

FORMAT EXPERIMENTONTWERP

Het NUMB eiwit zorgt samen met het ZIKV voor meer remming van de grootte van een glioblastoma ten opzichte van enkel het ZIKV

Opdracht: Experimentontwerp

Versie: Eindversie I / **Eindversie II** / herkansing (*doorhalen wat niet van toepassing is*)

1. GEGEVENS AUTEURS

Naam Auteur: [REDACTED]

Collegekaartnummer: [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Naam docent: Myrtille Gumbs

Datum: 14 mei 2019

Dit experimentontwerp is gebaseerd op de waarneming (geef titel):

Het Zika virus en hersenafwijkingen bij pasgeborenen

.....

1. ABSTRACT (maximaal 200 woorden)

Op dit moment zijn er nog niet veel behandelingsopties voor een glioblastoma; wél blijkt het Zika Virus (ZIKV) een remmend effect te hebben op de grootte van de glioblastoma. Allereerst blijkt uit eerder onderzoek (Iannolo et al., 2019) dat het ZIKV het eiwit miR34c tot expressie brengt, wat voor verminderde werking van het NUMB-eiwit zorgt. Tot op heden is het echter nog onbekend of het mogelijk is om het NUMB-eiwit samen met ZIKV extra toe te voegen aan een rattenbrein en of dit voor een significante vermindering van grootte van glioblastoma's zorgt in vergelijking als we enkel ZIKV zouden toevoegen; dit zorgt voor een gat in de wetenschappelijke kennis omtrent dit onderwerp. In dit experiment zal dosis-afhankelijk in een gekweekte glioblastoma-cel lijn goed-functionerende NUMB eiwitten en ZIKV ingebracht worden. Vervolgens worden deze glioblastoma's in ratten ingebracht. De resultaten van dit onderzoek zullen van belang zijn voor de maatschappij, omdat dit onderzoek meer inzicht kan geven naar alternatieve therapieën voor mensen met een glioblastoom of vrouwen met het ZIKV die in verwachting zijn.

2. BESCHRIJVING VAN HET PROJECT (richtlijn 1500 woorden)

Inleiding

Een glioblastoom is de meest kwaadaardige vorm van een hersentumor; de 2-jaar overlevingskans ligt op 15% (ANBI & CBF, 2019). De oorzaak van dit lage percentage is het feit dat een glioblastoom relatief slecht te behandelen is, wat komt omdat er niet heel veel behandelingsopties zijn die de groei van deze tumorcellen significant remmen. Echter is uit het onderzoek van Kaid et al. (2018) en het onderzoek van Zhu et al. (2017) gebleken dat het Zika Virus (ZIKV) wél een significante remming blijkt te hebben op de groei van deze tumorcellen. Echter heeft ZIKV een versturende werking bij de neuronale ontwikkeling, waardoor het moeilijk is om hiermee glioblastoma's te behandelen.

Bij de neuronale ontwikkeling speelt het eiwit NUMB een rol, wat normaliter voor remming van het eiwit NOTCH zorgt. Samen zorgen de eiwitten NUMB en NOTCH en de interacties hiertussen voor een goed verlopende celdeling tijdens de neuronale ontwikkeling.

Uit recent onderzoek (Iannolo et al., 2019) is echter gebleken dat het ZIKV zorgt voor de expressie van het eiwit miR34c, wat verminderde werking van NUMB en Blc2 veroorzaakt.

Het eiwit Bcl2 is betrokken bij de celdeling: dit eiwit verhoogt de resistentie van cellen tegen apoptose, vermindering hiervan vergemakkelijkt de afbraak van de glioblastoma.

Bij het NUMB eiwit wordt door het ZIKV een gedeelte niet getranscribeerd, waardoor het een andere structuur krijgt en er daardoor minder remming van het NOTCH eiwit plaatsvindt. Het gevolg hiervan is abnormale celdeling tijdens de neuronale ontwikkeling, wat te zien is aan de neuronale symptomen die bij ZIKV voorkomen, zoals bijvoorbeeld microcephalie. MiR34c zorgt daarnaast voor verminderde expressie van het eiwit Bcl2, wat als gevolg heeft dat cellen minder resistentie voor apoptose hebben. Dit verklaart mogelijk waarom de tumorcellen verminderen in groei bij ZIKV en waarom ZIKV dus effectief is tegen glioblastoomcellen (Kaid et al., 2018).

Uit ander onderzoek (Bu et al., 2016) blijkt dat het uitschakelen van het NUMB eiwit zorgt voor afwijkende celdeling van NOTCH intermediate cellen, deze cellen krijgen dan eigenschappen gelijk aan die van een tumor.

Het NUMB eiwit is dus cruciaal voor normale celdeling bij de neuronale ontwikkeling. Door toevoeging van het NUMB eiwit in het brein bij organismes met ZIKV, zou er meer remming moeten komen van het NOTCH eiwit. Hierdoor zou de celdeling minder abnormaal beïnvloed moeten worden en zou er zo dus sprake kunnen zijn van van vermindering van grootte van glioblastoma's.

Tot op heden is het echter nog niet bekend of het mogelijk is om het NUMB-eiwit samen met het ZIKV toe te voegen aan een rattenbrein en of dit dan voor een meer significante verkleining van glioblastoma's zorgt in vergelijking met het enkel toevoegen van het ZIKV; dit zorgt voor een gat in de wetenschappelijke kennis omtrent dit onderwerp. De resultaten van dit onderzoek zullen van belang zijn voor de maatschappij, omdat dit onderzoek herhaald kan worden in mensen en meer inzicht kan geven naar alternatieve therapieën voor mensen met een glioblastoom of vrouwen met het ZIKV die in verwachting zijn.

Het onderzoek van Li et al. (2019) heeft aangetoond dat ZIKV-protease-expressie een vertraagde celdeling en verhoogde cellulaire apoptose veroorzaakt.

Uit ander onderzoek (Iannolo et al., 2019) is echter gebleken dat het Zika Virus zorgt voor expressie van miR34c, wat verminderde werking van NUMB en Bcl2 veroorzaakt. Bij het NUMB eiwit wordt een gedeelte niet getranscribeerd, waardoor het een andere structuur krijgt en er minder remming van het NOTCH eiwit plaatsvindt.

Uit onderzoek van Bu et al. (2016) blijkt dat het uitschakelen van het NUMB eiwit zorgt voor afwijkende celdeling van NOTCH intermediate cellen, deze cellen krijgen dan eigenschappen gelijk aan die van een tumor.

Het is nog onbekend wat het effect is van het toedienen van het NUMB eiwit in het brein en of deze toevoeging voldoende compenseert met het aangepaste NUMB door ZIKV. Ook is nog onbekend of hierdoor NOTCH geremd kan worden wat leidt tot een effectievere werking van het ZIKV op glioblastoomcellen.

Kan het inbrengen van voldoende NUMB-eiwitten in het brein samen met het inbrengen van het ZIKV een glioblastoma sterker laten verminderen in grootte dan wanneer er enkel ZIKV wordt ingebracht?

Wij verwachten dat het inbrengen van het NUMB-eiwit samen met het ZIKV de grootte van een glioblastoma relatief sterker vermindert ten opzichte van het enkel toedienen van het ZIKV, omdat uit het onderzoek van Iannolo et al. (2019) en Bu et al. (2016) is gebleken dat aanwezigheid van het NUMB eiwit noodzakelijk is voor een goed verlopende celdeling en daardoor er meer vermindering van grootte van de glioblastoma zal plaatsvinden.

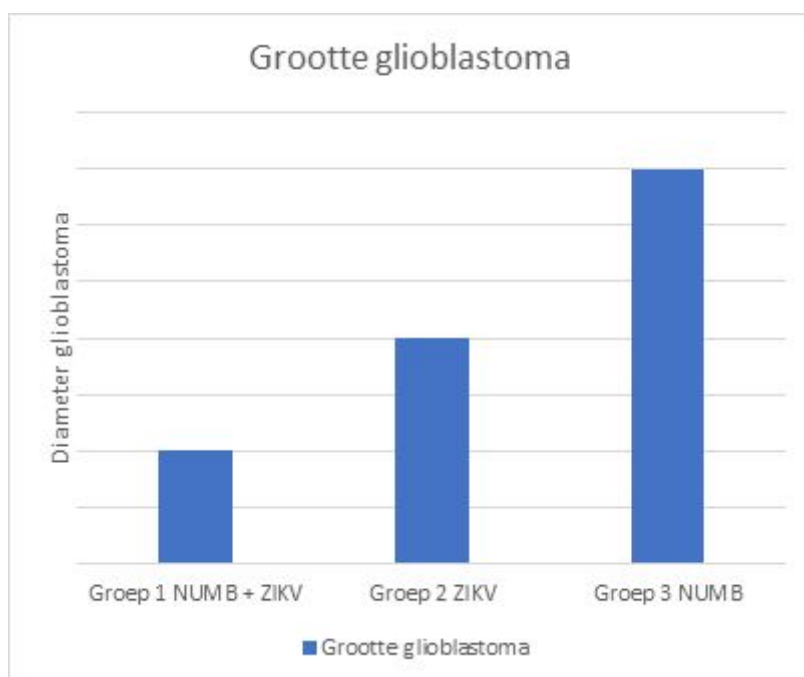
Er zijn 3 groepen: de eerste groep ratten krijgt een glioblastoma met het ZIKV en het NUMB eiwit toegediend. De tweede groep ratten krijgt een glioblastoma met alleen het ZIKV toegediend en de derde groep ratten krijgt enkel een glioblastoma toegediend. Verder wordt de eerste groep ratten verdeeld in 3 verschillende groepen met elk een andere toegediende dosis van het NUMB eiwit.

Eerst vindt er replicatie van de lijn T98G (Iannolo et al., 2019) glioblastoma cellen plaats in een gecontroleerde omgeving. Vervolgens wordt deze lijn 16 dagen geïncubeerd (Palumbo et al., 2017). Met behulp van de ouderplasmide wordt NUMB eiwit tot expressie gebracht. Vervolgens wordt er met behulp van een antilichaam gekeken of er werkelijk transcriptie van NUMB plaats heeft gevonden. Hierna vindt er extractie van deze NUMB eiwitten plaats en worden deze NUMB eiwitten ingebracht in de glioblastoma's van de ratten. Dan wordt er ZIKV aan deze glioblastoma's toegevoegd en wordt er met behulp van een antilichaam voor ZIKV gekeken of er werkelijk infectie heeft plaatsgevonden. Deze glioblastoma's worden in de hersenen van ratten geïnjecteerd.

Aan het begin wordt de diameter van de zichtbare glioblastoma's genoteerd. Daarna worden de ratten 12 dagen geobserveerd. CT scans worden gemaakt van het brein en fluorescentiemicroscopie wordt uitgevoerd. Dan wordt weer de diameter van de zichtbare

glioblastoma's genoteerd en wordt het slinkpercentage berekend. Hierna wordt er gekeken of de grootte van de glioblastoma's significant veranderd zijn en wordt deze informatie met de andere controlegroepen vergeleken. Als laatste wordt er een analyse uitgevoerd.

Er wordt verwacht dat de grootte van de glioblastoma's van de ratten uit groep 1 significant kleiner is geworden ten opzichte van de glioblastoma's van de ratten uit groep 2, waar overigens ook vermindering in grootte wordt verwacht. Bij de derde groep ratten verwachten we geen vermindering in grootte van de glioblastoma's. Zie hieronder voor een visuele presentatie van de verwachtingen per groep.



Grafiek 1. Verwachte grootte van de glioblastoma in het rattenbrein per groep na 28 dagen.

Experimentele opzet:

Proefdieren

Voor dit onderzoek wordt er gebruik gemaakt van 45 pCneoHA ratten ("pCneoHA mouse Numb (Plasmid #37012)", z.d.). In alle ratten wordt een glioblastoma ingebracht. De ratten zijn ingedeeld in 3 groepen bestaande uit 15 ratten. Groep 1 krijgt het ZIKV en het NUMB-eiwit ingespoten in de glioblastoma, deze groep wordt weer onderverdeeld in 3 groepen van elk 5 ratten. Er worden 3 verschillende dosissen van het NUMB-eiwit gegeven, uit groep 1 krijgt elke subgroep een andere dosis. In groep 2 wordt alleen het ZIKV in de glioblastoma ingespoten en in groep 3 wordt alleen het NUMB-eiwit ingespoten. Hierdoor

kan zowel de individuele werking als de werking van de twee stoffen samen worden bekeken.

Procedure

Als eerst vindt er replicatie plaats van een lijn glioblastoma cellen in een gecontroleerde omgeving. Deze lijn van glioblastoma cellen wordt in dit experiment gebruikt om de ratten mee te injecteren en zo een glioblastoma te creëren in het brein van de ratten. De glioblastoma's krijgen een incubatietijd van 1 week. Dan vindt er daarnaast een PCR plaats van ouderplasmide die het NUMB-eiwit kan aanmaken ("pCneoHA mouse Numb (Plasmid #37012)", z.d.) en wordt het DNA van deze ouder plasmide gezuiverd. Vervolgens wordt er een restrictiedigestie uitgevoerd met behulp van de restrictie enzymen EcoRI en SalI ("pCneoHA mouse Numb (Plasmid #37012)", z.d.) die vòòr en na de translatieregio van het NUMB-eiwit knippen. Dit NUMB-insert wordt vermenigvuldigd met behulp van een PCR. Hierna vindt er ligatie plaats van de stukken DNA die uit de PCR komen. Deze gemodificeerde plasmiden worden ingebracht in E-Coli bacteriën en worden geïncubeerd. Vervolgens wordt het DNA geïsoleerd uit de E-Coli bacteriën en wordt dit DNA in HEK293-cellen geplaatst. Het antilichaam rabbit anti-human NUMB (ab-14140, 1/ 1000, Abcam) wordt toegevoegd en er wordt gekeken of er daadwerkelijk transcriptie van het NUMB-eiwit heeft plaatsgevonden. Hierna vindt de extractie van de NUMB-eiwitten plaats uit de HEK293-cellen. Dit zijn de eiwitten die we injecteren in de glioblastoma's van de ratten.

Dan wordt de diameter van de zichtbare glioblastoma's genoteerd. Daarna worden de ratten 14 dagen geobserveerd. CT scans worden gemaakt van het brein en fluorescentiemicroscopie wordt uitgevoerd. Dan wordt weer de diameter van de zichtbare glioblastoma's genoteerd en wordt het slinkpercentage berekend. Hierna wordt er gekeken of de grootte van de glioblastoma's significant veranderd zijn en wordt deze informatie met de andere controlegroepen vergeleken. Als laatste wordt er een analyse uitgevoerd.

Data analyse

Nu worden de diameters bekeken en de slinkpercentage's berekend. Als data analyse worden van tevoren een Levene's test en een Shapiro Wilk test gedaan. Als toetsende statistiek wordt de Kruskal-Wallis test uitgevoerd. Daarna wordt als post-hoc test de Nemenyi test uitgevoerd.

3. IMPLICATIE VAN HET PROJECT (richtlijn 300 woorden)

Als resultaat van dit onderzoek wordt verwacht dat de glioblastoma's in rattenhersenen significant kleiner worden wanneer er NUMB-eiwit in combinatie met ZIKV worden ingespoten in de glioblastoma ten opzichte van de grootte van de glioblastoma's waar enkel het ZIKV ingespoten wordt.

Het ZIKV wordt op het moment al gebruikt als medicijn tegen een glioblastoma, maar zorgt er tot nu toe in de meeste gevallen enkel voor dat de glioblastoma vermindert in grootte (Kaid et al. 2018 en Zhu et al. 2017). Op deze manier zorgt ZIKV dus enkel voor een verlenging van de levensduur van de patiënt en niet voor een genezing van de glioblastoma.

Wanneer onze hypothese klopt, namelijk dat

het inbrengen van het NUMB-eiwit samen met het ZIKV de grootte van een glioblastoma relatief sterker vermindert ten opzichte van het enkel toedienen van het ZIKV, zou de kennis uit dit onderzoek positief kunnen bijdragen aan de zoektocht naar een potentieel medicijn voor glioblastoma's. Dit zou als gevolg een langere levensduur kunnen hebben en dus een opzet kunnen zijn voor een toekomstig medicijn dat de volledige verdwijning van een glioblastoma kan realiseren.

De resultaten van dit onderzoek kunnen worden gebruikt door andere onderzoeken die kijken naar neurologische schade die wordt veroorzaakt door het ZIKV wanneer het bijvoorbeeld wordt ingezet als medicijn tegen een glioblastoma. Zo kan er ook met deze resultaten gekeken worden naar een behandeling voor vrouwen die besmet zijn geraakt met het ZIKV en graag zwanger willen worden. Met deze behandeling kan er een gezond kind geboren worden i.p.v. een kind met microcephalie die in de huidige situatie geboren zal worden.

Daarnaast zou de kennis uit dit onderzoek van pas kunnen komen bij de zoektocht naar de interactie tussen een 'normaal functionerend' NUMB-eiwit en een door-miR34c-gemodificeerd NUMB eiwit (Iannolo et al., 2019). De kennis over de interactie tussen deze twee eiwitten kan ook eventueel van pas komen bij onderzoek naar een toekomstige kuur tegen glioblastoma's. Ook zou deze kennis van pas kunnen komen bij het onderzoek naar een behandeling om de neurologische symptomen te verminderen die zich voordoen bij het ZIKV.

4. LITERATUURLIJST

Iannolo, G., Sciuto, M. R., Cuscino, N., Pallini, R., Douradinha, B., Vitiani, L. R., . . . Conaldi, P. G. (2019). Zika virus infection induces MiR34c expression in glioblastoma stem cells: new perspectives for brain tumor treatments. *Cell Death & Disease*, 10(4).

<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1499-z>

pCneoHA mouse Numb (Plasmid #37012) [Dataset]. (z.d.). Geraadpleegd op 28 mei 2019, van <https://www.addgene.org/37012/>

Palumbo, P., Miconi, G., Cinque, B., Lombardi, F., La Torre, C., Dehcordi, S. R., . . . Cifone, M. G. (2017). NOS2 expression in glioma cell lines and glioma primary cell cultures: correlation with neurosphere generation and SOX-2 expression. *Oncotarget*, 8(15).

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16106>

Li, H., Saucedo-Cuevas, L., Yuan, L., Ross, D., Johansen, A., Sands, D., . . . Gleeson, J. G. (2019). Zika Virus Protease Cleavage of Host Protein Septin-2 Mediates Mitotic Defects in Neural Progenitors. *Neuron*, 101(6), 1089–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.010>

Bu, P., Wang, L., Chen, K., Srinivasan, T., Murthy, P., Tung, K., . . . Shen, X. (2016). A miR-34a-Numb Feedforward Loop Triggered by Inflammation Regulates Asymmetric Stem Cell Division in Intestine and Colon Cancer. *Cell Stem Cell*, 18(2), 189–202.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.006>

Pece, S., Confalonieri, S., R. Romano, P., & Di Fiore, P. P. (2011). NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1815(1), 26–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.10.001>

Song, Y., & Lu, B. (2012). Interaction of Notch Signaling Modulator Numb with α -Adaptin Regulates Endocytosis of Notch Pathway Components and Cell Fate Determination of Neural Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(21), 17716–17728.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.360719>

Flores, A. N., McDermott, N., Meunier, A., & Maignol, L. (2014). NUMB inhibition of NOTCH signalling as a therapeutic target in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, *11*(9), 499–507. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1038%2Fnrrol.2014.195>