

# Kanker bespieden met behulp van intravitale microscopie

Evelyne Beerling

*Nederlands Kanker Instituut, Moleculaire Pathologie, Amsterdam. e.beerling@nki.nl*

Kanker is een ziekte die, ondanks de enorme hoeveelheid kennis die de afgelopen decennia is verworven, nog steeds één van de meest voorkomende doodsoorzaken is in de Westerse wereld. De ziekte ontstaat door een opeenstapeling van fouten in het DNA, waardoor cellen uiteindelijk niet meer luisteren naar afremmende signalen en zich ongelimiteerd kunnen gaan vermenigvuldigen. De ontwikkeling van kanker wordt gekenmerkt door vele stappen, waaronder primaire tumorgroei, het losraken van tumorcellen van de primaire tumor en hun beweging door omliggend gezond weefsel.

Slechts enkele van deze losse tumorcellen kunnen, als ze eenmaal de bloedbaan bereikt hebben, overleven en op een andere plek in het lichaam de bloedbaan uit komen om zich daar te vestigen als uitzaaiing [1]. Al deze stappen zijn essentieel voor het vormen van uitzaaiingen, waaraan uiteindelijk de meeste patiënten overlijden. Het is daarom van groot belang om te bestuderen welke tumorcellen in staat zijn om in delen van het lichaam nieuwe kolonies te vormen en op welke manier ze deze ziekte zo dodelijk maken. Met deze informatie kan in de toekomst gericht gewerkt worden aan de ontwikkeling van kanker specifieke medicatie om deze kwaadaardige cellen te stoppen en zo het aantal kankerpatiënten dat aan deze ziekte overlijdt drastisch omlaag te brengen.

## Intravitale microscopie

Onderzoek naar de uitgroei en het uitzaaien van tumorcellen heeft al veel informatie opgeleverd over welke mechanismen tumorcellen gebruiken om ongeremd te delen en om zich te bewegen. Hiervoor wordt voornamelijk gebruik gemaakt van methodes om grote hoeveelheden tumorcellen in plastic schalen, buiten het lichaam, te kweken en te onderzoeken (*in vitro*). In deze situatie is de natuurlijke 3D-omgeving waarin tumorcellen zich normaalgesproken in het lichaam bevinden afwezig. Het is cruciaal om het gedrag van individuele tumorcellen ook in levende wezens (*in vivo*) te bestuderen, in de »

aanwezigheid van alle factoren die van invloed zijn (zoals bijvoorbeeld bloedvaten en het immuunsysteem), om het menselijke ziekteproces zo goed mogelijk na te bootsen en te begrijpen. Aangezien het uitzaaiingsproces zeer dynamisch is, zijn er geavanceerde filmtechnieken nodig om deze processen tot in detail en over de tijd te kunnen bestuderen. Bewegende beelden zijn veel informatiever dan stilstaande beelden. Op een afbeelding van een histologische coupe van een primaire tumor is het bijvoorbeeld vrijwel onmogelijk om te voorspellen welke tumorcellen bewegen, los gaan komen en door het omliggende gezonde weefsel gaan migreren. In het lab van Prof. Dr. Jacco van Rheenen op het Nederlands Kanker Instituut in Amsterdam worden technieken ontwikkeld om kankercellen te filmen in levende muizen, intravitale microscopie (IVM) genaamd. Met behulp van deze geavanceerde technieken kan het gedrag van zowel individuele als specifieke groepen (tumor)cellen gedurende alle stappen van het proces van tumorgroei en uitzaaiing bestudeerd worden [2]. Dit levert veel informatie op die essentieel is om te begrijpen hoe tumorcellen zich verspreiden door het lichaam en om betere medicatie te ontwikkelen tegen deze kwaadaardige kankercellen.

### **DNA van kwallen**

Om intravitale microscopie van tumorcellen te realiseren moeten de tumorcellen te onderscheiden zijn van het omliggende weefsel. Stukjes DNA (een gen) van een groen fluorescerend eiwit van kwallen wordt in het DNA van tumorcellen gebouwd zodat deze cellen groen oplichten zodra men dit eiwit met licht van een bepaalde golflengte aanstraalt (fluorescentie). Inmiddels zijn er veel verschillende fluorescerende eiwitten bekend en kunnen verschillende cellen gemarkeerd worden met verschillende kleuren. Ook kan door gebruik te maken van weefsel specifieke genregulatie de expressie van een fluorescent eiwit beperkt worden tot dat specifieke weefsel, wat hiermee heel gericht zichtbaar wordt gemaakt. Door gebruik te maken van bijvoorbeeld een borstklier specifieke genregulatie kan gelijktijdige expressie van een oncogen en een fluorescent eiwit geïnduceerd worden, waardoor de gevormde borsttumoren gevolgd kunnen worden.



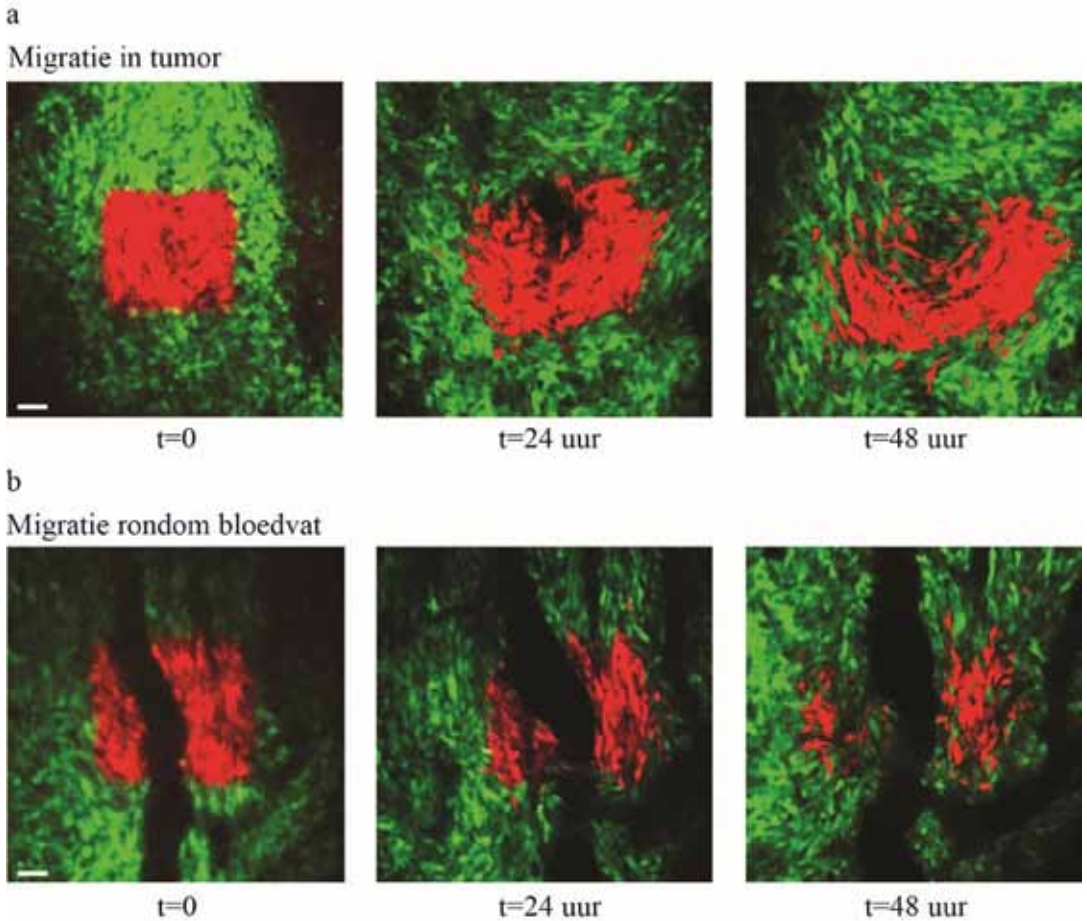
Naast fluorescente markeringsmethoden is er nog een methode essentieel voor het in beeld brengen van tumorcellen in levend weefsel. Wanneer fluorescente (tumor)cellen in vitro worden bekeken met een microscoop, betreft het één of hooguit enkele cellagen. Deze kunnen goed in beeld worden gebracht met een confocale microscoop, waarbij gebruik gemaakt wordt van licht met golflengtes van 400-700 nanometer (zichtbaar licht) om de fluorescente eiwitten aan te stralen. In vivo zijn er uiteraard meerdere lagen van cellen die kunnen worden bestudeerd, of liggen de cellen die gevolgd worden niet aan de oppervlakte maar dieper in het weefsel. Hiervoor is een geavanceerde microscoop nodig, die diepliggend weefsel kan belichten zonder het te beschadigen. De 2-photon microscoop heeft deze eigenschappen, omdat gebruik gemaakt wordt van infrarood licht. Dit licht heeft een grotere golflengte (> 780 nanometer), waardoor het minder kans heeft om afgebogen te worden door omliggende moleculen en zo diep in weefsel kan doordringen. Bij 2-photon microscopie worden fluorescente moleculen in actieve staat gebracht door gelijktijdige absorptie van 2 fotonen (lichtdeeltjes), waardoor op één specifieke plaats in het weefsel (in het brandpunt) aanstraling plaatsvindt. Hierdoor wordt de rest van het weefsel niet aangestraald, wordt het niet beschadigd en neemt de fluorescentie daar niet af [2,4].

Al deze methoden samen maken het mogelijk om in levend weefsel dezelfde tumorcellen over meerdere dagen te bestuderen, op (sub)cellulair niveau. Hiermee kan een enorme hoeveelheid essentiële informatie vergaard worden over de eigenschappen van deze kwaadaardige cellen. Om een paar voorbeelden te geven van de mogelijkheden binnen het kankeronderzoek worden hieronder twee studies in meer detail beschreven.

### **Migratie van tumorcellen in de primaire tumor bekijken**

Het dogma binnen het kankeronderzoek is dat tumorcellen aan de rand van de primaire tumor, waar een vezelig laagje (de basaalmembraan) de tumor omringt, losraken en door de basaalmembraan breken. Zo kunnen de tumorcellen het omliggende gezonde weefsel in bewegen en via de bloedbaan naar andere organen verspreiden. Als pathologen een tumor bestuderen, kijken ze daarom onder andere of de basaalmembraan doorbroken is en er tumorcellen te vinden zijn in het omliggende weefsel. Is dit niet het geval, dan wordt de tumor veelal als minder kwaadaardig beoordeeld. Maar de vraag is of tumorcellen middenin de tumor ook bewegen en of dit eventueel van belang is. Zijn deze tumorcellen wellicht ook in staat om uitzaaiingen te vormen?

Deze vragen kunnen met behulp van intravitale microscopie beantwoord worden. Zo werd bijvoorbeeld gebruik gemaakt van een markeringsmethode om individuele tumorcellen over de tijd van elkaar te kunnen onderscheiden. Als alle tumorcellen in een tumor dezelfde kleur hebben in hun cytoplasma, is soms lastig te zien of ze bewegen, omdat er één gelijk gekleurde massa cellen te zien is door de microscoop. Daarom werden de tumorcellen voorzien van Dendra2, een groen-fluorescent eiwit met een bijzondere eigenschap: het is photo-switchable. Dit houdt in dit geval in dat de groene kleur kan worden veranderd in rood door middel van aanstraling met een lasergolflengte van 405 nanometer. Wanneer Dendra2-groene tumorcellen worden aangestraald met licht van deze golflengte, verdwijnt het groen fluorescerende eiwit en komt er rood voor in de plaats. Zo kan van individuele (tumor) cellen de kleur van groen naar rood gewisseld worden, zodat een rode cel in een groep van groene cellen gevolgd kan worden over de tijd. Door dezelfde plek binnen een borsttumor bestaande uit Dendra2 tumorcellen over meerdere dagen te bekijken en het switchen van groen naar rood van enkele tumorcellen in het midden van de tumormassa, werd vervolgens over meerdere dagen bestudeerd of deze rode tumorcellen bewogen door de tumormassa [2, 5]. Dit bleek het geval te zijn (afb. 1a), dus tumorcellen bewegen zich niet alleen aan de >>

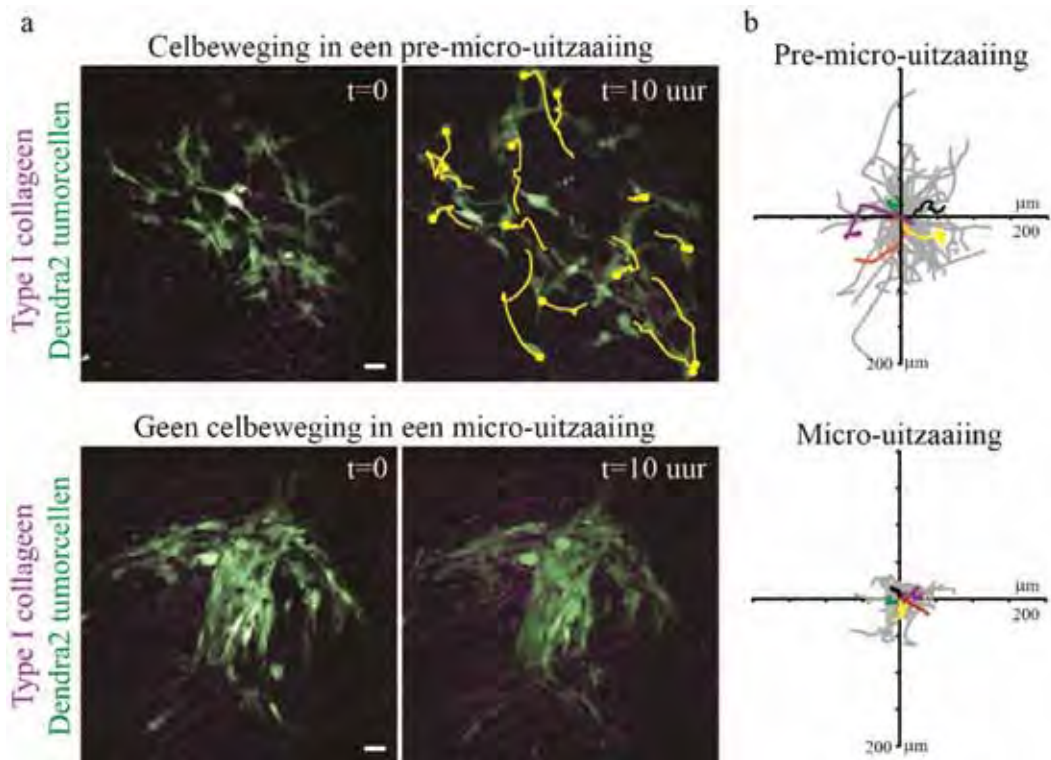


Afbeelding 1: Bekijken van tumorcelmigratie in de primaire tumor  
 IVM afbeeldingen van een tumor bestaande uit tumorcellen die het photo-switchable fluoresceente eiwit Dendra2 tot expressie brengen. Er zijn enkele tumorcellen (in de vorm van een vierkant) aangestraald met een 405 nm laser, waardoor Dendra2 van groen naar rood is geswitcht. Over de tijd (van links naar rechts) is te zien dat de rood geswitchte tumorcellen bewegen a) binnenin de tumor en b) rondom bloedvaten binnenin de tumor. Schaal = 20 micrometer ( $\mu\text{m}$ ). t= tijd na switching. Afbeeldingen zijn met toestemming afkomstig uit (2) en aangepast ten behoeve van dit artikel.

rand van de tumor! Ook rondom bloedvaten in de tumor was te zien dat na enkele dagen de meeste roodgekleurde tumorcellen verdwenen waren (afb. 1b). De vervolgvraag was of deze roodgekleurde tumorcellen naast bewegen ook in staat zijn om een ander orgaan te bereiken en daar een uitzaaiing te vormen. Met andere woorden: beweging van tumorcellen binnenin de tumor gebeurt, maar is het ook gevaarlijk? Tijdens het bestuderen van de longen van de dieren met Dendra2 rood-geswitchte tumorcellen in de borsttumor, werden roodgekleurde tumorcellen gevonden, wat bevestigt dat ook tumorcellen binnenin de tumor hun weg naar de longen kunnen vinden [5]. Deze bevindingen zijn erg belangrijk voor het diagnosticeren en behandelen van kanker, aangezien ook van deze cellen voorkomen moet worden dat ze zich nestelen in andere organen.

### Uitzaaiende tumorcellen bespieden in de lever

Het is belangrijk om ook te begrijpen hoe cellen na het losraken van de primaire tumor en het bereiken van andere organen de groei van uitzaaiingen bewerkstelligen. Met deze kennis kan



Afbeelding 2: Bekijken van tumorcelmigratie in leveruitzaaiingen

Beweging van cellen in een pre-micro-uitzaaiing, maar niet in een micro-uitzaaiing. a) Tumorcellen die Dendra2 tot expressie brengen (in groen) tussen de omliggende extracellulaire matrix (in paars). Gele lijnen geven de afgelegde route van individuele cellen weer. Te zien is dat migratie afwezig is zodra de uitzaaiing een bepaalde grootte bereikt heeft. Schaal = 20  $\mu\text{m}$ . t= tijd. b) Grafiek waarin de afgelegde routes van individuele cellen zijn weergegeven, met een paar voorbeelden uitgelicht in kleur. Afbeeldingen zijn met toestemming van AAAS afkomstig uit (3) en aangepast ten behoeve van dit artikel.

de behandeling van deze uitzaaiingen worden aangepast om zo een hogere kans op succes te bereiken. Door te filmen hoe leveruitzaaiingen ontstaan werd bestudeerd hoe tumorcellen arriveren en kolonies vormen in de lever [3]. Wat opviel was dat er na aankomst van de tumorcellen in de lever celdeling plaatsvindt en tumorcellen blijven bewegen, totdat de uitzaaiing een bepaalde grootte heeft. Daarna neemt de beweging van de uitgezaaide cellen af en vindt er vrijwel alleen nog maar celdeling plaats (afb. 2a, b). Deze beginfase van uitzaaien heeft de term pre-micro-uitzaaiing gekregen, omdat het een belangrijk apart stadium voorafgaand aan de vorming van een micro-uitzaaiing blijkt te zijn. Wanneer de beweging van tumorcellen tijdens deze periode namelijk werd geremd door het toedienen van bepaalde medicatie, was er een significante afname te zien van het aantal micro-uitzaaiingen en totaal tumorvolume in de lever van de onderzochte dieren [3]. Migratie blijkt dus niet alleen essentieel te zijn tijdens de eerste stappen van het uitzaaiingsproces bij het losraken van de primaire tumor, maar ook tijdens het koloniseren van anderen organen!

## De toekomst van IVM in kankeronderzoek

Het werkgebied van IVM ontwikkelt zich continu. Nieuwe therapieën worden ontwikkeld waarvan de werkzaamheid direct tot in detail kan worden bestudeerd door het gedrag van kankercellen te filmen en ook de ontwikkeling van de microscopie staat niet stil. Zo wordt de resolutie (zowel in de tijd als in de ruimte) steeds geoptimaliseerd en worden biosensoren >>

ontwikkeld die het visualiseren van allerlei processen in individuele (tumor)cellen kunnen verwezenlijken. Er is steeds meer mogelijk, de vooruitgang van IVM en kankeronderzoek in het algemeen gaat razendsnel.

Zonder de toepassing van IVM was de kennis die hierboven beschreven is niet wereldkundig geworden, en door de inzet van deze techniek zal deze tak van kankeronderzoek in de toekomst nog veel meer bijdragen aan het ontrafelen van de methoden die door tumorcellen worden gebruikt om te ontstaan, te groeien en uit te zaaien. Hierdoor kan er op een steeds adequatere en preciezere manier gehandeld worden tijdens de diagnose en behandeling, om zo het aantal patiënten en slachtoffers van kanker drastisch te verminderen.

## Bronnen

1. Talmagde JE, Fider IJ (2010) *AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective*. Cancer Research, July 15, 70(14), 5649–5669
2. Beerling E, Ritsma L, van Rheenen J et al (2011) *Intravital microscopy: new insights into metastasis of tumors*. Journal of Cell Science, 124, 299–310
3. Ritsma L, Steller EJ, Van Rheenen J et al (2012) *Intravital microscopy through an abdominal imaging window reveals a pre-micrometastasis stage during liver metastasis*. Science Translational Medicine, Oct 31, 4(158), 158ra145
4. Dunn KW, Young PA (2006) *Principles of multiphoton microscopy*. Nephron. Experimental Nephrology, 103, e33–e40.
5. Kedrin D, Gligorijevic B, Van Rheenen J et al (2008) *Intravital imaging of metastatic behavior through a Mammary Imaging Window*. Nature Methods, Dec, 5(12), 1019–1021.

«

coenen  
consultancy

# Advies op proefdierkundig gebied

Interim management

Waarnemingen IvD

Ondersteuning CCD aanvraag

Voorbereiding AAALAC accreditatie



Tineke Coenen,  
Laboratory Animal Scientist  
Coenen Consultancy B.V.  
info@coenenconsultancy.nl  
06515158207

