



Producers en karakteriseren
van DNA-constructen voor
fluorescente reporter eiwitten
Bente Megens

Fontys Hogeschool Toegepaste
Natuurwetenschappen

&

TU/e Groep den Toonder

18 november 2024



> FOR SOCIETY

TU/e EINDHOVEN
UNIVERSITY OF
TECHNOLOGY

Produceren en karakteriseren van DNA-constructen voor fluorescente reporter eiwitten

Auteur

Bente Petronella Megens
bente.megens@student.fontys.nl
bente.megens@hotmail.com

Opleiding

Fontys Hogeschool
Instituut Toegepaste Natuurwetenschappen
Applied Science
Rondom 1, 5612AP Eindhoven, Nederland

Afstudeermentor

Dr. ir. Mariëlle Moonen
marielle.moonen@fontys.nl

Afstudeerplaats

Technische Universiteit Eindhoven
Biomedical Engineering
Groene Loper 3, 5612AE Eindhoven, Nederland

Bedrijfsmentor

Dr. ir. Oscar M.J.A. Stassen
o.m.j.a.stassen@tue.nl

Afstudeerperiode

5 februari 2024 – 20 september 2024

Datum van inlevering

18 november 2024

Goedgekeurd:



Dr. ir. Oscar Stassen
Eindhoven, 18 november 2024

Voorwoord

Voor u ligt mijn verslag in het kader van het onderzoek naar het produceren en karakteriseren van DNA-constructen voor fluorescente reporter eiwitten. Dit verslag is onderdeel van mijn afstudeerstage welke gedaan is aan het einde van mijn opleiding Applied Science, Fontys Hogeschool. Deze afstudeerstage is uitgevoerd bij Groep den Toonder van de Technische Universiteit Eindhoven in de periode van 5 februari tot en met 20 september 2024.

Tijdens mijn afstudeerstage heb ik tot mijn plezier ervaring op mogen doen met technieken als lentivirusproductie en fluorescentiemicroscopie. Daarnaast heb ik ook kennis gemaakt en samen mogen werken met de vele mensen die dagelijks bezig zijn met een breed scala aan onderzoek in de moleculaire biologie. Ik ben dankbaar dat ik deze mogelijkheid gekregen heb en kijk dan ook met plezier terug op mijn tijd bij Groep den Toonder.

Dit onderzoek had ik niet kunnen doen zonder een aantal specifieke mensen. Allereerst was Oscar Stassen dagelijks beschikbaar om mij te ondersteunen en om te sparren over experimenten en problemen die naar boven kwamen. Buiten dat ik enorm veel van Oscar heb geleerd, heb ik ook een hele leuke tijd gehad en ben ik blij dat hij mij heeft willen begeleiden bij dit laatste deel van mijn opleiding. Daarnaast ook dank aan Mariëlle Moonen voor de fijne begeleiding. Vanaf dag 1 is ze heel erg betrokken en enthousiast geweest over dit onderzoek en heeft ze me vertrouwen gegeven. Daarnaast was de kritische blik op mijn verslag ook fijn. Het motiveerde me om alles uit mezelf te halen wat betreft verslaglegging en daarvoor had ik geen betere begeleider vanuit Fontys Hogeschool kunnen hebben. Tot slot, dank aan alle mensen binnen Groep den Toonder en iedereen wie ik heb getroffen op het laboratorium, ik heb tijdens mijn afstuderen namelijk ook veel plezier gehad naast dat iedereen altijd klaar stond om te helpen.

Dank jullie wel!

Bente Megens, 18 november 2024

Samenvatting

Fluorescente reporter eiwitten bieden waardevolle inzichten in cellulaire processen, essentieel voor onder andere kankeronderzoek. Bij de Technische Universiteit Eindhoven maakt Groep den Toonder gebruik van geavanceerde technologieën zoals organs-on-chips om de organisatie van cellen te simuleren. In combinatie met fluorescente reporter eiwitten kan bijvoorbeeld de overgang van een epitheliaal naar een mesenchymaal fenotype worden gevisualiseerd; een belangrijk proces bij metastase. Voor dit onderzoek worden fluorescente reporters geproduceerd en gekarakteriseerd. Bij de productie worden er technieken gebruikt als Gibson assembly en gateway cloning om een lentivirale vector te produceren. Met deze lentivirale vectoren kunnen stabiele cellijnen worden gemaakt met de betreffende DNA-constructen in het DNA, waarna karakterisatie plaatsvindt met fluorescentie-microscopie. Dit onderzoek bevat vier deelonderzoeken: productie en karakterisatie van twee yes-associated proteïne 1-reporters (YAP-reporters), karakterisatie van een epitheliale-mesenchymale overgang-reporter (EMT-reporter), karakterisatie van een hypoxiereporter en tot slot productie van een Notch-reporter.

Een YAP-reporter kan gebruikt worden in onderzoek naar de signaalroutes van YAP, maar ook in kankeronderzoek. In dit onderzoek zijn er twee YAP-reporters gemaakt, beiden met een ander fluorescent eiwit. Met deze reporters zijn zeven stabiele cellijnen geproduceerd. Met een deel van deze cellijnen is karakterisatie van de reporters uitgevoerd. Voorlopig is daarmee aangetoond dat de reporter werkt zoals verwacht; er is echter meer onderzoek nodig.

Ook is er een EMT-reporter gekarakteriseerd. Dit is gedaan met behulp van co-kweek met MG-63 waardoor EMT geïnduceerd werd. De efficiëntie hiervan was erg laag, maar de reporter werkt wel naar behoren. De hypoxiereporter werkte ook naar behoren. Deze is onderzocht met drie cellijnen en verschillende zuurstofniveaus. Aangetoond is dat bij een laag zuurstofniveau deze reporter inderdaad actief wordt; maar er is nog niet aangetoond dat dit proces omkeerbaar is. Beide reporters kunnen worden gebruikt in kankeronderzoek, omdat EMT en hypoxie invloed hebben op kanker of de behandeling ervan.

Tot slot is er een Notch-reporter ontworpen en geproduceerd. Notch kan een rol spelen bij EMT en hypoxie, maar wordt ook onderzocht als oncogen en tumoronderdrukker. In dit onderzoek zijn er vier DNA-constructen voor een Notch-reporter geproduceerd en deze zijn klaar voor virusproductie.

Kortom, er is met succes een YAP-reporter geproduceerd, maar er is meer karakterisatie nodig. Bij de hypoxiereporter is aangetoond dat deze werkt, maar er kan meer onderzoek gedaan worden naar de stabiliteit van het eiwit. De EMT-reporter werkt ook, maar om efficiënter EMT te induceren kan worden gekeken naar chemische inductie of een 3D-kweekmethode. De Notch-reporter is klaar voor virusproductie en deze heeft dus nog karakterisatie nodig.

Summary

Fluorescent reporter proteins provide valuable insights into cellular processes, essential for research areas such as cancer. At Eindhoven University of Technology, Group den Toonder utilizes advanced technologies like organs-on-chips to simulate cell organization. Combined with fluorescent reporter proteins, processes like the transition from an epithelial to a mesenchymal phenotype can be visualized, a crucial step in metastasis. For this research, fluorescent reporters are produced and characterized. Techniques such as Gibson assembly and gateway cloning are used to produce a lentiviral vector. These lentiviral vectors are used to create stable cell lines with the produced DNA constructs integrated into their DNA, followed by characterization with fluorescence microscopy. This research includes four sub-studies: production and characterization of two YAP reporters, characterization of an epithelial-mesenchymal transition reporter, characterization of a hypoxia reporter, and finally, production of a Notch reporter.

A YAP reporter can be used in research into the signalling pathways of YAP, but also in cancer research. In this study, two YAP reporters were made, both with a different fluorescent protein. With these reporters, seven stable cell lines have been produced. Characterization of the constructs has been done with some of these cell lines. For the time being, this shows that the reporter works as expected, but more research is needed.

An EMT reporter has also been characterized. This was done by coculturing with MG-63 which induced EMT. The efficiency of this was very low, but the reporter works properly. The hypoxia reporter also worked properly. This has been studied with three cell lines and different oxygen levels. It has been shown that at a low oxygen level this reporter does indeed become active, but it is not yet shown that this process is reversible. Both reporters can be used in cancer research, as EMT and hypoxia affect cancer or its treatment.

Finally, a Notch reporter was designed and produced. Notch may play a role in EMT and hypoxia but is also being investigated as an oncogene and tumor suppressor. In this study, four DNA constructs for a Notch reporter were produced and these are ready for virus production.

In short, a YAP reporter has been successfully produced, but more characterization is needed. The hypoxia reporter has been shown to work, but more research can be done on the stability of the protein. The EMT reporter also works, but to induce EMT more efficiently, chemical induction or a 3D culture method can be considered. The Notch reporter is ready for virus production, so it still needs characterization.

Gebruikte afkortingen

Afkorting	Definitie
bp	Baseparen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMT	Epitheliale-mesenchymale transitie
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Fetal bovine serum
FP	Fluorescent eiwit
GFP	Green fluorescent protein
HIF	Hypoxia-inducible factor
HRE	HIF-responselementen
LATS	Large tumor suppressor kinase
MCF	Michigan Cancer Foundation
MST	Mammalian sterile 20-like kinase
NHDF	Normale menselijke dermale fibroblasten
NICD	Notch intracellulaire domein
PAR1	Protease-activated receptor 1
TEAD transcriptiefactoren	transcriptional enhanced associate domain transcriptiefactoren
WWTR1/TAZ	WW-domain-containing transcriptie regulator 1
YAP1/YAP	Yes-associated proteïne 1
ZEB-eiwitten	Zinc finger E-box binding homeobox 1 eiwitten

Inhoudsopgave

Voorwoord	iv
Samenvatting	v
Summary	vi
Gebruikte afkortingen	vii
1 Inleiding en achtergrondinformatie	1
1.1 Fluorescente reporter eiwitten.....	1
1.2 Processen binnen de tumorbiologie	2
1.2.1 YAP/TAZ en mechanotransductie	2
1.2.2 Cell-cell signalling en EMT	4
1.2.3 Hypoxie.....	4
1.2.4 Notch signaalroute	5
1.3 Methoden en analyses.....	6
1.3.1 Gateway cloning.....	6
1.3.2 Gibson assembly.....	7
1.3.3 Lentivirale vectoren	8
1.3.4 Fluorescentiemicroscopie	9
1.3.5 FACS.....	10
1.4 Plan van aanpak	10
2 Materialen en methoden	12
2.1 Kloneren YAP-reporters	12
2.2 Transfectie YAP-reporters.....	12
2.3 Transductie YAP-reporters.....	12
2.4 Celkweek.....	13
2.5 Karakterisatie YAP-reporters	13
2.6 Karakterisatie EMT-reporter	13
2.7 Karakterisatie hypoxiereporter	14
2.8 Kloneren Notch-reporters.....	14
2.9 Microscopie.....	14
2.10 Data-analyse	14
3 Resultaten	16
3.1 Productie en karakterisatie YAP-reporters	16
3.1.1 Productie van DNA-constructen eGFP-YAP en mScarlet3-YAP.....	16
3.1.2 Productie van stabiele cellijnen met eGFP-YAP en mScarlet3-YAP.....	17
3.1.3 Karakterisatie van eGFP-YAP en mScarlet3-YAP.....	18
3.2 Karakterisatie EMT-reporter	19
3.3 Karakterisatie hypoxiereporter	20
3.3.1 Visualisatie.....	20
3.3.2 Vergelijking van gemiddelde intensiteit bij verschillende zuurstofgehalten.....	21
3.3.3 Vergelijking van gemiddelde intensiteit op twee tijdstippen.....	23

3.3.4	<i>Onderzoek reversibel effect HRE-UnaG construct</i>	24
3.4	Productie Notch-reporters.....	25
3.5	Deliverables	27
4	Discussie	28
4.1	Productie en karakterisatie YAP-reporters	28
4.2	Karakterisatie EMT-reporter	29
4.3	Karakterisatie hypoxiereporter	29
4.4	Productie Notch-reporters.....	29
5	Conclusie	31
6	Aanbevelingen	32
7	Literatuurlijst	33
Bijlagen	A
Bijlage A	Gebruikte primers	A
Bijlage B	Maps van geproduceerde expressievectoren	B
Bijlage C	Selectie foto's karakterisatie van YAP	E
Bijlage D	Gemiddelde percentages bij karakterisatie van GFP-YAP	F
Bijlage E	Selectie foto's verlengde incubatie inhibitoren/activatoren	G
Bijlage F	Fotoselectie MM231, CAMA1 en MCF-7 bij hypoxie experimenten.....	K
Bijlage G	Scatterplots gemiddelde intensiteit per annulus hypoxie experimenten.....	L
Bijlage H	Gemiddelde intensiteiten bij hypoxie experimenten	M

1 Inleiding en achtergrondinformatie

Fluorescente reporter eiwitten kunnen veel inzicht geven in cellulaire processen [1], [2], [3]. Deze cellulaire processen zijn belangrijk in de fysiologie en pathologie, zoals bijvoorbeeld kanker. Hiernaar wordt veel onderzoek verricht, waarbij de fluorescente reporters helpen om de processen rondom kanker in kaart te brengen en te begrijpen. Er zijn veel soorten kanker en daarbij spelen meerdere processen een rol. Om onderzoek te kunnen doen naar deze processen, is het zaak om fluorescente reporters te produceren. Met deze fluorescente reporters kunnen in het laboratorium vervolgens onderzoeken worden gedaan naar deze processen.

Binnen de onderzoeksgroep Groep den Toonder aan de Technische Universiteit Eindhoven wordt onder andere met organs-on-chips gewerkt: een geavanceerde technologie die de mogelijkheid biedt om complexe biologische processen na te bootsen [4], [5]. Dit stelt onderzoekers in staat om kankeronderzoek te doen in een gecontroleerde omgeving. In het geval van bijvoorbeeld borstkanker, kunnen organs-on-chips worden ontworpen om een tumor en lymfevaten te simuleren, waardoor het migratiegedrag van kankercellen kan worden gevisualiseerd. Bovendien is het mogelijk om met behulp van fluorescente reporters deze processen te onderzoeken, waardoor inzicht wordt verkregen in de dynamiek van kankerprogressie. Een andere toepassing van fluorescente reporters is het onderzoek naar de overgang van een epitheliaal naar een mesenchymaal fenotype, een cruciaal proces bij kankermetastase. Door het gebruik van twee verschillende fluorescente reporters kunnen onderzoekers de veranderingen in de fluorescerende kleur van cellen volgen als gevolg van dit proces.

Voordat de processen gevisualiseerd kunnen worden, moeten er dus fluorescente reporters worden ontwikkeld. Het is hierbij zaak om allereerst na te gaan wat voor DNA-construct er nodig is. Zo kan het nodig zijn om tegelijkertijd een fluorescente reporter te hebben welke altijd te zien is, zoals een fluorescent eiwit dat gekoppeld is aan een eiwit in de celkern, en een fluorescente reporter welke zichtbaar wordt bij een bepaald proces zoals hypoxie. Vervolgens dient dit DNA-construct te worden geproduceerd, wat kan worden gedaan met achtereenvolgend een Gibson assembly, gateway cloning en lentivirusproductie. Het DNA-construct wordt dan vervolgens in cellen gebracht om stabiele lijnen te maken. Tot slot moet het construct worden gekarakteriseerd met fluorescentiemicroscopie. In de volgende paragrafen zal de theorie worden beschreven die nodig is voor dit onderzoek.

1.1 Fluorescente reporter eiwitten

Tegenwoordig spelen fluorescente eiwitten (FP's) een essentiële rol in biologisch onderzoek, met name in experimenten met live cell imaging [1], [2], [3]. Er is nu een breed scala aan FP's beschikbaar voor experimenten, maar oorspronkelijk was er maar één FP ontdekt: het groene fluorescente eiwit (GFP). Inmiddels zijn er tal van kleuren die kunnen worden gebruikt, zoals blauw, rood en geel. In combinatie met fluorescentiemicroscopie worden FP's gebruikt voor diverse toepassingen, zoals het markeren van organellen, onderzoek naar transcriptieregulatie en live cell imaging van fysiologische processen. Hierbij kan men bijvoorbeeld intracellulaire gebeurtenissen zoals pH-schommelingen en apoptose bestuderen. Een groot voordeel van FP's is dat deze kunnen worden gekoppeld aan een gen van interesse en dat de cel deze FP's zelf aanmaakt. Er kan daarnaast *in vivo* onderzoek worden gedaan op het niveau van een enkele cel, zonder fixatie van de cellen [6]. Bovendien hebben FP's een minder toxisch effect op cellen in vergelijking met fluoroforen. Hierdoor kunnen processen gedurende langere periodes zonder toevoegingen en celbeschadiging worden gevisualiseerd.

Hoewel het in theorie eenvoudig lijkt om een FP aan een gen van interesse te koppelen en deze in een cel te brengen om een bepaald eiwit te volgen, zijn er in de praktijk enkele uitdagingen. Transfectie van de vector kan allereerst stress aan de cellen veroorzaken. Daarnaast moet er kritisch worden gekeken naar de locatie van het FP-gen, de functionaliteit van de koppeling met het gen van interesse en mogelijke onderdrukking van fluorescentie. Het fusie-eiwit moet zich namelijk hetzelfde gedragen als het wildtype eiwit, wat kan worden beïnvloed door de oriëntatie van de fluorescentietag [7]. De plaatsing van de tag aan de N- of C-terminus kan de functie en subcellulaire lokalisatie van het eiwit verstoren. Afhankelijk van het onderzoek moet er ook rekening worden gehouden met aspecten zoals het type promotor in de vector.

Er zijn dus veel variabelen en veel keuzes om een construct met een FP te maken, maar er wordt dan ook veel onderzoek mee gedaan. Zo kunnen FP's effectief worden toegepast in bijvoorbeeld kankeronderzoek om de complexe moleculaire processen te begrijpen die bij kanker spelen.

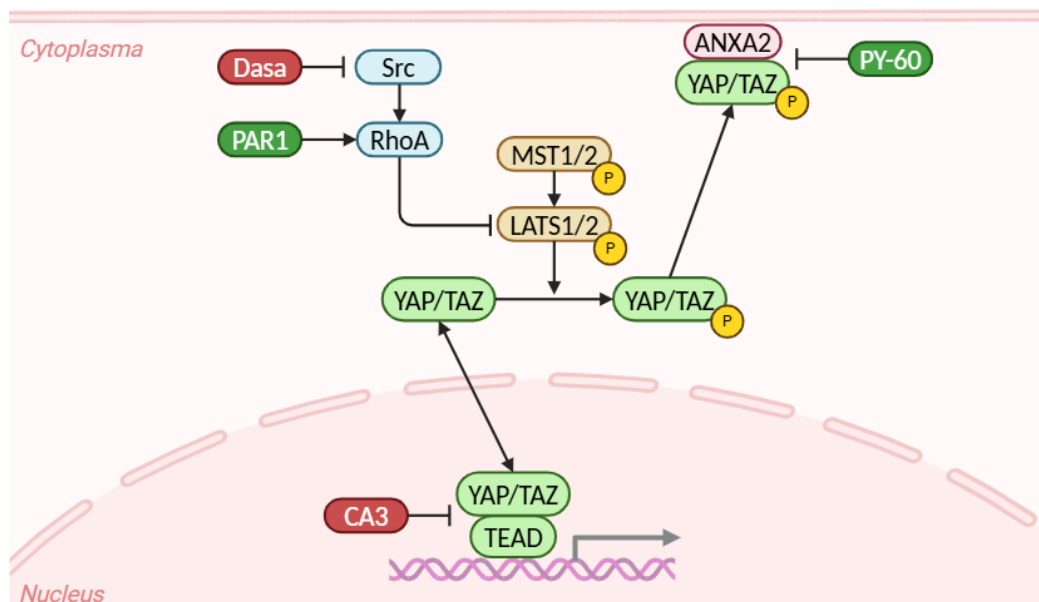
1.2 Processen binnen de tumorbiologie

Kanker is een complexe ziekte waarbij verstoringen in verschillende biologische processen leiden tot ongecontroleerde celgroei en verspreiding. In dit onderzoek worden vier processen rondom tumoren en kanker bij mensen besproken: YAP/TAZ en mechanotransductie, epitheliale-mesenchymale transitie (EMT), hypoxie en de Notch-signalroute. Deze processen dragen ieder op hun eigen manier bij aan ongecontroleerde celgroei, verhoogde celmigratie en/of resistentie tegen therapieën, wat tumorgroei en uitzaaiingen bevordert.

1.2.1 YAP/TAZ en mechanotransductie

De laatste tijd wordt er veel onderzoek gedaan naar het Yes-associated protein 1 (YAP1, verder aangeduid als YAP) [8], [9]. YAP werkt samen met de WW-domain-containing transcription regulator 1 (WWTR1, ook wel bekend en verder benoemd als TAZ). Deze twee eiwitten werden oorspronkelijk afzonderlijk geïdentificeerd, maar later werd ontdekt dat er een samenwerking is tussen de eiwitten als downstream mediator van de Hippo pathway bij de *Drosophila melanogaster* homolog Yki [10]. Bij activatie bevindt YAP/TAZ zich in de nucleus terwijl deze normaliter in het cytoplasma aanwezig zijn. In de nucleus bindt YAP/TAZ aan transcriptional enhanced associate domain transcriptiefactoren (TEAD transcriptiefactoren) en vindt er transcriptie plaats.

Normaal gesproken wordt YAP/TAZ goed gereguleerd. Dit gebeurt onder invloed van de Hippo pathway [11]. De Hippo pathway wordt in gang gezet door gefosfoyleerde mammalian sterile 20-like kinase 1 en 2 (MST1/2) (Figuur 1). Vervolgens fosforyleert MST1/2 large tumor suppressor kinase 1 en 2 (LATS1/2). LATS1/2 zorgt voor de fosforylatie van YAP/TAZ waarmee verplaatsing naar de nucleus wordt geblokkeerd. LATS1/2 kan onder andere geïnhibeerd worden door Src kinasen via Ras homolog family member A (RhoA) [12]. In dat geval zal YAP/TAZ zich overwegend in de nucleus bevinden.

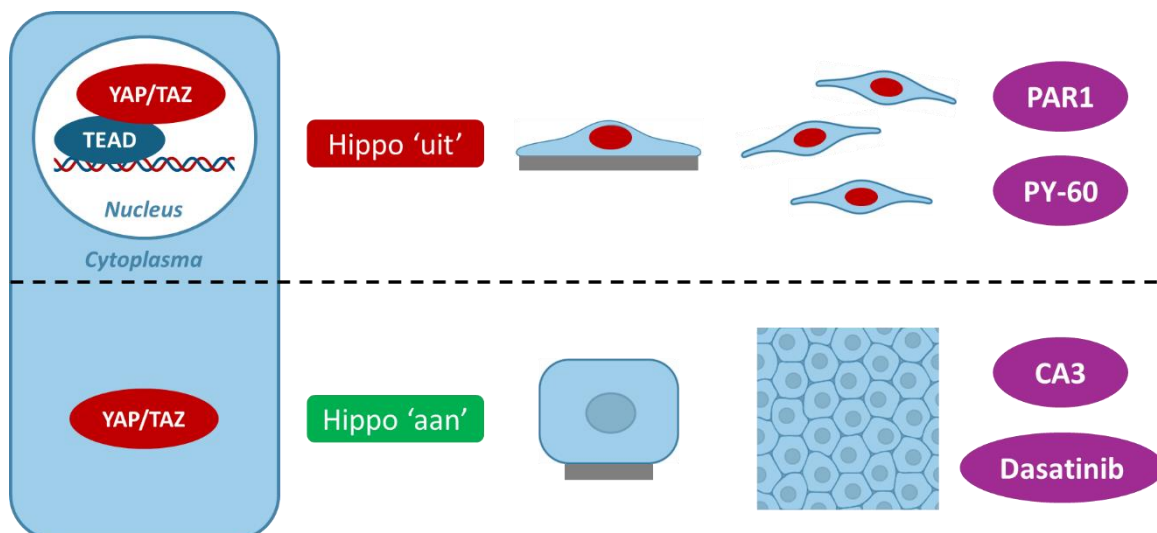


Figuur 1: Een verkort overzicht van de verdeling en regulatie van YAP/TAZ in de cel. De afbeelding is naar eigen ontwerp op basis van [11], [12], [14], [15], [16], [17], [18]. De Hippo pathway begint met de activatie van MST1/2, wat leidt tot de fosforylering van LATS1/2. Gefosforyleerd LATS1/2 fosforyleert vervolgens YAP/TAZ, wat verplaatsing van YAP/TAZ naar de nucleus blokkeert en binding aan annexine A2 (ANXA2) bevordert. LATS1/2 kan worden geïnhibeerd door Src-kinase (Src) via RhoA. Inhibitoren van YAP/TAZ zijn Dasatinib (Dasa) en CA3. Dasatinib remt Src-kinase, wat indirect leidt tot activatie van LATS1/2. CA3 remt de transcriptionele activiteit van YAP/TAZ door de binding met TEAD te verstoren. PAR1 activeert YAP/TAZ door LATS1/2 indirect te inhiberen via RhoA, terwijl PY-60 YAP/TAZ activeert door hun binding met annexine A2 te verstoren.

YAP/TAZ vervult tal van essentiële functies. Zo zijn de eiwitten cruciaal voor embryonale ontwikkeling en wondgenezing. In veel volwassen weefsels zijn deze eiwitten echter niet nodig voor celvernieuwing. YAP/TAZ speelt wel een rol bij onder andere het reguleren van bloedvatvorming, hartontwikkeling en het induceren van de EMT. Hoewel YAP/TAZ essentiële functies heeft, wordt overactiviteit van YAP geassocieerd met aandoeningen zoals kanker. Deze overactiviteit wordt veroorzaakt door mutaties. Dit leidt vervolgens tot ongeremde celproliferatie en defecte apoptose, met kanker tot gevolg. Dit wordt versterkt door de tumoromgeving, waar onder andere sprake is van afwijkende weefselorganisatie, ontstekingen en interstitiële druk. De overactiviteit van YAP kan ook leiden tot chemoresistentie en daarom is YAP een interessant doelwit voor de behandeling van kanker. Dit vereist echter nog veel onderzoek. De focus zal in dit onderzoek dan ook liggen op YAP. Het eiwit TAZ wordt niet meegenomen in het onderzoek.

Zoals eerder genoemd vindt de regulatie van YAP plaats via de Hippo pathway, maar YAP wordt ook gereguleerd door mechanische signalen [13]. Wanneer er veel mechanische signalen zijn, zal YAP zich van het cytoplasma naar de nucleus verplaatsen (Figuur 2). Zo bevindt YAP zich in het cytoplasma bij cellen die op een klein oppervlak hechten of cellen die zich bevinden in een hoge celdichtheid. Maar wanneer de cellen gerek zijn door bijvoorbeeld een groot oppervlak om op te hechten, zal YAP zich naar de nucleus verplaatsen.

Voor dit onderzoek zijn vooral deze mechanische signaalroutes van belang. Maar daarnaast kan YAP ook chemisch geactiveerd en geïnhibeerd worden. In dit onderzoek komen twee activatoren en twee inhibitoren aan bod (Figuur 1). Een van de activatoren van YAP is PY-60, een klein molecuul wat zich richt op annexine A2 [14]. Annexine A2 is een eiwit wat met het celmembraan geassocieerd is. Bij een hoge celdichtheid bindt YAP aan annexine A2 en bevindt YAP zich dus overwegend in het cytoplasma. PY-60 verstoort de binding tussen annexine A2 en het celmembraan, met uiteindelijk als gevolg een gedefosforyleerde en daarmee actieve vorm van YAP. Naast PY-60, kan ook protease-activated receptor 1 (PAR-1) voor activatie van YAP zorgen. PAR-1 inhibeert indirect LATS1/2 via RhoA, waardoor YAP niet meer gefosforyleerd wordt en zich dus in de actieve vorm in de nucleus zal bevinden [15]. Een van de inhibitoren van YAP is dasatinib. Dasatinib is een inhibitor van Src-kinase [16]. Src-kinase remt normaliter indirect LATS1/2 en dus de Hippo pathway. Met het inhiberen van Src kinase wordt de Hippo pathway dus geactiveerd en daarmee YAP geïnhibeerd [17]. Een andere inhibitor van YAP is CA3 [18]. Dit kleine molecuul heeft een inhiberend effect op de transcriptionele activiteit van YAP door de binding met TEAD te verstoren.



Figuur 2: Een verkort overzicht van de verdeling van YAP/TAZ in de cel. De afbeelding is naar eigen ontwerp op basis van [10], [14], [15], [16], [17], [18]. YAP/TAZ bevinden zich overwegend in het cytoplasma wanneer de Hippo pathway aan staat, de cel op een klein oppervlak hecht, bij hoge confluentie of bij het toevoegen van Dasatinib of CA3. Als de Hippo pathway uit staat, in het geval dat de cel zich hecht op een groot oppervlak (uitrekking), er een lage confluentie is of er PAR1 of PY-60 toegevoegd wordt, bevinden YAP/TAZ zich overwegend in de nucleus, gebonden aan de TEAD factoren.

Er is nog veel onbekend over de mechanismen rondom YAP. Zo is wel bekend wat er gebeurt met YAP onder invloed van bijvoorbeeld celcontractie, maar de bijbehorende signaalroutes zijn nog niet duidelijk. Met behulp van fluorescente reporters kan YAP gevisualiseerd worden, waarmee onderzoek kan worden gedaan naar deze signaalroutes.

1.2.2 Cell-cell signalling en EMT

Bij EMT ondergaan epitheliale cellen veranderingen die leiden tot een mesenchymaal fenotype. Normaal gesproken vormen epitheliale cellen een monolaag en hechten deze aan elkaar, waarbij het eiwit E-cadherine een belangrijke rol speelt [19], [20], [21]. Zinc finger E-box binding homeobox 1 eiwitten (ZEB-eiwitten) onderdrukken E-cadherine, wat resulteert in de inductie van EMT. Deze ZEB-eiwitten worden op hun beurt onderdrukt door microRNA's in epitheliale cellen. Tijdens EMT worden de ZEB-eiwitten niet onderdrukt door microRNA's, waardoor de epitheliale cellen een mesenchymaal fenotype krijgen. Dit resulteert onder andere in een toename van de migratiecapaciteit van de cel, waardoor de cel gemakkelijker kan binnendringen in weefsels. EMT speelt een rol bij natuurlijke processen, maar heeft ook een cruciale rol bij het induceren van kanker waarbij tumorcellen een mesenchymaal fenotype verwerven en zich vanuit de primaire tumor kunnen verspreiden.

EMT kan ook omgekeerd plaatsvinden, wat mesenchymale-epitheliale transitie wordt genoemd. Tijdens de embryonale ontwikkeling en orgaanontwikkeling kunnen bepaalde epitheliale cellen tussen epitheliale en mesenchymale fenotypen wisselen. Dit geldt ook voor mesenchymale cellen, waarbij na ontwikkeling epitheliale cellen een specifieke functie krijgen en mesenchymale cellen een ondersteunende rol vervullen. Daarnaast kan EMT optreden bij gedifferentieerde cellen, zoals tijdens weefselherstel na schade, waar het een belangrijke rol speelt in de regeneratie van weefsels. Er zijn verschillende typen EMT: type 1 en type 2 spelen een rol bij natuurlijke processen zoals orgaanontwikkeling en wondgenezing, terwijl type 3 EMT optreedt bij kankercellen met specifieke mutaties. Deze laatste leidt tot metastase en kan fataal zijn. Aangezien er nog veel onduidelijkheid bestaat over deze processen, wordt er uitgebreid onderzoek verricht waarbij type 3 EMT in cellen wordt geïnduceerd.

Het is mogelijk om EMT te induceren in de Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) borstkankercellijn, bijvoorbeeld door gebruik te maken van een 3D kweekmethode [22]. Hierbij ondergaan de MCF-7 cellen blijvende EMT en worden eigenschappen verkregen van tumorstamcellen, die geassocieerd worden met een slechtere prognose voor kankerpatiënten. Een andere methode is het co-kweken van MCF-7 cellen met botkankercellen, MG-63 [19]. Na herhaalde co-kweken vertonen de MCF-7 cellen verhoogde EMT's ten opzichte van MCF-7 cellen welke niet in co-kweek zijn geweest. Bij zowel de 3D kweekmethode als de co-kweek wordt de expressie van mesenchymale markers verhoogd en de invasiviteit vergroot. Echter, de 3D kweekmethode is efficiënter in het verkrijgen van voldoende gekweekte cellen in vergelijking met de co-kweekmethode. Desondanks kunnen beide methoden worden gebruikt voor het maken van mesenchymale MCF-7 cellen.

1.2.3 Hypoxie

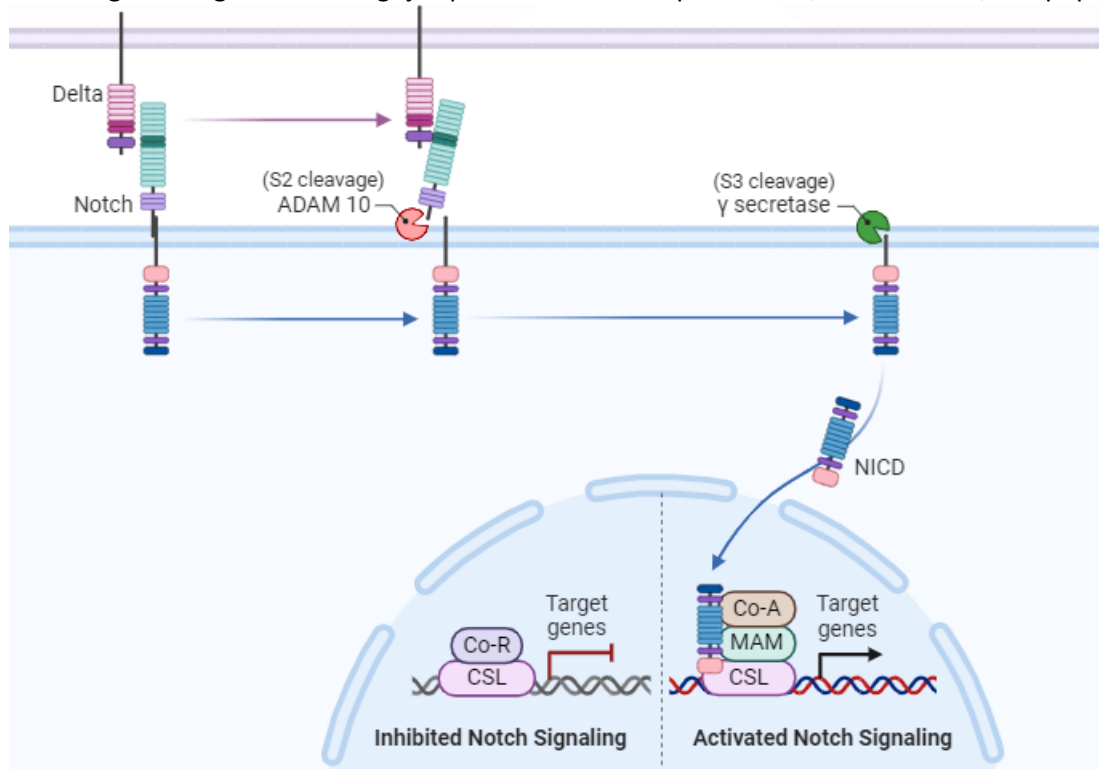
Hypoxie is een conditie waarbij weefsels onvoldoende zuurstof krijgen [23]. Dit speelt een cruciale rol bij verschillende ziekten. Zo bemoeilijkt hypoxie onder andere de behandeling van kanker. Er lijkt een verband te zijn tussen hypoxie en therapieresistentie, wat resulteert in een ongunstige prognose. In het geval van kanker wordt hypoxie gedefinieerd als een zuurstofgehalte van minder dan 2%. Bij dergelijke niveaus wordt de activiteit van hypoxie-induceerbare factoren (HIF's) gestimuleerd [24]. Deze HIF's zijn transcriptiefactoren die betrokken zijn bij de aanpassing aan een omgeving met een laag zuurstofgehalte. Om de effecten van hypoxie op kanker en de behandeling ervan te onderzoeken, is het cruciaal om niet alleen te beschikken over een betrouwbare reporter die gekoppeld is aan HIF's, maar ook over een reporter die functioneert onder hypoxische omstandigheden.

GFP kan niet dienen als FP bij hypoxie, omdat zuurstof essentieel is voor GFP voor de vouwing van de cofactor tot een fluorescente vorm. Een alternatief FP dat effectief kan worden ingezet, is UnaG. Dit FP is verkregen uit Japanse palingen en heeft bilirubine nodig om fluorescentie te produceren [25]. Onder controle van HIF-responsselementen (HRE's), DNA-sequenties die dienen als bindingsplaatsen

voor HIF's, kan UnaG HIF-activiteit aantonen in cellen die worden blootgesteld aan hypoxie. Belangrijk is dat deze activiteit ook omkeerbaar is. De werking hiervan kan versneld worden met behulp van een PEST-eiwitsequentie. Cellen onder hypoxische omstandigheden vertonen een verhoogde activiteit van HIF. Wanneer deze cellen echter terugkeren naar een normaal zuurstofniveau, neemt de HIF-activiteit af. Hiermee neemt ook de fluorescentie af, waarbij de snelheid afhankelijk is van hoe stabiel het FP is. Een HRE-UnaG-reporter kan dus een betrouwbare methode bieden om de activiteit van HIF aan te tonen in relatie tot hypoxie.

1.2.4 Notch signaalroute

Er is veel onderzoek gedaan naar de rol van Notch als oncogen en als tumoronderdrukker. Normaal gesproken speelt de Notch-sigtaalroute een essentiële rol in processen zoals orgaanontwikkeling en de regulatie van celgedrag, vooral via communicatie tussen aangrenzende cellen [26], [27]. Wanneer een Notch-receptor op de ene cel bindt aan een ligand op een naburige cel, activeert dit een reeks eiwitsplitsingen door peptidases (**Figuur 3**). De eerste splitsing wordt gekatalyseerd door ADAM10 en de tweede door het γ -secretase complex. Dit resulteert in de vrijmaking van het Notch intracellulaire domein (NICD). Het NICD wordt vervolgens naar de celkern getransporteerd en bindt aan het CSL-eiwit (een verzamelterm voor het eiwit in verschillende organismen), wat de genexpressie beïnvloedt. De betrokken genen reguleren belangrijke processen zoals celproliferatie, differentiatie, en apoptose.



Figuur 3: Verkorte schematische weergave van de Notch signaalroute met twee naburige cellen (paars en blauw) [26]. Voordat de Notch-receptor in het celmembraan komt, vindt S1 cleavage plaats. De Notch-receptor in het celmembraan van een cel (blauw) bindt aan een ligand van een aangrenzende cel (paars). Dit heeft twee eiwitsplitsingen tot gevolg, één gekatalyseerd door ADAM 10 (S2) en de andere door γ secretase (S3). Het vrijgekomen NICD verplaatst zich vervolgens naar de celkern waar het bindt aan het CSL-eiwit. Hierdoor wordt de corepressor (CO-R) verdreven en worden coactivatoren (Co-A) waaronder het mastermind-like (MAM) eiwit aangetrokken. Vervolgens vindt er genexpressie plaats.

Naast de normale cellulaire functies van de Notch-sigtaalroute, is uitgebreid onderzoek gedaan naar de rol van Notch in kanker. Afhankelijk van het celtype kan Notch fungeren als zowel een oncogen als een tumoronderdrukker. In kankers zoals T-cel acute lymfoblastische leukemie, borstkanker, en colorectale kanker leidt overactivering van Notch tot verhoogde celproliferatie, invasie en metastase. Notch bevordert processen zoals de EMT en angiogenese, waardoor tumoren beter kunnen groeien en zich verspreiden. In deze gevallen fungeert Notch als een oncogen, waarbij de route kankercellen

resistent maakt tegen standaardbehandelingen zoals chemotherapie. In andere gevallen, zoals bij blaaskanker, kan Notch een tumoronderdrukkende rol spelen. Verlies van Notch-activiteit leidt hier tot ongecontroleerde celgroei, wat bijdraagt aan tumorvorming. Een belangrijke uitdaging is de betrokkenheid van Notch bij chemoresistentie. Tumoren met een overactieve Notch signaalroute zijn vaak minder gevoelig voor chemotherapie, wat de behandeling bemoeilijkt. Tegelijkertijd kan reactivering van de route nuttig zijn in gevallen waar Notch normaal gesproken als tumoronderdrukker functioneert.

Onderzoek heeft daarnaast aangetoond dat Notch een belangrijke intermediaire rol speelt bij de interactie tussen hypoxie en EMT in tumorcellen [28]. Er werd aangetoond dat hypoxie, via de Notch-signalroute, EMT kan induceren. Dit resulteert in verhoogde motiliteit en invasiviteit. Blokkeren van Notch-signaling kan hypoxie-geïnduceerde EMT en invasie tegengaan, wat suggereert dat Notch een belangrijk therapeutisch doelwit is in de context van kankerprogressie en metastase. De Notch-signalroute is daarom niet alleen van belang voor de ontwikkeling van tumoren, maar ook voor de invasieve eigenschappen van tumorcellen onder hypoxische omstandigheden. Dit maakt de route een veelbelovend doelwit voor kankertherapie, met potentieel om zowel tumorgroei te remmen als chemoresistentie tegen te gaan. Naast zijn rol in kanker, blijkt uit recent onderzoek dat de Notch-signalroute ook direct en indirect mechanosensitief is en betrokken is bij mechanotransductie [29]. Deze mechanotransductieve eigenschappen kunnen invloed hebben op weefselherstel en celfuncties, maar ook op kankergroei, waardoor Notch een belangrijk onderzoeksgebied blijft.

Om de Notch-signalroute te onderzoeken met live cell imaging, kan een construct zoals een Notch/NICD-responsieve CSL-bindende promotor die een fluorescent eiwit (FP) produceert worden gebruikt, wat al eerder in een onderzoek is gedaan [30]. In dit onderzoek van Nowotschin *et al.* werd het construct CSL:H2B-Venus met succes ingezet om activatie van de Notch-signalroute zichtbaar te maken. Dit construct maakt gebruik van vier CSL-regio's, wat onderzoekers helpt om de activering van Notch in cellen in real-time te volgen. Deze methode biedt belangrijke inzichten in de rol van Notch in kanker en kan bijdragen aan de ontwikkeling van gerichte behandelingen.

1.3 Methoden en analyses

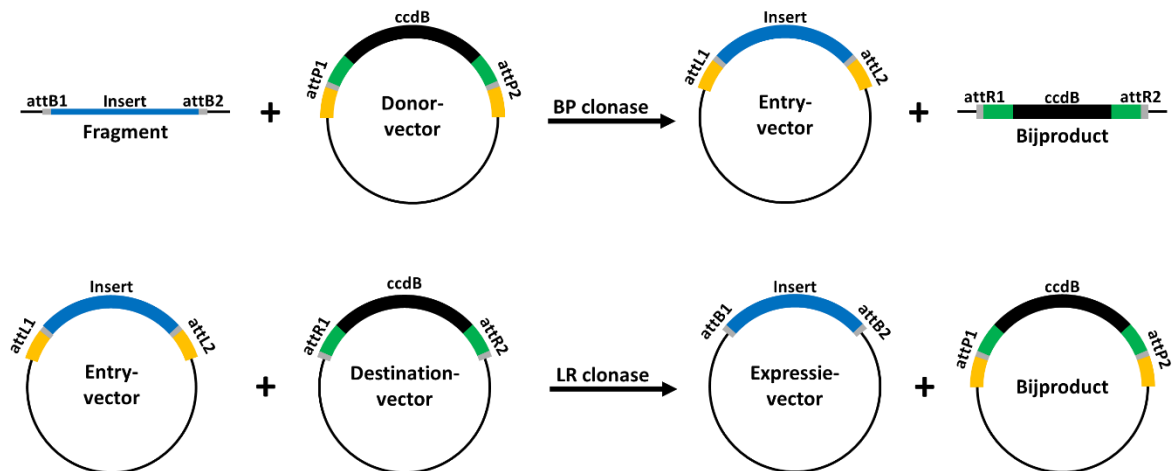
In modern biologisch onderzoek worden vaak FP's aan genen van interesse gekoppeld, ook wel bekend als reporter-constructen. Om deze constructen te produceren, worden technieken zoals gateway cloning en Gibson assembly gebruikt. Voor genexpressieonderzoek spelen lentivirale vectoren een belangrijke rol bij het in cellen brengen van deze constructen. Vervolgens kan fluorescentiemicroscopie en Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) worden gebruikt voor het visualiseren en analyseren.

1.3.1 Gateway cloning

In dit onderzoek, evenals in vele andere onderzoeken, worden FP's gekoppeld aan een gen van interesse [31], [32]. Dit staat bekend als reporter-constructen. Normaal gesproken worden deze reporter-constructen tot stand gebracht door een insert in een plasmide te brengen met behulp van restrictie-enzymen. Dit is echter een beperkte methode omdat zowel de insert als het plasmide geschikte digestieplaatsen moeten hebben en er een litteken achterblijft. Bovendien is het onwaarschijnlijk dat bij verschillende reporter-constructen dezelfde restrictie-enzymen worden gebruikt, wat het uitvoeren van meerdere reacties tegelijkertijd bemoeilijkt. Om deze reden is door Invitrogen de gateway cloning techniek ontwikkeld [33]. Deze techniek is erg flexibel en wordt daarom tegenwoordig veel gebruikt.

Gateway cloning is gebaseerd op de specifieke methode die bacteriofaag λ gebruikt om zijn genoom in *E. coli* te integreren. Het doel van deze methode is om specifieke DNA-fragmenten efficiënt in verschillende vectoren te klonen zodat deze in verdere experimenten gebruikt kunnen worden, zoals genexpressie en live cell imaging. Dit wordt gedaan met recombinatie van zogenaamde att-plaatsen. Deze att-plaatsen bestaan uit een kerngebied van minder dan 30 bp waaraan 'armen' van 25 bp gekoppeld kunnen zijn, in het groen en geel weergegeven in de figuur (**Figuur 4**). Er zijn vier verschillende att-plaatsen; elke att-plaats heeft een andere samenstelling van armen. attP-plaatsen

hebben twee armen, attL- en attR-plaatsen elk één arm, en attB-plaatsen geen arm. attB-plaatsen bestaan alleen uit het kerngebied, die ook bij de andere att-plaatsen voorkomt. Bij dit kerngebied wordt het DNA geknipt en weer aan elkaar gehecht, waardoor recombinatie kan plaatsvinden. De interactie tussen de enzymen en de 'armen' van de att-plaatsen is zeer specifiek. Door recombinatie worden attB- en attP-plaatsen, die respectievelijk bij het fragment en de donorvector horen, omgezet naar attL- en attR-plaatsen, behorend bij respectievelijk de entryvector en het bijproduct. Bij gateway cloning worden hiervoor twee enzymen gebruikt, BP clonase en LR clonase. BP clonase wordt gebruikt voor de eerdergenoemde reactie, LR clonase voert eenzelfde reactie uit. Bij de reactie met LR clonase wordt de entryvector met de destinationvector omgezet in de expressievector en een bijproduct.



Figuur 4: Een schematische weergave van gateway cloning. De afbeelding is naar eigen ontwerp op basis van [31]. Bij de reactie met BP clonase worden met behulp van recombinatie de attB- en attP-plaatsen omgezet in respectievelijk attL- en attR-plaatsen. Hierbij wordt het gewenste DNA-fragment (blauw) in de donorvector geplaatst, vervolgens entryvector genoemd. In het bijproduct bevindt zich het ccdB-gen (zwart), welke voor de reactie in de donor-vector zat. Bij de reactie met LR clonase vindt ook recombinatie plaats, hierbij worden de attL- en attR-plaatsen respectievelijk weer omgezet in attB- en attP-plaatsen. Hierbij wordt het gewilde DNA-fragment verwisseld met het ccdB-gen in een destinationvector, waarmee een expressievector wordt geproduceerd. In het bijproduct bevindt zich het ccdB-gen.

Selectie gebeurt met behulp van 'gateway cassettes' en antibiotica-resistentiegenen die aanwezig zijn in donor- en destinationvectoren. De gateway cassettes bevatten onder andere het *ccdB*-gen, dat giftig is voor *E. coli* stammen zoals DH5 α . Bij recombinatie wordt dit *ccdB*-gen verwisseld met de insert. De *E. coli* kolonies die vervolgens groeien, bevatten dus de entryvector of de expressievector met de insert. Het *ccdB*-gen bevindt zich in het bijproduct, dat bij transfectie dus geen levensvatbare kolonies oplevert. Zonder dit toxische gen bestaat de kans op vals positieven omdat er dan ook kolonies groeien met het bijproduct in plaats van de expressievector. Daarnaast wordt een voedingsmedium gebruikt met het antibioticum waarvoor de entry- of expressievector een resistentiegen heeft.

Kortom, gateway cloning is een effectieve en snelle methode om meerdere constructen te maken. Daarnaast kan gateway cloning ook worden gecombineerd met een andere methode zoals bijvoorbeeld Gibson assembly.

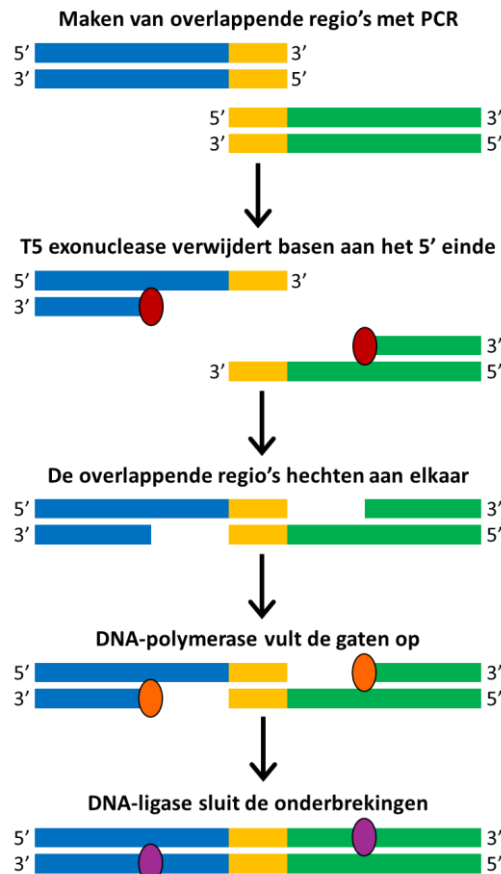
1.3.2 Gibson assembly

Al tientallen jaren worden DNA-fragmenten gerecombineerd, zoals ook de eerder besproken reporter-constructen. Dit proces wordt mogelijk gemaakt door verschillende technieken, waaronder gateway cloning, restrictie-enzymen en Gibson assembly. Gibson assembly is een eenvoudige en efficiënte methode waarbij meerdere DNA-fragmenten met één isotherme reactie kunnen worden samengevoegd [34]. Deze methode is toepasbaar op DNA-fragmenten met een grootte van 40 bp tot 583 kb, en mogelijk zelfs tot 900 kb. Bovendien kunnen de producten tot 300 kb efficiënt worden gekloneerd in *E. coli*.

Met behulp van PCR kunnen overlappende regio's gecreëerd worden in de fragmenten (Figuur 5). Vervolgens worden deze overlappende fragmenten samengevoegd met enzymen, 5' T5 exonuclease, DNA-polymerase en DNA-ligase. T5 exonuclease verwijdert nucleotiden aan het 5' einde van

dubbelstrengs DNA waarna de overloppende regio's aan elkaar hechten. DNA-polymerase vult vervolgens de ontstane gaten op. Ten slotte sluit DNA-ligase de onderbrekingen, resulterend in naadloos aan elkaar gehechte DNA-fragmenten.

Deze methode kan worden toegepast voor het invoegen van één of meerdere inserts in een vector en biedt bijvoorbeeld een alternatief voor de BP clonase-reactie in gateway cloning. Hieropvolgend kan de LR clonase-reactie worden ingezet voor het maken van reporter-constructen.



Figuur 5: Een schematische weergave van Gibson assembly. De afbeelding is naar eigen ontwerp op basis van [34]. Met behulp van PCR worden er overloppende regio's gemaakt waarna in de reactie T5 exonuclease de basen aan het 5' einde verwijdert. Hierna hechten de overloppende regio's aan elkaar. DNA-polymerase zorgt ervoor dat de gaten worden opgevuld en tot slot worden door DNA-ligase de onderbrekingen gesloten.

1.3.3 Lentivirale vectoren

In dit onderzoek worden lentivirale vectoren gebruikt als destinationvectoren bij de LR-reactie van gateway cloning. Lentivirale vectoren zijn gemodificeerde lentivirussen, die behoren tot de groep retrovirussen [35]. Deze retrovirussen, en dus ook lentivirussen, dragen het genetisch materiaal in de vorm van RNA, waarmee cellen kunnen worden binnengedrongen en geïnfecteerd. Door een lentivirus aan te passen tot een lentivirale vector, kan bijvoorbeeld onderzoek worden gedaan naar genexpressie. Veel lentivirale vectoren zijn gebaseerd op HIV-1 en worden replicatie incompetent gemaakt door onder andere genen voor replicatie te verwijderen of te muteren. De componenten die nodig zijn voor virusproductie worden in afzonderlijke plasmiden gemaakt. Daar zijn verschillende systemen voor, namelijk eerste, tweede en derde generatie lentivirale vectoren. Omdat er in dit onderzoek gebruik wordt gemaakt van tweede generatie lentivirale vectoren, zullen alleen de eerste en tweede generatie besproken worden.

Eerste generatie lentivirale vectoren bestaan uit drie plasmiden: een verpakkingsplasmide, een envelopplasmide en een transferplasmide. Het verpakkingsplasmide bevat de genen voor Gag, Pol en regulerende eiwitten. Het envelopplasmide zorgt voor een glycoproteïne, VSV-G. Tot slot bevat het transferplasmide de transgenen en alle andere essentiële genen, op HIV-eiwitten na.

Waar bij de eerste generatie lentivirale vectoren de risico's werden geminimaliseerd door het HIV-1-systeem op te splitsen in drie afzonderlijke plasmiden, werden er bij de tweede generatie wijzigingen gemaakt aan het transferplasmide. Deze wijzigingen betroffen de eliminatie van bepaalde accessoire genen, zoals *Vif*, *Vpu*, *Vpr* en *Nef*. Door het verwijderen van vier extra HIV-genen werd de kans op replicatiecompetente vectoren nog kleiner.

Niettemin blijft er ruimte voor verbetering, aangezien zelfs bij een overlap van slechts 10 bp tussen het verpakkingsplasmide en het transferplasmide risico's op homologe recombinatie en de vorming van replicatiecompetente virussen kunnen ontstaan. Het verminderen van homologe sequenties en het bekijken van een andere verdeling van functies in de verschillende plasmiden kan dit risico verkleinen. Iets waar al rekening mee kan worden gehouden is het voorkomen van recombinatie door de lentivirussen niet in aanraking te laten komen met wildtype HIV-virus. Daarnaast wordt er in dit onderzoek gewerkt met YAP, wat een oncogen is [9]. Door het werken in ML-II laboratoria moet worden voorkomen dat het virus met een eventueel oncogen kan binnendringen via bijvoorbeeld een wondje.

Hoewel er voortdurend verbeteringen worden doorgevoerd, worden lentivirale vectoren al op grote schaal en op een veilige manier gebruikt in onderzoek. De vectoren bieden een efficiënte manier om genen in het DNA van cellen in te brengen, wat essentieel is voor verschillende onderzoeksdoelen. Omdat lentivirussen veelvuldig worden toegepast, zijn deze inmiddels commercieel beschikbaar. In dit onderzoek worden lentivirale vectoren gebruikt om FP's te koppelen aan eiwitten van interesse. Deze eiwitten worden vervolgens in cellen tot expressie gebracht en kunnen worden gevisualiseerd met fluorescentiemicroscopie.

1.3.4 Fluorescentiemicroscopie

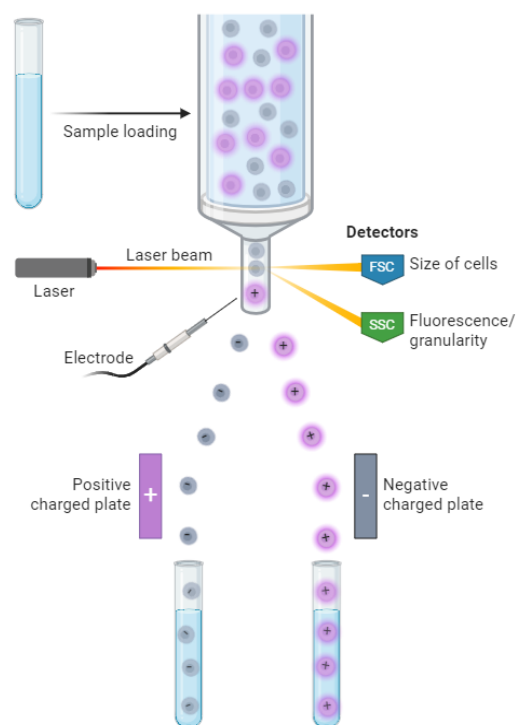
De eerdergenoemde gateway cloning-techniek en Gibson assembly worden in dit onderzoek gebruikt om FP's als reporter te gebruiken. Om dit te visualiseren wordt live-cel fluorescentiemicroscopie toegepast. Bij live-cell-imaging moet rekening worden gehouden met de omgeving waarin de cellen zich bevinden [36]. Cellen zullen zich namelijk alleen normaal gedragen in een geschikte omgeving, vaak bij 37°C en 5% CO₂. Dit moet ook worden overwogen bij time-lapse experimenten. Voor dit doel zijn er bijvoorbeeld omsloten ruimtes beschikbaar voor specifieke microscopen, waarmee een incubatoromgeving kan worden gecreëerd. Daarnaast is het ook zaak om de cellen minimaal aan de exciterende lamp bloot te stellen, terwijl er tegelijkertijd voldoende data met een goede signaal-ruisverhouding verzameld wordt.

Licht met een hoge intensiteit kan op zichzelf al schadelijk zijn voor cellen, maar de fototoxiciteit van FP's kan ook schade geven. Hoewel FP's minder fototoxisch zijn dan chemische fluorescente kleurstoffen, kunnen er wel schadelijke bijproducten worden gevormd bij het afnemen van de fluorescentie. De structuur van het eiwit in FP's helpt de vorming van deze bijproducten te beperken. Desondanks blijft het belangrijk om de blootstelling aan licht zoveel mogelijk te minimaliseren, zelfs bij het gebruik van FP's, om celbeschadiging te voorkomen. Dit vereist het optimaliseren van de belichtingstijd en lichtintensiteit waarmee onnodige schade aan cellen wordt voorkomen. Een te korte belichtingstijd leidt tot een lagere signaal-ruisverhouding, een te lange belichtingstijd resulteert daarentegen in wazige beelden zonder verbetering van de signaal-ruisverhouding. Naast het verlengen van de belichtingstijd kan de signaal-ruisverhouding worden verbeterd door binning. Bij binning worden de pixels gepoold om de data te vereenvoudigen. Echter heeft dit een negatief effect op de spatiale resolutie. Elk experiment met fluorescentiemicroscopie moet daarom zorgvuldig worden opgezet.

1.3.5 FACS

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) is een vorm van flowcytometrie die niet alleen het individueel analyseren, maar ook het sorteren van cellen mogelijk maakt [37]. Dit kan worden bereikt door cellen te labelen met fluorescente antilichamen of door FP's te koppelen aan genen van interesse. Tijdens FACS worden cellen door een zeer dunne buis geleid, waar de cellen individueel worden belicht door een laser en gedetecteerd door een detector (**Figuur 6**). Deze detector meet de forward-scatter, side-scatter en fluorescentie. De eerste twee parameters worden gebruikt om de grootte van de cel en de granulariteit te bepalen. In tegenstelling tot reguliere flowcytometrie, waarbij eigenschappen kunnen worden gemeten, maakt FACS het mogelijk om cellen ook te sorteren op basis van optische eigenschappen.

Afhankelijk van de onderzoeksvraag worden specifieke populaties cellen geselecteerd voor verdere analyse. Bijvoorbeeld, cellen die groen FP tot expressie brengen, kunnen worden gescheiden van cellen die rood FP tot expressie brengen. Binnen dezelfde fluorescentiekleur kan ook onderscheid worden gemaakt op basis van de mate van fluorescentie. Dit maakt FACS tot een zeer flexibele methode voor het sorteren van cellen die wel of niet door virus zijn geraakt of cellen met een bepaalde intensiteit.



Figuur 6: Schematische weergave van FACS op basis van [37]. De cellen worden door een dunne buis geleid waar deze belicht worden door een laser en waar detectie plaatsvindt. Met behulp van het meten van fluorescentie kunnen de cellen worden geladen en gesorteerd.

1.4 Plan van aanpak

Dit onderzoek richt zich, zoals eerder benoemd, op het produceren en karakteriseren van DNA-constructen voor fluorescente reporters. Het is verdeeld in vier deelonderzoeken, waarbij de productie en karakterisatie van een YAP-reporter het hoofdonderzoek is (**Figuur 7**). Dat YAP een grote rol speelt bij onder andere kanker is duidelijk, echter is er nog veel onderzoek nodig naar de werking ervan. Daarom worden er in dit onderzoek twee DNA-constructen met een YAP-reporter geproduceerd en in cellen gebracht zodat de TU/e hiermee onderzoek kan doen. Deze reporters, eGFP-YAP en mScarlet3-YAP, worden door middel van kloneren geproduceerd en vervolgens ook gekarakteriseerd. Het doel is om met beide constructen verschillende stabiele cellijnen te produceren en hier vervolgens karakterisatie mee te doen.

Naast de karakterisatie van de YAP-reporters, zullen nog twee reporters worden gekarakteriseerd. De eerste betreft een EMT-reporter, wat een combinatie is van twee verschillende constructen. Met behulp van co-kweek kan EMT geïnduceerd worden en kan de werking van de reporter bekeken worden. Het uiteindelijke doel is om de EMT-positieve cellen te kunnen selecteren. De tweede reporter die wordt gekarakteriseerd is een hypoxiereporter. Daarom is er een onderzoek gedaan naar de reporter bij lagere zuurstofniveaus om de werking ervan bij drie verschillende cellijnen in kaart te brengen. Door de karakterisatie van de YAP-reporter, EMT-reporter en hypoxiereporter zal duidelijk worden of de reporters naar verwachting werken. Als dit het geval is, kunnen de reporters zowel binnen als buiten de TU/e ingezet worden voor verder onderzoek.

Tot slot worden er vier Notch-reporters geproduceerd. Voor de productie van deze vier reporters is ook het ontwerp gemaakt voor het kloneren, welke bij de YAP-reporter al gereed was. Het doel is om de Notch-reporters alleen te produceren, het produceren van stabiele cellijnen en de karakterisatie van de reporters behoort niet tot dit onderzoek.

Kortom, in dit onderzoek worden twee typen reporters geproduceerd (YAP- en Notch-reporters) en drie typen reporters gekarakteriseerd (YAP-, EMT- en hypoxiereporters).

	YAP-reporter	EMT-reporter	Hypoxiereporter	Notch-reporter
Ontwerp Gibson assembly				
Gibson assembly				
Gateway cloning				
Productie lentivirus				
Kweken stabiele cellijnen				
Karakterisatie				

Figuur 7: Een overzicht van de vier deelonderzoeken en de werkzaamheden daarbij.

2 Materialen en methoden

In dit onderzoek werden vier deelonderzoeken gedaan. Het produceren en karakteriseren van twee YAP-reporters was het hoofdonderzoek. Bij de productie hiervan werd er gekloneerd, getransfecteerd en getransduceerd. Voor de hoofd- en nevenonderzoeken die karakterisatie betroffen is er celkweek gedaan. Voor elk van deze onderzoeken zal de karakterisatie apart worden beschreven. De karakterisatie is uitgevoerd met fluorescentiemicroscopie en vervolgens is er data-analyse gedaan. Daarnaast is er als nevenproject een DNA-construct ontworpen voor een Notch-reporter en werd hiervoor gekloneerd. Dit nevenproject is apart benoemd.

2.1 Kloneren YAP-reporters

Entryvectoren met eGFP-YAP en mScarlet3-YAP werden gemaakt door middel van Gibson assembly (E2621, New England Biolabs). De backbone voor beide constructen werd verkregen door PCR-amplificatie van een entryvector (17398, Addgene). De fragmenten eGFP en YAP werden verkregen door PCR-amplificatie van pEGFP-C3-hYAP1 (17843, Addgene). Het fragment mScarlet3 werd verkregen door PCR-amplificatie van pLCK-mScarlet3_C1 (189771, Addgene). De gebruikte primers zijn te vinden in de bijlagen (**Bijlage A, Tabel A1 en Tabel A2**). De Gibson assembly werd gevolgd door een LR-reactie met LR-clonase (11791020, Invitrogen). Tijdens de LR-reactie werden eGFP-YAP (**Bijlage B, Figuur B1**) en mScarlet3-YAP (**Bijlage B, Figuur B2**) gerecombineerd in pLenti PGK Puro DEST (19068, Addgene). Een eerste controle werd uitgevoerd met restrictiereacties. Op de entryvectoren werden restrictiereacties uitgevoerd met de restrictie-enzymen XhoI en NcoI. Bij de expressievectoren vonden de restrictiereacties plaats met BamHI, KpnI, AclI en BglI. Hieropvolgend werden gelelektroforeses uitgevoerd met 1% agarosegel (16500-100, Invitrogen) en een 1Kb DNA ladder (10787018, Invitrogen). Bij zowel de entryvectoren als de expressievectoren werd een aanvullende controle gedaan, hierop werd Sanger sequencing uitgevoerd welke werd uitbesteed aan GENEWIZ.

2.2 Transfectie YAP-reporters

HEK293T LentiX cellen werden in T75-flessen gedurende 24 uur gekweekt met een dichtheid van ongeveer $5,0 \times 10^6$ cellen/fles in 10 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) hoog glucose (41966029, Gibco) met 10% fetal bovine serum (FBS) (S-FBS-SA-015, Serana) (HEK-kweekmedium). Virusproductie van eGFP-YAP en mScarlet3-YAP werd gedaan middels transfectie van de constructen samen met verpakkingsplasmide pCMVR8.74 (22036, Addgene), envelopplasmide pMD2.G (12259, Addgene) in een 1:0,6:0,6 ratio waaraan polyethyleenimine met een eindconcentratie van 5 $\mu\text{g/mL}$ toegevoegd werd. 16 uur na transfectie werd het medium vervangen met 15 mL DMEM hoog glucose met 10% hitte geïnactiveerde FBS (productiemedium). 72 uur na het vervangen van het medium werd het productiemedium gecentrifugeerd bij 300xg gedurende 5 minuten. Het supernatant werd afgenomen en in hoeveelheden van 1 mL opgeslagen bij -80°C .

2.3 Transductie YAP-reporters

Van de cellijnen MG-63, NIH/3T3, normale menselijke dermale fibroblasten (NHDF) en MCF-10a H2B-mNeonGreen werden $1,0 \times 10^4$ cellen/well gezaaid in 24-wellsplaten. MG-63, NIH/3T3 en NHDF werden gekweekt met DMEM hoog glucose (31966021, Gibco) met 10% FBS. MCF-10a H2B-mNeonGreen werd gekweekt met DMEM/F12 (11330, Invitrogen) met 5% paardenserum (16050, Invitrogen), 20 ng/mL epidermale groeifactor (AF-100-15, Peprotech), 0,5 $\mu\text{g/mL}$ hydrocortison (H-0888, Sigma), 1 mg/mL cholera-toxine (C-8052, Sigma), 10 $\mu\text{g/mL}$ insuline (I-1882, Sigma) en 50 U/mL Pen/Strep (15070, Invitrogen). Na 24 uur werd het kweekmedium vervangen door productiemedium. Hierop volgend werden transducties gedaan met eGFP-YAP en mScarlet3-YAP waarbij het supernatant in verschillende hoeveelheden werd toegevoegd, met een multipliciteit van infectie van 1:4. Tegelijkertijd met de transductie werd er polybreen (TR-1003-G, Sigma-Aldrich) toegevoegd: 6 $\mu\text{g/mL}$ bij MG-63, 8 $\mu\text{g/mL}$ bij NIH/3T3, 10 $\mu\text{g/mL}$ bij NHDF en 8 $\mu\text{g/mL}$ bij MCF-10a H2B-mNeonGreen. 16 uur na transductie werd het productiemedium vervangen door standaard kweekmedium met 10% FBS en 0,5 $\mu\text{g/mL}$ puromycine (AAJ67236XF, Thermo Scientific) (selectiemedium). Alvorens werd met behulp

van een killcurve (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 & 1,0 µg/mL puromycine) de benodigde concentratie puromycine bepaald. Minimaal zeven dagen lang werd elke twee tot drie dagen het selectiemedium verversd. Hierna werd het medium verwisseld voor standaard kweekmedium, zonder puromycine. Bij MCF-10a H2B-mNeonGreen mScarlet3-YAP werden de cellen gesorteerd met behulp van FACS. De cellen werden opgelost in buffer, bestaande uit PBS met 1% BSA (A9418, Sigma-Aldrich). Als negatieve controle werd MCF-10a H2B-mNeonGreen meegenomen. De cellen werden gesorteerd met de BD FACS Aria II en BD FACSDiva softwareversie 8.0.1. Gesorteerde cellen werden opgenomen in standaard kweekmedium en gezaaid in een 6-wellsplaat.

2.4 Celkweek

MG-63, MCF-7 Z-cad, MM231 HRE-UnaG mKO2-H2B, CAMA1 HRE-UnaG mKO2-H2B, MCF-7 HRE-UnaG mKO2-H2B en de eerdergenoemde stabiele cellijnen met YAP-reporters werden gekweekt in DMEM laag glucose (21885025, Gibco) met 10% FBS. HEK293T LentiX werd gekweekt in HEK-kweekmedium. De cellen werden gekweekt bij 37°C en 5% CO₂. Voor een langere bewaartijd werden de cellen bij -150°C bewaard in cryovials met DMEM laag glucose + 20% FBS en 10% DMSO. Cellen werden minstens twee keer gepasseerd voordat een experiment werd gestart. Voor microscopie bij transfectie en transductie werd het medium verwisseld naar DMEM fenolroodvrij laag glucose (D4947-500ML, Sigma-Aldrich) met 10% FBS of werd tijdelijk phosphate buffered saline (P4417-100TAB, Sigma-Aldrich) gebruikt.

2.5 Karakterisatie YAP-reporters

MG-63 eGFP-YAP en MG-63 mScarlet3-YAP werden op hoge dichtheid gezaaid (100.000 cellen per well) in met fibronectine (F0556, Sigma-Aldrich) gecoate 24-wellsplaten in DMEM FluoroBrite™ (A1896701, Gibco). Hetzelfde werd gedaan voor NIH/3T3 eGFP-YAP en NIH/3T3 mScarlet3-YAP met 250.000 cellen per well. Na 24 uur incubatie bij 37°C en 5% CO₂ werd voor de vier cellijnen een lage dichtheid gezaaid, 50.000 cellen per well. Na 3 uur werden counterstains volgens bijgeleverde protocollen toegevoegd: NucBlue™ (R37605, Invitrogen) voor MG-63 mScarlet3-YAP en NIH/3T3 mScarlet3-YAP en SPY555 (sc201, Spirochrome) voor MG-63 eGFP-YAP en NIH/3T3 eGFP-YAP. 4 tot 5 uur na het zaaien van de lage dichtheid werden foto's met fluorescentiemicroscopie gemaakt (zie '2.9 Microscopie' en '2.10 Data-analyse'). Vervolgens werd er 10 µM PY-60 (SML3740-5MG, Sigma-Aldrich), PAR1 (AS-61530, AnaSpec), dasatinib (SML2589-50MG, Sigma-Aldrich) of CA3 (300802-28-2, Selleck Chemicals) toegevoegd. 2 uur na het toevoegen van de stoffen werden wederom foto's gemaakt. Per benoemde stof en blanco werd er een duplo ingezet en het experiment in zijn geheel werd in triplo gedaan.

2.6 Karakterisatie EMT-reporter

Er werd een 12-wellsplaat met daarin inserts (3462, Corning) gebruikt, vergelijkbaar met een Boyden chamber. Per well werden 25.000 MCF-7 Z-cad cellen per well gezaaid. In de inserts werden 25.000 MG-63 cellen per insert gezaaid, deze inserts werden boven wellen met alleen medium geplaatst. Beide cellijnen werden tijdens het experiment gekweekt in DMEM fenolroodvrij laag glucose medium en geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂. Na 24 uur werden de inserts met MG-63 cellen op de wellen met MCF-7 Z-cad cellen geplaatst. Dit werd gedaan in triplo en er werden ook drie blanco's meegenomen (inserts zonder MG-63 cellen). Gedurende zeven dagen werden de MCF-7 Z-cad cellen regelmatig met fluorescentiemicroscopie bekeken. Bij het vaststellen van EMT-positieve cellen werden de inserts verwijderd. Daarna werden de EMT-negatieve cellen met behulp van steriele pipetpuntjes zoveel mogelijk weggeschrapt waarna het medium werd verwisseld. Dit proces werd herhaald totdat ongeveer 50% van de cellen EMT-positief was. Hierna werden de cellen opgekweekt naar T150-flessen voor eventuele selectie met behulp van FACS.

2.7 Karakterisatie hypoxiereporter

MM231 HRE-UnaG mKO2-H2B, CAMA1 HRE-UnaG mKO2-H2B en MCF-7 HRE-UnaG mKO2-H2B werden per $4,00 \cdot 10^5$ cellen gezaaid in 24-wellsplaten in DMEM fenolroodvrij laag glucose (D4947, Sigma-Aldrich) en 10% FBS. Elke cellijn werd in triplo gezaaid per 24-wellsplaat. Elke plaat werd 24 uur bij 37°C en 5% CO₂ geïncubeerd waarna er foto's met fluorescentiemicroscopie werden gemaakt. Vervolgens werden er platen in triplo bij 1%, 2%, 3%, 5% en 20% O₂ geïncubeerd gedurende 24 uur. Na 24 uur werden er wederom foto's gemaakt (zie '2.9 Microscopie' en '2.10 Data-analyse'). De platen komend uit een zuurstofgehalte van 1% en 20% werden vervolgens gedurende 24 uur in 20% zuurstof geïncubeerd waarna opnieuw foto's werden gemaakt.

2.8 Kloneren Notch-reporters

Er werden ontwerpen gemaakt voor een Gibson assembly van twee entryvectoren, namelijk 12xCSL:H2B-mCherry en 12xCSL:H2B-Citrine. De backbone voor beide constructen werd verkregen door PCR-amplificatie van een entryvector (19364, Addgene). De fragmenten 12xCSL:H2B-mCherry en 12xCSL:H2B-Citrine werden verkregen door PCR-amplificatie van twee entryvectoren (Sprinzak *et al.* [38]). De gebruikte primers zijn te vinden in de bijlagen (**Bijlage A, Tabel A3 en Tabel A4**). Tijdens de LR-reactie werden 12xCSL:H2B-mCherry (**Bijlage B, Figuur B3 en Figuur B4**) en 12xCSL:H2B-Citrine (**Bijlage B, Figuur B5 en Figuur B6**) beiden gerecombineerd in pLenti X1 Puro DEST (17297, Addgene) en in pLenti X1 Zeo DEST (17297, Addgene). Met behulp van restrictiereacties en gelelektroforeses werd een controle uitgevoerd. Bij de entryvectoren werden restrictiereacties gedaan met de enzymen KpnI, XbaI, NheI, XhoI en BseRI. Bij de expressievectoren werden restrictiereacties gedaan met NheI, XbaI en XhoI. De gelelektroforeses werden op dezelfde manier uitgevoerd als bij eGFP-YAP en mScarlet3-YAP (zie 2.1 Kloneren YAP-reporters). Bij de entryvectoren werd een aanvullende controle gedaan; Sanger sequencing welke werd uitbesteed aan GENEWIZ.

2.9 Microscopie

Om foto's te maken werd de Leica DMI8 gebruikt met LAS X-software versie 1.4.6 en de Hamamatsu-C13440-20CU-US-300708 camera. Er werden verschillende fluorescente kanalen gebruikt (**Tabel 1**).

Tabel 1: De verschillende fluorescente kanalen die zijn gebruikt bij de Leica DMI8 met de bijbehorende emissie, excitatie en beamsplitter.

Kanaal	Excitatie (nm)	Emissie (nm)	Beamsplitter (nm)
GFP-T	450-490	500-550	500
mCherry-T	540-580	593-668	590
Dapi	325-275	435-485	400

Van cellijnen met eGFP-YAP en mScarlet3-YAP werden na transfectie en transductie foto's gemaakt met de objectieven HC PL FLUOTAR 5x/0.15 DRY, HC PL FLUOTAR L 20x/0.40 DRY en HC PL FLUOTAR L 20x/0.40 DRY. Dit werd gedaan met drie kanalen, Brightfield, GFP-T en mCherry-T. Voor het vaststellen van EMT-positieve cellen bij de co-kweek van MCF-7 Z-cad en MG-63 werden dezelfde objectieven en kanalen gebruikt. De karakterisatie van eGFP-YAP werd gedaan met het HC PL FLUOTAR 20x/0.55 DRY objectief met dezelfde kanalen. Bij de karakterisatie van mScarlet3-YAP werd Dapi gebruikt in plaats van GFP-T. Voor de karakterisatie van HRE-UnaG mKO2-H2B bij hypoxie werd het HC PL FLUOTAR L 20x/0.40 DRY objectief gebruikt met drie kanalen, Brightfield, GFP-T en mCherry-T.

2.10 Data-analyse

Image Lab (Bio-Rad) werd gebruikt voor het analyseren van de gelelektroforeses van de restrictiereacties. Voor kwantitatieve experimenten werd ImageJ en Cellprofiler gebruikt om de data te verkrijgen en IBM SPSS Statistics 29 om de data te verwerken.

Voor de karakterisatie van eGFP-YAP werden in ImageJ van tien cellen per foto de kernen en de gehele cellen handmatig afgebakend. Door alles buiten de kernen te verwijderen werd de geïntegreerde intensiteit in de kern gemeten. Door de kern van de gehele cellen af te trekken en alles buiten de cellen te verwijderen werd de intensiteit in het cytoplasma gemeten. Hiermee werd de

geïntegreerde intensiteit verkregen. In SPSS werden vervolgens Mann Whitney U en Kruskal Wallis toetsen uitgevoerd met $\alpha=0,05$.

Voor de karakterisatie van HRE-UnaG mKO2-H2B werd met een Gaussian filter en een diameter van 3 pixels in Cellprofler de ruis verwijderd. Daarna werd de achtergrond afgetrokken met een Gaussian filter en een diameter van 500 pixels. Vervolgens werden de kernen van de cellen afgebakend, met behulp van de Otsu thresholding methode. De kern werd overal geëxpandeerd met 5 pixels waarmee een annulus werd gemaakt. In deze annulus werd de intensiteit per pixel gemeten, waarmee de gemiddelde intensiteit in de annulus per cel werd verkregen. In SPSS werden vervolgens Mann Whitney U toetsen en Kruskal Wallis toetsen uitgevoerd met $\alpha=0,05$.

3 Resultaten

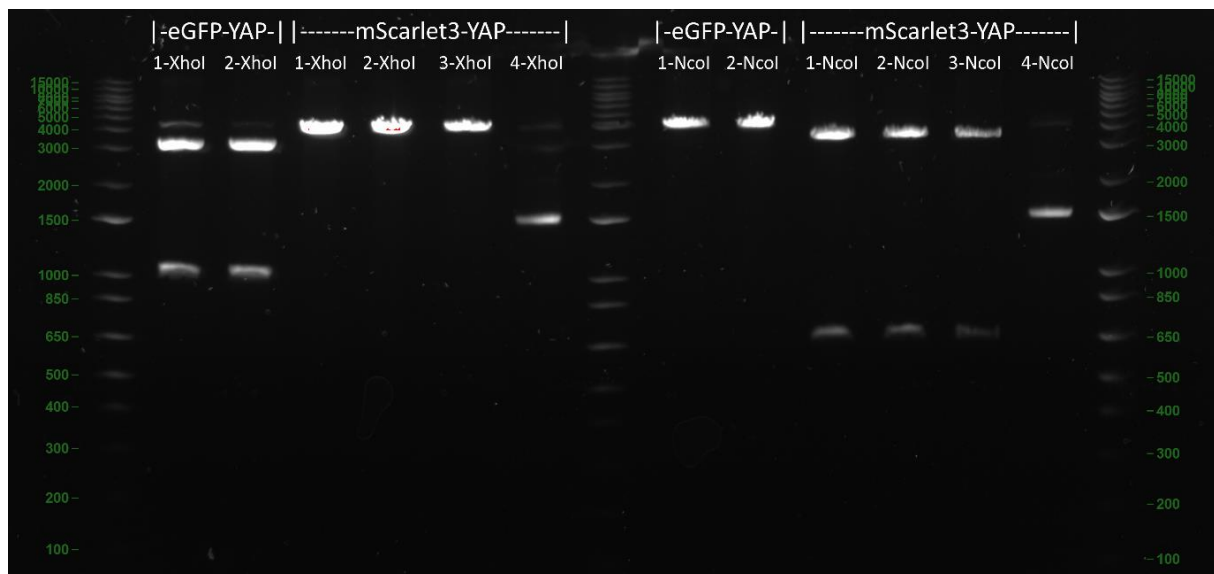
De resultaten zullen worden besproken per onderdeel van het onderzoek. Allereerst zal het hoofdonderzoek besproken worden: de productie en karakterisatie van eGFP-YAP en mScarlet3-YAP. Daarna volgen de deelonderzoeken, de co-kweek van MCF-7 Z-cad met MG-63, de karakterisatie van HRE-UnaG mKO2-H2B en tot slot het opzetten en uitvoeren van een Gibson assembly van een Notch-reporter. Aan het einde van dit hoofdstuk is een overzicht van alle constructen weergegeven.

3.1 Productie en karakterisatie YAP-reporters

De DNA-constructen eGFP-YAP en mScarlet3-YAP werden geproduceerd met Gibson assembly en de LR-reactie van de gateway cloning techniek. Na het controleren van de gemaakte DNA-constructen, werden stabiele cellijnen met deze DNA-constructen verkregen. Een deel van de cellijnen werd tot slot gebruikt voor de karakterisatie van eGFP-YAP en mScarlet3-YAP.

3.1.1 Productie van DNA-constructen eGFP-YAP en mScarlet3-YAP

Voor de productie van de DNA-constructen eGFP-YAP en mScarlet3-YAP werd allereerst een Gibson assembly uitgevoerd om de entryvector te maken. Voor de controle van de Gibson assembly werd een restrictiereactie ingezet met de enzymen XhoI en NcoI. Bij de restrictiereactie met XhoI worden bij eGFP-YAP twee bandjes (3313 bp en 1065 bp) en bij mScarlet3-YAP één bandje (4316 bp) verwacht. Voor NcoI geldt dat bij eGFP-YAP één bandje (4378 bp) en bij mScarlet3-YAP twee bandjes (3629 bp en 687 bp) worden verwacht. Voor eGFP-YAP werden twee monsters gecontroleerd en voor mScarlet3-YAP vier monsters (**Figuur 8**). Alle monsters op een na (monster 4 van mScarlet3-YAP) voldoen aan de verwachting. Na controle van de sequenties met Sanger sequencing werden monster 1 van eGFP-YAP en monster 2 van mScarlet3-YAP geselecteerd voor het maken van de expressievector op basis van de hoogste concentratie DNA (data niet weergegeven).

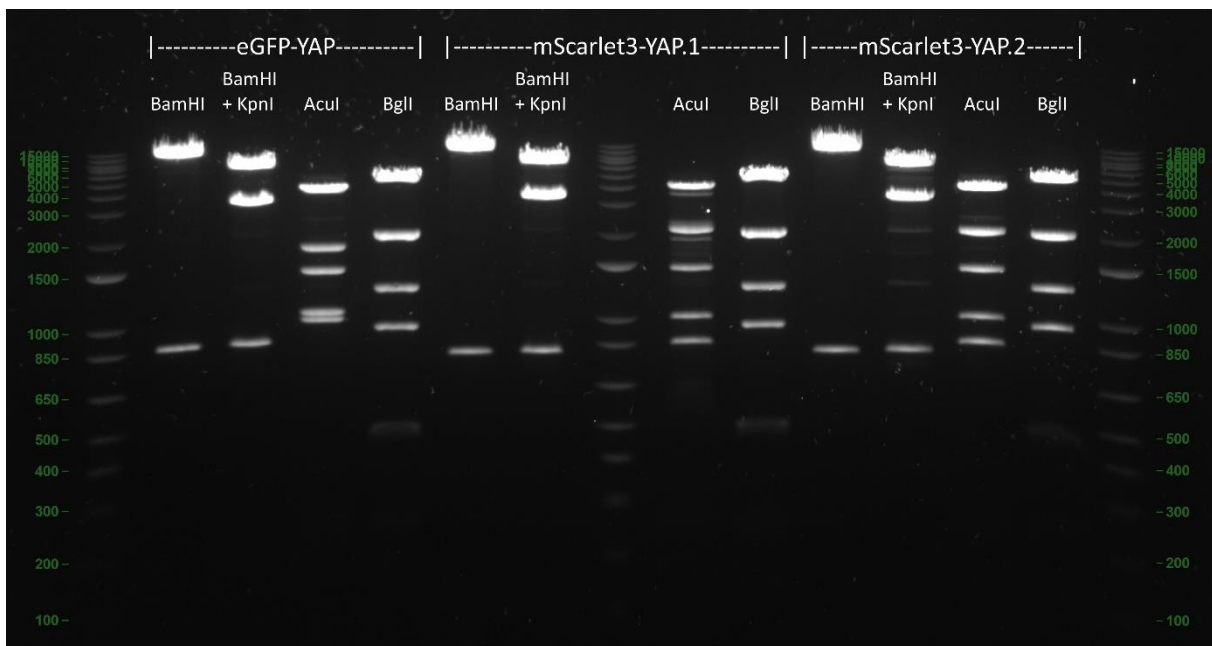


Figuur 8: 1% agarosegel van restrictiereacties van eGFP-YAP en mScarlet3-YAP met XhoI en NcoI.

Vanuit de eerder gemaakte entryvectoren samen met een lentivirale vector als destinationvector werden expressievectoren gemaakt. Om de productie van de expressievectoren te controleren werd er wederom een restrictiereactie ingezet. Hierbij werden de enzymen BamHI, een combinatie van BamHI en KpnI, AclI en BglI gebruikt voor beide expressievectoren. Voor eGFP-YAP werd één monster gecontroleerd; voor mScarlet3-YAP werden er twee monsters gecontroleerd (**Figuur 9**). De resultaten werden vergeleken met de verwachte bandjes (**Tabel 2**). De resultaten kwamen volledig overeen met wat er werd verwacht, ondanks dat bandjes onder de 400 bp niet duidelijk te zien zijn in de weergegeven afbeelding. Op eGFP-YAP en monster 2 van mScarlet3-YAP werd een Sanger sequencing uitgevoerd; hieruit bleek ook dat de sequenties klopten. Vervolgens konden de constructen ingezet worden om stabiele cellijnen te produceren.

Tabel 2: De bandjes die werden verwacht bij de verschillende restrictiereacties op eGFP-YAP en mScarlet3-YAP. Er zijn bandjes tussen haakjes geplaatst: deze zijn niet duidelijk te zien bij de gelelektroforese.

Construct	Enzymen	Verwachte bandjes (bp)
eGFP-YAP	BamHI	9236, 849, (14)
	BamHI + KpnI	6026, 3210, 849, (14)
	AcuI	4127, 1810, 1455, 1093, 1012, (251, 199, 162, 44)
	BglI	5014, 2065, 1267, 943, 436, (243, 131)
mScarlet3-YAP	BamHI	9258, 779
	BamHI + KpnI	6026, 3232, 779
	AcuI	4149, 2143, 1455, 1012, 835, (251, 162, 30)
	BglI	4930, 2087, 1267, 943, 436, (243, 131)

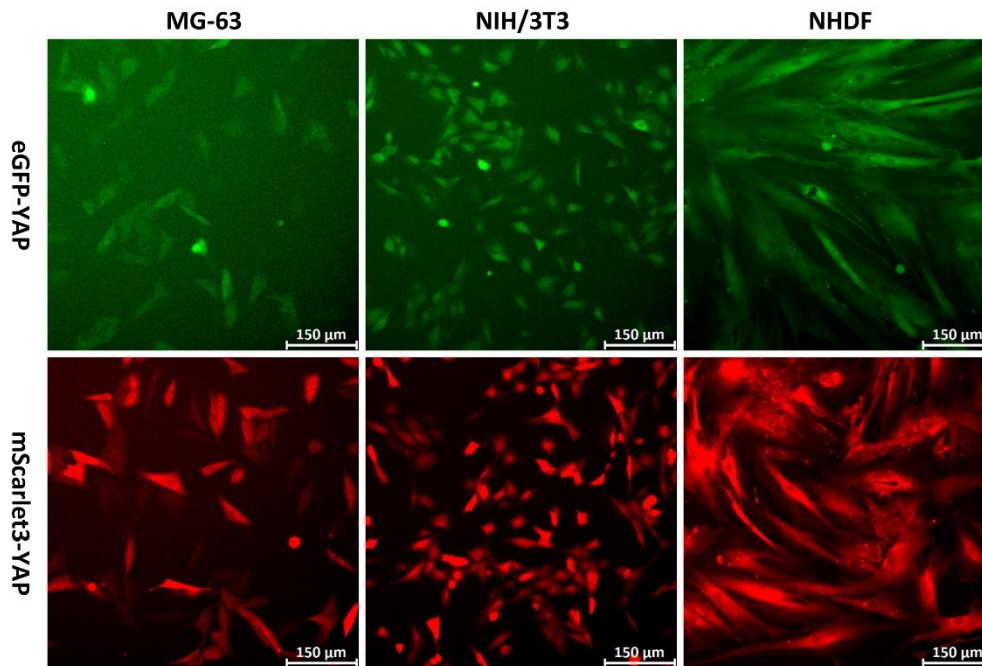


Figuur 9: 1% agarosegel van restrictiereacties van eGFP-YAP en mScarlet3-YAP met BamHI, KpnI, AcuI en BglI.

3.1.2 Productie van stabiele cellijnen met eGFP-YAP en mScarlet3-YAP

Onder invloed van een hPGK-promotor wordt het eGFP-YAP of het mScarlet3-YAP construct tot expressie gebracht en een fusie-eiwit geproduceerd. In het geval van eGFP-YAP is YAP met groene fluorescentie te detecteren; in het geval van mScarlet3-YAP met rode fluorescentie.

De expressievector met mScarlet3-YAP werd in vier cellijnen gebracht: MG-63, NIH/3T3, NHDF en MCF10a H2B-mNeonGreen. Dit geldt voor de expressievector met eGFP-YAP ook, uitgezonderd de MCF10a H2B-mNeonGreen cellijn. Met fluorescentiemicroscopie werd gevisualiseerd of de constructen succesvol in de cellen waren ingebracht (**Figuur 10**). Hierbij zijn de resultaten van MCF10a H2B-mNeonGreen niet weergegeven vanwege confidentialiteit. Bij de andere drie cellijnen werden met succes stabiele cellijnen geproduceerd met eGFP-YAP of mScarlet3-YAP. Bij alle drie de cellijnen met eGFP-YAP is namelijk groene fluorescentie te zien. Hetzelfde geldt voor de cellijnen met mScarlet3-YAP, daar is rode fluorescentie te zien. In de andere fluorescente kanalen was geen fluorescentie waar te nemen. Met de cellijnen MG-63 en NIH/3T3 is een karakterisatie uitgevoerd.

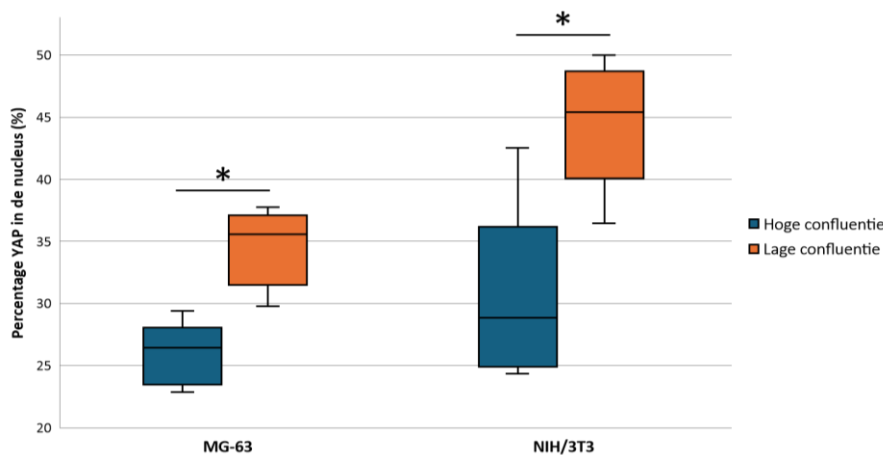


Figuur 10: Foto's van drie cellijnen (MG-63, 3T3/NIH en NHDF) waar eGFP-YAP of mScarlet3-YAP is ingebracht.

3.1.3 Karakterisatie van eGFP-YAP en mScarlet3-YAP

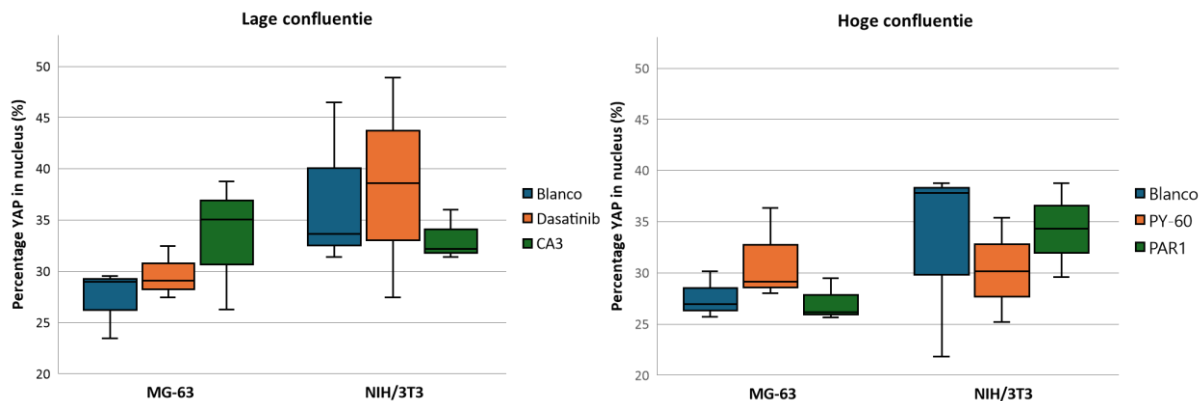
Om te bepalen of eGFP-YAP en mScarlet3-YAP naar verwachting werken, werd een karakterisatie gedaan. Hierbij werd uitgegaan van de werking van het YAP-eiwit. Cellen in lage confluente zijn vergeleken met cellen in hoge confluente. Ook is er chemische inhibitie en activatie van YAP gedaan. De karakterisatie is gedaan met MG-63 en NIH/3T3, met behulp van ImageJ. Omdat er veel handmatig werk was, is alleen eGFP-YAP geanalyseerd (**Bijlage C, Figuur C1**). Het gaat om drie afzonderlijke experimenten, maar binnen deze experimenten zijn er per conditie handmatig tien willekeurige cellen geselecteerd. Van deze tien cellen is de geïntegreerde intensiteit in de nucleus en in het cytoplasma bepaald. Vervolgens is aan de hand van de intensiteit het percentage YAP in de nucleus berekend (**Bijlage D, Tabel D1**).

Allereerst is bekeken of er een verschil waar te nemen is tussen lage confluente en hoge confluente (**Figuur 11**). De verwachting is dat het percentage YAP in de nucleus hoger is bij lage confluente ten opzichte van hoge confluente [13]. Bij MG-63 is het percentage YAP in de nucleus significant hoger bij een lage confluente (34,3%) ten opzichte van een hoge confluente (25,9%). Voor NIH/3T3 geldt hetzelfde, respectievelijk 44,6% en 31,0%. Wat betreft confluente lijkt het er dus op dat het construct eGFP-YAP goed werkt.



Figuur 11: Het gemiddelde percentage YAP in de nucleus op $t=-15$ minuten per cellijn. Hierbij is een lage confluente vergeleken met een hoge confluente (*= $p < 0,05$).

Vervolgens is er onderzocht of de inhibitoren (dasatinib en CA3) en activatoren (PY-60 en PAR1) van YAP een effect hadden op het percentage YAP in de nucleus (**Figuur 12**). De inhibitoren zijn onderzocht bij een lage confluentie en de activatoren bij een hoge confluentie. De verwachting is dat bij een lage confluentie dasatinib zorgt voor een verlaagd percentage YAP in de nucleus ten opzichte van de blanco [16]. Bij CA3 zou er geen significant verschil te zien moeten zijn, gezien CA3 een effect heeft op de transcriptionele activiteit van YAP en niet op de lokalisering van YAP [18]. Bij een hoge confluentie zouden PY-60 en PAR1 daarentegen een hoger percentage moeten geven ten opzichte van de blanco [14], [15]. Er is in dit onderzoek echter geen significant verschil aangetoond tussen de verschillende condities.



Figuur 12: Het percentage YAP in de nucleus na $t=2$ uur per cellijn. Hierbij zijn inhibitoren (Dasatinib en CA3) en activatoren (PY-60 en PAR1) vergeleken met een blanco ($*=p<0,05$).

De gebruikte concentratie ($10 \mu\text{M}$) en incubatietijd (2 uur) zijn deels verkregen vanuit literatuur [14], [15], [16], [18]. Om het effect van andere concentraties en incubatietijden te onderzoeken is nog een aanvullend experiment gedaan. Hierbij zijn er verschillende concentraties van de activatoren en inhibitoren ($5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$ en $50 \mu\text{M}$) onderzocht met een incubatietijd van 15 uur (**Bijlage E, Figuur E1, Figuur E2, Figuur E3 en Figuur E4**). Bij dasatinib is het inhiberende effect op YAP al zichtbaar bij een concentratie van $5 \mu\text{M}$ (**Bijlage E, Figuur E1**). Het effect van dasatinib wordt duidelijker naarmate de cellen langer geïncubeerd zijn. De cellen hechten hierbij aan elkaar en YAP verplaatst zich naar het cytoplasma. CA3 blijkt toxisch voor de cellen te zijn vanaf 10 uur voor elke concentratie en de effecten hiervan zijn al te zien na 5 uur voor een concentratie van $10 \mu\text{M}$ en hoger (**Bijlage E, Figuur E2**). Daarnaast is er geen inhiberend effect waar te nemen. PY-60 en PAR1 hebben beiden geen zichtbaar effect hebben op de activatie van YAP, ongeacht de concentratie van de twee stoffen (**Bijlage E, Figuur E3 en Figuur E4**).

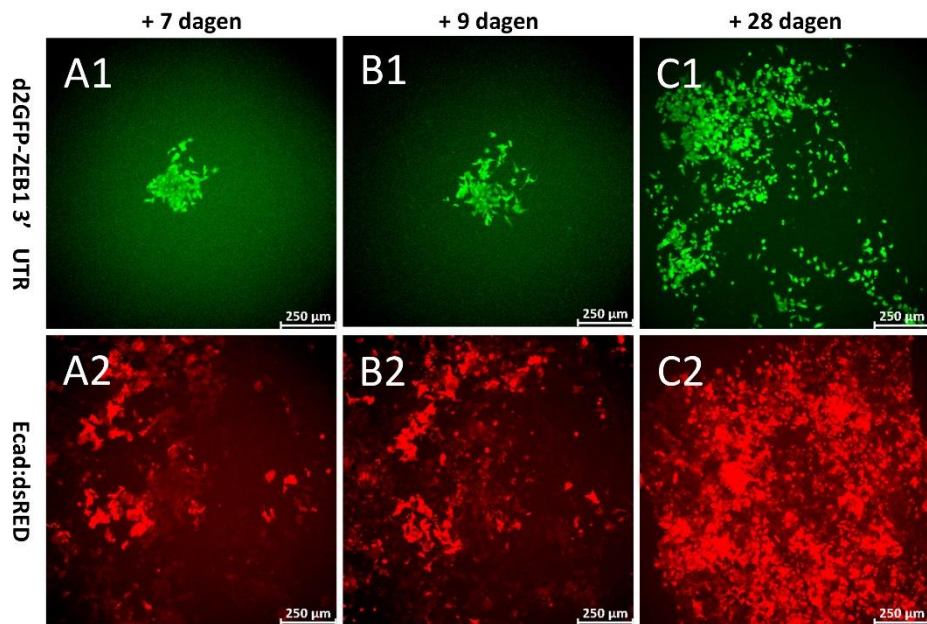
Kortom, met behulp van dasatinib en het vergelijken van lage en hoge confluentie is voorlopig aangetoond dat de constructen werken. Er is echter wel meer onderzoek nodig.

3.2 Karakterisatie EMT-reporter

Bij MCF-7 Z-cad spelen twee FP's een rol: een ZEB1 reporter en een E-cadherine reporter. De combinatie van deze twee FP's wordt de Z-cad dual sensor genoemd. Wanneer een cel epitheliaal is, wordt ZEB1 samen met d2GFP onderdrukt en wordt er E-cadherine geproduceerd waarbij dsRED tot expressie komt. Bij epitheliale cellen is er dus overwegend rode fluorescentie te zien. Bij EMT wordt ZEB1, samen met d2GFP, niet meer onderdrukt en zal er groene fluorescentie te zien zijn. Tegelijkertijd wordt E-cadherine door ZEB1 onderdrukt en zal er weinig tot geen rode fluorescentie zichtbaar zijn.

MG-63 cellen zouden EMT kunnen induceren bij MCF-7 Z-cad [19]. In dit onderzoek is de co-kweek met MG-63 zes keer gedaan. Er werden steeds 25.000 MCF-7 Z-cad cellen gezaaid. Na een week incubatie samen met MG-63 zijn er in totaal vier groepjes van cellen aangetroffen waarbij er groene fluorescentie te zien was en waar dus EMT is geïnduceerd door MG-63. Een van deze groepjes cellen is weergegeven (**Figuur 13A**). Na weer twee dagen is te zien dat de groen fluorescerende cellen zich verspreiden (**Figuur 13B**). De cellen zijn in totaal 28 dagen in kweek geweest waarbij meermaals

geschraapt is, dit heeft het percentage EMT-positieve cellen verhoogd (**Figuur 13C**). Hoewel het co-kweken met MG-63 dus niet efficiënt is, is het wel mogelijk om EMT te induceren bij MCF-7 Z-cad. Dit is niet reversibel. Duidelijk is dat de twee constructen beide werken.



Figuur 13: Foto's van MCF-7 Z-cad cellen waarbij getracht is EMT te induceren. Een van de vier gevonden groepen cellen is weergegeven in twee verschillende kanalen. Na in totaal 9 dagen en 28 dagen zijn er opnieuw foto's gemaakt.

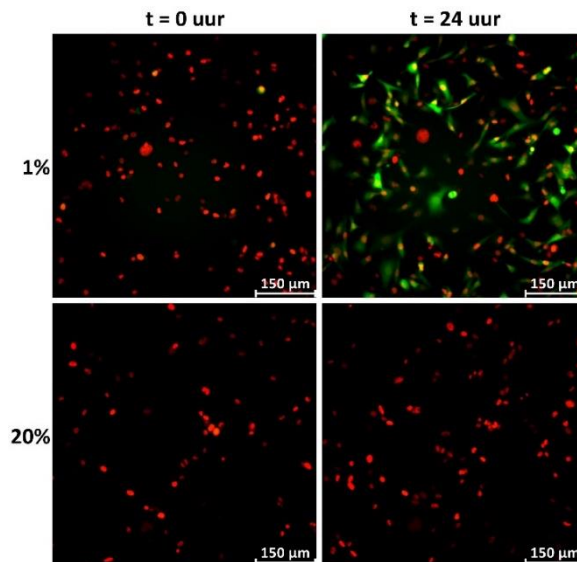
3.3 Karakterisatie hypoxiereporter

Het HRE-UnaG construct (hypoxiereporter) was al samen met het mKO2-H2B construct in cellijnen gebracht. Er moest echter nog karakterisatie op dit construct worden uitgevoerd, wat in dit onderzoek is gedaan door het gebruik van verschillende zuurstofniveaus.

3.3.1 Visualisatie

Met fluorescentiemicroscopie werden de constructen HRE-UnaG en mKO2-H2B gevisualiseerd in drie verschillende cellijnen: MM231, CAMA1 en MCF-7. Dit werd gedaan op twee tijdstippen: op 0 uur en na 24 uur. Fluorescentie van het construct mKO2-H2B zou altijd te zien moeten zijn, als rode kern. Het construct HRE-UnaG dient als reporter voor hypoxie. Bij hypoxie wordt verwacht dat er fluorescentie te zien zal zijn in de vorm van groene cellen omdat er HRE's worden aangemaakt.

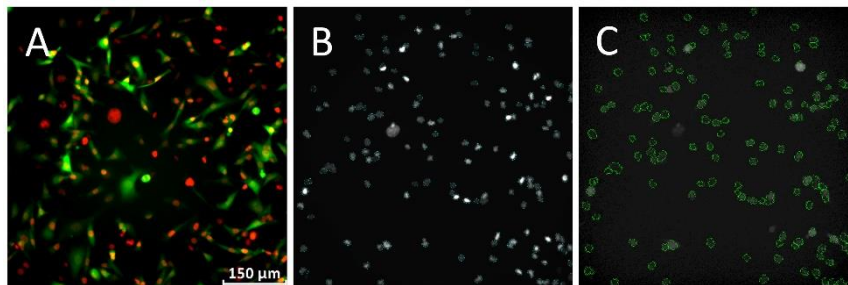
In iedere gemaakte foto zijn cellen met rode kernen te zien, onafhankelijk van het zuurstofgehalte bij incubatie en de cellijn die gebruikt is (**Figuur 14**). Bij alle cellijnen was er na 24 uur incubatie bij een zuurstofgehalte van 20% (normoxie) geen zichtbare fluorescentie in het groene kanaal. Daarentegen was er bij alle cellijnen na 24 uur incubatie bij een zuurstofgehalte van 1% wel fluorescentie zichtbaar in het groene kanaal. Dat wil voorlopig zeggen dat het HRE-UnaG construct naar verwachting werkt. Voor de cellijn MM231 zijn hieronder foto's getoond, een selectie van de foto's per cellijn en per zuurstofgehalte is te vinden in de bijlagen (**Bijlage F, Figuur F1**). De selectie van de foto's representeert alle gemaakte foto's.



Figuur 14: Fotoselectie van MM231 HRE-UnaG mKO2-H2B op t = 0 uur en t = 24 uur met incubatie in een zuurstofgehalte van 1% en 20%. mKO2-H2B laat de celkernen zien in het rode kanaal, HRE-UnaG geeft fluorescentie in het groene kanaal.

3.3.2 Vergelijking van gemiddelde intensiteit bij verschillende zuurstofgehalten

In Cellprofiler werd met behulp van de rode kernen een rand gemaakt om de kern (**Figuur 15B**). Deze rand werd uitgebreid naar buiten toe om een annulus te maken (**Figuur 15C**). In deze annulus werd de gemiddelde intensiteit in het groene kanaal gemeten.

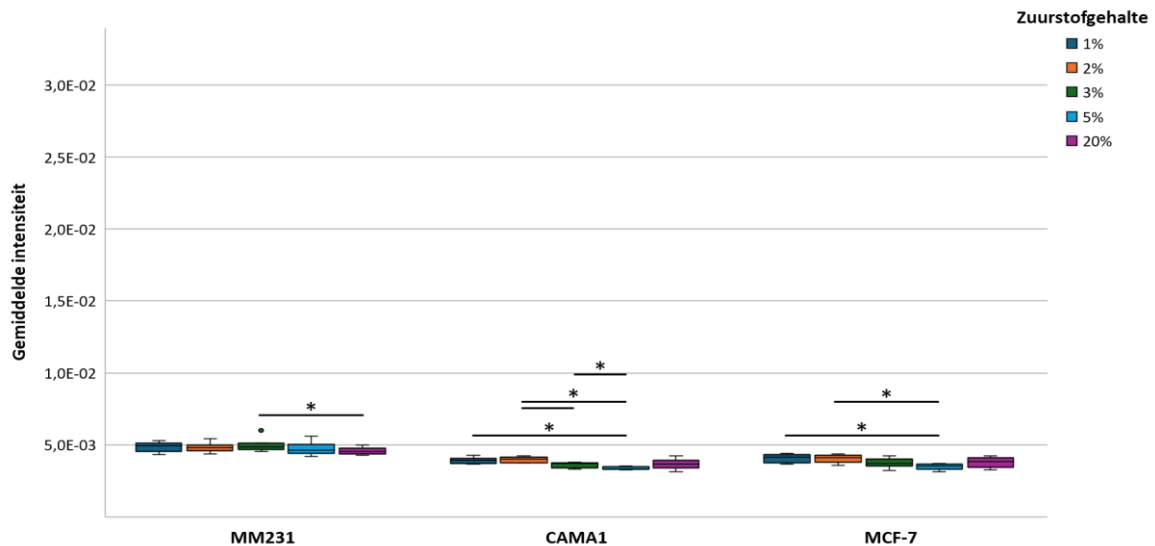


Figuur 15: Vanuit de gemaakte foto (A) werd met behulp van Cellprofiler een rand gemaakt om de rode kernen (B). Vanuit deze rand werd een annulus naar buiten gemaakt (C) om daarin de gemiddelde intensiteit in het groene kanaal te kunnen meten.

Na een eerste analyse via SPSS met alle individuele objecten in een spreidingsdiagram (**Bijlage G, Figuur G1**) werd er per well een gemiddelde genomen van de gemiddelde intensiteit van de annuli, verder benoemd als gemiddelde intensiteit (**Bijlage H, Tabel H1**). Met de gemiddelde intensiteit zijn Kruskal-Wallis toetsen uitgevoerd. Hierbij werd de gemiddelde intensiteit bij verschillende zuurstofgehalten vergeleken, apart voor t = 0 uur en t = 24 uur.

Allereerst werd de gemiddelde intensiteit bij de verschillende zuurstofgehalten vergeleken op t = 0 uur voor het vaststellen van eventuele verschillen bij de start van het experiment (**Figuur 16**). In dit geval zijn alle condities nog hetzelfde, de zuurstofgehalten die genoemd worden zijn de zuurstofgehalten waarin de cellen geïncubeerd werden na de benoemde resultaten. Er werd verwacht dat er geen significant verschil zou zijn. Hoewel het een klein verschil betreft, zijn er echter bij alle cellijnen significante verschillen waar te nemen tussen één of meer startintensiteiten.

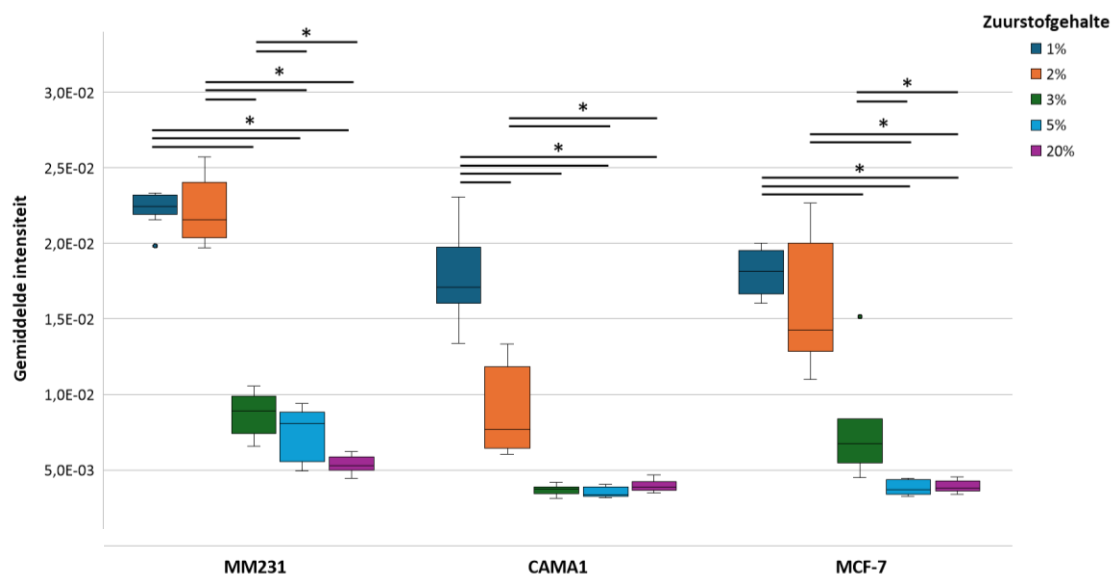
De verschillen tussen 1% en 2% ten opzichte van 3% en 5% zijn te verklaren omdat de resultaten zijn verkregen vanuit twee experimenten. Bij het eerste experiment zijn de resultaten van 1% en 2% parallel aan elkaar verkregen, bij het tweede experiment gold dit voor 3% en 5%. Daarentegen zijn er ook significante verschillen te zien binnen een experiment, zoals bijvoorbeeld het verschil tussen 3% en 5% bij CAMA1. Er is dus fluctuatie te zien in de gemiddelde intensiteit bij de start van het experiment ondanks dezelfde condities. Voor het werken bij één zuurstofgehalte is dit echter geen probleem.



Figuur 16: De gemiddelde intensiteit bij $t = 0$ uur per zuurstofgehalte en per cellijn. Vijf zuurstofgehalten (1%, 2%, 3%, 5% en 20%) zijn met elkaar vergeleken ($*=p<0,05$).

Vervolgens werden de resultaten na 24 uur vergeleken om het effect van het zuurstofgehalte per cellijn te bepalen (Figuur 17). Na $t = 24$ uur zijn bij alle cellijnen vooral duidelijke verschillen te zien tussen 1% en 2% ten opzichte van de overige zuurstofgehalten. Voor alle cellijnen geldt dat de gemiddelde intensiteit significant hoger is bij een zuurstofgehalte van 1% en 2% ten opzichte van een zuurstofgehalte van 5% en 20%. Daarnaast is ook bij alle cellijnen te zien dat er geen significant verschil is in de gemiddelde intensiteit bij een zuurstofgehalte van 5% ten opzichte van 20%. De verschillen tussen de drie cellijnen zijn vooral te zien wanneer er wordt vergeleken met 2% en 3% zuurstofgehalte.

Bij MM231 en MCF-7 is er geen significant verschil tussen de gemiddelde intensiteit bij een zuurstofgehalte van 1% en bij 2%, maar bij CAMA1 is te zien dat de intensiteit significant hoger is bij 1% dan bij 2%. Ook is bij MM231 en MCF-7 te zien dat de gemiddelde intensiteit bij een zuurstofgehalte van 3% significant hoger is dan bij een zuurstofgehalte van 5% en 20%, waar hier bij CAMA1 ook geen significant verschil te zien is. Tot slot is er bij CAMA1 en MCF-7 geen significant verschil betreft de intensiteit tussen een zuurstofgehalte van 2% en 3%, terwijl bij MM231 te zien is dat hier wel een significant verschil is.



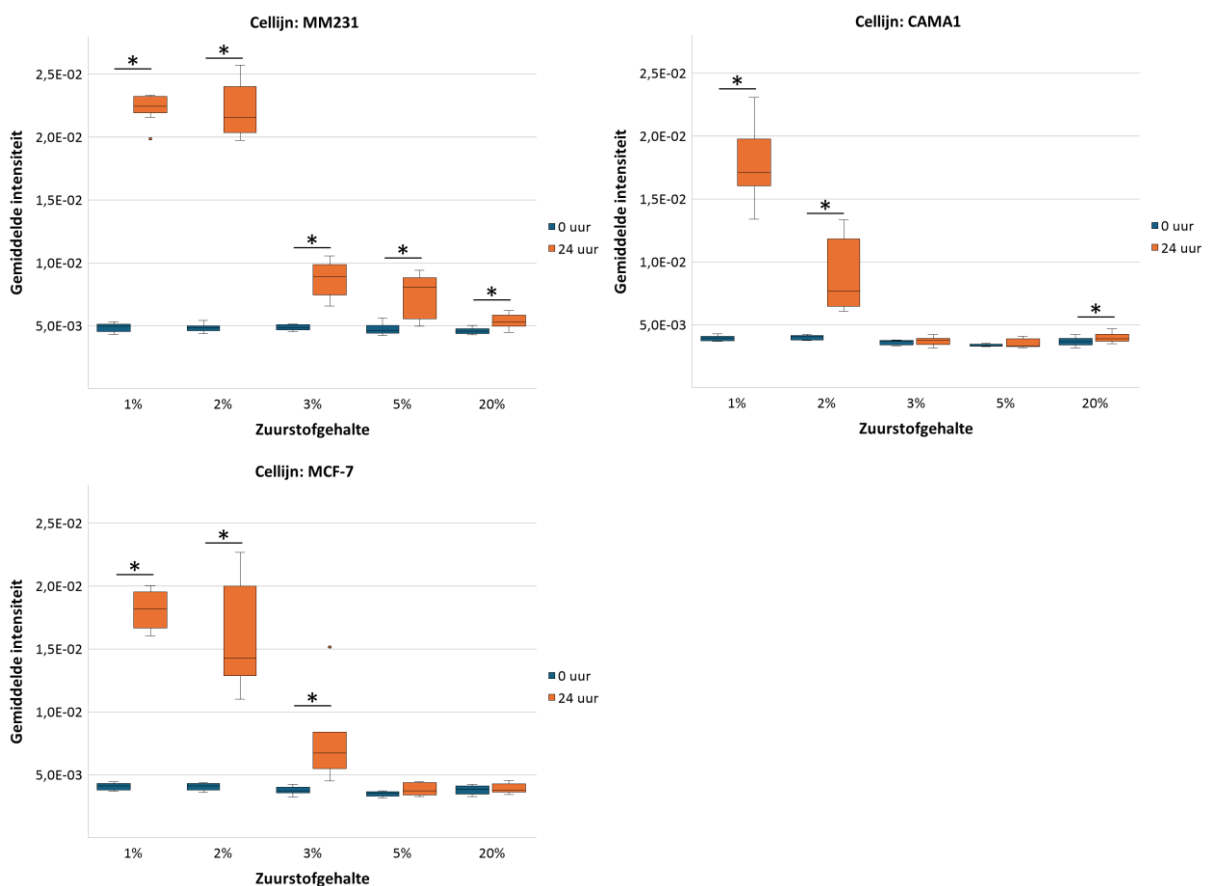
Figuur 17: De gemiddelde intensiteit bij $t = 24$ uur per zuurstofgehalte en per cellijn. Vijf zuurstofgehalten (1%, 2%, 3%, 5% en 20%) zijn met elkaar vergeleken ($*=p<0,05$).

3.3.3 Vergelijking van gemiddelde intensiteit op twee tijdstippen

Er is al gekeken naar verschillen in de gemiddelde intensiteit tussen de zuurstofgehalten. Vervolgens is er gekeken naar verschillen in de gemiddelde intensiteit tussen twee tijdstippen: $t=0$ uur en $t=24$ uur. Hierbij wordt er verwacht, ook aan de hand van de eerdere analyse, dat de gemiddelde intensiteit na $t=24$ uur significant hoger is dan op $t=0$ uur bij in ieder geval een zuurstofgehalte van 1% en 2%. Bij een zuurstofgehalte van 20% zou er geen significant verschil te zien moeten zijn. Dit is bekeken voor de drie cellijnen welke eerder benoemd zijn: MM231, CAMA1 en MCF-7 (**Figuur 18**).

Bij een zuurstofgehalte van 1% en 2% is bij alle drie de cellijnen de gemiddelde intensiteit significant hoger na $t=24$ uur ten opzichte van op $t=0$ uur. Bij een zuurstofgehalte van 3% is er bij CAMA1 geen significant verschil te zien in de gemiddelde intensiteit na $t=24$ uur ten opzichte van $t=0$ uur. Bij MM231 en MCF-7 is wel een significant verschil waar te nemen. Bij MM231 is daarnaast bij 5% zuurstofgehalte te zien dat de gemiddelde intensiteit na $t=24$ uur significant hoger is dan op $t=0$ uur. Opvallend is dat bij MM231 en CAMA1 ook een significant verschil te zien is tussen de twee tijdstippen bij een zuurstofgehalte van 20%, al is het verschil klein. Dit zou mogelijk kunnen komen omdat het twee verschillende experimenten betreft, zoals ook eerder besproken.

Dat er een significant verschil is tussen de twee tijdstippen bij een zuurstofgehalte van 1% en 2% bevestigt dat het construct HRE-UnaG werkt. Voor nu is dus aangetoond dat een laag zuurstofgehalte duidelijk invloed heeft op het construct HRE-UnaG en dat dit te visualiseren en kwantificeren is. Met dit construct zou bijvoorbeeld onderzoek naar kanker en de behandeling ervan gedaan kunnen worden. Maar het effect van hypoxie op verschillende celtypen kan ook worden onderzocht.

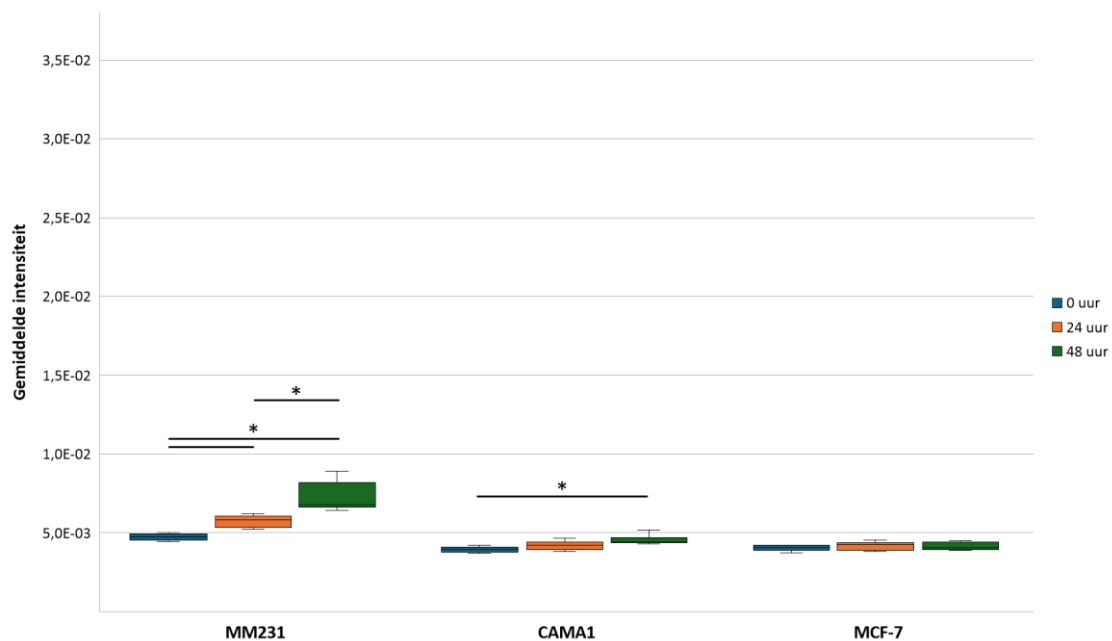


Figuur 18: De gemiddelde intensiteit op $t = 0$ uur en $t = 24$ uur voor vijf zuurstofgehalten (1%, 2%, 3%, 5% en 20%) per cellijn (*= $p < 0,05$).

3.3.4 Onderzoek reversibel effect HRE-UnaG construct

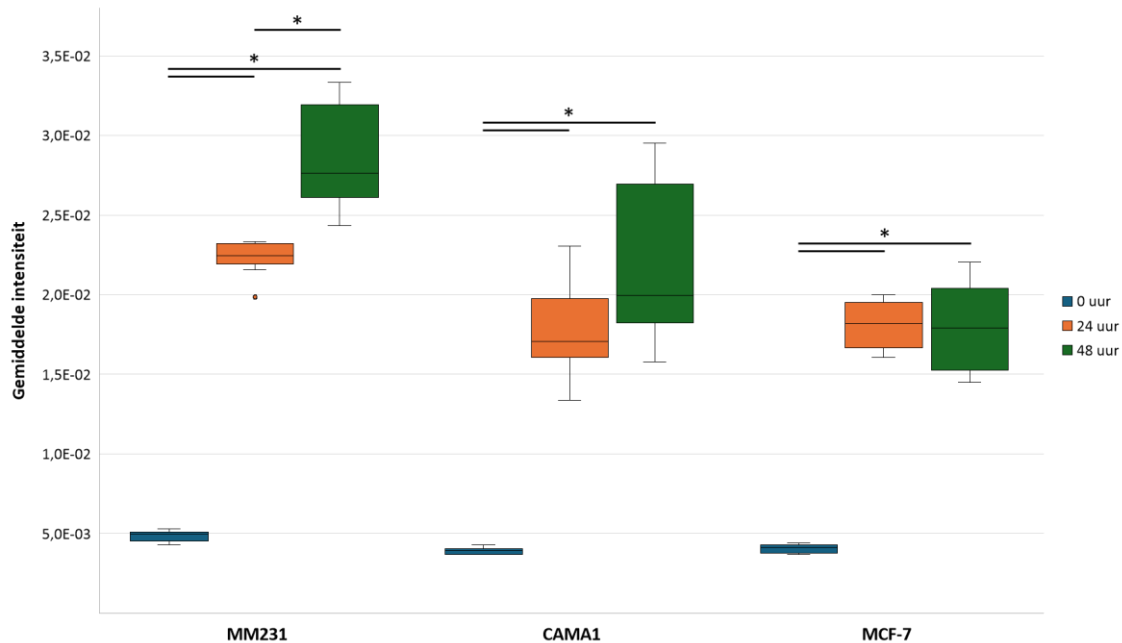
Om te onderzoeken of de werking van het construct reversibel is, is er ook een analyse gedaan voor het tijdstip $t=48$ uur. Hierin zijn twee zuurstofgehalten meegenomen: 1% en 20%. Aanvullend op de foto's die op $t=0$ uur en na $t=24$ uur gemaakt zijn, zijn er ook foto's gemaakt na $t=48$ uur. Na 24 uur werden alle cellen in een zuurstofgehalte van 20% geplaatst. Er werd verwacht dat de cellen die steeds in een zuurstofgehalte van 20% zijn geplaatst, geen significant verschil in gemiddelde intensiteit tonen. De cellen die voor 24 uur in een zuurstofgehalte van 1% zijn geplaatst zouden daarentegen na $t=48$ uur een significant lagere intensiteit moeten hebben ten opzichte van $t=24$ uur.

Voor het zuurstofgehalte van 20% is de gemiddelde intensiteit bij MM231 na $t=48$ uur significant hoger dan na $t=24$ uur en op $t=0$ uur (**Figuur 19 en Bijlage H, Tabel H2**). Dit is opmerkelijk omdat bij normoxie de gemiddelde intensiteit niet hoger zou moeten worden. Bij CAMA1 is de gemiddelde intensiteit na $t=48$ uur significant hoger dan bij $t=0$ uur. De gemiddelde intensiteit na $t=24$ uur is gelijk aan $t=0$ uur en ook $t=48$ uur. Tot slot is er bij MCF-7 geen significant verschil tussen de gemiddelde intensiteiten bij $t=0$ uur, $t=24$ uur en $t=48$ uur.



Figuur 19: De gemiddelde intensiteit op $t = 0$ uur, $t = 24$ uur en $t = 48$ uur bij een zuurstofgehalte van 20%, weergegeven per cellijn (*= $p < 0,05$).

De verschillen tussen $t=0$ uur en $t=24$ uur zijn bij een zuurstofgehalte van 1% niet van toepassing in deze paragraaf omdat deze eerder besproken zijn en deze verschillen verwacht werden. De tijdstippen $t=24$ uur en $t=48$ uur zullen echter wel worden vergeleken (**Figuur 20**). Bij een zuurstofgehalte van 1% is bij MM231, net als bij 20%, de gemiddelde intensiteit op $t=48$ uur significant hoger dan op $t=24$ uur. Dit valt op en zou betekenen dat het effect van het construct niet reversibel is op deze tijdschaal. Bij CAMA1 is er geen significant verschil tussen $t=24$ uur en $t=48$ uur. Tot slot is er bij MCF-7 ook geen significant verschil te zien tussen $t=24$ uur en $t=48$ uur. Ook dit toont aan dat het construct in ieder geval niet reversibel werkt.



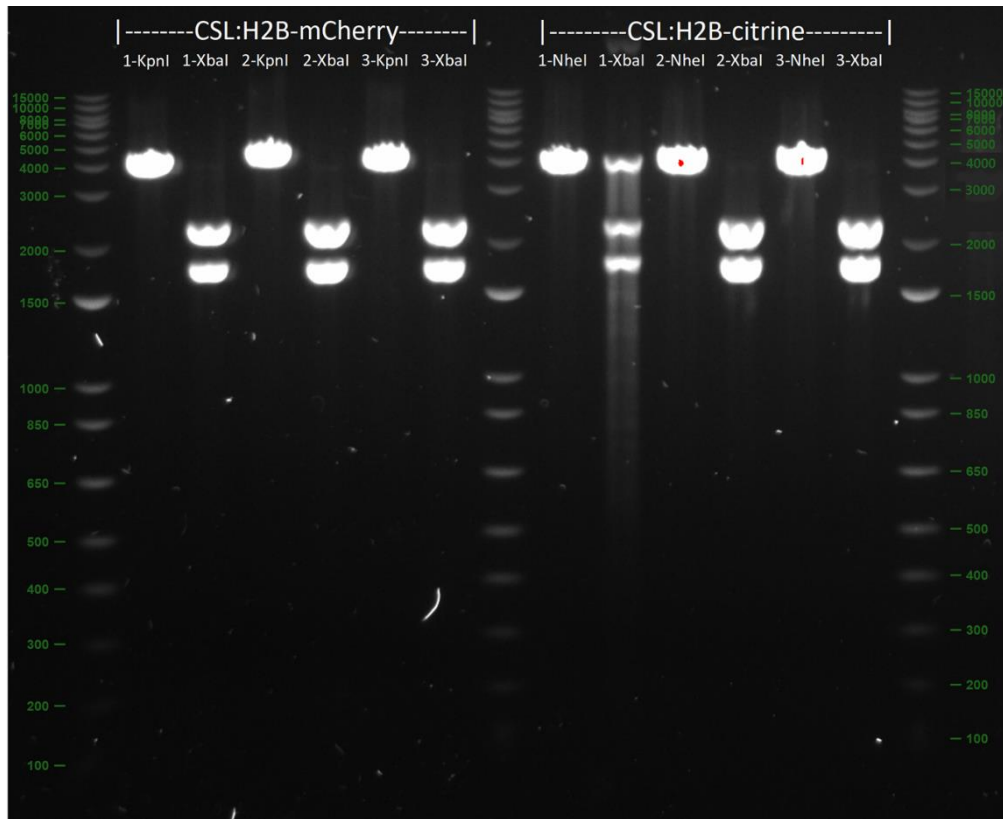
Figuur 20: De gemiddelde intensiteit op $t = 0$ uur, $t = 24$ uur en $t = 48$ uur bij een zuurstofgehalte van 1%, weergegeven per cellijn (*= $p < 0,05$).

Eerder is besproken dat het construct goed gebruikt kan worden bij een zuurstofgehalte van 1% en 2%. De resultaten waarbij de gemiddelde intensiteit op de tijdstippen $t=0$ uur en $t=24$ uur vergeleken werden bevestigen dit. Zo is er bij een zuurstofgehalte van 3% bij MM231 en MCF-7 wel nog een significant verschil waar te nemen tussen $t=0$ uur en $t=24$ uur, maar bij CAMA1 is er geen significant verschil meer tussen de twee tijdstippen. Wat verder opvalt is dat de werking van het construct niet reversibel is en dat de gemiddelde intensiteit in sommige gevallen zelfs blijft stijgen. Dit is vooral bij MM231 te zien, maar ook bij CAMA1. De MCF-7 cellijn laat dit echter niet zien. In dit onderzoek was dit echter geen expliciet onderdeel. Het construct toont wel kwantitatief en visueel een duidelijk verschil tussen hypoxie en normoxie en is dus geschikt om te worden gebruikt in live imaging onderzoeken. De karakterisatie is dus succesvol gedaan.

3.4 Productie Notch-reporters

Bij eGFP-YAP en mScarlet3-YAP zijn de twee constructen buiten dit onderzoek ontworpen. Voor twee Notch reporters (12xCSL:H2B-mCherry en 12xCSL:H2B-citrine) moest echter nog een Gibson assembly ontworpen worden, wat is gedaan met behulp van Benchling. Vervolgens werd de Gibson assembly uitgevoerd en volgde na controle ook de LR-reactie van de gateway cloning techniek.

Na het online ontwerpen van de Gibson assembly via Benchling en PCR-amplificatie van de fragmenten werd een Gibson assembly uitgevoerd om de twee entryvectoren te maken. Voor de controle van de Gibson assembly werd een restrictiereactie gedaan. Dit werd gedaan met drie verschillende enzymen: KpnI en XbaI voor CSL:H2B-mCherry en NheI en XbaI voor CSL:H2B-citrine. Bij CSL:H2B-mCherry werd met KpnI één bandje (4078 bp) verwacht en met XbaI twee bandjes (1774 bp en 2304 bp). Voor CSL:H2B werd met NheI ook één bandje (4097 bp) verwacht en met XbaI twee bandjes (1798 bp en 2299 bp). Voor beide constructen werden drie monsters meegenomen (**Figuur 21**). Op één monster na (monster 1 van CSL:H2B-citrine) voldoen alle monsters aan de verwachting. Van beide constructen is monster 2 geselecteerd op basis van concentratie (data niet weergegeven) om te worden gecontroleerd met Sanger sequencing. De sequenties bleken te kloppen en de entryvectoren werden verder gebruikt voor het maken van expressievectoren.

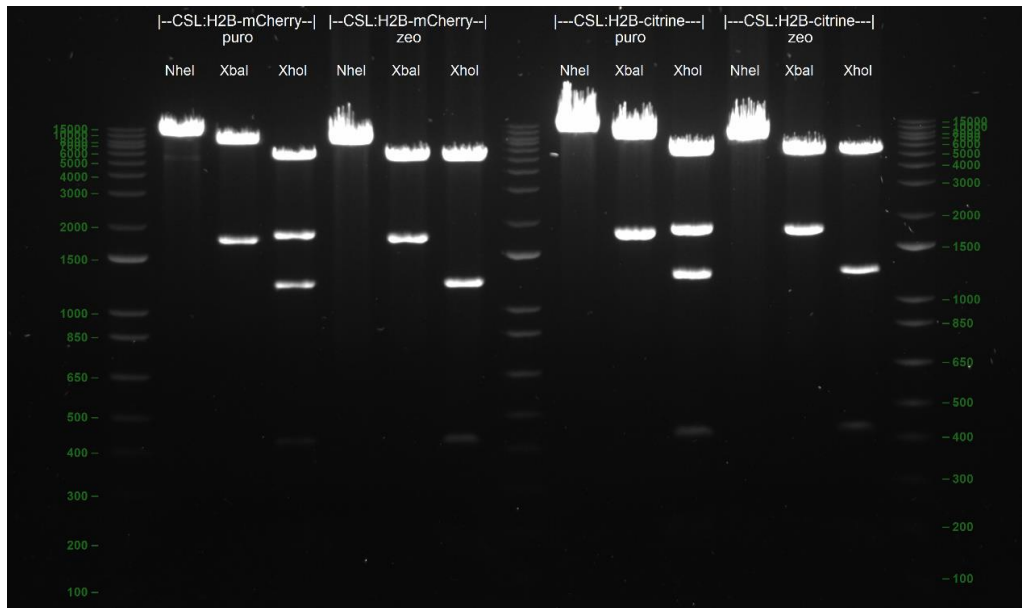


Figuur 21: 1% agarosegel van restrictiereacties van CSL:H2B-mCherry en CSL:H2B-citrine met KpnI, NheI en XbaI.

Per entryvector werden er twee verschillende expressievectoren gemaakt, een met een puromycine resistentie en een met een zeo resistentie (**Figuur , Figuur, Figuur en Figuur, 0**). Voor het controleren van de gemaakte expressievectoren werden wederom restrictiereacties gebruikt. Dit werd gedaan met de enzymen NheI, XbaI en XhoI (**Tabel 3 en Figuur 22**). Bij XhoI werd er onder andere een bandje verwacht onder de 400 bp welke niet terug te zien zijn op de gelelektroforese. Verder komen de resultaten geheel overeen met de verwachtingen. De DNA-constructen voor een Notch reporter zijn dus geproduceerd en kunnen worden gebruikt bij virusproductie.

Tabel 3: De bandjes die werden verwacht bij de verschillende restrictiereacties op CSL:H2B-mCherry (puro en zeo) en CSL:H2B-citrine (puro en zeo). Er zijn bandjes tussen haakjes geplaatst; deze zijn niet duidelijk te zien bij de gelelektroforese.

Construct	Enzymen	Verwachte bandjes (bp)
CSL:H2B-mCherry puro	NheI	9225
	XbaI	7451, 1774
	XhoI	5572, 1846, 1216, 440, (151)
CSL:H2B-mCherry zeo	NheI	7047
	XbaI	5273, 1774
	XhoI	5240, 1216, 440, (151)
CSL:H2B-citrine puro	NheI	9244
	XbaI	7446, 1798
	XhoI	5572, 1846, 1240, 435, (151)
CSL:H2B-citrine zeo	NheI	7066
	XbaI	5268, 1798
	XhoI	5240, 1240, 435, (151)



Figuur 22: 1% agarosegel van restrictiereacties van CSL:H2B-mCherry (puro en zeo) en CSL:H2B-citrine (puro en zeo) met NheI, XbaI en XhoI.

3.5 Deliverables

In dit onderzoek zijn verschillende constructen geproduceerd en gekarakteriseerd. Om al deze constructen op een rijtje te zetten is een overzicht gemaakt (**Tabel 4**).

Tabel 4: Overzicht van de geproduceerde en gekarakteriseerde constructen in dit onderzoek. De constructen voor karakterisatie zijn door een ander geproduceerd.

Construct	Schematische weergave	Cellijnen	Wat
eGFP-YAP		MG-63 NIH/3T3 NHDF	Productie + karakterisatie
mScarlet3-YAP		MG-63 NIH/3T3 NHDF MCF-10a H2B-mNeonGreen	Productie + karakterisatie
Z-cad (d2GFP-ZEB1 + E-cadherine-dsRED)		MCF-7	Karakterisatie
HRE-UnaG		MM231 CAMA1 MCF-7	Karakterisatie
CSL:H2B-mCherry (2x, zeo + puro)		N.v.t.	Productie
CSL:H2B-citrine (2x, zeo + puro)		N.v.t.	Productie

4 Discussie

In dit onderzoek zijn er vier deelonderzoeken, welke allen behoren tot het produceren en/of karakteriseren van DNA-constructen voor fluorescente reporter eiwitten. Het hoofdonderzoek betreft het produceren en karakteriseren van twee YAP-reporters. Daarnaast waren er ook drie nevenonderzoeken: karakterisatie van een EMT-reporter, karakterisatie van een hypoxiereporter en productie van vier Notch-reporters.

4.1 Productie en karakterisatie YAP-reporters

Het hoofddoel van dit onderzoek is om zowel de productie als de karakterisatie te doen van twee constructen voor een YAP-reporter: eGFP-YAP en mScarlet3-YAP. De DNA-constructen eGFP-YAP en mScarlet3-YAP konden met succes worden geproduceerd met behulp van Gibson assembly en de LR-reactie van gateway cloning. Met deze constructen werden ook zeven stabiele cellijnen geproduceerd, drie met eGFP-YAP en vier met mScarlet3-YAP. Met de cellijnen MG-63 en NIH/3T3 werden experimenten gedaan om beide constructen te karakteriseren. Hierbij is er een handmatige analyse gedaan met behulp van ImageJ omdat het technisch gezien niet mogelijk was om dit te doen met Cellprofiler. Hiermee wordt een eerste beeld van de werking van het construct gegeven, maar het is wel zaak om een vervolgonderzoek te doen met Cellprofiler. Zo is voorlopig aangetoond dat het percentage YAP in de nucleus significant hoger is bij een lage confluentie ten opzichte van een hoge confluentie. Daarnaast zorgt dasatinib ervoor dat de cellen aan elkaar hechten en YAP zich verplaatst van de nucleus naar het cytoplasma. CA3, PY-60 en PAR1 laten echter niet de verwachte resultaten zien. CA3 is toxisch voor de cellen en PY-60 en PAR1 hebben geen effect op de lokalisatie van YAP.

Dat het percentage YAP in de nucleus significant hoger is bij lage confluentie komt overeen met de verwachting [9], [10], [11]. In een onderzoek van Zhao *et al.* is met NIH/3T3 cellen en MCF10a cellen ook aangetoond dat YAP overwegend in de nucleus waar te nemen is bij lage confluentie en in het cytoplasma bij hoge confluentie [39]. In dat onderzoek wordt ook gesuggereerd dat de werking van YAP in kankercellijnen niet normaal gereguleerd is. In kankercellijnen zoals MG-63 is er overactiviteit van YAP. Dat zou betekenen dat YAP bij de MG-63 cellijn verhoogd zou moeten zijn in de nucleus, wat in dit onderzoek nog niet is aangetoond.

Dat dasatinib YAP inhibeert is eerder aangetoond. Dasatinib inhibeert Src kinase waarmee YAP ook wordt geïnhibeerd [16], [17]. Met het remmen van Src kinase wordt daarnaast E-cadherine verhoogd, wat ervoor zorgt dat de cel-celadhesie ook wordt versterkt [40]. Dit is ook terug te zien in de resultaten van dit onderzoek. CA3 is een zeer krachtige remmer van YAP en geeft al effect bij een concentratie van 0,5 μM [18]. YAP is een regulator van genen die betrokken zijn bij onder andere het overleven van cellen. Wanneer YAP dus niet actief is, zal apoptose niet langer geremd worden. Dit treedt al op bij een concentratie van 0,5 μM CA3. In dit onderzoek is 10 μM CA3 gebruikt, wat duidelijk een toxische hoeveelheid was. De concentratie van CA3 moet dus heroverwogen worden bij verder onderzoek. Bij PY-60 en PAR1 zijn geen duidelijke resultaten naar voren gekomen. PY-60 en PAR1 zijn beiden activatoren die een indirect effect op YAP hebben [14], [15]. Afhankelijk van het celttype kan het zo zijn dat deze twee stoffen geen effect laten zien. Daarnaast kan het zijn dat de confluentie te hoog is om een effect te zien. Alternatieven zijn latrunculine A en leptomycine B. Deze stoffen zijn ook geen directe activatoren van YAP, maar remmen de lokalisatie van YAP naar het cytoplasma [41], [42]. Daarnaast is ook GA-017 een optie, wat LATS1/2 remt [43].

Voor het analyseren van de resultaten met Cellprofiler zou overwogen kunnen worden om gebruik te maken van een construct waarmee het celmembraan zichtbaar gemaakt kan worden, zoals LCK-mScarlet [44]. Tot slot zijn er nog andere manieren om de YAP-reporters te karakteriseren. Zo kan er gewerkt worden met verschillende gels, stijf ten opzichte van zacht [11]. Deze gels kunnen worden gecombineerd met migratie-experimenten [45]. Daarnaast kunnen er experimenten worden opgezet waarbij de cellen gerekt worden.

4.2 Karakterisatie EMT-reporter

Behalve het karakteriseren van YAP, zijn er nog meer karakterisaties uitgevoerd. Een van de nevendoelen van dit onderzoek was om het construct Z-cad in MCF-7 te karakteriseren. Door het co-kweken met MG-63 werd succesvol EMT geïnduceerd in MCF-7 Z-cad cellen, wat te zien was met groene fluorescentie. De efficiëntie van deze methode was echter erg laag. In een onderzoek van Ziegler *et al.* bleek het induceren van EMT met behulp van 3D kweekmethode ook efficiënter te zijn [19]. Daarnaast kan EMT ook chemisch worden geïnduceerd; met bijvoorbeeld TNF- α [46]. Echter is het wel mogelijk om EMT te induceren met co-kweek. In het onderzoek van Ziegler *et al.* werd een co-kweek gebruikt waarbij de MCF-7 Z-cad cellen in de insert gekweekt werden en de MG-63 cellen in de well, in tegenstelling tot dit onderzoek. Hiermee konden de EMT-positieve cellen direct geselecteerd worden zonder gebruik van bijvoorbeeld FACS. Bij het kweken van deze EMT-positieve cellen was ook het fenotype van de MCF-7 cellen veranderd; deze hadden een meer mesenchymaal uiterlijk. In het huidige onderzoek is het niet mogelijk geweest om dit verschil aan te tonen en hiervoor is dus meer onderzoek nodig naast het kunnen selecteren van de cellen.

4.3 Karakterisatie hypoxiereporter

Naast het karakteriseren van een EMT-reporter, was een ander nevendoel het karakteriseren van een hypoxiereporter. Dit is gedaan met het HRE-UnaG construct, waarmee bij lage zuurstofniveaus de activiteit van HIF in relatie tot hypoxie onderzocht kan worden. Bij drie verschillende cellijnen (MM231, CAMA1 en MCF-7) met het HRE-UnaG construct is de gemiddelde intensiteit gemeten bij vijf verschillende zuurstofgehalten (1%, 2%, 3%, 5% en 20%). Gebleken is dat het construct actief is bij een zuurstofgehalte van 5% en lager bij de cellijn MM231. Voor CAMA1 geldt dat dit het geval is bij een zuurstofgehalte van 2% en lager en bij MCF-7 bij een zuurstofgehalte van 3% en lager. Bij MM231 is dus het grootste effect te zien en bij CAMA1 en kleinste effect. Daarnaast is gebleken dat de gemiddelde intensiteit niet afneemt en zelfs kan toenemen wanneer de cellen weer in normoxie worden gekweekt. In een eerder onderzoek van Erapanedi *et al.* met CHO-cellen werd echter aangetoond dat de gemiddelde intensiteit voor ongeveer de helft afneemt wanneer de cellen voor 24 uur in normoxie worden geplaatst [47]. Ook werd aangetoond dat HRE-UnaG wordt geactiveerd bij een zuurstofgehalte van 5% en dat de intensiteit stijgt naarmate het zuurstofgehalte daalt onder de 5%. De stijging van de intensiteit heeft te maken met de sterkere activatie van HIF bij een daling van het zuurstofgehalte. Dit komt overeen met de MM231 cellijn in dit onderzoek. In het onderzoek van Erapanedi *et al.* werd een aanpassing aan het plasmide gedaan, waarbij een PEST-sequentie aan de C-terminus van UnaG werd gekoppeld om de aanmaak en afbraak van UnaG te bevorderen. Dit resulteerde in een afname van de gemiddelde intensiteit bij normoxie, terwijl de niet aangepaste UnaG juist een stijgende intensiteit vertoonde. Dit komt overeen met de resultaten van het huidige onderzoek, wat mogelijk betekent dat de PEST sequentie niet het beoogde resultaat geeft in dit onderzoek. Dit ondanks dat er wel een kloppende PEST sequentie is en dat deze eerder werkte [48]. Daarnaast kan de halfwaardetijd van dUnaG een rol spelen. Deze is vastgesteld op 7,8 uur [47]. 24 uur is hoogstwaarschijnlijk niet genoeg tijd om de gemiddelde intensiteit terug op het niveau van t=0 uur te brengen. Echter is nog niet duidelijk waarom de gemiddelde intensiteit op blijft lopen tot 48 uur bij MM231 en CAMA1, tenzij de PEST sequentie kapot is. Mogelijk heeft een kapotte PEST sequentie invloed op de aanmaak van UnaG, welke dan nog een tijd kan blijven aanhouden ondanks normoxie.

4.4 Productie Notch-reporters

Tot slot het derde nevenproject; met als doel om DNA-constructen te maken voor een Notch-reporter. In een onderzoek van Nowotschin *et al.* is ook een dergelijk construct gebruikt [30]. Hier is echter geen Gibson assembly en LR-reactie gebruikt, maar restrictieplaatsen. Desondanks werkt dat betreffende construct op eenzelfde manier en is aangetoond dat dit construct werkt als Notch-reporter bij live imaging. Naast dit construct zijn er ook andere Notch-reporters ontwikkeld in andere onderzoeken. Deze waren echter niet voldoende gevoelig of hadden onvoldoende resolutie. In dit onderzoek is een start gemaakt om wel een gevoelige Notch-reporter te produceren.

In dit onderzoek zijn vier deelonderzoeken uitgevoerd die samen bijdragen aan een beter begrip van belangrijke processen in kankeronderzoek. De YAP-reporter richt zich op mechanotransductie en celregulatie, de EMT-reporter op celtransitieprocessen, de hypoxiereporter op zuurstofafhankelijke signaalroutes, en de Notch-reporter op intercellulaire communicatie. Hoewel de onderzoeken afzonderlijk waardevolle inzichten bieden, kunnen de verschillende reporters ook gecombineerd worden. Door deze reporters samen te gebruiken in modellen zoals organs-on-chips, kan in de toekomst beter worden onderzocht hoe deze routes samen bijdragen aan kankerprogressie en therapieresistentie.

5 Conclusie

Dit onderzoek heeft zich gericht op het produceren en/of karakteriseren van DNA-constructen voor fluorescente reporters. Er zijn twee YAP-reporters geproduceerd en er is een start gemaakt met de karakterisatie hiervan bij twee verschillende cellijnen. Bij een hoge confluentie is er significant minder YAP waar te nemen in de nucleus ten opzichte van een lage confluentie. Naar activatoren en inhibitoren van YAP is meer onderzoek nodig voor de karakterisatie. Voorlopig kan dus geconcludeerd worden dat de reporter werkt. Verder is er een EMT-reporter gekarakteriseerd. Ondanks een lage efficiëntie is het mogelijk om EMT te induceren bij cellen met deze reporter middels co-kweek en is aangetoond dat de reporter werkt. Er is daarnaast een hypoxiereporter gekarakteriseerd in drie cellijnen waarbij is aangetoond dat de hypoxiereporter geactiveerd wordt bij een zuurstofgehalte van 2% en lager. Er is hierbij een significant verschil aangetoond met een zuurstofgehalte van 20% en na t=24 uur ten opzichte van t=0 uur. Tot slot is er een Notch-reporter geproduceerd en is de sequentie hiervan gecontroleerd; welke kloppend was.

6 Aanbevelingen

Voor de YAP-reporter is een betere analyse en meer onderzoek nodig om deze te karakteriseren. Met ImageJ zijn geen betrouwbare resultaten verkregen en het is dan ook aan te raden om met Cellprofiler een analyse te doen van de foto's. Daarnaast kan overwogen worden om het experiment te herhalen met een andere activator (GA-017) of inhibitoren van de verplaatsing naar de nucleus (latrunculine A en leptomycine B). Andere experimenten die overwogen kunnen worden zijn het gebruik van verschillende gels in combinatie met migratie-experimenten en het rekken van de cellen.

Bij de EMT-reporter is aangetoond dat de reporter werkt. Het is echter tijdens dit onderzoek niet mogelijk geweest om de cellen die EMT-positief zijn te selecteren. Dit kan gedaan worden met behulp van FACS. Maar er kan ook overwogen worden om EMT chemisch te induceren met bijvoorbeeld TNF- α of met behulp van een 3D kweekmethode.

De hypoxiereporter kan worden gebruikt in experimenten waarbij het zuurstofgehalte lager dan 2% is. Hierbij moet wel in acht worden genomen dat het construct erg stabiel is door de halfwaardetijd van dUnaG en mogelijk een kapotte PEST sequentie. Hiervoor zou de stabiliteit van het eiwit onderzocht moeten worden. Voor nu is het proces van activatie niet reversibel binnen 24 uur en zelfs niet binnen 48 uur. Om te bepalen of het proces reversibel is zouden er vervolggexperimenten plaats moeten vinden waarbij de cellen langer dan 48 uur worden geïncubeerd in normoxie, na blootstelling aan hypoxie. Ter verbetering van de resultaten zou er overwogen kunnen worden om met behulp van FACS cellen met een zwakke intensiteit te elimineren. Er is immers veel spreiding in de gemiddelde intensiteit tussen cellen.

Het DNA-construct voor de Notch-reporter is geproduceerd, maar er moeten wel nog stabiele cellijnen geproduceerd worden. Vervolgens kan de karakterisatie gedaan worden.

Uiteindelijk kunnen de reporters worden ingezet bij onderzoeken rondom onder andere kanker en ook in organ-on-chips. De reporters zouden zelfs gecombineerd kunnen worden met elkaar of andere constructen om zo een beeld te krijgen van de processen in de cel.

7 Literatuurlijst

- [1] R. E. Campbell and M. W. Davidson, 'Fluorescent reporter proteins', in *Molecular Imaging with Reporter Genes*, Cambridge: Cambridge University Press, 2010, pp. 3–40.
- [2] A. Müller-Taubenberger and H. C. Ishikawa-Ankerhold, 'Fluorescent reporters and methods to analyze fluorescent signals', *Methods Mol. Biol.*, vol. 983, pp. 93–112, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-302-2_5.
- [3] H. Hutter, 'Fluorescent protein methods: Strategies and applications', *Methods Cell Biol.*, vol. 107, pp. 67–92, 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-394620-1.00003-5.
- [4] B. Subia *et al.*, 'Breast tumor-on-chip models: From disease modeling to personalized drug screening', *J. Control. Release*, vol. 331, p. 103, 2021, doi: 10.1016/J.JCONREL.2020.12.057.
- [5] 'Group Den Toonder'. Accessed: Aug. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.tue.nl/en/research/research-groups/microsystems/group-den-toonder>
- [6] P. van Roessel and A. H. Brand, 'Imaging into the future: Visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins', *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 1, pp. E15–20, 2002, doi: 10.1038/NCB0102-E15.
- [7] E. Snapp, 'Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology', *Curr. Protoc. cell Biol.*, vol. Chapter 21, no. 1, Jun. 2005, doi: 10.1002/0471143030.CB2104S27.
- [8] A. Pocaterra, P. Romani, and S. Dupont, 'YAP/TAZ functions and their regulation at a glance', *J. Cell Sci.*, vol. 133, no. 2, 2020, doi: 10.1242/JCS.230425.
- [9] R. Abylkassov and Y. Xie, 'Role of Yes-associated protein in cancer: An update (Review)', *Oncol. Lett.*, vol. 12, no. 4, pp. 2277–2282, 2016, doi: 10.3892/OL.2016.4955.
- [10] T. Panciera *et al.*, 'Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease', *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 18, no. 12, pp. 758–770, 2017, doi: 10.1038/NRM.2017.87.
- [11] I. Dasgupta and D. McCollum, 'Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation', *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 46, pp. 17693–17706, 2019, doi: 10.1074/JBC.REV119.007963.
- [12] A. L. Elaimy and A. M. Mercurio, 'Convergence of VEGF and YAP/TAZ signaling: Implications for angiogenesis and cancer biology', *Sci. Signal.*, vol. 11, no. 552, 2018, doi: 10.1126/SCISIGNAL.AAU1165.
- [13] L. Valon *et al.*, 'Optogenetic control of cellular forces and mechanotransduction', *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1038/ncomms14396.
- [14] S. Z. Shalhout *et al.*, 'YAP-dependent proliferation by a small molecule targeting annexin A2', *Nat. Chem. Biol.*, vol. 17, no. 7, pp. 767–775, 2021, doi: 10.1038/S41589-021-00755-0.
- [15] D. Fujimoto *et al.*, 'PAR1 participates in the ability of multidrug resistance and tumorigenesis by controlling Hippo-YAP pathway', *Oncotarget*, vol. 6, no. 33, pp. 34788–34799, 2015, doi: 10.18632/ONCOTARGET.5858.
- [16] Y. Oku *et al.*, 'Small molecules inhibiting the nuclear localization of YAP/TAZ for chemotherapeutics and chemosensitizers against breast cancers', *FEBS Open Bio*, vol. 5, pp. 542–549, 2015, doi: 10.1016/J.FOB.2015.06.007.
- [17] Y. Si *et al.*, 'Src inhibits the Hippo tumor suppressor pathway through tyrosine phosphorylation of LATS1', *Cancer Res.*, vol. 77, no. 18, pp. 4868–4880, 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0391.
- [18] S. Song *et al.*, 'A novel YAP1 inhibitor targets CSC-enriched radiation-resistant cells and exerts strong antitumor activity in esophageal adenocarcinoma', *Mol. Cancer Ther.*, vol. 17, no. 2, pp. 443–454, 2018, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0560.
- [19] E. Ziegler *et al.*, 'Generation of MCF-7 cells with aggressive metastatic potential in vitro and in vivo', *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 148, no. 2, pp. 269–277, 2014, doi: 10.1007/s10549-014-3159-4.
- [20] R. Kalluri and R. A. Weinberg, 'The basics of epithelial-mesenchymal transition', *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428, 2009, doi: 10.1172/JCI39104.
- [21] M. W. Nam, C. W. Kim, and K. C. Choi, 'Epithelial-mesenchymal transition-inducing factors involved in the progression of lung cancers', *Biomol. Ther. (Seoul)*, vol. 30, no. 3, pp. 213–220, 2022, doi: 10.4062/BIOMOLTHER.2021.178.
- [22] I. K. Guttilla *et al.*, 'Prolonged mammosphere culture of MCF-7 cells induces an EMT and repression of the estrogen receptor by microRNAs', *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 132, no. 1, pp. 75–85, 2012, doi: 10.1007/S10549-011-1534-Y.
- [23] A. L. D. Wallabregue *et al.*, 'Two color imaging of different hypoxia levels in cancer cells', *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 145, no. 4, pp. 2572–2583, 2023, doi: 10.1021/jacs.2c12493.
- [24] A. Sattiraju *et al.*, 'Hypoxic niches attract and sequester tumor-associated macrophages and cytotoxic T cells and reprogram them for immunosuppression', *Immunity*, vol. 56, no. 8, pp. 1825–1843.e6, 2023, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2023.06.017.

- [25] A. Kumagai *et al.*, 'A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle', *Cell*, vol. 153, no. 7, pp. 1602–1611, 2013, doi: 10.1016/J.CELL.2013.05.038.
- [26] Q. Shi *et al.*, 'Notch signaling pathway in cancer: from mechanistic insights to targeted therapies', *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 9, no. 1, 2024, doi: 10.1038/S41392-024-01828-X.
- [27] D. Anusewicz, M. Orzechowska, and A. K. Bednarek, 'Notch signaling pathway in cancer-Review with bioinformatic analysis', *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 4, pp. 1–33, 2021, doi: 10.3390/CANCERS13040768.
- [28] C. Sahlgren *et al.*, 'Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 17, pp. 6392–6397, 2008, doi: 10.1073/PNAS.0802047105.
- [29] O. M. J. A. Stassen, T. Ristori, and C. M. Sahlgren, 'Notch in mechanotransduction - from molecular mechanosensitivity to tissue mechanostasis', *J. Cell Sci.*, vol. 133, no. 24, 2020, doi: 10.1242/JCS.250738.
- [30] S. Nowotschin *et al.*, 'A bright single-cell resolution live imaging reporter of Notch signaling in the mouse', *BMC Dev. Biol.*, vol. 13, no. 1, 2013, doi: 10.1186/1471-213X-13-15.
- [31] J. S. Reece-Hoyes and A. J. M. Walhout, 'Gateway recombinational cloning', *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2018, no. 1, 2018, doi: 10.1101/PDB.TOP094912.
- [32] D. Esposito, L. A. Garvey, and C. S. Chakiath, 'Gateway cloning for protein expression', *Methods Mol. Biol.*, vol. 498, pp. 31–54, 2009, doi: 10.1007/978-1-59745-196-3_3.
- [33] F. Katzen, 'Gateway recombinational cloning: a biological operating system', *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 2, no. 4, pp. 571–589, 2007, doi: 10.1517/17460441.2.4.571.
- [34] D. G. Gibson *et al.*, 'Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases', *Nat. Methods*, vol. 6, no. 5, pp. 343–345, 2009, doi: 10.1038/nmeth.1318.
- [35] T. Sakuma, M. A. Barry, and Y. Ikeda, 'Lentiviral vectors: basic to translational', *Biochem. J.*, vol. 443, no. 3, pp. 603–618, 2012, doi: 10.1042/BJ20120146.
- [36] A. Ettinger and T. Wittmann, 'Fluorescence live cell imaging', *Methods Cell Biol.*, vol. 123, pp. 77–94, 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-420138-5.00005-7.
- [37] 'Benefits of fluorescence-activated cell sorting in stem cell research'. Accessed: Apr. 02, 2024. [Online]. Available: <https://www.bio-rad.com/en-nl/applications-technologies/benefits-fluorescence-activated-cell-sorting-stem-cell-research?ID=Q0JH51RT8IG9#References>
- [38] D. Sprinzak *et al.*, 'Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states', *Nature*, vol. 465, no. 7294, pp. 86–90, 2010, doi: 10.1038/NATURE08959.
- [39] B. Zhao *et al.*, 'Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control', *Genes Dev.*, vol. 21, no. 21, p. 2747, 2007, doi: 10.1101/GAD.1602907.
- [40] A. R. Dosch *et al.*, 'Src kinase inhibition restores E-cadherin expression in dasatinib-sensitive pancreatic cancer cells', *Oncotarget*, vol. 10, no. 10, pp. 1056–1069, 2019, doi: 10.18632/ONCOTARGET.26621.
- [41] K. T. Furukawa *et al.*, 'The epithelial circumferential actin belt regulates YAP/TAZ through nucleocytoplasmic shuttling of merlin', *CellReports*, vol. 20, pp. 1435–1447, 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.032.
- [42] A. Das *et al.*, 'YAP nuclear localization in the absence of cell-cell contact is mediated by a filamentous actin-dependent, myosin II- and phospho-YAP-independent pathway during extracellular matrix mechanosensing', *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 12, p. 6096, 2016, doi: 10.1074/JBC.M115.708313.
- [43] A. Aihara *et al.*, 'Small molecule LATS kinase inhibitors block the Hippo signaling pathway and promote cell growth under 3D culture conditions', *J. Biol. Chem.*, vol. 298, no. 4, p. 101779, 2022, doi: 10.1016/J.JBC.2022.101779.
- [44] A. O. Chertkova *et al.*, 'Robust and bright genetically encoded fluorescent markers for highlighting structures and compartments in mammalian cells', 2017, doi: 10.1101/160374.
- [45] M. Sakabe *et al.*, 'YAP/TAZ-CDC42 signaling regulates vascular tip cell migration', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 41, pp. 10918–10923, 2017, doi: 10.1073/PNAS.1704030114/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [46] C. W. Li *et al.*, 'Epithelial-mesenchyme transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1', *Cancer Res.*, vol. 72, no. 5, p. 1290, 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3123.
- [47] R. Erapaneedi *et al.*, 'A novel family of fluorescent hypoxia sensors reveal strong heterogeneity in tumor hypoxia at the cellular level', *EMBO J.*, vol. 35, no. 1, pp. 102–113, 2016, doi: 10.15252/EMBJ.201592775.
- [48] 'Addgene: pLenti-HRE-dUnaG'. Accessed: Jun. 28, 2024. [Online]. Available: <https://www.addgene.org/124372/>

Bijlagen

Bijlage A Gebruikte primers

Tabel A1: Overzicht van primers voor de PCR-amplificatie voor de Gibson assembly van de entryvector eGFP-YAP. De overlap is weergegeven in kleine letters.

Primer	Sequentie
Backbone FW	5' gataaagaagctttcttacatggttatagACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTa 3'
Backbone RV	5' cccttgctcacatggtggcgaccgtagcAGCCTGCTTTTTGTACAAAGTTGGCATTa 3'
eGFP-YAP FW	5' taatgccaactttgtacaaaaagcaggctGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGG 3'
eGFP-YAP RV	5' taatgccaactttgtacaagaagctgggtCTATAACCATGTAAGAAAGCTTTCTTTATC 3'

Tabel A2: Overzicht van primers voor de PCR-amplificatie voor de Gibson assembly van de entryvector mScarlet3-YAP. De overlap is weergegeven in kleine letters.

Primer	Sequentie
Backbone FW	5' ggttatagagccctcaggcagactgaattcACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTa 3'
Backbone RV	5' gcctcgggtctatccatggtggcgaccggtAGCCTGCTTTTTGTACAAAGTTGGCATTa 3'
mScarlet3 FW	5' taatgccaactttgtacaaaaagcaggctACCGGTCGCCACCATGGATAGCACCGAGGC 3'
mScarlet3 RV	5' ttgaggcggcggctgctgcccgggatccatGGAGCCACCGGAGCCGCCGGTGGAGTGGCG 3'
YAP FW	5' cgccactccaccggcggtccgggtgctccATGGATCCCGGCAGCAGCCGCCCTCAA 3'
YAP RV	5' taatgccaactttgtacaagaagctgggtGAATTCAGTCTGCCTGAGGGCTCTATAACC 3'

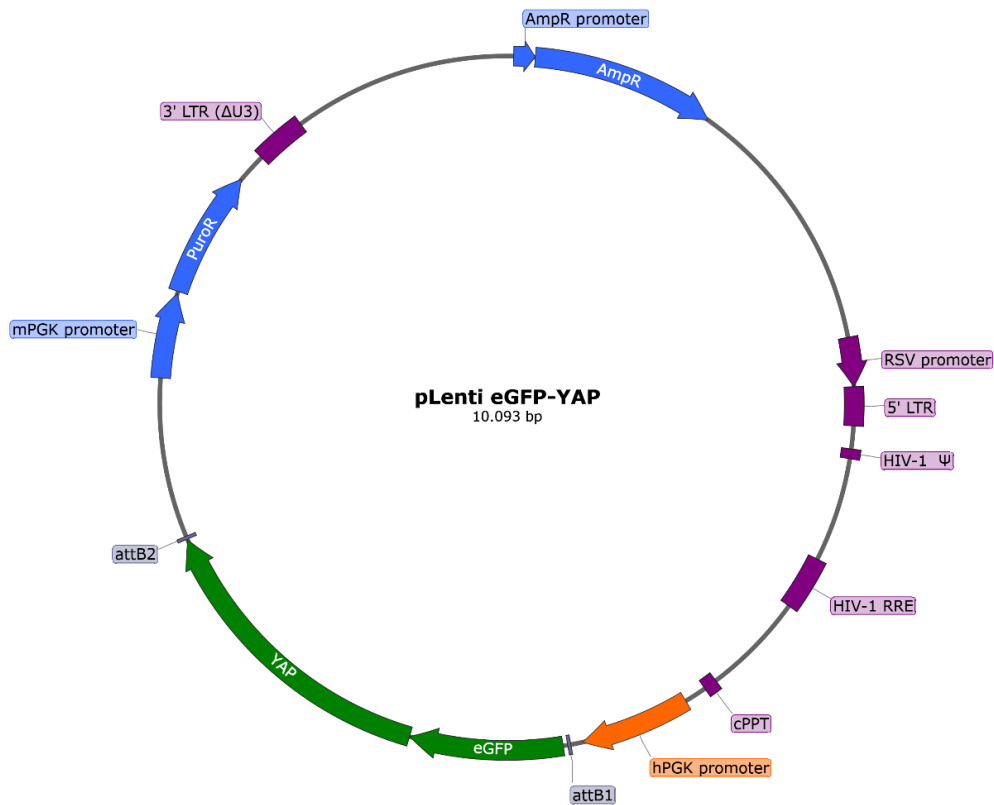
Tabel A3: Overzicht van primers voor de PCR-amplificatie voor de Gibson assembly van de entryvector 12xCSL:H2B-mCherry. De overlap is weergegeven in kleine letters.

Primer	Sequentie
Backbone FW	5' agcctcgactgtgccttctagttgccagCGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCA 3'
Backbone RV	5' agtcgacctgcaggcatgcaagcttgCGAAGCTTGAGCTCGAGATCCAGTCGACTG 3'
mCherry FW	5' cagtcgactggatctcgagctcaagcttcgCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACT 3'
mCherry RV	5' tgcggccgctttactgtacagctcgCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCT 3'

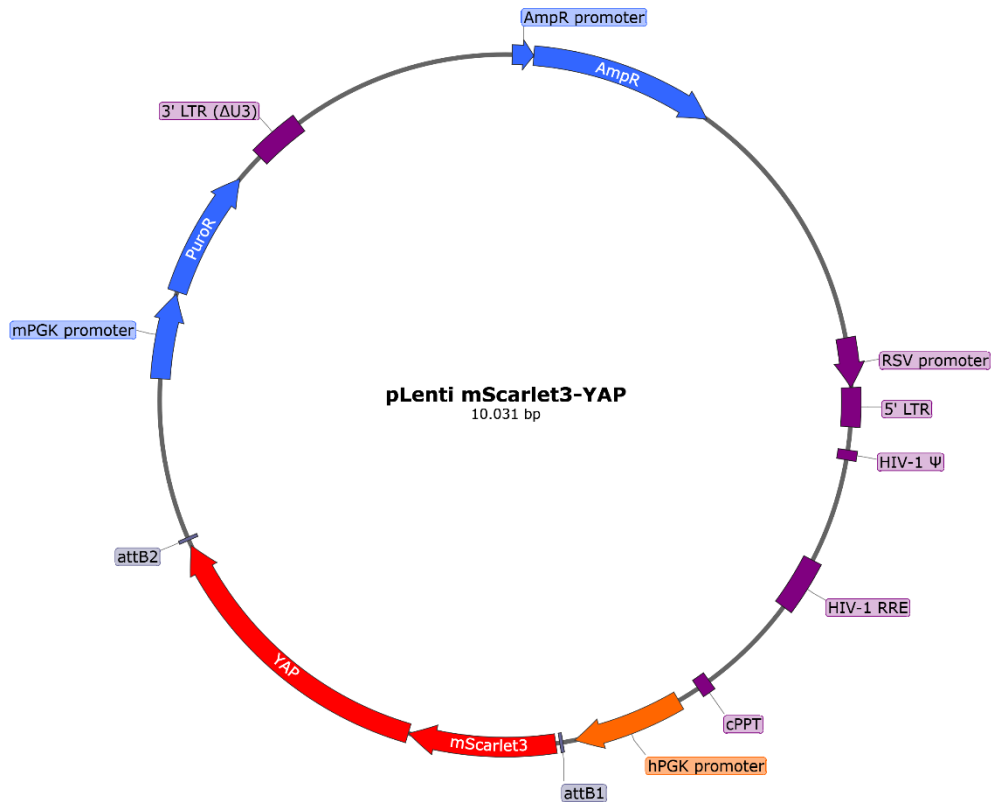
Tabel A4: Overzicht van primers voor de PCR-amplificatie voor de Gibson assembly van de entryvector 12xCSL:H2B-citrine. De overlap is weergegeven in kleine letters.

Primer	Sequentie
Backbone FW	5' agcctcgactgtgccttctagttgccagCGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCA 3'
Backbone RV	5' cctctagagtgcacctgcaggcatgcaaCGAAGCTTGAGCTCGAGATCCAGTCGACTG 3'
Citrine FW	5' cagtcgactggatctcgagctcaagcttcgTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGG 3'
Citrine RV	5' tgcggccgctttactgtacagctcgCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCT 3'

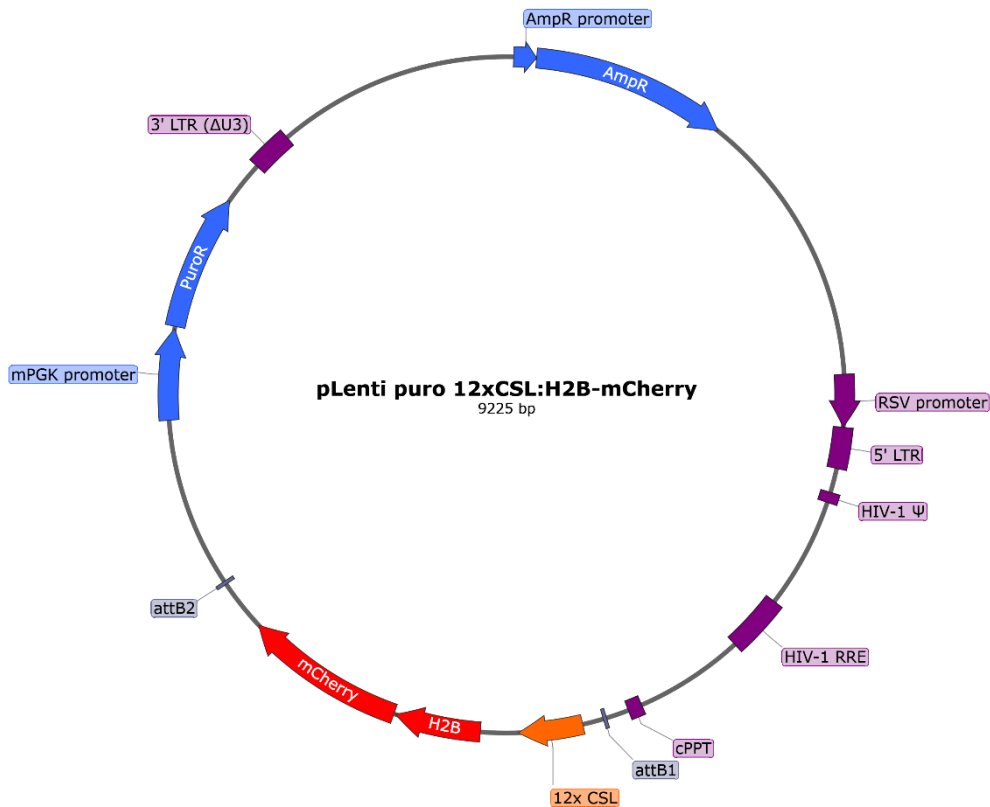
Bijlage B Maps van geproduceerde expressievectoren



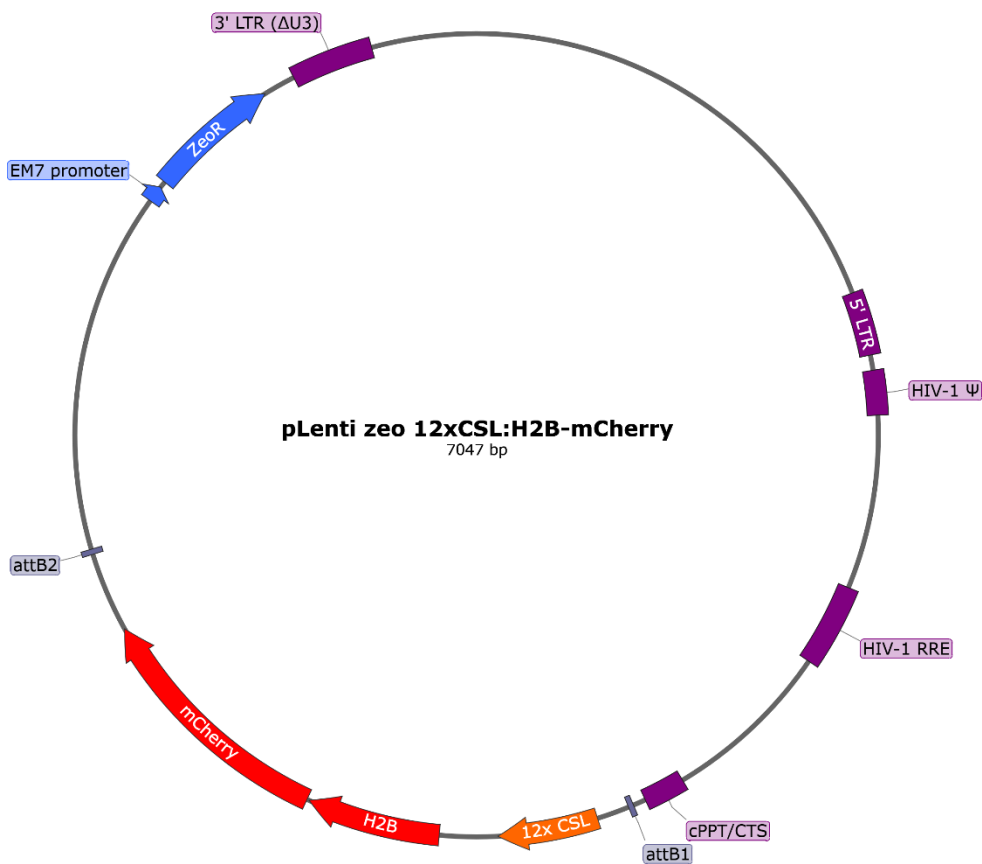
Figuur B1: De map van het eGFP-YAP construct wat geproduceerd is met Gibson assembly en gateway cloning, gemaakt met behulp van Benchling en SnapGene.



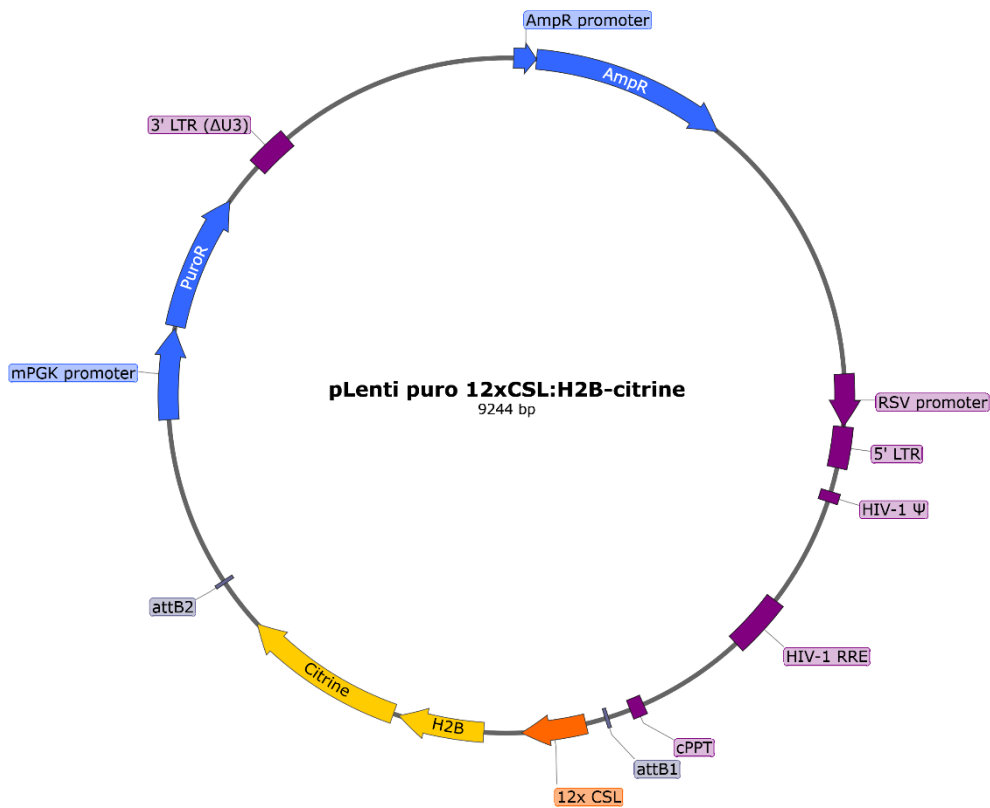
Figuur B2: De map van het mScarlet3-YAP construct wat geproduceerd is met Gibson assembly en gateway cloning, gemaakt met behulp van Benchling en SnapGene.



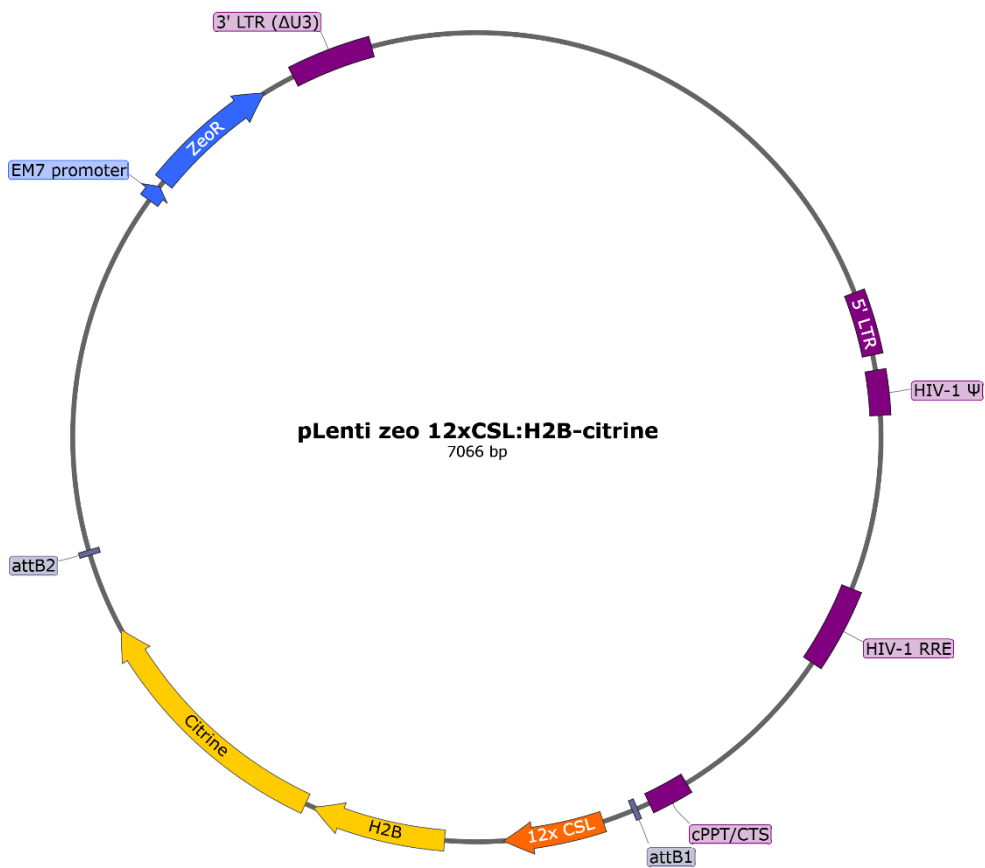
Figuur B3: De map van het 12xCSL:H2B-mCherry construct met puromycine resistentie wat geproduceerd is met Gibson assembly en gateway cloning, gemaakt met behulp van Benchling en SnapGene.



Figuur B4: De map van het 12xCSL:H2B-mCherry construct met Zeocin resistentie wat geproduceerd is met Gibson assembly en gateway cloning, gemaakt met behulp van Benchling en SnapGene.

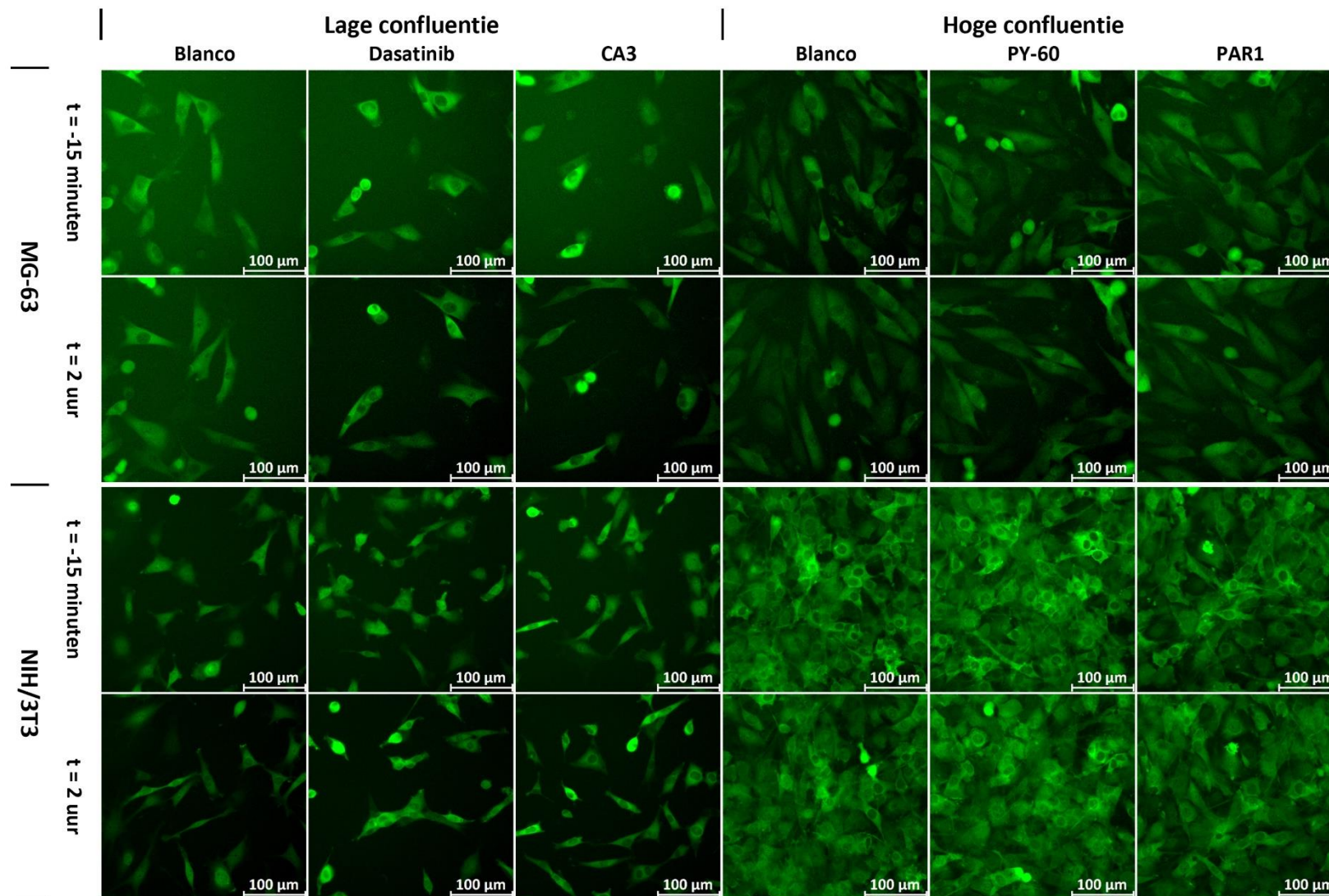


Figuur B5: De map van het 12xCSL:H2B-citrine construct met puromycine resistentie wat geproduceerd is met Gibson assembly en gateway cloning, gemaakt met behulp van Benchling en SnapGene.



Figuur B6: De map van het 12xCSL:H2B-citrine construct met Zeocin resistentie wat geproduceerd is met Gibson assembly en gateway cloning, gemaakt met behulp van Benchling en SnapGene.

Bijlage C Selectie foto's karakterisatie van YAP



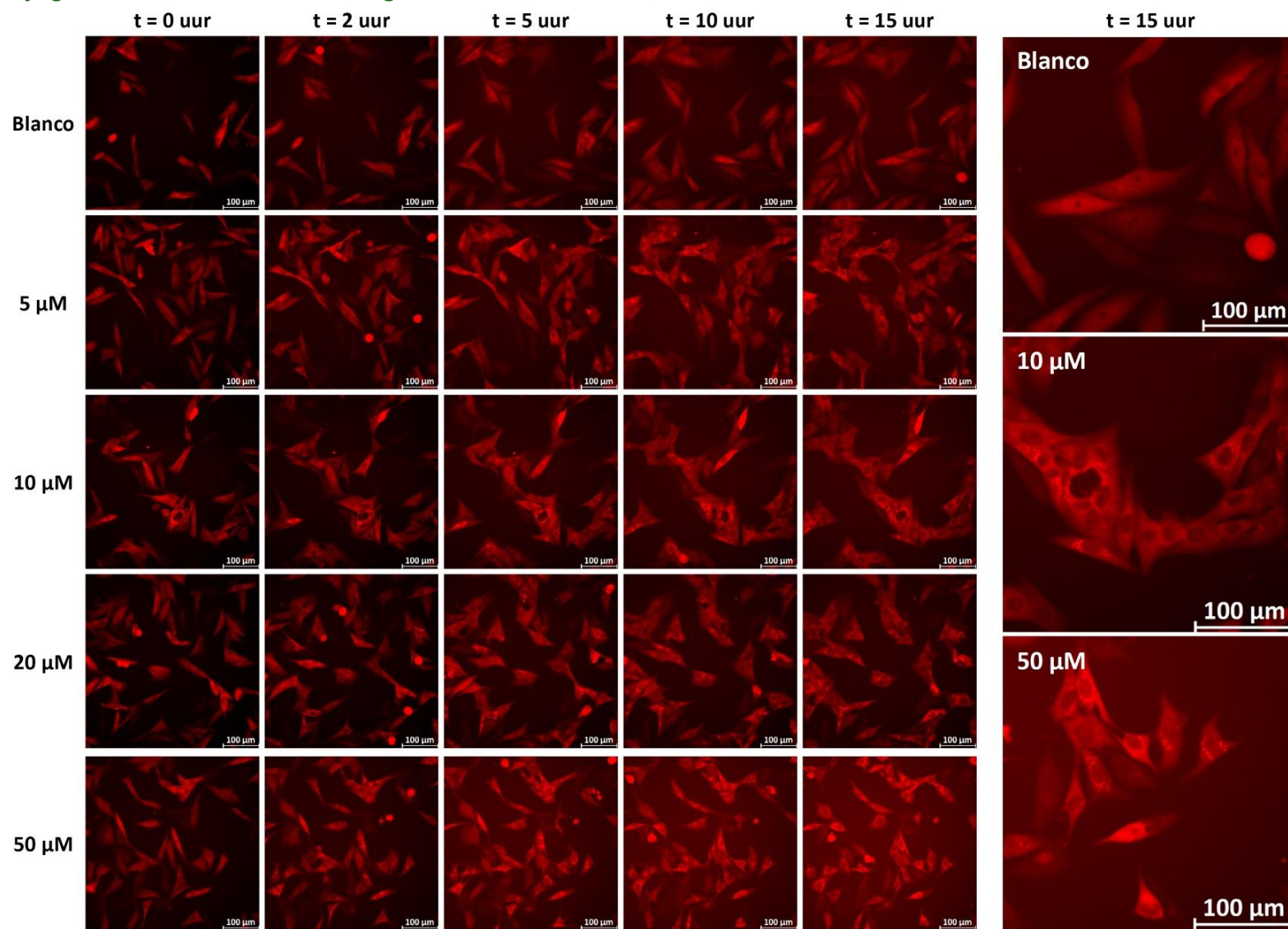
Figuur C1: Een selectie van foto's van MG-63 GFP-YAP en NIH/3T3 GFP-YAP op verschillende tijdstippen met verschillende confluenties en activatoren/inhibitoren.

Bijlage D Gemiddelde percentages bij karakterisatie van GFP-YAP

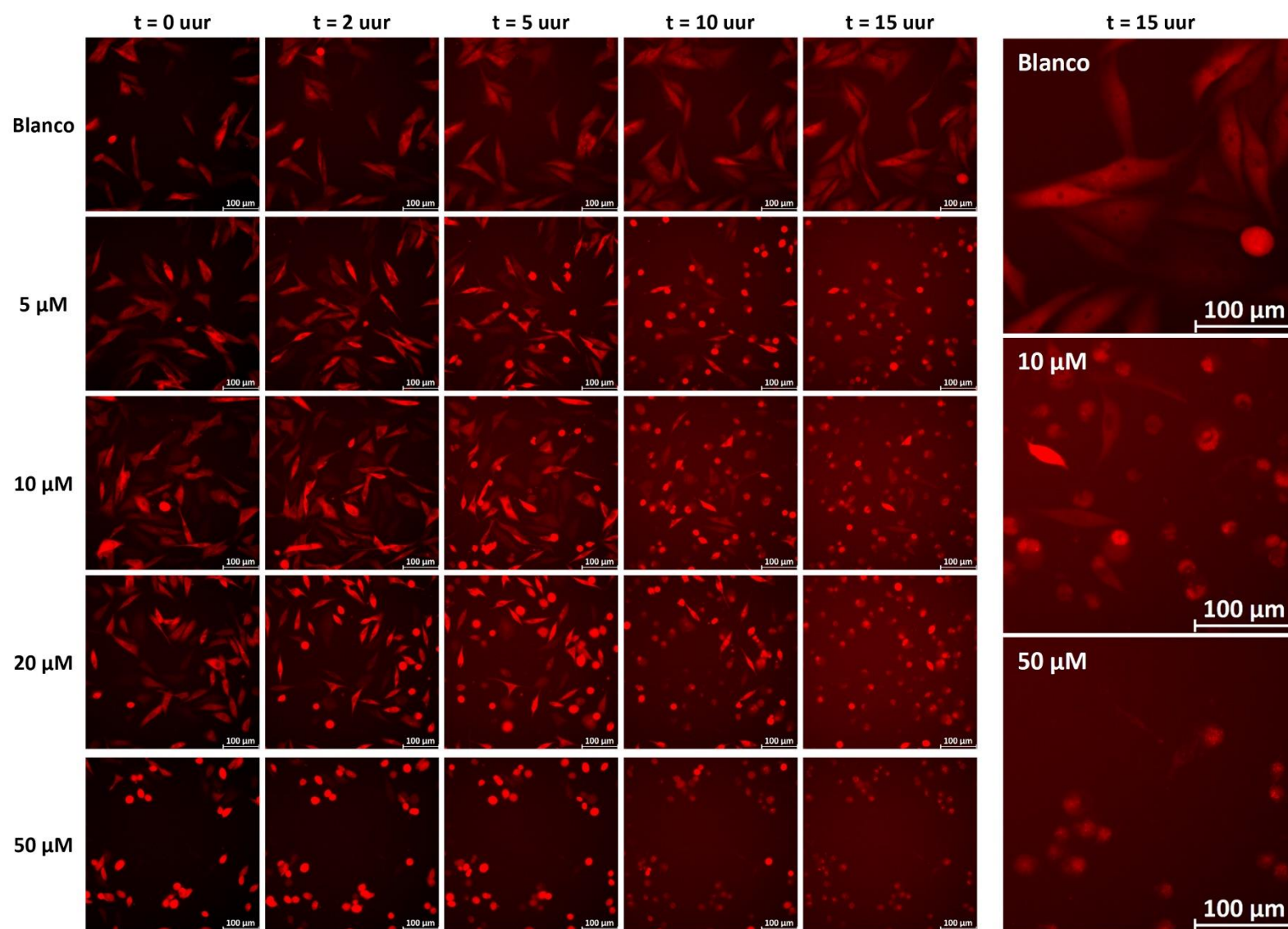
Tabel D1: Het gemiddelde percentage met de standaarddeviatie bij de verschillende activatoren/inhibitoren, per cellijn en tijdstip.

		Lage confluentie						Hoge confluentie					
		<i>Blanco</i>		<i>Dasatinib</i>		<i>CA3</i>		<i>Blanco</i>		<i>PY-60</i>		<i>PAR1</i>	
		<i>Gemiddeld percentage</i>	<i>Standaard-deviatie</i>	<i>Gemiddeld percentage</i>	<i>Standaard-deviatie</i>	<i>Gemiddeld percentage</i>	<i>Standaard-deviatie</i>	<i>Gemiddeld percentage</i>	<i>Standaard-deviatie</i>	<i>Gemiddeld percentage</i>	<i>Standaard-deviatie</i>	<i>Gemiddeld percentage</i>	<i>Standaard-deviatie</i>
MG-63	t=-15 minuten	34,3	2,7	33,1	3,6	35,6	3,3	26,6	2,1	24,7	2,3	26,4	3,3
	t=2 uur	27,3	3,3	29,7	2,6	33,4	6,4	27,6	2,3	31,2	4,5	27,1	2,1
NIH/3T3	t=-15 minuten	45,3	6,6	41,3	4,3	47,2	2,0	30,7	4,0	30,7	10,2	31,6	6,4
	t=2 uur	37,1	8,1	38,3	10,7	33,2	2,5	32,8	9,5	30,2	5,1	34,2	4,6

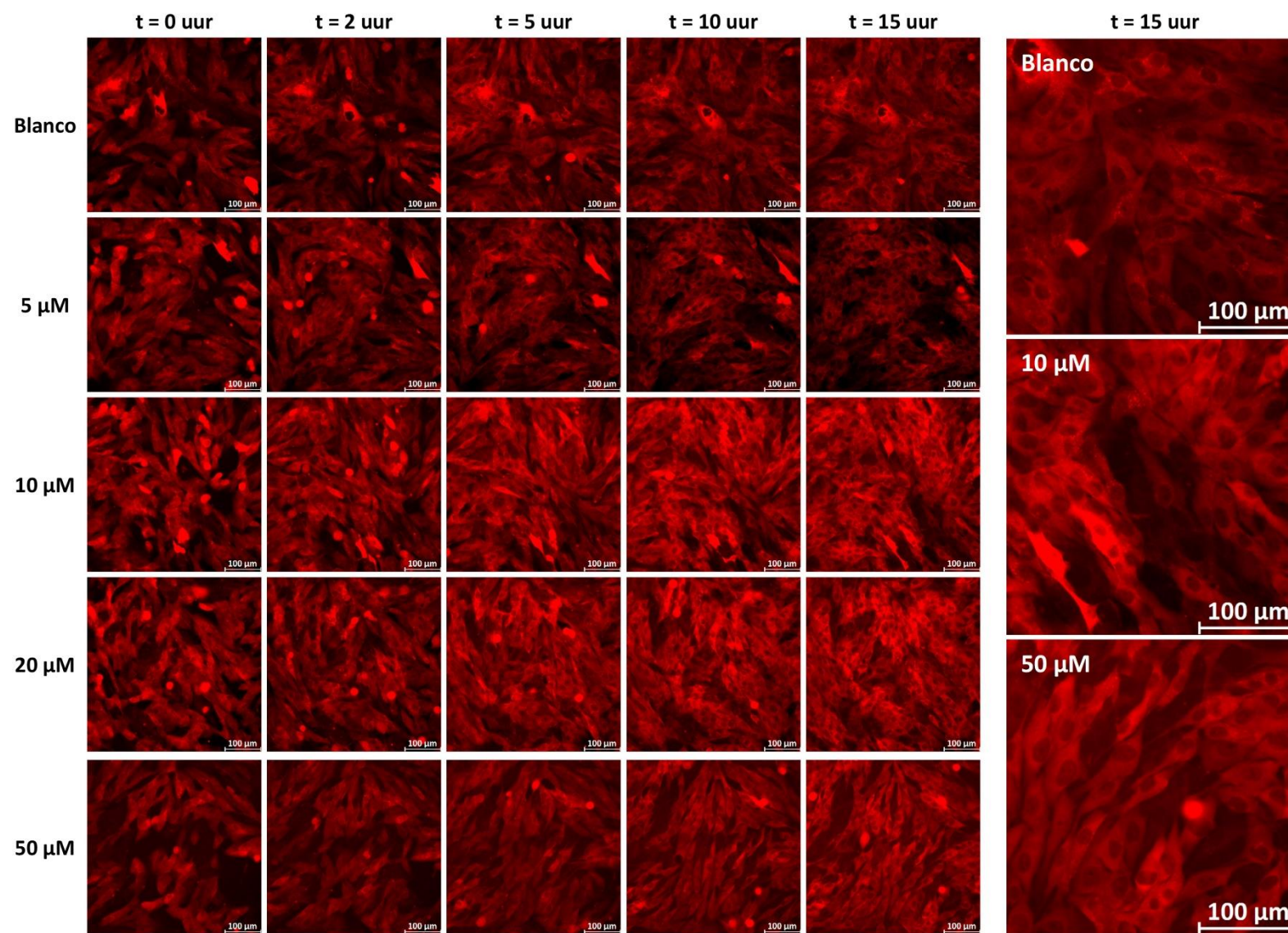
Bijlage E Selectie foto's verlengde incubatie inhibitoren/activatoren



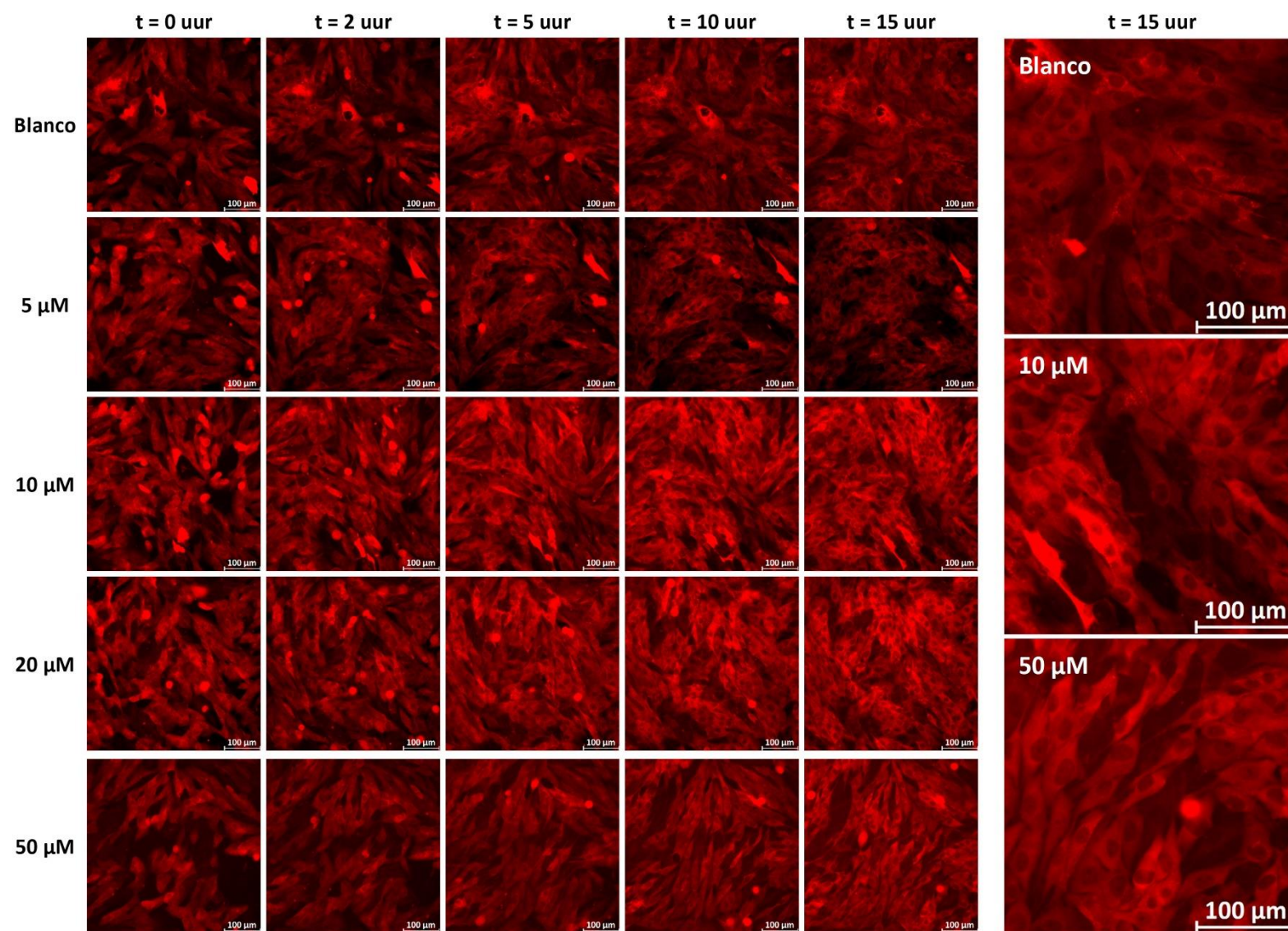
Figuur E1: Foto's op verschillende tijdstippen met de invloed van verschillende concentraties Dasatinib op MG-63 mScarlet3-YAP met drie uitgelichte foto's.



Figuur E2: Foto's op verschillende tijdstippen met de invloed van verschillende concentraties CA3 op MG-63 mScarlet3-YAP met drie uitgelichte foto's.

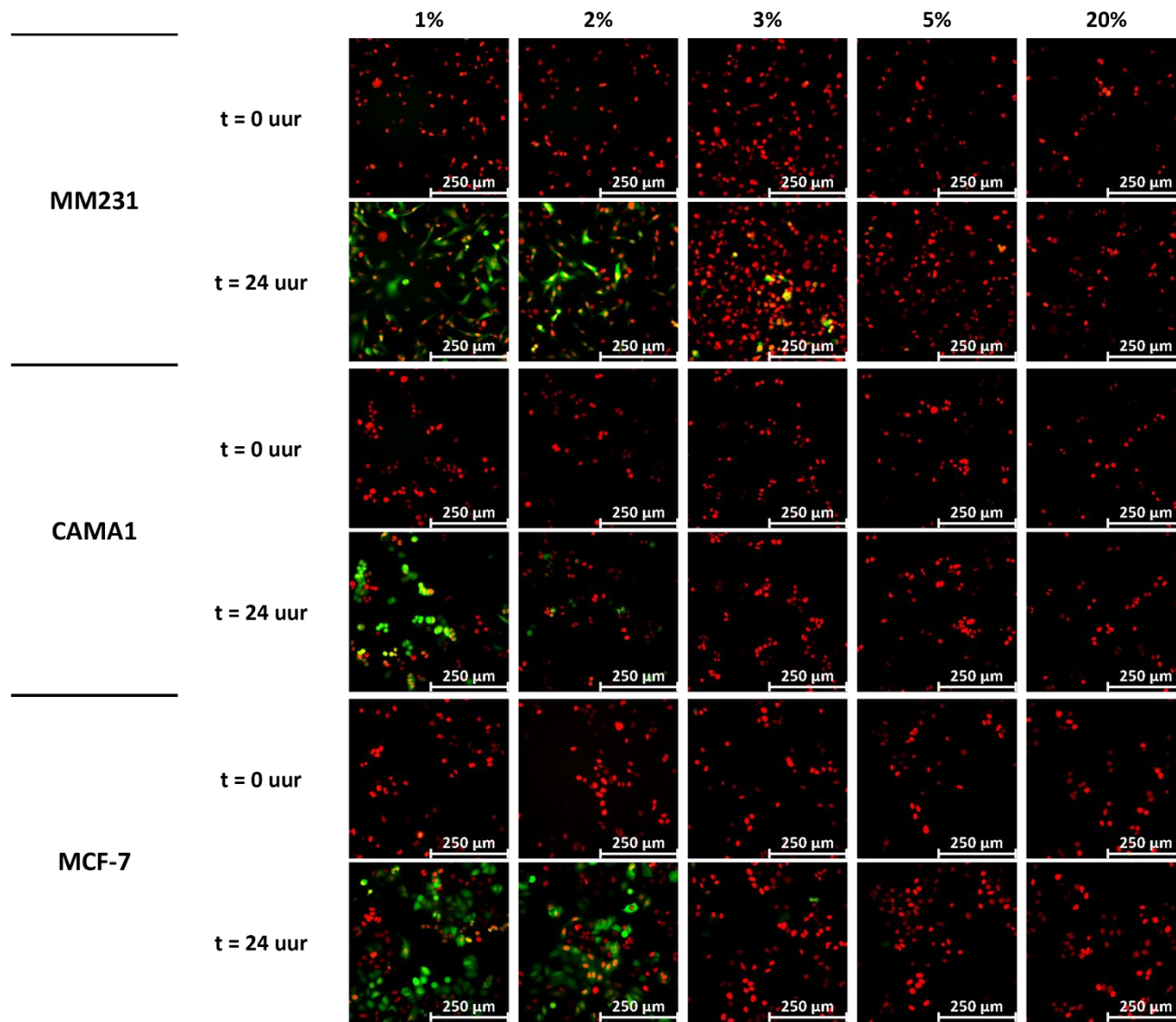


Figuur E3: Foto's op verschillende tijdstippen met de invloed van verschillende concentraties PY-60 op MG-63 mScarlet3-YAP met drie uitgelichte foto's.



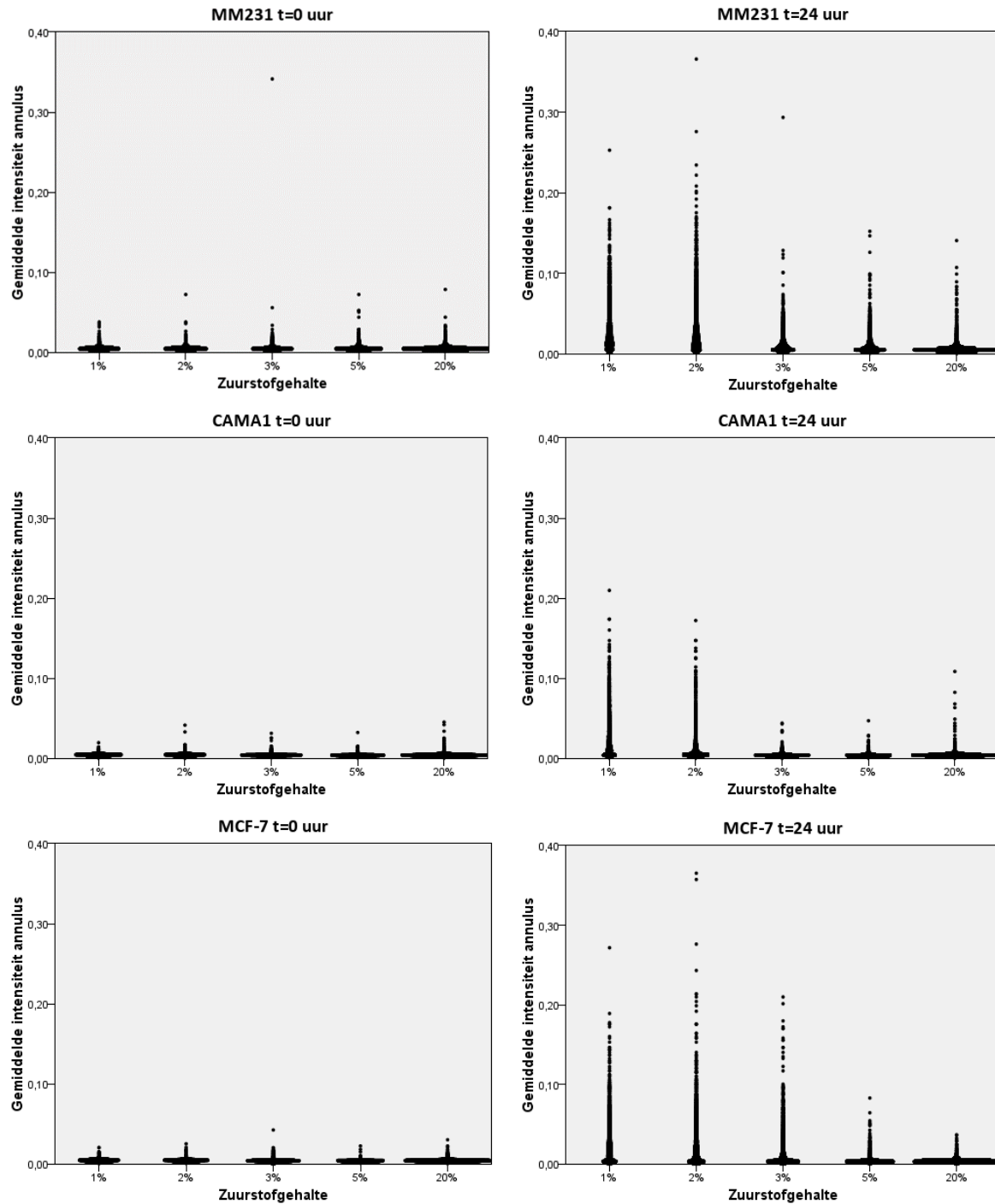
Figuur E4: Foto's op verschillende tijdstippen met de invloed van verschillende concentraties PAR1 op MG-63 mScarlet3-YAP met drie uitgelichte foto's.

Bijlage F Fotseselectie MM231, CAMA1 en MCF-7 bij hypoxie experimenten



Figuur F1: Fotseselectie van MM231, CAMA1 en MCF-7 (allen met HRE-UnaG mKO2-H2B) op t = 0 uur en t = 24 uur met incubatie in een zuurstofgehalte van 1%, 2%, 3%, 5% en 20%. mKO2-H2B laat de celkernen zien in het rode kanaal, HRE-UnaG geeft fluorescentie in het groene kanaal.

Bijlage G Scatterplots gemiddelde intensiteit per annulus hypoxie experimenten



Figuur G1: Alle individuele objecten vanuit de resultaten in Cellprofiler in een Scatterplot weergegeven per zuurstofniveau, de grafieken zijn weergegeven per cellijn (MM231, CAMA1 en MCF-7) en tijdstip (t=0 uur en t=24 uur).

Bijlage H Gemiddelde intensiteiten bij hypoxie experimenten

Tabel H1: De gemiddelde intensiteit met de standaarddeviatie in het groene kanaal voor drie cellijnen en vijf zuurstofgehalten.

	MM231				CAMA1				MCF-7			
	0 uur		24 uur		0 uur		24 uur		0 uur		24 uur	
	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie
1%	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$0,34 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$0,11 \cdot 10^{-2}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$0,20 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$0,28 \cdot 10^{-2}$	$4,1 \cdot 10^{-3}$	$0,27 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$0,15 \cdot 10^{-2}$
2%	$4,8 \cdot 10^{-3}$	$0,30 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$0,21 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$0,19 \cdot 10^{-3}$	$8,7 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$0,28 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$0,41 \cdot 10^{-2}$
3%	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$0,44 \cdot 10^{-3}$	$8,8 \cdot 10^{-3}$	$0,14 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$0,19 \cdot 10^{-3}$	$3,7 \cdot 10^{-3}$	$0,31 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$0,31 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-3}$
5%	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$0,43 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-3}$	$0,17 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	$0,10 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$0,35 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$0,21 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$0,49 \cdot 10^{-3}$
20%	$4,6 \cdot 10^{-3}$	$0,25 \cdot 10^{-3}$	$5,4 \cdot 10^{-3}$	$0,50 \cdot 10^{-3}$	$3,7 \cdot 10^{-3}$	$0,32 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$0,33 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$0,35 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$0,34 \cdot 10^{-3}$

Tabel H2: De gemiddelde intensiteit met de standaarddeviatie in het groene kanaal voor drie cellijnen en drie tijdstippen.

	MM231				CAMA1				MCF-7			
	1%		20%		1%		20%		1%		20%	
	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie	Gemiddelde intensiteit	Standaarddeviatie
0 uur	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$0,34 \cdot 10^{-3}$	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$0,20 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$0,20 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$0,18 \cdot 10^{-3}$	$4,1 \cdot 10^{-3}$	$0,27 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$0,18 \cdot 10^{-3}$
24 uur	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$0,11 \cdot 10^{-2}$	$5,7 \cdot 10^{-3}$	$0,38 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$0,28 \cdot 10^{-2}$	$4,2 \cdot 10^{-3}$	$0,28 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$0,15 \cdot 10^{-2}$	$4,1 \cdot 10^{-3}$	$0,27 \cdot 10^{-3}$
48 uur	$2,9 \cdot 10^{-2}$	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$7,3 \cdot 10^{-3}$	$0,90 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$0,49 \cdot 10^{-2}$	$4,5 \cdot 10^{-3}$	$0,28 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$0,28 \cdot 10^{-2}$	$4,2 \cdot 10^{-3}$	$0,25 \cdot 10^{-3}$