borstkanker incidentie

Borstkanker incidentie en sterfte cijfers variëren wereldwijd tot een factor 5, met de laagste cijfers in Oost Azië en de hoogste in Westerse landen^[16] (zie figuur 2).



Figuur 2: Borstkanker incidentie en mortaliteit in verschillende landen^[16].

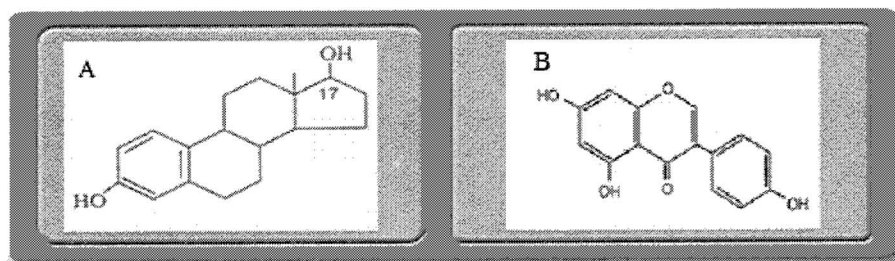
Migratie studies hebben aangetoond dat Oost Aziatische vrouwen die de Amerikaanse eet en leefgewoontes overnemen binnen 2 generaties dezelfde borstkanker incidentie cijfers hebben als Amerikaanse vrouwen^[17].

Dit maakt het waarschijnlijk dat eet en leefgewoontes, en niet genetische verschillen tussen populaties, verantwoordelijk zijn voor verhoogde borstkanker risico's^[18]. Hoge soja consumptie in Oost Azië is een zeer waarschijnlijke factor die zorgt voor een verlaagd borstkanker risico^[19]. Epidemiologische studies naar de consumptie van soja tijdens het volwassen leven en borstkanker risico hebben aangetoond dat er geen associatie of verlaagd risico is bij verhoogde soja consumptie^[20-22]. Maar, hoge soja consumptie tijdens de jeugd of adolescentie is wel geassocieerd met een verlaagd borstkanker risico^[20, 23, 24]. Hierdoor is het tijdstip van blootstelling aan soja in het leven van groot belang.

5.2 Fyto-oestrogenen

Fyto-oestrogenen zijn natuurlijke stoffen verkregen uit planten en bestaan voornamelijk uit isoflavonoiden en lignanen. Een subtype van isoflavonoiden zijn de isoflavonen (IF) en zitten vooral in soja, hop, erwten, bonen, linzen en rode klover.

Het IF genistein, het meest aanwezige IF in soja, is een oestrogeen agonist doordat het voornamelijk bindt aan de Estrogen Receptor β (ER- β). Hier kan het oestrogene, maar ook antioestrogene effecten teweeg brengen^[25, 26]. In figuur 3 is te zien dat genistein en 17-P-estradiol een overeenkomstige structuur hebben. Genistein heeft geen steroïde structuur zoals oestrogenen, maar bestaat uit fenolen die sterk lijken op de structuur van oestrogenen. In tabel 1 is de bindingsaffiniteit van verschillende stoffen voor Estrogen Receptor α (ER- α) en ER- β weergegeven.



Figuur 3. A) structuur van 17- β -estradiol. B) structuur van genistein.

Compound	ER- α	ER- β
17 beta estradiol	100	100
Apigenin	0.3	6
Zearalenone	7	5
Genistein	4	87
Daidzein	0,1	0,5
Formononetin	< 0,01	< 0,01

Tabel 1: Bindingsaffiniteit van verschillende stoffen voor ER- α en ER- β waarbij 17 β estradiol op 100 is gesteld^[27].

Fyto-oestrogenen gedragen zich als oestrogenen indien er geen andere oestrogeenachtige stoffen aanwezig zijn, maar gedragen zich als antioestrogenen indien er wel andere oestrogene stoffen aanwezig zijn.

5.3 Muismodel

De FVB/N[Tg]c-neu muizen zijn verkregen uit een kruising van een vrouwelijk wildtype FVB muis en een mannelijke homozygote FVB/N[Tg]c-neu muis. De verkregen muizen hebben een puntmutatie in de transmembraan regio van het neu gen, waardoor een valine verandert in een glutamine en het neu gen in een oncogen verandert. Vóór dit gen is een Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) promotor geplaatst waardoor het gen alleen tot expressie komt als de muizen in de “pubertijd” komen. Deze dieren ontwikkelen dan borsttumoren als ze rond de 6 maanden oud zijn zonder tumoren in andere weefsels^[28].

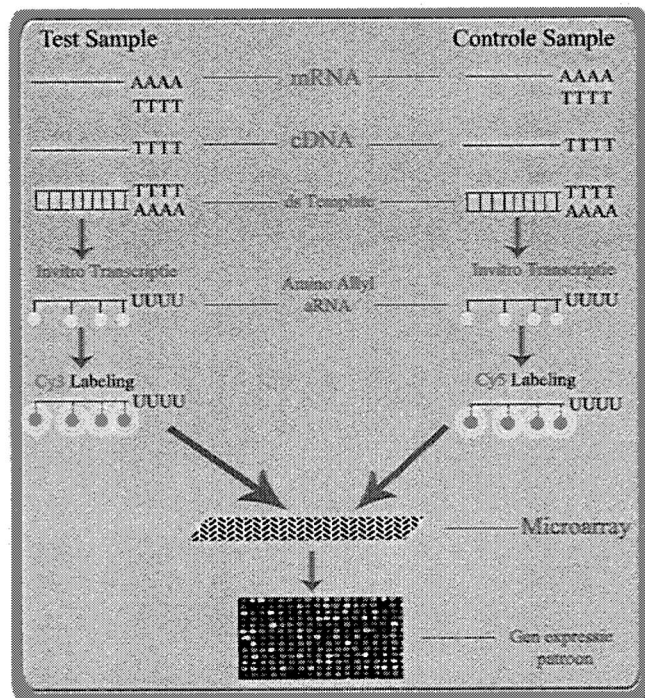
Het menselijke homolog van het neu gen, **Her2/ErbB-2**, komt in 20-30% van alle borstkanker gevallen geamplificeerd en tot overexpressie bij de mens voor^[29]. Dit muizenmodel is zeer geschikt voor interventie studies^[30] en is beter te vergelijken met de menselijke situatie dan chemisch geïnduceerde muismodellen.

5.4 Microarray

De microarray techniek wordt gebruikt voor het bepalen van gen expressieverschillen. Met deze techniek kunnen wel 20.000 genen tegelijkertijd worden geanalyseerd.

Een microarray slide is een glaasje waarop oligo's gespot kunnen worden. Elke oligo is specifiek voor een bepaald gen, zo kun je bepalen welke genen er op de array worden gezet. In figuur 4 is te zien hoe een microarray experiment in zijn werk gaat. Als eerst wordt er van het messenger RNA (mRNA) copy DNA (cDNA) gemaakt en dubbelstrengs gemaakt. Na de in vitro transcriptie heb je antisense amino allyl RNA (aRNA). Dit wordt vervolgens gelabeld met Cy3 (test sample) of Cy5 (controle sample) die binden aan de amino allyl UTP nucleotiden. Dan wordt het Cy3 en Cy5

gelabeld aRNA gehybridiseerd op een microarray slide en gaan een competitie aan. De emissie piek voor Cy3 ligt bij 570 nm en voor Cy5 bij 670 nm. Na het scannen is voor elke spot een bepaald signaal gemeten en kan voor elk gen de verhouding tussen Cy3 (test sample) en Cy5 (controle sample) bepaald worden. Hieruit is vervolgens een gen expressie patroon te bepalen.



Figuur 4: Schematische weergave van de werking van een microarray experiment.

5.5 Real-Time PCR

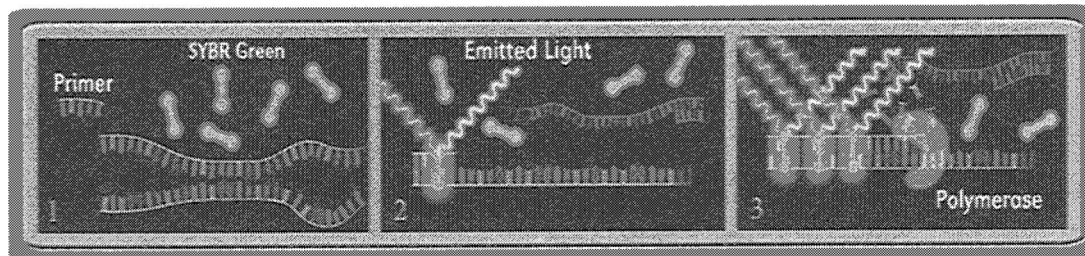
De Real-Time PCR (qPCR) is een kwantitatieve PCR waarmee per cyclus kan worden gevolgd hoeveel product er is gevormd. QPCR kan gebruikt worden voor het bepalen van gen expressie verschillen. Hierbij wordt eerst van het mRNA cDNA gemaakt en daarmee wordt de PCR reactie gedaan. Bij de één stappen qPCR gebeurt dit in 1 reactie, bij de twee stappen qPCR vindt de reverse transcriptie apart plaats van de PCR reactie. Bij een qPCR wordt altijd een huishoudgen meegenomen. Een huishoudgen is een gen waarvan de expressie constant is in verschillende organen, verschillende stadia van de ontwikkeling en niet wordt beïnvloed door een behandeling.

Er is in het experiment gebruik gemaakt van de comparatieve C_T ($\Delta\Delta C_T$) methode. Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van rekenkundige formules om tot een relatief kwantificeerbaar resultaat te komen. Om gebruik te kunnen maken van deze methode moet de efficiëntie van de PCR van het target gen en het huishoud gen nagenoeg gelijk zijn.

5.5.1 Één stappen Real-Time PCR

De één stappen qPCR houdt in dat alles in 1 reactie wordt gedaan. De reverse transcriptase stap vindt in dezelfde reactie plaats als de PCR, doordat het polymerase wat wordt gebruikt zowel reverse transcriptase als polymerase activiteit bevat.

Hierbij kan gebruik gemaakt worden van de SYBR Green methode. Bij deze methode zit een fluorescerende dye bij de reactie die alleen signaal geeft als het bindt aan dubbelstrengs DNA (zie figuur 5). In figuur 5 is alleen de PCR reactie weergegeven en niet de **reverse** transcriptie. Te zien is dat als er meer product is ontstaan door de PCR reactie er ook meer SYBR Green moleculen worden ingebouwd en dus meer fluorescentie ontstaat.

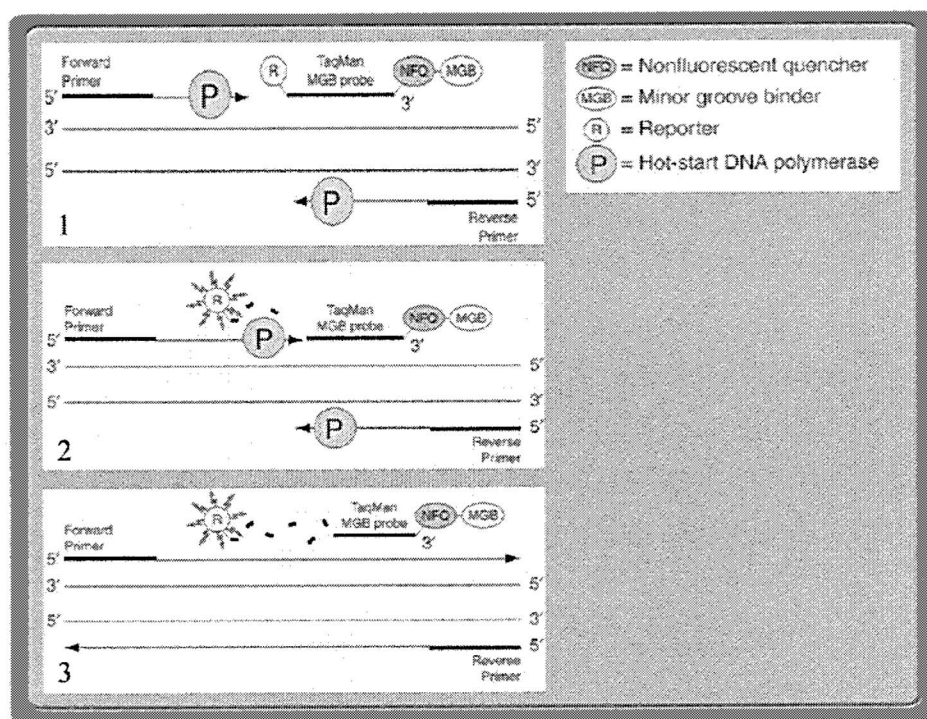


Figuur 5: Het principe van de SYBR Green methode.

5.5.2 Twee stappen Real-Time PCR

Bij de twee stappen **qPCR** vind de **reverse** transcriptie apart van de PCR reactie plaats. Voor deze techniek wordt de TaqMan probe assay gebruikt. Bij deze assay wordt er gebruik gemaakt van primers met een probe. Deze primers en probe worden specifiek gemaakt voor het gen dat je wilt analyseren.

In figuur 6 wordt de werking van deze assay uitgelegd. Ook hier is alleen de PCR reactie te zien en niet de **reverse** transcriptie. Deze methode is veel specifiekker omdat de probe erg specifiek is voor een bepaalde sequentie. In dit figuur is te zien dat de (R) Reporter alleen een signaal geeft als het van de probe wordt afgehaald door het polymerase. Dit signaal is dus ook weer een maat voor de hoeveelheid gevormd product.



Figuur 6: Het principe van de Taqman probe assay.

6. Materialen en Methoden

6.1 Muizen experiment

Om te kijken welk effect isoflavonen in combinatie met een hoog vet dieet hebben op het ontstaan van borsttumoren, zijn in alle groepen de muizen blootgesteld aan een hoog vet dieet, en de isoflavonen werden perinataal, postnataal of levenslang toegediend. De muizen zijn verkregen uit 160 **wildtype** vrouwelijke FVB muizen en 40 mannelijke homozygote FVB/N[Tg]c-neu muizen. Deze muizen zijn gepredisponeerd voor het krijgen van borsttumoren binnen 6 maanden, zonder tumorontwikkeling in andere weefsels. De vader en moeder muizen zijn beschikbaar gesteld door NIEHS/USA (Research Triangle Park, NC, USA).

De muizen worden verdeeld in 4 behandelingsgroepen zoals aangegeven in tabel 2.

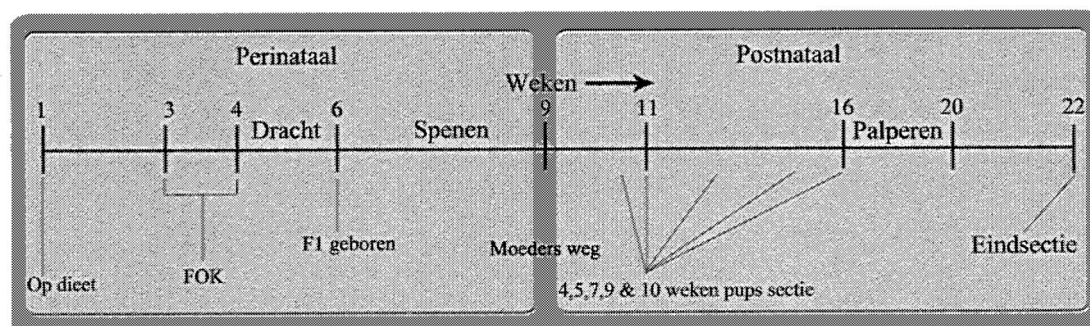
Behandelingsgroep	Vetzuurratio n-6:n-3 hoog
1	Controle geen isoflavonen
2	Perinataal isoflavonen 90 mg/kg dieet
3	Postnataal isoflavonen 90 mg/kg dieet
4	Levenslang isoflavonen 90 mg/kg dieet

Tabel 2: Verschillende behandelingsgroepen met bijbehorend dieet.

Het isoflavonen bevattende bestanddeel in het dieet is prevastein. Dit bestaat voor 66.5, 32.3 en 1.17 % uit respectievelijk genistein, daidzein en glycitein.

In week 1 worden in elke groep 20 vrouwelijke **wildtype** FVB muizen geplaatst, die het dieet uit de desbetreffende groep krijgen (Zie figuur 7). De homozygote FVB/N[Tg]c-neu vaders krijgen het **hoogvet** dieet zonder isoflavonen gevoerd. In week 3 worden er 2 mannetjes bij 5 vrouwtjes geplaatst. Nadat de mannetjes in week 4 zijn weggehaald, worden in week 6 de pups (F1) geboren. Deze pups worden gemerkt met knipjes in het linker of rechter oor en worden gewogen.

In week 9 worden de moeder muizen weg gehaald. In week 11 worden 8 muizen uit elke groep verbloed en de borstklieren worden geïsoleerd (dit zijn de 5 weken oude pups). Hieruit wordt het RNA geïsoleerd voor het array experiment. Tevens worden er 34 muizen verbloed die 10 weken oud zijn, 6 muizen van 4 weken oud, 2 muizen van 7 & 9 weken en een aantal volwassen dieren. Deze muizen worden gebruikt om later de referentiepool van samen te stellen voor het **microarray** experiment. Vijf weken later, in week 16, wordt begonnen met het palperen (handmatig voelen of er tumoren aanwezig zijn). Dit wordt elke 2 weken gedaan. De eindsectie vindt plaats als de muizen 22 weken oud zijn.



Figuur 7: Schematisch tijdschema van het muizen experiment.

6.2 RNA isolaties

De RNA isolaties zijn voor het grootste gedeelte uitgevoerd door Salvatore op borstklieren van 5 weken oude muizen. Dit RNA wordt later gebruikt om expressie profielen voor de verschillende groepen te bepalen.

Reagentia

- RNeasy[®] Lipid Tissue Midi Kit (Qiagen)
- Trizol Reagent (Invitrogen)
- DNaseI stock (Qiagen)
- Chloroform
- Ethanol (70% en 96-100%)
- 1M NaAc
- RDD buffer (Qiagen)

Apparatuur

- Homogenizer (Heidolph, DiAx 900)
- Centrifuge (Sigma 6K15)
- Nanodrop (BaseClear, ND-1000)
- Bioanalyzer (Agilent, 2100)

Er wordt maximaal 500 mg weefsel afgewogen en vervolgens overgebracht in 5 ml Trizol. Het orgaan wordt 30-60 seconden gehomogeniseerd. Na 5 min. incuberen bij kamertemperatuur (KT) wordt er 1 ml chloroform toegevoegd, en met de hand geschud. Na 2-3 min. incubatie bij KT, 15 min. bij 4⁰C met 5000 x g centrifugeren.

De bovenstaande fase wordt overgebracht in een nieuwe buis, hieraan wordt 1 volume 70% ethanol toegevoegd en gemixt op de vortex. Deze suspensie wordt overgebracht op een RNeasy Midi Spin kolom die in een 15 ml buis zit. Na 5 min. bij 3000-5000 x g gecentrifugeerd te hebben, wordt de vloeistof uit de buis verwijderd. Het ethanol wordt gewassen door 2 ml RW1 buffer op de kolom te brengen en 5 min. te centrifugeren bij 3000-5000 x g. De vloeistof wordt wederom verwijderd, en een mix van 20 µl DNaseI Stock oplossing en 140 µl RDD buffer wordt op de kolom gepipetteerd. Na 15 min. incuberen bij KT, wordt er 2 ml RW1 buffer op de kolom gepipetteerd en 5 min bij 3000-5000 x g gecentrifugeerd. De vloeistof wordt verwijderd, en er wordt 2,5 ml RPE buffer op de kolom gebracht en 2 min. bij 3000-5000 x g afgedraaid. De vloeistof wordt weer verwijderd, en er wordt weer 2,5 ml RPE buffer toegevoegd en 5 min. bij 3000-5000 x g afgedraaid om de silica-gel te drogen. De kolom wordt overgebracht naar een nieuwe 15 ml buis, en de elutie wordt gestart door de juiste hoeveelheid RNase vrij water toe te voegen (Zie tabel 3). Na 1 min. incubatie bij KT 3 min afdraaien bij 3000-5000 x g. Vervolgens wordt er weer geëluëerd met hetzelfde volume.

Na de isolatie, precipitatie en na de amplificatie wordt de concentratie gemeten m.b.v. de nanodrop. Dit apparaat meet net als een spectrofotometer de RNA concentratie bij 260 en 280 nm. Vervolgens wordt de kwaliteit van het RNA gecontroleerd op de bioanalyzer. Daarna wordt aan het RNA 0,1 volume 1M NaAc toegevoegd en 3 volumes 100% EtOH. En wordt het RNA opgeslagen bij -80⁰C.

Verwachte totaal RNA opbrengst	RNase vrij water
<150 pg	150 µl
150 pg - 1 mg	250 µl

Tabel 3: Overzicht van de hoeveelheid RNase vrij water dat toegevoegd moet worden voor de elutie.

6.2.1 Bioanalyser

Na de isolatie en amplificatie werd er gekeken of het verkregen **RNA** van goede kwaliteit was. De bioanalyser is het best te vergelijken met een elektroforese gel. Er wordt gekeken naar het ribosomaal **RNA** omdat dit 95% van het totaal **RNA** beslaat en dus een goede indicator is om te zien of er **RNA** is afgebroken. Als het geïsoleerde **RNA** op een elektroforese gel gezet wordt dan ontstaan er 2 bandjes: een 18S en 28S band. De 28S band hoort 2x zo dik te zijn als de 18S band. De bioanalyser die aangesloten zit aan de computer geeft deze 2 bandjes weer in een grafiek als 2 pieken. Uit deze grafiek kan bepaald worden of het **RNA** zuiver is of dat het afgebroken is.

6.3 RNA precipitaties

Het **RNA** dat geïsoleerd werd uit de borstklieren van de muizen is onder 100% ethanol opgeslagen, omdat het **RNA** onder deze omstandigheden stabiel is. Het **RNA** moet eerst geprecipiteerd worden om al het ethanol te verwijderen.

Reagentia

- 70% Ethanol
- RNase vrij water (Qiagen)

Apparatuur

- Tafelcentrifuge (Eppendorf 5402)
- Nanodrop (BaseClear, ND-1000)

De epjes worden 40 min. bij 4°C bij 14000 rpm afgedraaid, waarna het supernatant verwijderd wordt, en 500 µl 70% EtOH wordt toegevoegd. Vervolgens wordt er weer 40 min. afgedraaid bij 4°C en 14000 rpm. Het supernatant wordt nu verwijderd en 1 uur bij KT gezet. Daarna wordt er * µl RNase vrij water toegevoegd om tot een concentratie van 1 µg/µl te komen. Daarna wordt de concentratie gemeten op de nanodrop en wordt het **RNA** opgeslagen bij -80°C.

* Deze hoeveelheid berekenen met de volgende formule (**RNA conc. in µg/µl** * Volume waar je **RNA** in geëluëerd is) / 1 = De hoeveelheid RNase vrij water wat toegevoegd moet worden om tot een concentratie te komen van 1 µg/µl.

6.4 RNA amplificatie & labeling

De **RNA** amplificatie wordt uitgevoerd om je **RNA** te vermeerderen en om een amino allyl groep in het aRNA in te bouwen. Aan deze groep bindt de dye die gebruikt wordt bij het labelen. De dye koppeling is nodig om uiteindelijk na hybridisatie op de microarray de fluorescentie te zien.

Reagentia

- Amino Allyl MessageAmpTM aRNA Kit (Ambion)
- 100% Ethanol
- CyDye Post Labeling Reactive Dyes (Amersham Biosciences)

Apparatuur

- 37⁰C stoof (Memmert)
- 42⁰C stoof (Inventum Salvis)
- Thermal cycler (Applied Biosystems)
- Centrifuge (IEC, Micromax)
- Schuddend waterbad (GFL 1083)
- Speed Vac[®] (Savant, SC110)
- Bioanalyzer (Agilent, 2100)
- Nanodrop (BaseClear, ND-1000)

6.4.1 RNA amplificatie

Bij 1 µg totaal RNA wordt 1 µl T7 Oligo(dT) primer gedaan en tot 12 µl aangevuld met nuclease vrij water. Na 10 min. incubatie in een thermal cycler bij 70⁰C wordt master mix 1 toegevoegd (Zie tabel 4).

Reagens	Volume (µl)
10X First Strand Buffer	2
Ribonuclease Inhibitor	1
dNTP Mix	4
Reverse Transcriptase	1
Totaal volume	8

Tabel 4: Master Mix 1 voor 1 reactie.

Na een incubatie van 2 uur bij 42⁰C wordt master mix 2 toegevoegd en 2 uur geïncubeerd bij 16⁰C (Zie tabel 5).

Reagens	Volume (µl)
Nuclease vrij H ₂ O	63
10X Second Strand Buffer	10
dNTP mix	4
DNA Polymerase	2
RNase H	1
Totaal volume	8

Tabel 5: Master Mix 2 voor 1 reactie.

Vervolgens wordt er op een cDNA filter in een epje 50 µl cDNA Binding Buffer gebracht. Na dit 5 min. geïncubeerd te hebben bij KT wordt er 250 µl cDNA Binding Buffer aan de monsters toegevoegd en meteen overgebracht op het cDNA filter.

Na 1 min. afdraaien bij 10.000 x g wordt de vloeistof uit de buis verwijderd. Er wordt 500 µl cDNA Wash Buffer op het filter gebracht en 1 min. bij 10.000 x g afgedraaid. De vloeistof wordt verwijderd, waarna er weer 1 min. bij 10.000 x g wordt afgedraaid om resten ethanol te verwijderen. Het filter wordt overgebracht in een nieuw epje, en de elutie start door 9 µl 50⁰C H₂O op het filter te brengen, dit 2 min. bij KT laten staan en vervolgens 2 min. bij 10.000 x g af te draaien.

Deze **elutie** stap wordt herhaald en het dubbel strengs DNA zit nu in ongeveer 18 μl H_2O . Master mix 3 wordt toegevoegd en 6-14 uur overnacht geïncubeerd (Zie tabel 6).

Reagens	Volume (μl)
aaUTP Solution(50mM)	3
ATP, CTP, GTP Mix(25mM)	12
UTP Solution	3
T7 10X Reaction Buffer	4
T7 Enzyme Mix	4
Totaal volume	8

Tabel 6: Master Mix 3 voor 1 reactie.

De volgende ochtend wordt 58 μl nuclease vrij water toegevoegd, vervolgens 350 μl aRNA Binding Buffer en als laatst 250 μl 100% ethanol aan alle epjes. Deze suspensie wordt op een aRNA filter gebracht die in een epje zit en 1 min. afgedraaid bij 10.000 x g. De vloeistof wordt verwijderd en er wordt 650 μl aRNA Wash Buffer op elk filter gepipetteerd. Na 1 min. bij 10.000 x g gecentrifugeerd te hebben wordt de vloeistof verwijderd en nogmaals 1 min. afgedraaid bij 10.000 x g.

Het filter wordt overgebracht naar een nieuw epje en op het filter wordt 50 μl 50°C H_2O gebracht, 2 min. geïncubeerd bij KT en 2 min. bij 10.000 x g afgedraaid. Deze **elutie** stap wordt herhaald en het amino allyl aRNA (aRNA) zit nu in 100 μl H_2O . Hierna wordt de concentratie gemeten m.b.v. de nanodrop en de kwaliteit gecontroleerd met de bioanalyzer. Uiteindelijk wordt het aRNA opgeslagen bij -20°C.

6.4.2 aRNA labeling

Er wordt een volume met daarin 10 μg referentiepool aRNA en een volume met daarin 10 pg aRNA van 5 weken monsters ingedampt tot 7 μl in een speedvac. De referentiepool wordt met Cy5 gelabeld en de 5 weken monsters worden Cy3 gelabeld. Aan beide epjes wordt 9 μl Coupling Buffer en 4 μl NHS ester dye in DMSO (Cy5 voor referentiepool; Cy3 voor aRNA) toegevoegd en 30 min. geïncubeerd.

Vervolgens wordt er 4,5 μl 4M Hydroxylamine toegevoegd en 15 min. geïncubeerd. Het volume wordt aangevuld met 75,5 μl nuclease vrij water, 350 μl W A Binding Buffer en 250 μl 100% ethanol. Deze suspensie wordt op een W A filter gebracht die in een epje zit en 1 min. afgedraaid bij 10.000 x g. De vloeistof wordt verwijderd en er wordt 650 μl aRNA Wash Buffer op elk filter gepipetteerd. Na 1 min. bij 10.000 x g gecentrifugeerd te hebben wordt de vloeistof verwijderd en nogmaals 1 min. afgedraaid bij 10.000 x g. De filters worden overgebracht naar nieuwe epjes en op de filters wordt 50 μl 50°C H_2O gebracht, 2 min. geïncubeerd bij KT en 2 min. bij 10.000 x g afgedraaid. Er wordt nogmaals 50 μl 50°C H_2O op de filters gebracht, 2 min. geïncubeerd bij KT en afgedraaid bij 10.000 x g. Het aRNA van de 5 weken monsters en de referentiepool met ingebouwde labels zit nu in 2 aparte epjes met 100 μl H_2O . Hierna wordt de concentratie van de dyes gemeten op de nanodrop. Het gelabelde aRNA wordt opgeslagen bij -20°C.

6.5 Hybridisatie

Tijdens de hybridisatie wordt het gelabelde aRNA op een 22k oligo MAD slide gehybridiseerd waarop competitie optreedt tussen het Cy5 gelabeld aRNA van de referentiepool en Cy3 gelabeld aRNA van de 5 weken monsters.

Reagentia

- 20X SSC
- 10% SDS
- Isopropanol
- Haring sperma DNA (Gibico BRL)
- 2x hybridisatie mix:
 - 50% formamide
 - 10x SSC
 - 0,2% SDS
- 20X SSPE
- MilliQ
- Fragmentatie Reagents (Ambion)
- H₂O

Apparatuur

- Schuddend waterbad (GFL 1083)
- Centrifuge (4-25°C) (Sigma 6K15)
- Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Arrayscanner (Packard BioScience)
- 22k MAD Oligo array glaasjes (MAD)

Reagens	Volume (ml)
20X SSPE	5
0,2 % SDS	1
MilliQ	44
Totaal volume	50

Tabel 7: Prehybridisatie mix voor maximaal 10 glaasjes.

Er wordt 50 ml prehybridisatie mix gemaakt volgens tabel 7.

Deze prehyb-mix wordt 2 uur verwarmd bij 52°C. Na 1 uur worden de arrayglaasjes in de prehyb-mix bij 52°C gezet. Daarna wordt 150 pmol van zowel Cy3 aRNA als Cy5 referentiepool ingedampt tot 9 µl met een speedvac. Er wordt 1 µl fragmentatie reagents toegevoegd en 15 min. bij 70°C in een thermal cycler geïncubeerd. Hierdoor ontstaan fragmenten van 60-200 nucleotiden waardoor de hybridisatie beter verloopt. Vervolgens wordt er 1 µl Stop Buffer en 1,5 µl H₂O toegevoegd en Cy3 en Cy5 worden samengevoegd. Bij 250 µl 2x hyb-mix wordt 5 µl haringsperma DNA gedaan en bij 42°C gezet. De arrayglaasjes worden uit de 52°C gehaald en gewassen in milliQ en daarna in isopropanol. Terwijl de glaasjes aan de lucht drogen, wordt er 25 µl 2x hyb-mix bij 25 µl gelabeld aRNA gepipetteerd, en 5 min. bij 95°C in een thermal cycler gezet. Er wordt 2 min afgedraaid bij 10.000 rpm. De glaasjes worden in de hybridisatie kamer gelegd nadat er 20 µl water in elke gleuf is gepipetteerd. Vervolgens wordt er 45 µl van de 2x hyb-mix + gelabeld aRNA (dit is dus het gecombineerde Cy5 van de referentiepool en Cy3 van je monster) op de glaasjes gebracht; daar overheen wordt een dekglasje gelegd. De hybridisatiekamer wordt dan 16-20 uur overnacht bij 42°C geïncubeerd.

De volgende ochtend worden 5 bakjes met de reagentia uit tabel 8 gevuld.

Bakje	Volume	Reagens	Temperatuur
1	20 ml 2 ml 178 ml	20X SSC 10% SDS MilliQ	42 ⁰ C schuddend waterbad
2	Idem als 1	Idem als 1	Idem als 1
3	1 ml 2 ml 197 ml	20X SSC 10% SDS MilliQ	Kamer Temp. Schud plateau
4	1 ml 199 ml	20X SSC MilliQ	Kamer Temp. Schud plateau
5	Idem als 4	Idem als 4	Idem als 4

Tabel 8: Samenstelling van de wasbakjes voor de arrayglasjes.

De arrayglasjes worden uit de hybridisatiekamer gehaald en in bakje 1 gedaan, als het dekglasje loslaat wordt het schema van tabel 9 aangehouden.

Bakje	tijd
2	5 min
3	5 min
4	1 min
5	1 min

Tabel 9: Wasprocedure voor de arrayglasjes.

De glasjes worden 2 min. afgedraaid bij 1000 **rpm** in een platencentrifuge en bewaard in een exciccator kastje(vochtvrij kastje) totdat de arrayglasjes gescand kunnen worden.

6.6 Real-Time PCR

De qPCR wordt uitgevoerd om de resultaten van het array experiment te bevestigen, daarnaast kunnen eventuele expressieverschillen van andere genen worden aangetoond.

Primers & target sequenties ontwerpen

Voor de één steps qPCR zijn primers ontworpen m.b.v. de NCBI website, Primer3 software en Primerbank. Er is daarbij rekening gehouden met de volgende criteria:

Primers moeten:

- Ervoor zorgen dat het product over een intron exon grens heen gaat (hierdoor wordt het DNA lang niet zo effectief gekopieerd als je gewenste product)
- Ongeveer 100 nucleotiden product maken met een smelt temperatuur rond de 78⁰C
- Maximaal 22 nucleotiden lang zijn
- Overeenkomstige smelttemperaturen hebben
- Niet of nauwelijks op andere genen in het genoom van de muis kunnen plakken

Voor de twee stappen qPCR is gebruik gemaakt van de Assyas-by-Design Service van Applied Biosystems. Voor de custom kits hebben we rekening gehouden met de volgende criteria:

Target sequentie moet:

- Intron >1000 bp (hierdoor wordt het DNA lang niet zo effectief gekopieerd als je gewenste product)
- De probe moet binden op een intron-exon overgang zodat er geen signaal komt van eventueel DNA.
- Tussen de 61 – 5000 bp zijn
- Geen SNP's of repeats bevatten
- Meer dan 30 bp van 5' of 3' kant afzitten
- Niet veel homologie vertonen met andere genen.
- Niet in geconserveerde domeinen zitten

Gen naam:	Taqman gene expression ID	Indicatie Probe sequentie (5' - 3')	
Standaard kits:			
Cav1	Mm00483057_m1	GACGACGTGGTCAAGATTGACTTTG	
Fasn	Mm00662319_m1	GTGGATGGAGGTATCAACCCAGCCT	
Pigs2	Mm00478374_m1	GCCATGGAGTGGACTTAAATCACAT	
Cyclin D1	Mm00432359_m1	TGTGCCACAGATGTGAAGTTCATT	
ESRβ transcript 2	Mm00599819_m1	CCTCGTTCTGGACAGGGATGAGGGG	
Dbp	Mm00497539_m1	GAACCGGCCAGCTGTCTCCTGAAGG	
BRCA1	Mm00515386_m1	TCCCGGGAAAAGCTCTTCAAGGGCC	
FOS	Mm00487425_m1	TGTCAACACACAGGACTTTTGCGCA	
HRas1	Mm00476174_m1	CCCGGCAGGGCGTGGAGGATGCCTT	
Mapk1	Mm00442479_m1	CTACGGCATGGTTTGCTCTGCTTAT	
P53	Mm01731287_m1	CTCCGAAGACTCGATGACTGCCATG	
SRC	Mm00436783_m1	AAGGTGGATGTCAGAGAGGGAGACT	
Gen naam:	Probe sequentie	Forward primer (5' -3')	Reverse primer (5' - 3')
Custom kits:			
ESRα	TTGTGTCCTTGAATGCTTC	AGGCTGCAAGGCTTCTTTAAGA	GTTTGTAGCTGGACACATGTAGTCA
p21	CAGAGCCACAGGCACCA	GATCCACAGCGATATCCAGACATT	CGGACATCACCAGGATTGGA
Polr2a	CATCCGCTTCAATTCAT	GCAGTTCGGAGTCTCTGAGT	CCCTCTGTTGTTTCTGGGTATTGA
Hprt	CAGTCCTGTCCATAATCA	GCCGAGGATTGGAAGTGTGTTA	TTCATGACATCTCGAGCAAGTCTT

Tabel 10: Overzicht van primer en probe sequenties van de genen die geanalyseerd zijn met de twee stappen Real-Time PCR. Standaard kits zijn kant en klaar gemaakt bij Applied Biosystems en custom kits zijn zelf ontwikkeld.

Een overzicht van de genen die geanalyseerd zijn met de twee stappen qPCR is weergegeven in tabel 10.

6.6.1 Één stappen Real-Time PCR

Reagentia

- LightCycler RNA Master SYBR Green 1 (Roche)
- Forward & Reverse Primer (6pmol/μl) (Isogen)
- LightCycler 20μl Capillair kit (Roche)

Apparatuur

- LightCycler (Roche)
- Capillair houder

Reagens	Volume (µl)
H ₂ O PCR	8,2
Mn(OAc) ₂	1,3
Reverse Primer (6pmol/µl)	1
Forward Primer (6pmol/µl)	1
LightCycler RNA Master SYBR Green 1	7,5
Totaal volume	19

Tabel 11: Master mix voor 1 reactie.

Er wordt een master mix gemaakt volgens tabel 11. Vervolgens wordt er 19 µl master mix per reactie in de capillairtjes gebracht die in de capillair houder staan. Dan wordt aan ieder capillairtje 1 µl RNA (max. 500 ng/µl) toegevoegd. Naast de samples wordt 1 negatieve controle meegenomen hier wordt 1 µl H₂O aan toegevoegd. Daarna worden de capillairtjes 5 sec. afgedraaid bij 3000 rpm. De capillairtjes worden in de LightCycler gezet en de software wordt ingesteld volgens tabel 12.

Programma	Temperatuur	Tijd (hh:mm:ss)	Procedure
1	61	00:20:00	
2	95	00:00:30	Denaturatie
3	95	0:00:01	Amplificatie
	55	0:00:05	
	72	0:00:13	
	78	0:00:01	
4	95	0:00:05	Smelt curve
	45	0:00:15	
	95	0:00:00	
5	40	0:00:30	Koelen

Tabel 12: Instellingen van de LightCycler software.

6.6.2 Twee steps Real Time PCR

Reagentia

- High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)
- TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems)
- TaqMan[®] Gene Expression Assay Mix (20x) (Applied Biosystems)
- TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems)

Apparatuur

- 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems)
- PCR System 9600 thermal cycler (GeneAmp)
- Multifuge 3 S-R (Heraeus)

Als eerste wordt van het mRNA cDNA gemaakt. Hiervoor wordt de master mix uit tabel 13 gemaakt. Vervolgens wordt er voor elke reactie 50 µl master mix in elke well van een 96-wells plaat gepipetteerd. Bij elke reactie wordt 50 µl RNA gedaan met een concentratie tussen de 0,002 µg/µl en 0,2 µg/µl. De plaat wordt afgesloten en 5 sec. in een platencentrifuge afgedraaid bij 2000 rpm daarna in een PCR apparaat gezet en vervolgens wordt het PCR programma van tabel 14 gestart. Er wordt een RNA monster meegenomen zonder dat daarbij reverse transcriptase zit om te kijken of er geen DNA in het RNA monster zit.

Reagens	Volume (µl)
10x Reverse Transcription Buffer	10
25x dNTP's	4
10x random primers	10
Multiscribe Reverse Transcriptase, 50U/ul	5
Nuclease vrij H ₂ O	21
Totaal volume	50

Tabel 13: cDNA archive kit Master mix voor 1 reactie.

	Stap 1	Stap 2
Temperatuur	25 °C	37 °C
Tijd	10 min	120 min

Tabel 14: PCR programma voor reverse transcriptie.

Voor langdurige opslag wordt het cDNA bij -20°C opgeslagen.

De 7500 Fast System software wordt ingesteld volgens tabel 15. Als de software is ingesteld wordt de **reaction mix** voor de qPCR van tabel 16 gemaakt. Er wordt 20 µl van elk monster in de 96-wells Fast Reaction Plate gepipetteerd, en in de 7500 Fast system real time PCR gezet. Er wordt altijd een NTC (No Template Control) meegenomen.

	Stage 1	Stage 2
Temperatuur	95	95
Tijd	5 sec	3 sec
Temperatuur	-	60
Tijd	-	30 sec
Cyclus	1	40

Tabel 15: Instellingen voor de 7500 Fast System software.

Reagens	Volume (µl)
TaqMan Gene Expression Assay Mix (20X)	1
• Forward PCR primer (18 µM)	
• Reverse PCR primer (18 µM)	
• TaqMan probe (5 µM)	
cDNA template (10 tot 100 ng cDNA)	5
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase UNG	10
RNase vrij water	4
Totaal volume	20

Tabel 16: Reaction Mix voor de qPCR.

6.7 Immunohistochemische kleuringen

De ER-a kleuring wordt gedaan op borstklieren en borsttumoren. Hierbij wordt bekeken of er een expressieverschil te vinden is voor dit eiwit tussen de verschillende dieetgroepen. De kleuring wordt gedaan op paraffine coupes van 4 µm.

Reagentia

- 0,01M citraat buffer pH 6.0
- 0,3% H₂O₂ in 50% methanol

1x PBS
 1x PBS/Tween20
 Blocking reagent (0,5%)
 GaR/Bio 1:300 in PBS
 ER-a antigen
 ABC
 Natrium-PBS
 DAB-nikkel substraat

Apparatuur

- Schudplateau
- Magneetplaat

Er wordt een bekerglas citraatbuffer opgewarmd tot 95°C. En ondertussen worden de slides ontdaan van paraffine door ze te wassen met de reagentia uit tabel 17. Vervolgens worden de slides 30 min. geïncubeerd in de voorverwarmde citraat buffer. Nadat de slides 30 min. zijn afgekoeld bij kamertemperatuur worden ze 3 x 5 min. in aquadest gewassen. De slides worden dan 20 min. in 0,3% H₂O₂ 50% methanol geïncubeerd. Na deze incubatie worden de slides 3 x 5 min. in 1x PBS/Tween20 gewassen. Er wordt 20 min. geblokt met 0,5% blocking reagent. En vervolgens overnacht geïncubeerd met 200 µl ER-a (1:2000) in 0,5% blocking reagent bij 4°C. De volgende ochtend worden de slides 3 x 5 min. gewassen in 1x PBS/Tween20. En daarna 60 min. geïncubeerd met GaR/Bio in 1x PBS. Na de incubatie wordt er wederom 3 x 5 min. in 1x PBS/Tween20 gewassen, en vervolgens 45 min. geïncubeerd met ABC. Nadat de slides 3 x 5 min. in 1x PBS zijn gewassen, wordt er 4 min. geïncubeerd met DAB-nikkel. Daarna worden de slides 1 min. in 1x PBS, 1 min. in aquadest, 1 min. in nuclear fast red en als laatst 2 min. in aquadest gewassen. Daarna wordt het dehydratie schema van tabel 18 aangehouden. Als laatst worden de slides afgedekt met een dekglasje.

Tijd	Reagens
2 min.	xyleen
2 min.	xyleen
2 min.	100% ethanol
2 min.	96% ethanol
2 min.	70% ethanol

Tabel 17: Deparafinisering schema.

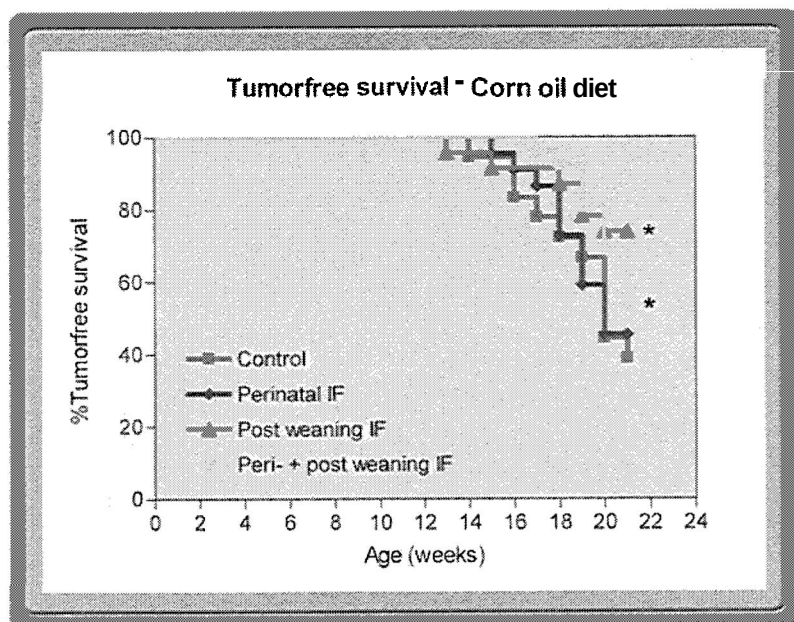
Tijd	Reagens
2 min.	70% ethanol
2 min.	96% ethanol
2 min.	100% ethanol
2 min.	Xyleen
2 min.	Xyleen

Tabel 18: Dehydratie schema.

7. Resultaten

7.1 Muizen experiment

De dieren die tot de eindsectie in experiment zaten, en dus op een leeftijd van 22 weken voor sectie gingen, lieten in deze studie een significant verschil zien in de tumor vrije overleving. In de postnatale en levenslange blootstellinggroep was de tumor vrije overleving hoger dan bij de controle en perinatale blootstellinggroep (P -waarde $<0,05$) (zie figuur 8).



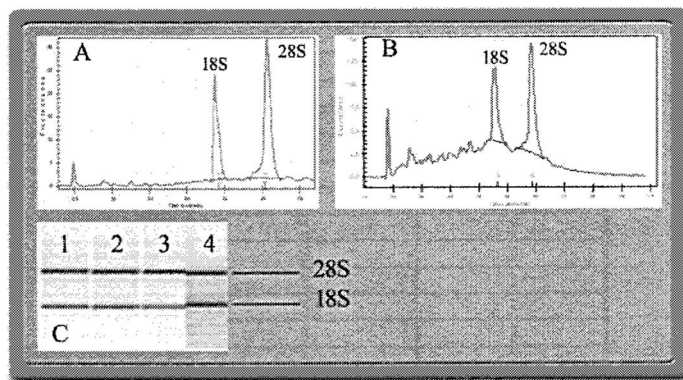
Figuur 8: Tumorfrije overleving van alle blootstellinggroepen (P -waarde $<0,05$).

7.2 RNA isolaties & precipitaties

De RNA isolatie is gedaan uit de borstklieren van 32 muizen van 5 weken, 34 muizen van 10 weken, 6 muizen van 4 weken, 2 muizen van 7 & 9 weken oud en 3 volwassen dieren. Vervolgens werden uit elke groep 5 RNA isolaties van 5 weken monsters gekozen. Hierbij werd rekening gehouden met:

- Kwaliteit van het RNA
- Totale RNA opbrengst
- Afbraak percentage
- Ratio van het RNA (2601280)

In figuur 9a is een bioanalyzer grafiek te zien van geïsoleerd RNA uit FVB/N[Tg]c-neu muizen. De eerste kleine piek is de controle piek en moet altijd aanwezig zijn. De 2^{de} piek is de 18S ribosomaal RNA piek, de 3^{de} piek laat de aanwezigheid zien van het 28S ribosomaal RNA. Doordat de 18S en 28S pieken aanwezig zijn en er vrijwel geen ruis zichtbaar is voor of tussen deze 2 pieken kun je van figuur 9a zeggen dat het RNA niet afgebroken is. In figuur 9b is een duidelijk verschil te zien: hier zijn de 18S en 28S pieken nog wel aanwezig, maar er is veel ruis zichtbaar voor en tussen de 2 pieken in. Dit komt doordat er afbraak is geweest van het ribosomale RNA. Hierdoor zijn fragmenten ontstaan die een verschillende grootte hebben en de ruis veroorzaken.



Figuur 9: A) Bioanalyzer grafiek van zuiver geïsoleerd RNA. B) Bioanalyzer grafiek van afgebroken geïsoleerd RNA. C) Agarose gel van geïsoleerd RNA (laantje 1 t/m 3 is zuiver FVB/N[Tg]c-neu RNA laantje 4 is afgebroken FVB/N[Tg]c-neu RNA).

In figuur 9c is een elektroforese gel te zien waarop in slotjes 1 t/m 3 RNA van FVB/N[Tg]c-neu muizen is opgebracht. De bovenste band is het 28S en de onderste band het 18S ribosomaal RNA. Bij slotje 4 is ook RNA van FVB/N[Tg]c-neu muizen opgebracht. Dit RNA is echter voor een deel afgebroken. Er is te zien dat er een smeer ontstaat vanaf de 28S band doordat er veel verschillende fragmenten ontstaan zijn.

Al het geïsoleerde RNA was opgeslagen onder ethanol en moest dus worden geprecipiteerd. Hierbij gaat altijd wat van het RNA verloren waardoor de concentratie van het RNA opnieuw werd gecontroleerd m.b.v. de nanodrop en de kwaliteit m.b.v. de bioanalyzer. Hieruit bleek dat er een aantal RNA's vervangen moesten worden omdat ze te veel waren afgebroken of omdat er te weinig RNA opbrengst was.

7.3 Referentiepool

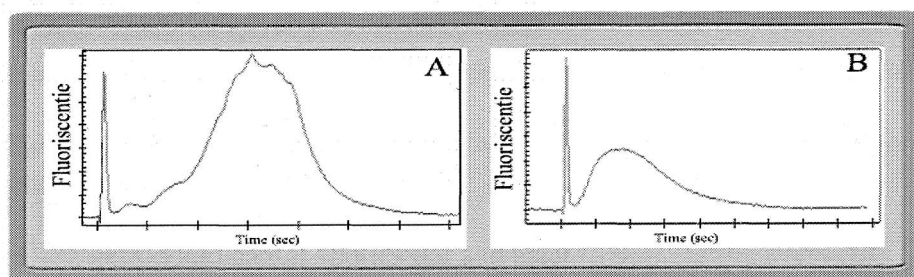
Voor het array experiment werd gebruik gemaakt van een referentiepool (RP). Deze RP is net als alle test RNA's geamplificeerd zoals dat bij de materialen en methoden is beschreven. De referentiepool is elke keer Cy5 gelabeld en uitgezet tegen het Cy3 gelabelde test RNA van de 20 muizen van 5 weken. Door het gebruik van de RP zou het nooit mogen voorkomen dat er een bepaald spotje wel signaal geeft voor Cy3 en geen signaal voor Cy5, omdat de referentiepool ook is samengesteld uit het RNA van je test RNA's zoals te zien is in tabel 19. Dit is erg belangrijk voor de analyse van de spotjes want het signaal van Cy3 wordt hierbij gedeeld door het signaal van Cy5 en delen door 0 kan niet. Doordat de RP altijd hetzelfde is en tegen elk monster wordt uitgezet kunnen de test RNA's van de 5 weken oude pups onderling met elkaar vergeleken worden. Hierdoor kunnen genexpressie verschillen ontdekt worden. Van elk monster uit tabel 1 zit 1,5 µg in de RP.

7.4 RNA amplificatie & labeling

Zowel de referentiepool als de 20 RNA's van de pups van 5 weken werden geamplificeerd. Dit zorgde ervoor dat we nog een extra controle punt hadden na de amplificatie door het weer op de bioanalyzer te zetten. Deze extra controle geeft meer zekerheid dat de referentiepool in orde is. In figuur 10 zijn twee resultaten van de bioanalyzer metingen weergegeven.

Muis nr.	leeftijd weken	Groep
12BL	5	1
14L1	5	1
18L2	5	1
18R1	5	1
54BL	5	1
35L2	5	2
40BL	5	2
40L1	5	2
76L1	5	2
36BL	5	2
53BL	5	3
57BL	5	3
57L1	5	3
58BL	5	3
58L1	5	3
64L1	5	4
64L2	5	4
65L1	5	4
78BL	5	4
78L1	5	4
18 L1	4	1
18L2	4	1
76 bl	4	4
76L1	4	4
78 L1	4	4
78L2	4	4
78L1R1 LA	7	
78L1R1 RA	7	
74B BKL	9	
74B BKR	9	
M40.2a	volwassen	
M40.2b	volwassen	
M40RB	volwassen	
53BL	10	1
6L1	10	1
32BL	10	2
34BL	10	2
49BL	10	3
50L1	10	3
71BL	10	4
74BL	10	4
= Test RNA's van 5 weken oude pups		

Tabel 19: Samenstelling van de referentiepool met daarin ook het RNA van de 5 weken oude pups. Groep 1 = controle groep, 2 = perinatale groep, 3 = postnatale groep en 4 = levenslange groep.



Figuur 10: A) Bioanalyser grafiek van goed geamplificeerd RNA. B) Grafiek van een mislukte amplificatie.

Bij de amplificatie wordt het mRNA geamplificeerd. De 18S en 28S pieken zijn hier verdwenen, omdat bij de amplificatie RNase H wordt gebruikt dat het RNA afbreekt. Tijdens de in vitro transcriptie worden alle verschillende stukken RNA afgeschreven die verschillen in lengte. Uit deze plaatjes is dus alleen af te lezen of de amplificatie gelukt is. Een voorbeeld van een mislukte amplificatie is te zien in figuur 10b: hier is de opbrengst van de amplificatie veel te laag.

Het RNA moest minimaal 15x geamplificeerd worden.

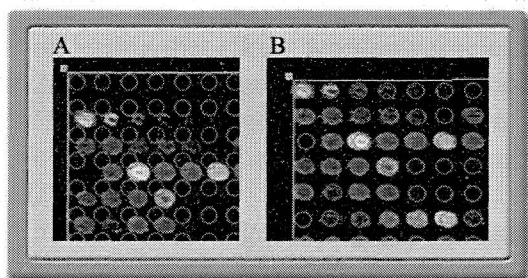
Bij de labeling voor zowel Cy3 als Cy5 werd als eis gesteld dat er 150 pmol gehybridiseerd moest worden. De concentratie van het label kon worden gemeten op de nanodrop en lag tussen de 3 en 6 pmol/ μ l. Dus er werd steeds tussen de 50 en 25 μ l gelabeld RNA ingedampt.

7.5 Microarras Analyse

7.5.1 Arrayvision

Nadat alle test RNA's waren uitgezet tegen de RP en gescand waren moesten deze m.b.v. het computer programma ArrayVision geanalyseerd worden.

Met dit programma worden de grids (rode circels uit figuur 11a) zo gelegd dat ze precies over de spotjes op de array vallen. Dit is erg belangrijk om een zo juist mogelijk signaal te krijgen zonder al te veel achtergrond signaal. In figuur 11a is te zien dat het grid niet mooi over de spotjes heen ligt, terwijl dit in figuur 11b gecorrigeerd is. In deze figuren is de rode en groene kleur van Cy5 en Cy3 verdwenen doordat de instellingen van het programma zijn gewijzigd. Dit is bewust gedaan om alle spotjes wat duidelijker te maken zodat de grids er goed overheen gelegd konden worden.



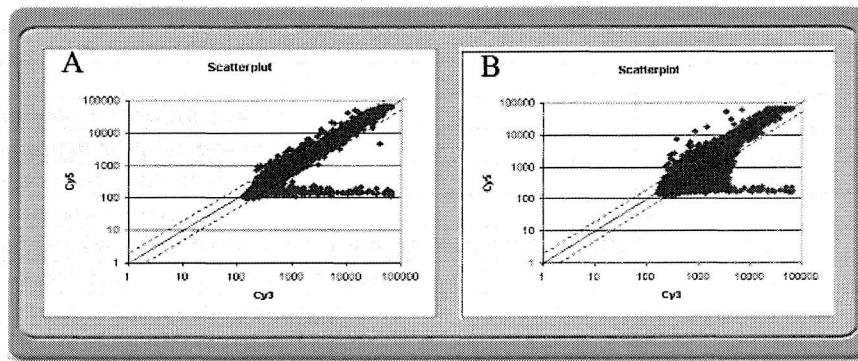
Figuur 11: A) Grid ligt niet goed over de spotjes. B) Grid is goed over de spotjes heen gelegd.

Nadat alle 24 grids op hun plaats waren gelegd, werden de volgende parameters berekend voor Cy3 en Cy5:

- het achtergrond signaal
- gemiddeld aantal spotjes dat aan staat
- signaal van elk spotje

Deze data werd daarna samengevoegd in een tekst bestand en m.b.v Excel omgezet in een grafiek vorm.

In figuur 12a is te zien dat de wolk van spotjes redelijk vlak loopt tussen de 2 gestippelde lijnen door. De punten in de grafiek staan voor de spotjes op de array. De stippellijnen zijn een factor 2 verschoven ten opzichte van de $Cy3 = Cy5$ lijn. En dit is een mooie marge waar de punten grotendeels binnen moeten liggen. Wanneer deze wolk breder wordt, zoals in figuur 12b kan het betekenen dat de slide een uitbijter is. Deze slide is dan ook niet meegenomen bij de verdere analyse. De wolk puntjes die horizontaal loopt bij $Cy5 = 100$ zijn de controle spots van de array.



Figuur 12: A) Scatterplot van een goede slide. B) Scatterplot verkregen van een slechte slide.

7.52 Excel

Tijdens deze analyse is er gekeken of er tussen de verschillende behandelingsgroepen genen waren die verhoogd of verlaagd tot expressie kwamen. Er werden steeds 4 analyses gedaan:

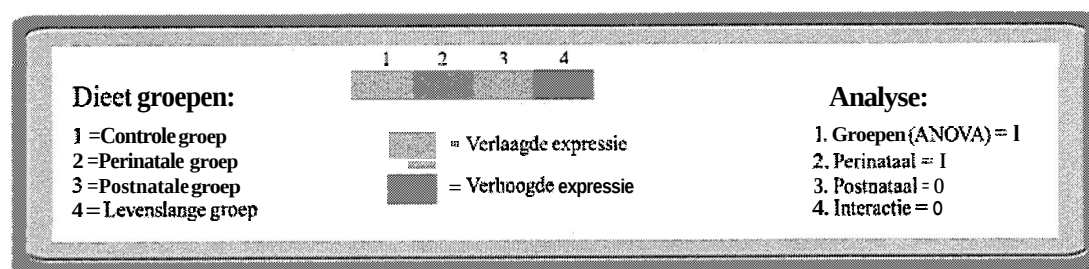
1. Alle groepen individueel tegen elkaar (ANOVA)
Hierbij wordt gekeken of er een significant verschil te vinden is als alle groepen onderling met elkaar worden vergeleken.
2. Perinataal tegenover niet perinataal blootgesteld
Hierbij wordt gekeken of er een significant verschil is als de perinataal blootgestelde groepen 2 en 4 worden vergeleken met de groepen 1 en 3 (zie tabel 2).
3. Postnataal tegenover niet postnataal blootgesteld
Hierbij wordt gekeken of er een significant verschil is als de postnataal blootgestelde groepen 3 & 4 worden vergeleken met de groepen 1 & 2 (zie tabel 2).
4. Interactie
Hierbij wordt gekeken of er een interactie is tussen de groepen 2 en 3. Als bijvoorbeeld in groep 2 de expressie iets verhoogd is en in groep 3 ook iets verhoogd, dan kun je verwachten dat in groep 4 de expressie extra verhoogd moet zijn, omdat die groep eigenlijk groep 2 + groep 3 is.

Met een P-waarde van 0,01 en een Foldsratio van 1,5 kwamen er 18 genen uit die minimaal bij 1 van de 4 analyses significant verschilden. Met deze P-waarde heb je 1% kans dat dit resultaat berust op toeval. De Foldsratio is het verschil tussen de hoogst en de laagst gevonden waarde. In tabel 20 is een overzicht te zien van de genen die bij één van de analyses significant verschilden. Hier is te zien dat er haast geen postnatale effecten gevonden zijn maar vooral perinatale effecten.

Bij de microarray analyses zijn 2 slides niet mee genomen bij de analyse, omdat de muizen 53BL en 65L1 afweken. Als voorbeeld zijn de resultaten voor p21 te zien in figuur 13. Hierin zijn de dieet groepen terug te vinden uit het muizen experiment (zie tabel 2). Te zien is dat in de controle en in de postnatale groep het gen verlaagd tot expressie komt, terwijl in de perinatale groep en de groep waarbij peri & postnataal is blootgesteld de genexpressie juist verhoogd is. Een significant verschil wordt bij de analyse aangegeven met een 1; een 0 betekent dat er geen significant verschil gevonden is voor die analyse.

	ANOVA	Perinataal	Postnataal	Interactie
Genen:				
adipocyte-specific mRNA	1	0	0	1
clathrin adaptor protein mu3A	1	1	0	0
lysosomal acid lipase 1 (Lip1)	1	0	0	1
syntaxin 5 (Stx5)	1	0	0	1
aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (Arntl)	0	1	0	0
potassium inwardly-rectifying channel (Kcnj8)	1	1	0	1
Similar to lipoprotein-binding protein	0	0	0	1
open reading frame 5 (ORF5)	0	1	0	0
Dlxin-1 (Dlxin1)	1	0	0	1
nuclear factor, interleukin 3 (Nfil3)	1	1	0	0
D site albumin promoter binding protein (Dbp)	1	1	0	0
fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2 (Facl2)	1	1	0	1
10 day old male pancreas cDNA	1	1	0	1
cDNA sequence AF180471 (AF180471)	0	0	1	0
10 day old male pancreas cDNA clone:1810064A23	1	1	0	0
Similar to KIAA0663 gene product	1	0	0	0
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (Cdkn1a)	1	1	0	0
adaptor-related protein complex AP-3, beta 1 (Ap3b1)	1	0	0	1

Tabel 20: Overzicht van alle genen die op de microarray voor 1 van de analyses een significant verschil lieten zien, Dikgedrukte genen zijn genen die zonder het poolen van groepen een expressie verschil laten zien.



Figuur 13: Microarray analyse resultaten van cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (Cdkn1a). Zie tekst voor uitleg analyse typen. Bij de analyse geldt: 1 = significant verschil, 0 = geen significant verschil.

Uit de ANOVA blijkt niet waar het significante effect zit, dus is er een vervolg test gedaan: de zogenaamde Dunnett T test. In tabel 21 is hiervan het resultaat te zien. Hierbij werden de individuele dieetgroepen 2, 3 of 4 vergeleken tegen de controle groep 1.

Genen	Groep 2 tegen 1	Groep 3 tegen 1	Groep 4 tegen 1
Adipocyte-specific mRNA	1↓	0	0
Clathrin adaptor protein mu3A	1↓	0	0
Nuclear factor, interleukin 3 (Nfil3)	1↑	0	0
Syntaxin 5 (Stx5)	1↓	0	0
Dlxin-1 (Dlxin1)	1↓	1↓	0
D site albumin promoter binding protein (Dbp)	0	0	1↓
Fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2 (Facl2)	1	1↓	1↓
Cyclin-dependentkinase inhibitor 1A (P21) (Cdkn1a)	0	0	1↑
Adaptor-related protein complex AP-3, beta 1 subunit (Ap3b1)	1↓	1↓	0

Tabel 21: Resultaat van de Dunnett T test 1 = significant verschil, 0 = geen significant verschil, ↓ = verlaagde expressie, ↑ = verhoogde expressie.

Ook hieruit bleek dat de meeste effecten in de perinatale groep zaten. Interessant is het om te zien dat de genen Dlxin1 en p21, beide uit dezelfde pathway, significante verschillen laten zien. Dlxin1 induceert namelijk p21 en p53 levels en p53 fosforylering. P53 reguleert vervolgens p21 wat weer een remmende werking heeft op de CDK's 2 & 4 en dus indirect een modulator van de celcyclus is.

7.6 Real-Time PCR

Nadat er in het array experiment van een aantal genen een gen expressieverschil werd aangetoond, is geprobeerd dit expressieverschil ook met qPCR aan te tonen. Er zijn genen gekozen die uit het array onderzoek kwamen, maar ook genen die op de array niet statistisch verschilden maar wel interessant waren voor het onderzoek. In tabel 22 is een lijst te zien van de genen die we hebben geanalyseerd m.b.v. twee steps qPCR.

Target genen	Huishoudgenen
FOS	Polr2a
HRas	Hprt
Mapk1	
SRC	
Fasn	
Ptgs2	
Cyclin D1	
ER-β specifiek voor transcript 2	
Dbp	
BRCA 1	
p21	
ER-α	
p53	
Cav1	

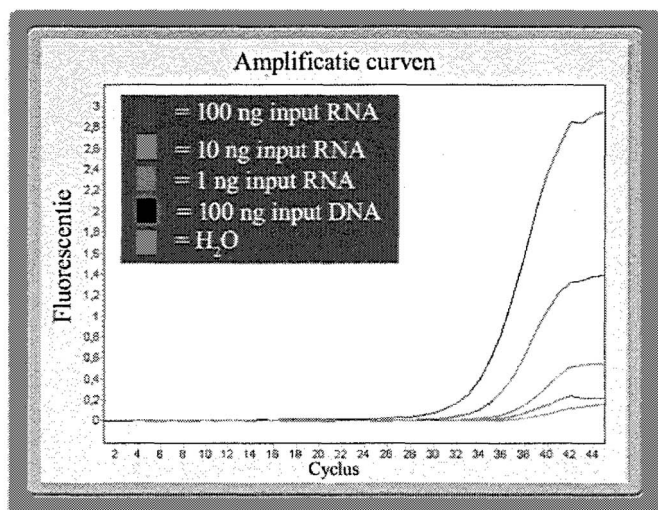
Tabel 22: Geanalyseerde genen en huishoudgenen m.b.v. twee steps qPCR

7.6.1 Één steps Real-Time PCR

In figuur 14 is het resultaat te zien van een qPCR van het gen Estrogen Receptor α. Op de x-as het aantal cycli en op de y-as is de hoeveelheid fluorescentie weergegeven.

Te zien is dat het DNA monster wat meegenomen werd sneller opkomt dan het RNA. We hadden voor dit gen echter primers gekozen die over **een** intron van ongeveer 500 bp zouden gaan. Als het DNA ook producten geeft heb je geen specifiek signaal van het mRNA maar krijg je ook signaal van eventueel DNA in je monsters.

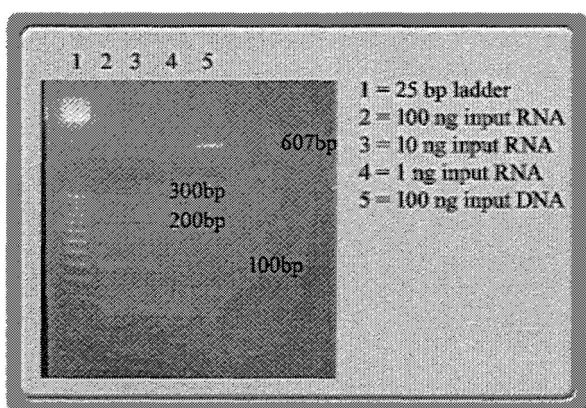
In figuur 15 is te zien dat het polymerase het intron heeft kunnen overbruggen tot de andere primer, omdat in laantje 5 een band te zien is die ongeveer 607 bp groot is. In laantje 2 & 3 is bij de 100 bp het specifieke PCR product terug te vinden. In laantje 4 is het product niet te zien omdat er te weinig RNA inzit. Er is toen besloten dat het intron rond de 1000 bp moet zijn om er zeker van te zijn dat het polymerase het intron niet kan overbruggen.



Figuur 14: Één steps qPCR resultaat van *Estrogen Receptor a* met de SYBR Green methode.

Deze methode bleek niet optimaal te werken doordat er veel problemen ontstonden met het ontwerpen van de primers.

Voor sommige genen was het signaal niet specifiek genoeg omdat een DNA controle ook producten gaf, en voor andere genen **was** er te weinig signaal. Toen is er besloten om een ander apparaat te gebruiken dat gebruik maakt van de TaqMan probe assay.



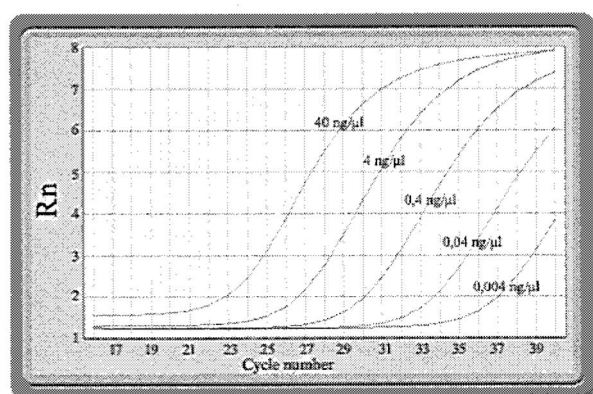
Figuur 15: Electroforese gel van de qPCR producten van *Estrogen Receptor a* uit figuur 14.

7.6.2 Twee stappen Real-Time PCR

Bij de twee stappen qPCR hebben we gebruik gemaakt van de $\Delta\Delta C_t$ methode. Om de $\Delta\Delta C_t$ methode te kunnen gebruiken moet de efficiëntie van de target genen ongeveer overeen komen met die van de huishoudgenen. Om dit na te gaan moeten alle genen eerst worden gevalideerd tegen 1 of meer huishoudgenen.

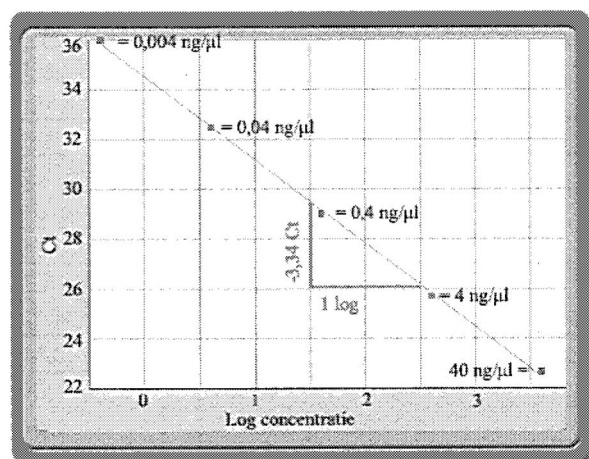
Voor dit valideren wordt er van elk gen een **ijklijn** gemaakt door een verdunningsreeks te maken van het cDNA. De helling van deze ijklijn is een maat voor de efficiëntie van de PCR reactie.

In figuur 16 is het resultaat te zien van een validatie van het gen FOS. Hierbij is een concentratie reeks gemaakt waarbij 4 pg (conc. 80 ng/μl) totaal RNA werd omgezet naar cDNA. Dit cDNA werd steeds 10x verdund tot 10^4 . Ervan uitgaande dat de reverse transcriptie 1:1 efficiënt was is de hoogste concentratie 40 ng/μl cDNA en de laagste 0,004 ng/μl.



Figuur 16: qPCR resultaat van FOS met een concentratie reeks van 40 ng/μl tot 0,004 ng/μl cDNA.

In figuur 16 zie je dat de hoogste concentratie de laagste Ct waarde heeft en dus het eerst opkomt en steeds gevolgd wordt door de 10x verdunning.



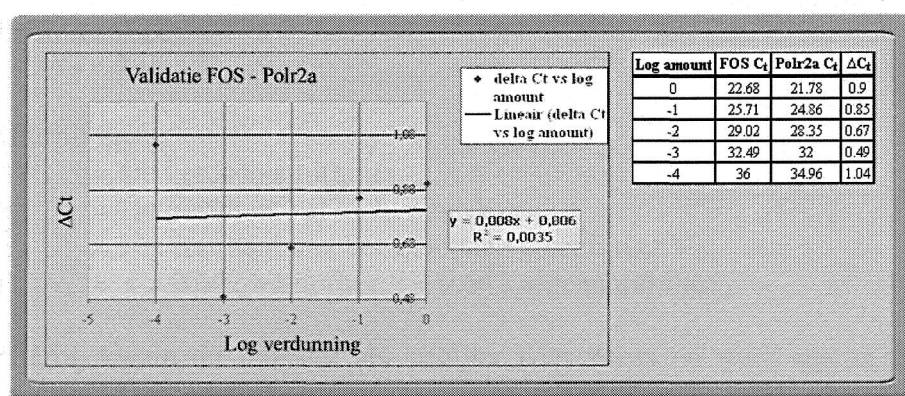
Figuur 17: Ijklijn van de resultaten uit figuur 16.

De ijklijn in figuur 17 laat zien dat de helling van de ijklijn -3.34 is. Dit komt overeen met een efficiëntie van 99,3%. Bij een 100% efficiënte reactie is de helling -3.32. De bovengrens voor de efficiëntie ligt bij 105% en de ondergrens bij 95%. Een dergelijke ijklijn met dezelfde verdunningsreeks is ook voor de huishoudgenen gemaakt.

In figuur 18 is de validatie te zien van FOS tegen het huishoudgen Polr2a. Hierin wordt de ΔC_t ($= C_t$ target gen $- C_t$ huishoudgen) uitgezet tegen de log concentratie. Tussen deze punten wordt een trendlijn getrokken met de formule ($y=A*x + b$). Het getal A is de hellingscoëfficiënt en moet tussen de -0,1 en 0,1 liggen om de $\Delta\Delta C_t$ methode te kunnen gebruiken. De hellingscoëfficiënt in dit voorbeeld is 0,008.

In tabel 23 is een overzicht te zien van alle validaties tegen de huishoudgenen Polr2a en Hprt. Er is steeds gekeken naar het gemiddelde van de 2 huishoudgenen, omdat 2 huishoudgenen een betere indicatie geven dan 1 huishoudgen.

Hieruit bleek dat we bij Cyclin D1 en ErbB2 niet de $\Delta\Delta C_t$ methode konden gebruiken met deze huishoudgenen. Bij de andere genen die een hellingscoëfficiënt hadden van meer dan 0,1 of minder dan -0,1 was de overschrijding minimaal en zijn toch meegenomen. Wanneer er bij deze genen effecten waren ontstaan waren deze genen opnieuw gevalideerd.



Figuur 18: Validatie van FOS tegen het huishoudgen Polr2a.

Gen	Hprt	Polr2a	Gemiddelde hellingscoëfficiënt
BRCA1	-0.055	-0.159	-0.107
Cav1	0.134	0.073	0.104
Ptgs2	0.094	0.033	0.064
Cyclin D1	0.173	0.112	0.143
Dbp	0.006	-0.055	-0.025
ErbB2	-0.308	-0.412	-0.360
ER- α	0.046	-0.015	0.016
ER- β specifiek	-0.085	-0.14	-0.113
Fasn	-0.051	-0.11	-0.081
FOS	-0.059	0.008	-0.026
HRAS	0.007	0.074	0.041
JUN	-0.14	-0.073	-0.107
MAPK1	-0.037	0.03	-0.004
P21	-0.083	-0.016	-0.050
P53	0.067	0.134	0.101
SRC	-0.1	0.085	-0.008

Tabel 23: Hellingscoëfficiënt van de validaties van alle target genen tegen de huishoudgenen Hprt en Polr2a. De assay die alle transcripten van ER- β zou moeten aantonen had geen goede efficiëntie en kon niet gevalideerd worden.

Van de 5 weken monsters werd steeds 20 ng/ μ l cDNA gebruikt. Dit ligt mooi in het midden van de ijklijn van de validatie, zodat een verhoging of verlaging in expressie nog steeds goed gemeten kan worden. Er is op elke plaat een $-rt$ monster meegenomen: een monster waar de reverse transcriptie zonder reverse transcriptase is gedaan. Dit is een extra controle om te kijken of er geen contaminatie is en of de RNA isolaties zuiver zijn. Verder werd op elke plaat voor twee monsters 14 target genen en 2 huishoudgenen geanalyseerd. Alle monsters werden in duplo op de platen gezet.

De C_t waarden van de duplo's (technische replica's) waren vrijwel gelijk met een maximaal verschil van 0,3 C_t . De gemiddelde C_t waarden binnen een behandelingsgroep (biologische replica's) verschilden maximaal 1 C_t .

Er was 1 afwijkend monster in groep 4 dat per gen in meer of mindere mate afweek van het gemiddelde. Om er zeker van te zijn of dit monster ook echt een uitbijter was werd de volgende formule gebruikt:

$$r = \frac{(Y_2 - Y_1)}{(Y_n - Y_1)}$$

Hierbij geldt:

Y_1 = De verdachte uitbijter.

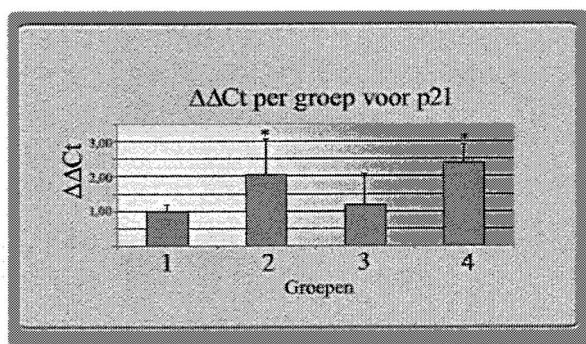
Y_2 = Het resultaat het dichtst bij Y_1 .

Y_n = Het resultaat met het grootste verschil met Y_1 .

r = $r > 0.642$ = uitbijter, $r < 0.642$ = geen uitbijter.

Hierbij kwam dit monster als uitbijter naar voren en werd niet meegenomen in de analyse. Opmerkelijk is dat bij de microarray ook muis nummer 65L1 niet is meegenomen omdat deze afweek. Hieruit blijkt dat de resultaten van de microarray goed te koppelen zijn aan de qPCR. Bij de analyse is de gemiddelde ΔC_t (= gemiddelde C_t target gen – gemiddelde C_t huishoudgen) berekend met het gemiddelde van de duplo's. Daarna is de $\Delta\Delta C_t$ berekend (= gemiddelde ΔC_t controle groep – gemiddelde ΔC_t groep X) door de gemiddelde ΔC_t van de desbetreffende groep af te trekken van de gemiddelde ΔC_t van de controle groep.

Voor de meeste genen is geen significant expressie verschil gevonden. Echter voor p21, Dbp en ER α is er wel een significant verschil gevonden. In figuur 19 is de $\Delta\Delta C_t$ uitgezet van elke groep ten opzichte van de controlegroep die op 1 is gesteld voor het gen p21. Hier is duidelijk te zien dat er een significante verhoging is in de expressie van p21 in groep 2 en 4.



Groep:	1	2	3	4
P21	1	2,039*	1,19	2,382*
Dbp	1	0,297*	0,555	0,157*
Era	1	0,902	0,815	0,655*

Tabel 24: MC, van p21, Dbp en ER α
Voor elke groep.

Figuur 19: AAC, van elke behandelingsgroep waarbij de controle groep op 1 is gesteld. Bij groep 2 en vooral bij groep 4 is een verschil in expressie te zien.

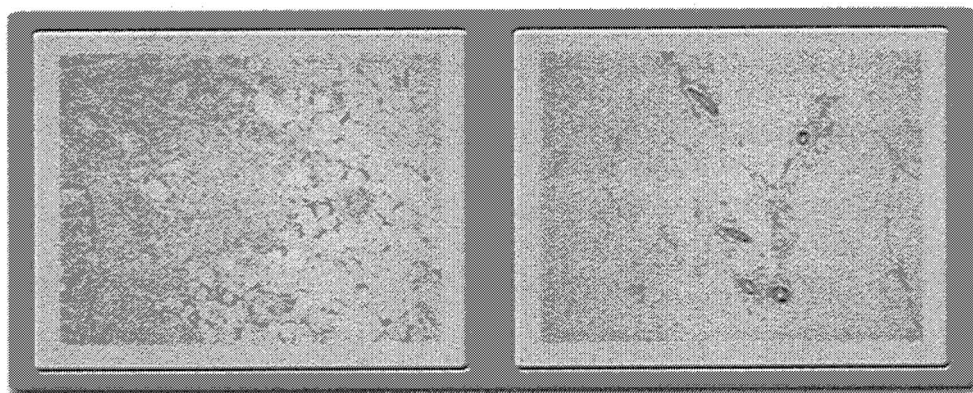
Het verschil in expressie zat voor Dbp ook in de groepen 2 en 4 waar het verlaagd was, en voor **ER α** was een significante verlaging in groep 4 (zie tabel 24). P21 en Dbp lieten ook op de microarray al zien dat ze significant verschilden en lieten daar ook precies hetzelfde patroon tussen de groepen zien. Dit geldt niet voor **ER α** dat op de array nauwelijks een verandering vertoonde.

7.7 Immunohistochemische kleuring

We hebben een Immunohistochemische kleuring gedaan van ER-a. Dit is gedaan op coupes van borstklieren en borsttumoren van de 5 weken oude muizen.

Bij het scoren van de coupes is het 2 punten systeem gebruikt:

- 1 = Negatief
- 2 = Positief



Figuur 20: Links een negatieve ER-(x)kleuring van een tumor, rechts een positieve ER-(n)kleuring van een borstklier.

Er is voor dit systeem gekozen omdat er een duidelijk verschil was tussen positieve en negatieve kleuringen. Er was een groot verschil te zien tussen de kleuring van borstklieren of borsttumoren.

In figuur 20 is goed te zien dat de borstklieren sterk positief waren (veel zwart gekleurde cellen) en de borsttumoren negatief (zonder zwart gekleurde cellen).

Dit is een belangrijk gegeven omdat nadat er een tumor ontstaan is deze tumor geen eiwit expressie meer heeft van **ER-a**. Een eventuele therapie gebaseerd op deze receptor zou dus niet werken bij het bestrijden van de tumoren.

8. Discussie en conclusies

8.1 Discussie

Dierexperiment:

Bij het dier experiment zijn de dieren allemaal op een leeftijd van 22 weken voor eindsectie gegaan. Deze dieren werden gevolgd om de tumorvorming te kunnen bestuderen. Door het gekozen tijdstip is niet goed in te schatten hoe groot het effect is op de tumorvrije overleving. Het lijkt nu of de postnatale en levenslange blootstellinggroepen een hoger percentage tumorvrije overleving hebben. Doordat de eindsectie precies in het gebied viel waar veel dieren tumoren kregen, had de eindsectie misschien later moeten plaatsvinden om zo een beter beeld te krijgen van het effect. Het verschil in tumorvrije overleving zou mogelijk verklaard kunnen worden door het feit dat de muizen in deze groepen langer blootgesteld zijn aan isoflavonen dan de perinatale blootstellinggroep. Verder is het lastig om het experiment af te spiegelen tegen de menselijke situatie, omdat de "levenslange" blootstelling in totaal maar 21 weken is en voor het microarray en qPCR experiment zelfs maar 10. Echter in deze studie wordt wel het gehele ontwikkelingsproces en een periode ervoor en daarna bekeken.

RNA isolaties:

In de borstklieren van de muis zitten verschillende typen cellen, wat het lastig maakt om eventuele expressie verschillen aan te tonen. Het is namelijk niet duidelijk als er al een expressie verschil is of dit in alle typen cellen even sterk tot zijn recht komt. Ook kan het zo zijn dat een eventueel effect in een bepaald type cel wordt verzwakt door de andere typen cellen waar dit effect niet waarneembaar is.

De ratio van het geïsoleerde RNA moest tussen de 1,90 en 2,05 liggen, maar uit een studie bleek dat bij een ratio van 1,90 er nog steeds 70% eiwit aanwezig kan zijn^[31]. Onze monsters hadden soms wel een ratio van 1.90, maar we hebben alle monsters gecontroleerd m.b.v. de bioanalyzer. Hieruit werd duidelijk dat er geen eiwitten aanwezig waren en er geen RNA was afgebroken. In elk monster waren de 18S en 28S pieken duidelijk aanwezig en was er weinig ruis ontstaan.

Microarray's:

Om een indruk te krijgen van het expressie profiel van ons muismodel is het microarray experiment gedaan. We hebben dit gedaan om genen te vinden die we kunnen relateren aan de invloed van isoflavonen op het ontstaan van borstkanker. Voor een aantal genen is deze relatie al in meerdere studies beschreven, bijvoorbeeld voor p21^[32] en Fasn^[33, 34]. Er zitten in het microarray experiment een aantal onzekere factoren zoals bij de labeling van het aRNA. Hierbij wordt een bepaalde hoeveelheid label gebruikt om te hybridiseren, maar nergens is te controleren of de inbouw van het label overal even efficiënt gebeurt. Het is voor te stellen dat bij een slechte labeling er meer aRNA genomen moet worden voor dezelfde hoeveelheid label. Dit beïnvloedt direct het resultaat van de microarray, omdat de minder goed gelabelde aRNA strengen wel meedoen in de competitie op een spotje.

Bij de eerste analyse van de microarray's werden er steeds groepen gepoold om zo toch een effect weer te geven. Op deze manier zullen eventuele milde effecten eerder opgemerkt worden. Het idee achter deze vorm van analyse is dat er zo eenvoudiger genen gevonden worden die perinataal of postnataal een effect hebben. Het nadeel van deze analyse is dat de blootstellingduur in groep 3 een vijfde deel van de blootstellingduur in groep 4 is. Hiermee is bij deze analyse geen rekening gehouden. Hierdoor is het mogelijk dat voor genen waar geen postnataal verschil is gevonden dit kan liggen aan de korte postnatale blootstelling.

Real-Time PCR:

Met de qPCR is geprobeerd de expressie verschillen van de microarray te bevestigen en eventueel die van andere genen aan te tonen. We zijn hierbij begonnen met de SYBR Green methode op de lightcycler. Door de vele problemen en onverklaarbare resultaten is ervoor gekozen over te stappen op de primer probe assay van Applied Biosystems. Deze techniek blijkt veel specifiek en gevoeliger te zijn dan de SYBR Green methode.

Voor p21 en Dbp is het gelukt met qPCR de expressie verschillen van de microarray te bevestigen. Andere genen van de microarray zijn nog niet gecontroleerd in verband met tijd gebrek. Bij het selecteren van genen van de microarray was het nog niet duidelijk welke genen in relatie stonden tot borstkanker. Bij nader inzien was het interessant geweest om bijvoorbeeld *Facl* en *Dlx1* van de microarray te analyseren, door hun relatie met borstkanker. Bij het valideren van de assay's en het uitvoeren van de echte monsters is een andere master mix gebruikt. Wij waren genoodzaakt de TaqMan® Universal PCR Master Mix te gebruiken voor de echte monsters, doordat de voorraad van de TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix wereldwijd uitverkocht was en er weinig tijd over was om op de nieuwe synthese hiervan te wachten. Na enkele tests op onze afdeling was een duidelijk verschil te zien in de efficiëntie van de PCR reactie tussen deze master mixen. Hierbij waren vooral de C_t waarden van de laagste cDNA concentraties (0,001 ng/μl) afwijkend, maar de hogere concentraties (10 ng/μl) kwamen wel overeen. Wij hebben concentraties van 20 ng/μl gebruikt, die dus binnen het overeenkomstige gebied liggen. Toch is het noodzakelijk dat er met de TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix gecontroleerd wordt of de gevonden expressie verschillen met deze mix ook worden gevonden.

Microarray's & Real-Time PCR:

Bij het microarray experiment en de qPCR bleek dat p21 significant verschilde. P21 is bij de microarray's in groep 2,3 en 4 verhoogd, maar alleen in groep 4 significant. Dit patroon zien we terug bij de qPCR waar de p21 expressie ook is verhoogd in groep 2,3 en 4. Ditmaal is de expressie echter significant in de groepen 2 en 4. Zowel bij de microarray's als bij de qPCR is een lichte verhoging te zien in groep 3. Dit zou verklaard kunnen worden doordat de blootstelling tijd gelijk loopt met de verhoging in expressie. Groep 4 had een $\Delta\Delta C_t$ van 2,38 en is 10 weken blootgesteld, dan volgt groep 2 met een $\Delta\Delta C_t$ van 2,039 en een blootstelling van 8 weken, terwijl groep 3 maar een blootstelling heeft gehad van 2 weken met een $\Delta\Delta C_t$ van 1,190. Een verhoogd p21 vertraagt de tumorgroei doordat p21 een regulator is van de celcyclus door de CDK's 2 en 4 te remmen^[35]. Dit beeld is voor een deel terug te vinden in de tumorvrije overleving omdat in groep 4 waar de verhoging van p21 het grootst is, er

ook een significant verschil is in de tumorvrije overleving. Verder is er voor p21 een slechte prognose wanneer p21 in het cytoplasma aanwezig is^[35].

Het andere gen dat significant verschilde bij de microarray en qPCR is Dbp. Ook voor dit gen geldt dat de expressie verschilt in de groepen 2 en 4, alleen is de expressie juist verlaagd. Ook hier is weer hetzelfde patroon te zien voor groep 3, net als voor p21. De exacte relatie van dit gen met borstkanker is nog niet geheel duidelijk, maar het is een element van de “cel-klok” en speelt een rol bij het ontstaan van type 2 diabetes^[36].

Het gen voor ER α dat op de microarray geen expressie verschil aangaf was met de qPCR in groep 4 wel significant verlaagd. Isoflavonen grijpen vooral aan op ER β , dus de isoflavonen hebben niet direct een effect op ER α . Wel zou het mogelijk zijn dat isoflavonen via ER β een effect hebben op ER α , omdat aangetoond is dat deze eiwitten wel een interactie met elkaar aangaan^[37].

De qPCR is een gevoeliger techniek dan de microarray. Hierdoor zou het kunnen voorkomen dat er met de qPCR voor een bepaald gen een significant verschil wordt opgepikt dat met de microarray niet wordt gedetecteerd. Het is lastig de resultaten van de microarray en de qPCR te koppelen aan de resultaten van de tumorvrije overleving, omdat de eindsectie 17 weken later plaatsvond dan de sectie van de 5 weken pups. Dit kan echter wel een indicatie geven voor de genen die al in een vroeg stadium veranderen en veranderd blijven. En zo dus al in een vroeg stadium van de ontwikkeling een positief effect hebben op de tumorvrije overleving.

Immunohistochemische kleuring:

Bij de qPCR is een verlaagde expressie gevonden van ER α , wat echter bij de kleuringen niet is waar te nemen. Bij het microscopisch scoren van de coupes kon er alleen een verschil gezien worden tussen positief en negatief. Een waarde daartussen is erg moeilijk te onderscheiden en is dus niet gevonden. De tumoren waren allemaal negatief en de borstklieren allemaal positief. Dit zou een belangrijk gegeven kunnen zijn voor het kiezen van een bepaalde behandeling. Een tumor behandeling gebaseerd op deze ER α receptor zou niet werkzaam zijn bij iemand met ER α negatieve tumoren. Dit is het geval bij Tamoxifen: een middel vaak gebruikt bij het bestrijden van borstkanker door te binden aan ER α ^[38]. Sommige studies geven aan ER α screening te doen om te bepalen of een hormoon therapie zin zou hebben^[39].

8.2 Conclusies

Microarray's:

Uit het microarray experiment kan geconcludeerd worden dat de expressie van een aantal genen in ons muismodel significant is veranderd door een bepaalde behandeling met isoflavonen. De verschillen in de gevonden genen zouden mogelijk een effect kunnen hebben op de tumor ontwikkeling, echter om dit te bewijzen is extra onderzoek vereist.

qPCR:

We zijn erin geslaagd om het expressie verschil voor p21 en Dbp van de microarray te bevestigen met qPCR. Waarbij ook hetzelfde patroon is ontstaan tussen de groepen. Ook is er van ER α een expressie verschil aangetoond in de levenslange blootstellinggroep.

Immunohistochemischekleuring:

We hebben met de ER α kleuringen aangetoond dat de borsttumoren in ons muismodel geen eiwitexpressie meer hebben van ER α , en dat dit eiwit in de borstklieren wel tot expressie kwam. We zijn er niet in geslaagd om hierbij een onderscheid te maken tussen de behandelingsgroepen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat met deze methode geen effecten worden waargenomen bij blootstelling aan isoflavonen op de eiwitexpressie van ER α .

Totaal:

We hebben in deze studie geprobeerd effecten te vinden van isoflavonen op het ontstaan van borsttumoren. Effecten van isoflavonen hebben we op gen expressie niveau aan kunnen tonen. Of er een effect is van isoflavonen op het ontstaan van borsttumoren kan op basis van onze resultaten moeilijk gezegd worden. Hoewel er een verhoogd percentage tumorvrije overleving is in de levenslange blootstellinggroep, mag hieruit niet geconcludeerd worden dat dit door de behandeling met isoflavonen komt. Wel moedigen deze resultaten aan tot een vervolg onderzoek. Hierbij kan gedacht worden aan studies waarin wordt onderzocht welk effect de gevonden genen hebben op de borsttumor ontwikkeling. Ook is het belangrijk verder te kijken naar het effect van de isoflavonen op de expressie van deze genen. Daarnaast is het noodzakelijk meer inzicht te krijgen in de interactie tussen genen zoals p21, ER α , β , Dlx1, p53 en cyclin D1.

9. Literatuurlijst

1. Incidence of cancer in the Netherlands, VIKC 2004, 1999-2000
2. <http://www.kwfkankerbestrijding.nl>
3. Beatson GT. The treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* 1896;2:104-7.
4. Nandi S, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3650-7.
5. Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis Annu Rev Pharmacol Toxicol 1996;36:203-32
6. Rosner B, Colditz GA, Nurses' Health Study: log-incidente mathematical model of breast cancer incidence. *J Natl Cancer inst* 1996;988:359-64.
7. Paffenbarger RS Jr, Kampert JB, Chang HG. Characteristics that predict risk of breast cancer before and after menopause. *Am J Epidemiol* 1980;112:258-68.
8. Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, et al. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. *Res* 1999;59:1015-20.
9. Weston A, Pan CF, Bleiweiss IJ, et al. CYP17 genotype and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:941-4.
10. Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson JA: Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* 2003, 546:17-24.
11. E Robson, P Chappuis.: Differences in survival based on BRCA1/BRCA2 mutation status and administration of adjuvant treatment. *Breast Cancer Res* 2004.
12. C Blackburn, D Jerry.: Knockout and transgenic mice of Trp53: what have we learned about p53 in breast cancer? *Breast Cancer Res* 2002, 4: 101-111.
13. <http://tgmouse.compmed.ucdavis.edu/molpaths/p53/p53indexpage.htm>
14. Lemmon MA.: The EGF receptor family as therapeutic targets in breast cancer. *Breast Dis.* 2003;18:33-43.
15. Shibata MA, Yoshidome K, Shibata E, Jorcyk CL, Green JE.: Suppression of mammary carcinoma growth in vitro and in vivo by inducible expression of the Cdk inhibitor p21. *Cancer Gene Therapy* 2001 Jan;8(1):23-35.
16. Ferlay J, Bray F, Pisani P, and Parkin DM: GLOBOSCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC CancerBase No. 5, Lyon, France: IARC Press, 2001.
17. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, et al.: Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *JNCI* 85, 1819-1827, 1993.
18. Key TJ, Allen NE, Spencer EA, and Travis RC: The effect of diet on risk of cancer. *Lancet* 360,861-868,2002.
19. Messina MJ, Persky V, Setchell KD, and Barnes S: Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 21, 113-131, 1994.
20. Peeters PH, Keinan-Boker L, Van Der Schouw YT, and Grobbee DE: Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Res Treat* 77, 171-183,2003.
21. Horn-Ross PL, Hoggatt KJ, West DW, Krone MR, Stewart SL, et al.: Recent diet and breast cancer risk in the California Teachers Study (USA). *Cancer Causes Control* 13,407-415,2002.
22. Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S, and Tsugane S: Soy isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *JNCI* 95,906-913,2003.
23. Wu AH, Wan p, Hankin J, Tseng CC, Yu MC, et al.: Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis* 23, 1491-1496,2002.
24. Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Potter JD, et al.: Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer epidemiol Biomarkers Prev* 10,483-488,2001.
25. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, et al.: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263, 1998.
26. Bouker KB and Hilakivi-Clarke L: Genistein: does it prevent or promote breast cancer? *Environ Health Perspect* 108,701-708,2000.
27. George G. J. M. Kuiper, Josephine G. Lemmen: Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor B. *Endocrinology* Vol. 139,4252-4263, 1998.

28. M.Luijten, J.A.H. van den Berg, P.W. Wester, A. Verhoef: Effects of Soy-Derived Isoflavones and a High-Fat Diet on Spontaneous Mammary Tumor Development in Tg.NK(MMTV/c-neu) Mice. *Nutrition and Cancer*, 50(1), 46-54.
29. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, et al.: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244,707-712, 1989.
30. Rao GN, Ney E, and Herbert RA: Influence of diet on mammary cancer in transgenic mice bearing an oncogene expressed in mammary tissue. *Breast Cancer Res Treat* 45, 149-158, 1997.
31. A.Tanner et al. *Clin Lab Haem* 2002, 24, 337-341
32. Gururaj AE, Rayala SK, Kumar R.: p21-activated kinase signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 20057, 5-12. 2004.
33. Alli PM, Pinn ML, Jaffee EM, McFadden JM, Kuhajda FP.: Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene* 6, 39-46 2005.
34. Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM.: Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res* 63, 132-9 2003.
35. Zoë E Winters, Russell D Leek, Mike J Bradburn.: Cytoplasmic p21^{WAF1/CIP1} expression is correlated with HER-21 neu in breast cancer and is an independent predictor of prognosis. *Breast Cancer Res* 2003, 5:R242-R249.
36. Ailaman-Pillet N, Roduit R, Oberson A, Abdelli S, Ruiz J, Beckmann JS, Schorderet DF.: Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Oct 29;226(1-2):59-66.
37. Benita S Katzenellenbogen and John A Katzenellenbogen.: Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta - regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2000; 2(5): 335-344
38. Medina D, Kittrell FS, Hill J, Shepard A, Thordarson G, Brown P.: Tamoxifen inhibition of estrogen receptor-alpha-negative mouse mammary tumorigenesis. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3493-6.
39. van 't Veer W, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA.: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.

Bijlagen:

1. Algemene informatie stageplek
2. Werking van estradiol – Estrogen Receptor complex
3. qPCR resultaten
4. Scoren van immunohistochemische kleuring

1. Algemene informatie stageplek

RIVM algemeen:

Het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) is het onderzoeksinstituut van de overheid op het gebied van volksgezondheid en milieu. Het Milieu- en Natuurplanbureau is ook ondergebracht bij het RIVM. Het RIVM verricht niet alleen zelf onderzoek, maar verzamelt ook wereldwijd kennis en past die kennis toe. Het RIVM brengt jaarlijks een groot aantal rapporten en adviezen uit. Bij het RIVM, dat gevestigd is in Bilthoven, werken ongeveer 1550 mensen.

Het onderzoek en de adviestaak van het RIVM hebben betrekking op:

- de ontwikkeling van de volksgezondheid en de gezondheidszorg
- de effecten van voeding en andere consumentenproducten op de gezondheid
- milieu- en natuurvraagstukken
- voorbereidingen, maatregelen en nazorg die nodig zijn bij calamiteiten en rampen.

Opdrachtgevers

Het RIVM voert met name onderzoek uit voor de ministeries van VWS, VROM en LNV, inspecties en internationale organisaties zoals de Europese Unie en de Verenigde Naties.

Afdeling Toxicologie Pathologie & Genetica (TOX)

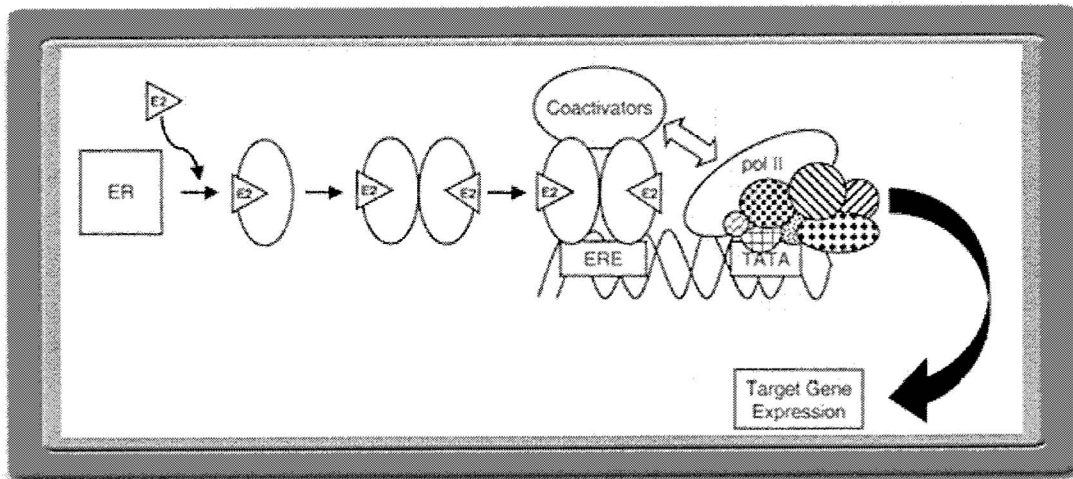
De overheid streeft ernaar dat mensen in goede gezondheid geboren worden, opgroeien en oud worden. Het voorkomen of beperken van chronische ziekten en infecties levert daar een belangrijke bijdrage aan. Het is belangrijk om te onderzoeken hoe deze ziekten ontstaan en te voorspellen waar de problemen zich voor zullen doen. Het laboratorium voor Toxicologie, Pathologie en Genetica (TOX) houdt zich hiermee bezig. TOX onderzoekt bijvoorbeeld hoe stoffen of biologische producten (zoals vaccins) de gezondheid kunnen schaden of juist verbeteren. Met dit onderzoek adviseert TOX de overheid over de toelating van stoffen, geneesmiddelen en vaccins. Maar ook hoe voorlichting aan de bevolking gegeven kan worden over voedingsmiddelen, tabaksproducten of medische hulpmiddelen.

Niet iedereen ondervindt dezelfde soort gezondheidsproblemen. Individuele verschillen in gevoeligheid kunnen een genetische oorsprong hebben, maar kunnen ook ontstaan tijdens het leven. TOX onderzoekt in welke mate erfelijke aanleg, verworven gevoeligheid, huidige blootstelling aan agentia of juist combinatie daarvan leiden tot bepaalde typen ziekten of infecties.

Onderzoeksgebieden:

1. Genetica, voeding en veroudering
2. Voeding, **allergie** en overgevoeligheid
3. Voeding en zwangerschap
4. Genetica, voeding en chronische ziekten
5. Schadelijke stoffen in consumentenproducten
6. Gezondheidseffecten van tabaksproducten
7. Infectieziekten pathologie
8. Alternatieven voor dierproeven

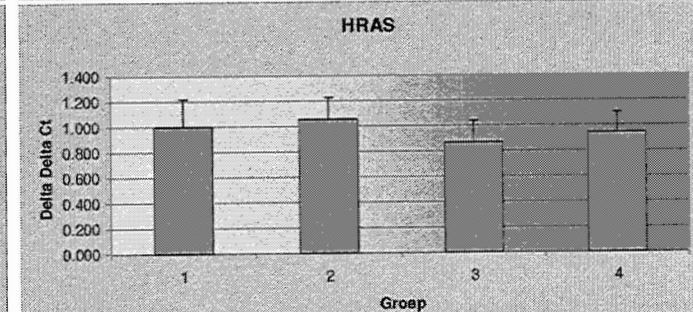
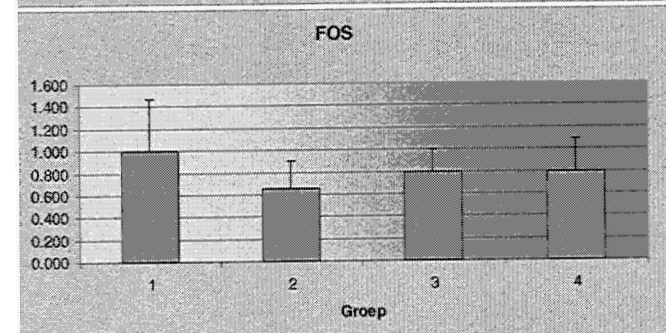
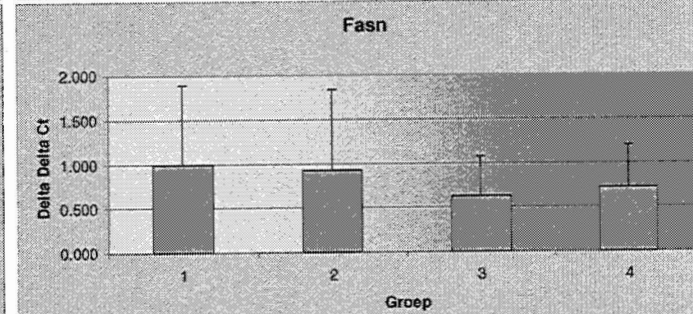
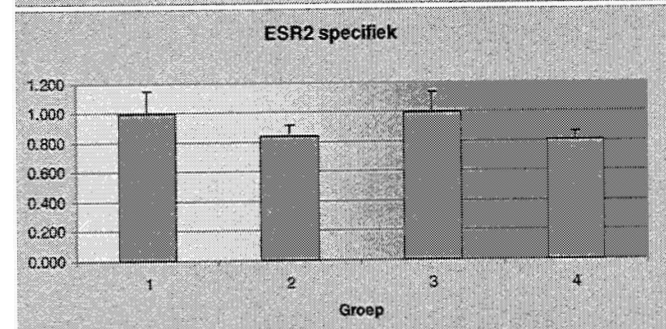
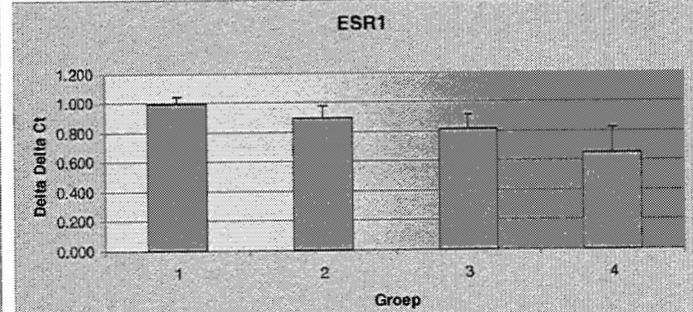
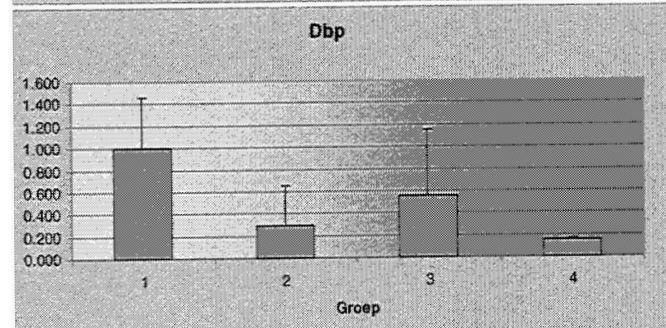
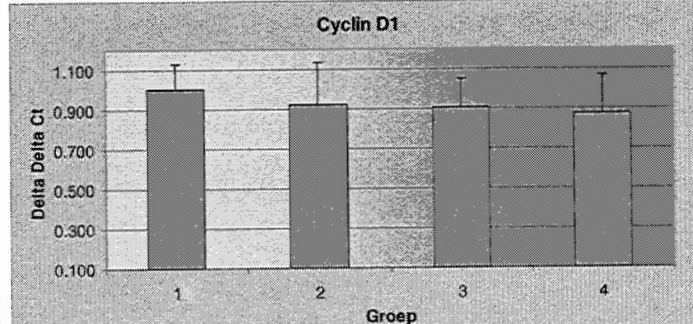
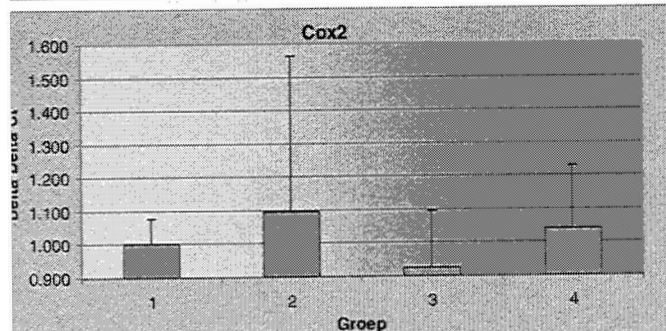
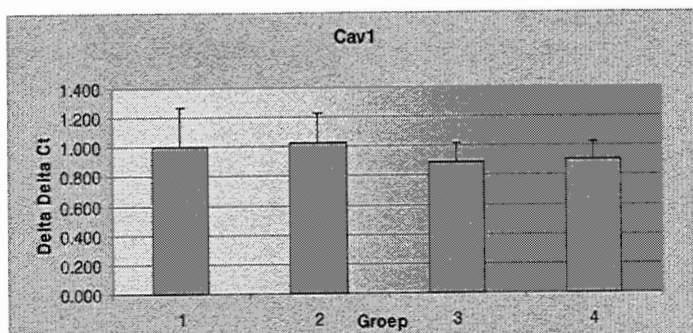
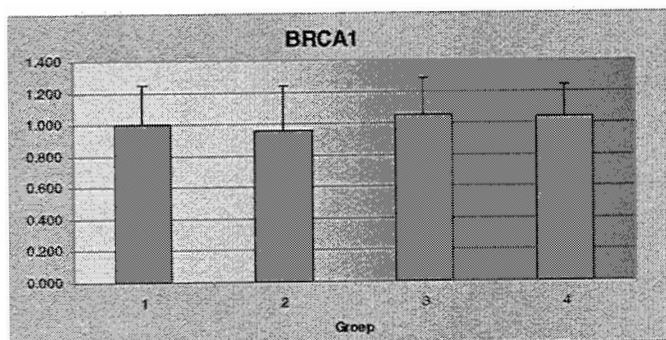
2. Werking van estradiol – Estrogen Receptor complex

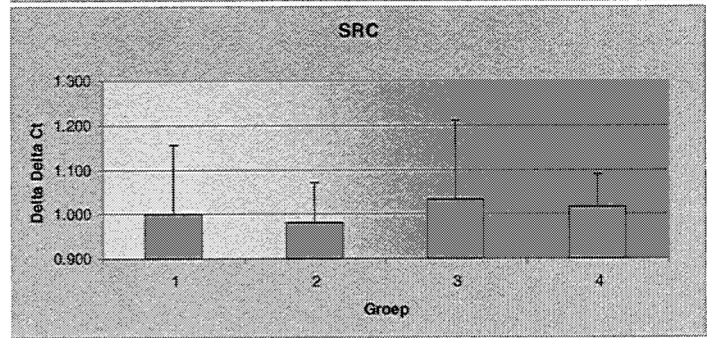
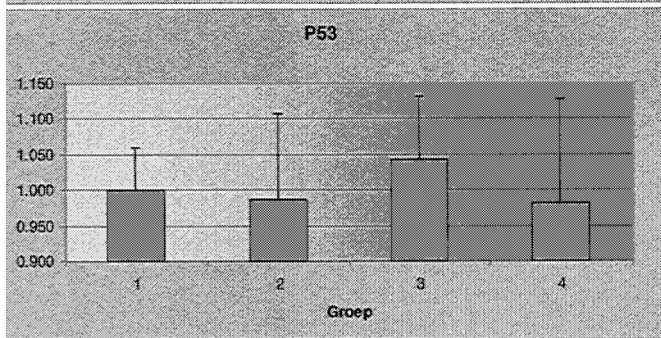
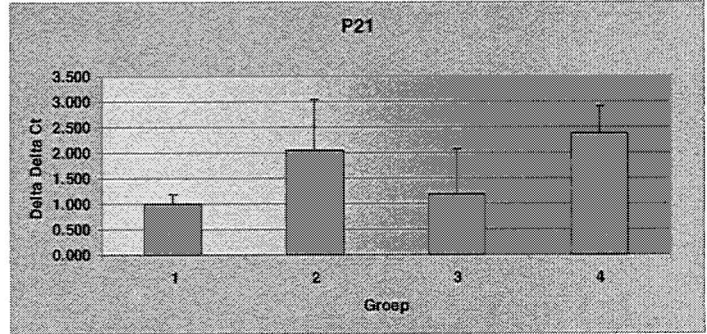
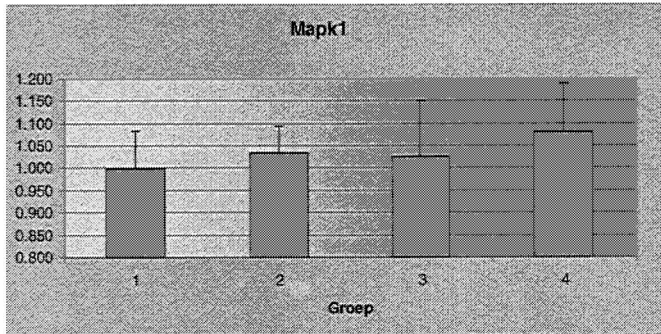


Figuur 21: Werking van estradiol (E2) op Estrogen Receptor (ER) en Estrogen Response Element (ERE) voor activatie van target genen.

In figuur 21 is een schematische weergave te zien van gen activatie door Estradiol (E2) via de Estrogen Receptor (ER). Het E2-ER complex bindt op het DNA aan Estrogen Response Elements (ERE). Doormiddel van coactivatie vindt de transcriptie plaats van bepaalde target genen. Dit mechanisme is ook van belang bij behandeling met isoflavonen, omdat die ook kunnen binden aan ER.

3. qPCR resultaten





Dit zijn alle resultaten van de qPCR met bijbehorende $\Delta\Delta C_t$ waarden voor elke groep van elk gen.

4. Scoren van immunohistochemische kleuring

Muis nr.	Tumor	Borstklier
149a L1	-	+
136BL	-	+
92a	-	+
74BL	-	+
142BL	-	+
158L1	-	+
137L1	-	+
105aL2R1	-	+
55L1R1	-	+
6L2	-	+
65L1	-	+
120BL	-	+
153R1	-	+
137R1	-	+
2L1	-	+
37R1	-	+
59BL	-	+
142BL	-	+
76R1	-	+
92L2	-	+
47BL	-	+
103	-	+
12L2	-	+
14L2	-	+
66R1	-	+
35R1	-	+

Tabel 25: Scoren fabel van ER α kleuringen op coupes van borstklieren en borsttumoren uit volwassen muizen (+ = positief, - = negatief).