



KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN  
FACULTEIT BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN

## SIMULEREN VAN WEEFSELGROEI OP BASIS VAN EEN PARTIKEL-GEBASEERD MODEL

Promotor: Prof. Dr. Ir. Herman Ramon  
Departement Biosystemen  
Afdeling Mechatronica, Biostatistiek en  
Sensoren

Eindwerk voorgedragen  
tot het behalen van de graad van  
Bio-ingenieur in de Landbouwkunde  
STEFAN WITTOCX

juni 2008

Dit proefschrift is een examendocument dat na de verdediging niet meer werd gecorrigeerd voor eventueel vastgestelde fouten. In publicaties mag naar dit proefwerk verwezen worden mits schriftelijke toelating van de promotor, vermeld op de titelpagina.

# Dankwoord

Nu deze thesis af is, kijk ik dankbaar terug naar het afgelopen jaar. Aan stress, problemen van allerlei aard, onvoorziene moeilijkheden en beperkingen, ... was er geen gebrek. Maar ondanks dat alles heb ik er echt van genoten: het leren programmeren in C++, het schrijven in  $\text{\LaTeX}$  onder de knie krijgen, de visualisatie in Matlab programmeren, ja, zelfs de talloze medische en theoretisch-biologische artikels vond ik af en toe heel interessant. Ook al is een thesis een werk dat je alleen schrijft, toch is het enkel mogelijk dankzij de belangenloze hulp van een heleboel mensen, die ik dan ook via deze weg wil bedanken.

Mijn dank gaat uit naar Katrien Michiels, voor het ter beschikking stellen van een  $\text{\LaTeX}$ -sjabloon voor thesissen aan onze faculteit, naar Peter Dedecker van UGent voor zijn bijzonder nuttige website voor  $\text{\LaTeX}$ -gebruikers, naar Arne Muller, de maker van TeXMed (een webtoepassing voor het omzetten van referenties van medische artikels naar een formaat voor  $\text{\LaTeX}$ ), aangezien mij dat ettelijke uren typewerk heeft bespaard en naar Jeroen Eyckmans voor de verhelderende uitleg op Gasthuisberg.

Ik wil niet nalaten professor Herman Ramon te bedanken voor het openstellen van een ideaal thesisonderwerp voor witte raven als ik, die én bio-ingenieur studeren én graag modelleren en programmeren. Mijn thesis is uitermate multidisciplinair qua inhoud: kennis uit de biologie, chemie, biochemie, wiskunde, fysica, computerwetenschappen en medische wetenschappen werd erin gecombineerd, en is ze dus een toepasselijke afsluiting van de interdisciplinaire opleiding tot bio-ingenieur. Zonder de hulp van mijn begeleider Bert Tijskens was mijn model er niet geweest, of toch niet in C++. Bedankt voor het geduld, alle uitleg, de ter beschikking gestelde code, de voortdurende bereidwilligheid om zo snel mogelijk te helpen, de tips en de sturing. Maar wat ik eigenlijk nog het meest gewaardeerd heb, is de vrijheid die ik gekregen heb, vrijheid om creatief te zijn, om zelf over alles na te denken, en om te kiezen wanneer ik aan de thesis werkte (en wanneer niet).

Natuurlijk mag ik niet vergeten mijn klasgenoten te bedanken voor de toffe tijd

die we samen hebben beleefd, binnen en buiten het klaslokaal, Karel Lambie, voor het geven van zijn thesis, die me van veel nut is geweest, mijn broer Johan voor de onschatbare hulp met L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X, Hanna Deman voor het minutieus nalezen van de thesis en het rapporteren van talloze fouten en mijn kotgenoot Philip Johnson voor het verbeteren van de Engelse samenvatting. En ten slotte wil ik mijn ouders bedanken voor de kansen en financiële ondersteuning die ik heb gekregen om te studeren wat ik wou, en voor de warme thuis, waar ik in het weekend steeds weer mocht herbronnen.

En u als lezer wil ik bedanken voor uw interesse in de vrucht van een klein jaar wetenschappelijke arbeid.

Stefan

# Samenvatting

Onder meer de wetenschapstak van de weefselengineering (waarin cellen en weefsels *in vitro* gekweekt worden, voor toepassing in de regeneratieve geneeskunde) en het onderzoek naar de bestrijding van kanker, zijn gebaat bij modellen die de proliferatie en het gedrag van cellen nabootsen. Computermodellen zijn nuttig om inzicht te verwerven in celgedrag onder diverse condities en om voorspellingen te kunnen doen over de werkzaamheid van bijvoorbeeld een nieuwe kankertherapie. Zulk een computermodel wordt in dit werk voorgesteld. Groei en gedrag van driedimensionele avasculaire celaggregaten wordt gemodelleerd. Tal van aspecten van celgedrag zijn erin opgenomen, zoals groei, metabolisme, deling, dood, fysische interactie en celcycluspropagatie. Er is ook een onderscheid gemaakt tussen tumorcellen en normale cellen.

Cellen zijn de basiseenheid in alle levende wezens. Hun gedrag is zeer veelzijdig en ze reageren ook op een veelheid aan externe stimuli. Daarom wordt ook in het model de individuele cel als basiseenheid genomen. Door de verschillende cellulairre basisprocessen in een model te gieten, kan nagegaan worden hoe cellen reageren op omgevingsparameters van diverse aard. Het model bevat wiskundige, fysische, chemische, biologische en computertechnische aspecten. Deze multi- en interdisciplinaire aanpak is de kracht van het model. Het model is ook eenvoudig uitbreidbaar en aanpasbaar. Omwille van de gedetailleerdheid van het model is het echter vrij rekenintensief, waardoor het simuleren van weefselgedrag van grote celaggregaten over een lange periode veel tijd in beslag neemt.

Via simulaties met dit model kunnen verschillende situaties nagebootst worden, eenvoudigweg door de parameterwaarden te wijzigen. In combinatie met laboratoriumexperimenten kunnen ze inzicht geven in celgedrag onder diverse condities. Dit kan leiden tot een geoptimaliseerde behandelingswijze voor tal van ziektes en aandoeningen. Mits verdere verfijning en validatie kan dit model predictieve waarde hebben.

# Abstract

Tissue engineering (an engineering science concerning the cultivation of cells and cellular tissues in a lab, for their use in regenerative medicine) and research in cancer therapy, can benefit from computer models that describe cellular proliferation and behaviour. Models may give insight into different aspects of cell behaviour under different conditions and can predict the activity of a new cancer therapy for example. Such a model is presented in this thesis. Proliferation and behaviour of three-dimensional avascular cellular aggregates is modeled. Different aspects of cellular behaviour are implemented in the model, like growth, metabolism, division, death, physical interaction and propagation through the cell cycle. Also a distinction between the behaviour of tumor cells and normal cells has been made.

Cells are the elementary unit in all living organisms. Their behaviour is complex, and they react to a variety of different external stimuli. Therefore the individual cell will also be the elementary unit in the model. The reaction of the cells to different environmental parameters is examined by including the description of the main cellular processes. The model contains mathematical, physical, chemical, biological and computer-technical aspects. Its strength lies in this multidisciplinary and interdisciplinary approach. The model can also be adapted easily. But its high degree of detail makes it computationally expensive. This makes it difficult to simulate large tissues over a long period of time, because it takes too much time.

With the model, different conditions can be simulated, simply by altering the parameter values of the model. In combination with *in vitro* experiments the model may give insight into cellular behaviour under different conditions. This can lead to a more optimised treatment of a variety of diseases. The model described here can have predictive power, if it is further developed and validated.

# Gebruikte afkortingen

<b>Afkorting</b>	<b>Betekenis</b>
3D	driedimensioneel
ADP	adenosine-5'-difosfaat
ATP	adenosine-5'-trifosfaat
AFM	'atomic force microscopy'
CA	cellulair automaat
CDK	cycline afhankelijke kinase
CFP	'cellular fate processes'
CKI	cycline afhankelijke kinase inhibitor
DEM	discrete elementen model
DNA	deoxyribonucleïnezuur
ECM	extracellulaire matrix
ETK	elektronentransportketen
FADH <sub>2</sub>	flavine adenine dinucleotide (gereduceerde vorm)
FasL	Fas ligand
GTP	guanosine-5'-trifosfaat
HDC	hybride discreet-continuüm
HIF	'hypoxia-inducible factor'
MMP	matrix metalloprotease
mTOR	'mammalian target of rapamycin'
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide (gereduceerde vorm)
OLM	'off-lattice model' (roostervrij model)
P <sub>i</sub>	anorganisch orthofosfaat
RNA	ribonucleïnezuur
SCB	'single-cell based'
TCA	'tricarboxylic acid'; de TCA cyclus is synoniem voor de citroenzuurecyclus

<b>Afkorting</b>	<b>Betekenis</b>
gl	glucose
gr	groefactor
in	inhibitor
la	lactaat
ox	zuurstof



# Verklarende woordenlijst

Actine	Een eiwit dat onderdeel is van het cytoskelet in de eukaryote cel. Actine-moleculen maken deel uit van actine-filamenten (ook wel micro-filamenten genoemd), een polymeer van actine-monomeren. Ze geven de cel vorm en maken het mogelijk dat de cel zich kan bewegen. In spiercellen zorgen ze samen met myosine voor samentrekking, waardoor spieren kracht kunnen uitoefenen. Bij de deling van een dierlijke cel spelen actine en myosine een rol bij de insnoering van de cel tot twee nieuwe cellen.
Affiniteit	De sterkte van een chemische binding.
Anatomie	(De leer van) de samenstellende delen van levende organismen.
Anisotroop	Waarin een fysische eigenschap in verschillende richtingen niet gelijk is.
Angiogenese	De vorming van nieuwe bloedvaten.
Apoptose	Geprogrammeerde celdood als onderdeel van de steeds doorgaande verjonging van weefsels.
Autocrien	Inwerkend op de cel die de signaalmolecule uitscheidt.
Avasculair	Geen bloedvaten bevattend.
Aviditeit	De gecombineerde sterkte van meerdere bindingsinteracties met een eiwit. Aviditeit geeft de gecombineerde synergetische sterkte van bindingsaffiniteiten, in plaats van de som van de affiniteiten van elke binding apart.

Biomechanica	Wetenschapstak waarin de wetten uit de natuurkundige mechanica specifiek worden toegepast om (de beweging van) biologische organismen, weefsels en cellen te beschrijven.
Cellulair automaat-model	Een discreet model, gebruikt in computertheorie, wiskunde, theoretische biologie en microstructuurmodellering. Het bestaat uit een regelmatig grid van cellen (niet in de biologische betekenis van het woord), elk in een bepaalde toestand. Tijd wordt eveneens gediscrètiseerd, en de toestand van een cel op tijdstip $t$ is functie van de toestand van de omliggende cellen op tijdstip $t - 1$ . Elke cel volgt dezelfde regel van updating; elke tijdstap wordt een set van regels toegepast op het volledige grid om een nieuwe generatie te creëren.
Citroenzuurcyclus	(synoniem: Krebs-cyclus) Een serie van (bio)chemische reacties waarbij één van de uitgangsstoffen weer teruggevormd wordt. De reacties zijn samen verantwoordelijk voor de laatste stap in de dissimilatie van eiwitten, vetten en suikers tot kooldioxide en water. Daarbij wordt een deel van de energierijke metaboliëten (ATP, NADH, etc.) gemaakt die de cel gebruikt. Bij anaerobe stofwisseling (afwezigheid van zuurstof) stopt de citroenzuurcyclus.
Chromosoom	Draadvormige structuur in de celkern die de genen bevat. Een menselijke cel bevat normaal 46 chromosomen. Ieder chromosoom bevat één spiraalvormig opgewonden DNA-molecule.
Coarse graining	Een techniek waarbij in een model op een hoger niveau zo goed mogelijk de werkelijke kenmerken en het gedrag van het onderzoeksobject overgenomen worden uit een model op een lager niveau. Veelal wordt een model op een hoger niveau gebruikt omwille van een beperkte reken capaciteit.
Cytokinese	Het in twee delen van het cytoplasma van een cel.

Diffusie	<i>Twee mogelijke betekenissen:</i> (1) Beweging van een deeltje door een verschil in concentratie, van een plaats met hogere naar een plaats met lagere concentratie. (2) Willekeurige (Brownse) beweging van een deeltje door een groot aantal botsingen met relatief veel kleinere deeltjes.
Endotheel	Binnenste bekleding van bloed- en lymfevaten.
Epidermis	Opperhuid.
Epitheel	Een laag van cellen die een extern oppervlak of caviteit bedekken.
Extensie	Celstrekking.
Fagocyt	Vreetcel. Elke cel in het organisme die het vermogen heeft vreemde materie (zoals bacteriën) in zich op te nemen en door lysosomale activiteit onschadelijk te maken.
Fagocytose	De vernietiging van in het organisme binnengedrongen bacteriën, virusdeeltjes en andere schadelijke elementen door fagocyten.
Fas ligand	Een transmembraaneiwit dat behoort tot de tumor necrose factor familie. De binding van een Fas ligand met zijn receptor induceert apoptose.
Fibroblast	De belangrijkste cel van het bindweefsel. Fibroblasten zijn verantwoordelijk voor de synthese van de elementen van de extracellulaire matrix.
Filament	Vezel. Draadvormige structuur.
Filopodium	Een fijne uitstulping van het cytoplasma aan de voorzijde van bewegende cellen; vergelijkbaar met een lamellipodium, maar smaller.
Fysiologie	(De leer der) levensverrichtingen.
Glycolyse	Omzetting van glucose tot pyrodruivenzuur in een op-eenvolging van reacties, plaatsgrijpend in het cytoplasma. Hierbij komt energie vrij.
Hemostatisch	Bloedstelpend.
Homeostase	Het bestaan van onderling op elkaar afgestemde processen die voor het leven noodzakelijke toestanden constant houden.

Hypoxie	Een conditie waarbij weefsels in het lichaam als geheel of in een bepaald deel van het lichaam niet voorzien worden van voldoende zuurstof.
Integrine	Celoppervlakreceptor die interageert met de extracellulaire matrix en een rol speelt bij diverse intracellulaire signalen.
Interstitieel weefsel	Het tussen het klierweefsel (parenchym) liggende bindweefsel; steunweefsel.
Kanker	Kwaadaardige gezwellvorming, gekenmerkt door progressieve woekering van veranderde lichaamseigen cellen, welke hierdoor geen nuttige functie meer vervullen. Verder wordt kanker gekenmerkt door verlies van celdifferentiatie, invasieve groei en metastasering.
Lamellipodium	Een cytoskeletale actine-uitstulping van de mobiele zijde van een cel; breder dan een filopodium.
Laminine	Een bepaald ECM-eiwit.
Ligand	(betekenis in de biochemie) Een molecule die in staat is te binden aan een biomolecule en er een complex mee te vormen, waardoor het biologisch actief wordt.
Lysis	Het vrijkomen van celmateriaal door breuk van het celmembraan.
Macrofaag	(synoniem: mononucleaire fagocyt) Verzamelnaam voor witte bloedcellen die in staat zijn om (delen van) andere cellen ‘op te eten’, en op deze manier schadelijke stoffen of bacteriën uit het lichaam te verwijderen”.
Metaboliet	Een chemische stof die tijdens de stofwisseling ontstaat.
Metabolisme	De verzamelnaam voor alle chemische reacties en interacties die plaatsvinden in een biologisch systeem. Primair metabolisme omvat alle reacties met stoffen die gevormd worden als onderdeel van normale anabolische en katabolische processen, die resulteren in assimilatie, ademhaling, transport en differentiatie. Voorbeelden van primaire stoffen zijn suikers, aminozuren, nucleotiden, ... Het primair metabolisme wordt dan eenvoudigweg gedefinieerd als het metabolisme van primaire stoffen.

Metastase	Het proces waarbij een kanker zich verspreidt van de plaats waar ze het eerst voorkwam als primaire tumor naar andere locaties in het lichaam, via het bloed- of lymfevatenstelsel.
Mitogen	Een chemische stof (meestal een eiwit of eiwitachtige stof) die een cel aanzet tot celdeling (mitose).
Mitose	Deling van de kern van een eukaryote cel, waarbij DNA condenseert tot zichtbare chromosomen.
Morfogenese	Het ontstaan van anatomische vormen in de levende natuur.
Morfologie	(De wetenschap van) vorm en bouw van levende organismen.
Mutatie	Een permanente wijziging/structurele verandering in het DNA (erfelijk materiaal).
Myosine	Een van de contractiele eiwitten van het spierweefsel.
Necrose	Het plaatselijk ongecontroleerd afsterven van weefsel. Dit kan veroorzaakt worden door schadelijke invloeden van buitenaf.
Neoplasma	Gezwelvorming, autonome groei van cellen of weefsels tot goed- of kwaadaardige gezwellen.
Neoplastisch	Gepaard gaand met nieuwvorming (neoplasma).
Nucleatie	Het begin van een nieuwe fase in een materiaal, bijvoorbeeld het begin van de vorming van een tumor.
Nutriënt	Voedingsstof.
Oncologie	Gezwelleer.
Oncogen	Kankerverwekkend gen. Een gen dat betrokken is bij het ontstaan van tumoren.
Oxidatieve fosforylering	Proces in mitochondriën waarin ATP-vorming wordt aangedreven door de transfert van elektronen van voedselmoleculen naar moleculaire zuurstof.
P:O verhouding	Een maat voor de oxidatieve fosforylering. Het is de verhouding van veresterde fosfaatradicalen (die ATP vormen uit ADP) over het aantal zuurstofatomen, opgenomen door de mitochondriën.
Paracrien	Inwerkend op een buurcel van de cel die de factor uitscheidt.

Precursor	Een stof die als voorloper dient voor een andere stof en deel uit maakt van de nieuwe stof.
Proliferatie	De toename in cel aantal. Dit begrip moet onderscheiden worden van cel groei, waarmee de toename in cel volume van een individuele cel aangeduid wordt.
Proliferatief	Zich voortplantend, uitbreidend.
Proteolyse	Ontleding van proteïnen.
Proto-oncogen	Een gen dat bij verhoogde activiteit of expressie de maligniteit (kwaadaardigheid) van kanker doet toenemen. Na deze veranderde werking spreken we van een oncogen.
Recidivering	Het terugkeren van een tumor na chirurgische verwijdering van de tumor.
Serum	De vloeistof die overblijft als men bloed laat stollen en het stolsel afcentrifugeert. De samenstelling is in grote trekken vergelijkbaar met die van bloedplasma, behalve dat de stollingseiwitten (zoals fibrinogeen) grotendeels verwijderd zijn. De samenstelling ervan is: 91% water, 7% proteïnen en 2% elektrolyten, voedingsstoffen en hormonen.
Stochastisch	Onderworpen aan een waarschijnlijkheidsverdeling, afhankelijk van een bepaalde kans of van het toeval. In een stochastisch proces is de uitkomst niet precies gekend, ook al is de begintoestand volledig gekend, dit in tegenstelling tot een deterministisch proces, waarbij de eindtoestand rechtstreeks kan afgeleid worden uit de begintoestand.
Stoechiometrie	De verhouding waarin chemische verbindingen met elkaar reageren en de verhouding tussen de uitgangsstoffen en reactanten van een chemische reactie.
Synergie	Een begrip dat een proces beschrijft waarbij het samengaan van delen meer oplevert dan de som der delen.
Tumor	Een weefsel dat ongecontroleerd toeneemt in cel aantal en afmetingen.
In vitro	In glas; in een reageerbuisje (bij onderzoek in een laboratorium).

In vivo	Levend op of in het lichaam zelf.
Weefsel	Een verzameling cellen die onderlinge samenhang vertonen.

# Inhoudsopgave

Dankwoord	i
Samenvatting	iii
Abstract	iv
Gebruikte afkortingen	v
Verklarende woordenlijst	vii
Inhoudsopgave	xiv
Inleiding	xviii
<b>1 Kanker, weefselengineering en weefselgroeimodellen</b>	<b>1</b>
1.1 Tumorigenese en behandeling van kanker . . . . .	1
1.1.1 Weefsel, tumor en kanker . . . . .	1
1.1.2 Tumorigenese . . . . .	4
1.1.3 De derde dimensie brengt nieuwe uitdagingen . . . . .	5
1.2 Weefselengineering . . . . .	7
1.3 Modellen voor weefselgroei . . . . .	9
1.3.1 Waarom modelleren? . . . . .	9
1.3.2 Validatie van wiskundige modellen . . . . .	10
1.3.3 Overzicht van de verschillende modeltypes . . . . .	10
1.3.4 Mogelijkheden en beperkingen van de verschillende modeltypes	12
1.3.5 Reeds voorgestelde modellen voor weefselgroei . . . . .	13
1.3.6 De uitdagingen in het modelleren . . . . .	16
<b>2 Literatuurstudie celbiologie</b>	<b>18</b>
2.1 Weefselorganisatie . . . . .	18



2.2	De extracellulaire matrix . . . . .	19
2.2.1	Nutriënten en groeifactoren . . . . .	19
2.2.2	Diffusie van nutriënten en groeifactoren . . . . .	20
2.2.3	Numerieke waarden van concentraties en diffusiecoëfficiënten . . . . .	21
2.2.4	Cultuurmedia . . . . .	22
2.3	De cel . . . . .	24
2.3.1	Celorganellen . . . . .	24
2.3.2	Cytosol . . . . .	25
2.3.3	Cytoskelet . . . . .	26
2.4	Morfogenese . . . . .	26
2.5	Celdifferentiatie . . . . .	26
2.6	Cellulaire processen . . . . .	27
2.7	Celmigratie . . . . .	27
2.7.1	Celaggregaten . . . . .	32
2.7.2	Numerieke waarden (geïsoleerde cellen) . . . . .	33
2.8	De celcyclus . . . . .	33
2.8.1	Overzicht van de celcyclus . . . . .	33
2.8.2	Duur van de verschillende fasen . . . . .	35
2.8.3	Celcycluscontrole . . . . .	35
2.8.4	Quiescentie van cellen . . . . .	37
2.9	Celgroei en celdeling . . . . .	37
2.9.1	Celgroei . . . . .	37
2.9.2	Celdeling . . . . .	38
2.10	Celdood . . . . .	39
2.10.1	Apoptose . . . . .	40
2.10.2	Anoikis . . . . .	41
2.10.3	Necrose . . . . .	41
2.10.4	Regulatie van celdood . . . . .	41
2.11	Metabolisme . . . . .	41
2.11.1	Glycolyse . . . . .	42
2.11.2	Fermentatie tot lactaat . . . . .	43
2.11.3	De citroenzuurcyclus en de elektronentransportketen . . . . .	43
2.11.4	mTOR . . . . .	44
2.11.5	Numerieke waarden . . . . .	44
2.12	Cellulaire communicatie . . . . .	45
2.12.1	Intercellulaire communicatie . . . . .	45

2.12.2	Oplosbare signalen . . . . .	45
2.12.3	Cellulaire communicatie via de ECM . . . . .	48
2.12.4	Rechtstreeks cel-cel contact . . . . .	49
2.12.5	Interacties tussen signaalmechanismen . . . . .	50
2.12.6	Reactie op mechanische stimuli . . . . .	50
2.13	Tumorweefsel . . . . .	52
2.13.1	Tumormorfologie . . . . .	52
2.13.2	Groei . . . . .	53
2.13.3	Anoikis . . . . .	53
2.13.4	Metabolisme van tumorcellen . . . . .	53
2.13.5	Numerieke gegevens . . . . .	54
<b>3</b>	<b>Het model</b>	<b>56</b>
3.1	Inleiding . . . . .	56
3.2	Modeltype . . . . .	57
3.3	Modelopbouw . . . . .	58
3.3.1	Celeigenschappen . . . . .	58
3.3.2	Cultuurmedium . . . . .	60
3.3.3	Groefactoren en inhibitoren . . . . .	60
3.3.4	Krachtwerking tussen cellen . . . . .	61
3.3.5	Celmigratie . . . . .	63
3.3.6	Groei . . . . .	63
3.3.7	Opname van deeltjes . . . . .	66
3.3.8	Celmetabolisme . . . . .	66
3.3.9	Celdeling . . . . .	71
3.3.10	Celdood . . . . .	73
3.3.11	Celcyclus . . . . .	75
3.4	Programmastructuur . . . . .	75
3.5	Visualisatie . . . . .	76
3.6	Modelparameters . . . . .	79
3.7	Mogelijkheden en beperkingen van het model . . . . .	82
3.7.1	Mogelijkheden . . . . .	82
3.7.2	Beperkingen . . . . .	83
3.7.3	Besluit . . . . .	84

<b>4 Resultaten &amp; discussie</b>	<b>85</b>
4.1 Simulaties . . . . .	85
4.1.1 Het verschil van groei van normale cellen en tumorcellen . . .	85
4.1.2 Weefselgroei bij verschillende nutriëntconcentraties . . . . .	86
4.1.3 Discussie van de resultaten . . . . .	86
<b>5 Besluit</b>	<b>88</b>
<b>Bibliografie</b>	<b>90</b>

# Inleiding

In dit werk wordt een theoretisch model van de groei van dierlijk weefsel voorgesteld. Beschrijvingen van celgroei, celdeling, celmigratie, celdood, celmetabolisme en krachtwerking tussen cellen zijn allemaal in het model opgenomen. Het model is geïmplementeerd in de programmeertaal C++. In het model worden de cellen als individuele entiteiten beschouwd, die elk reageren op hun micro-omgeving. De cellen worden beschouwd als niet-gedifferentieerde cellen in een avasculair weefsel. In de biomedische wetenschappen worden modellen - naast de experimenten *in vitro* - vandaag de dag steeds belangrijker in het zoeken naar betere therapieën voor kanker en de optimalisatie van omgevingsparameters bij weefselengineering. Modellen kunnen ons inzicht doen verwerven in de processen die het celgedrag bepalen.

In het eerste hoofdstuk worden twee belangrijke toepassingsdomeinen van weefselgroeimodellen toegelicht, om de relevantie van modellen te onderstrepen. Een bespreking van tumorgroei en kankers wordt gegeven, gevolgd door een beknopt overzicht van weefselengineering, een moderne technologie voor het *in vitro* kweken van weefsels. Daarna komt er een korte bespreking van de reeds bestaande weefselgroeimodellen. In hoofdstuk 2 volgt een uitgebreider stuk literatuurstudie van elementaire celbiologie, met een kwalitatieve en (indien beschikbaar) kwantitatieve beschrijving op celniveau van celgroei, celdeling, celmigratie, celdood, celmetabolisme en krachtwerking tussen cellen. Op deze informatie is het model gebaseerd. In hoofdstuk 3 wordt dan het weefselgroeimodel voorgesteld. Zoals het model daar beschreven wordt, is het ook geprogrammeerd. Het model, zowel de theoretische beschrijving van celgedrag als de omzetting van deze beschrijving in C++ code, is praktisch volledig eigen werk. Uiteraard zijn er met dit model simulaties uitgevoerd. De resultaten van deze simulaties zijn beschreven in hoofdstuk 4, met een bondige discussie van deze resultaten.

# Hoofdstuk 1

## Kanker, weefselengineering en weefselgroeimodellen

In dit hoofdstuk worden twee grote toepassingsdomeinen van modellen van weefselgroei besproken, namelijk het onderzoek naar tumorgroei en weefselengineering. Daarna wordt een overzicht gegeven van de bestaande modellen voor weefselgroei.

### 1.1 Tumorigenese en behandeling van kanker

#### 1.1.1 Weefsel, tumor en kanker

Groei en differentiatie zijn essentiële eigenschappen van levende organismen. Normale groei is gereguleerd. In het volwassen organisme wordt onder fysiologische omstandigheden in de meeste weefsels geen groei meer waargenomen: de aanmaak van nieuwe cellen is in evenwicht met het celverlies. Op celniveau gaat de groei in de meeste weefsels echter levenslang door: voortdurend worden oude cellen vervangen door nieuw aangemaakte. Celverlies vindt vooral plaats door geprogrammeerde celdood, ook wel apoptose genoemd. Celaanmaak vindt plaats door celdeling (mitose). In sommige weefsels, zoals beenmerg, darmslijmvlies en epidermis, is de celgroei zeer actief; er is voortdurend celverlies en er worden eveneens continu cellen aangemaakt. Deze weefsels worden gekenmerkt door de aanwezigheid van stamcellen die ongedifferentieerd zijn en proliferatieve eigenschappen behouden (Bosman & Van Krieken, 2004).

Bij tumorgroei is het evenwicht tussen celafbraak en celaanmaak verstoord (Wagner, 2008, Bosman & Van Krieken, 2004); er worden meer cellen gevormd dan er

afsterven. Dat kan zowel door vermeerderde celaanmaak als door verminderde apoptose. Deze graduele toename in celaantal geeft een groeiende massa van weefsel, dat dan ‘tumor’ of ‘neoplasma’ genoemd wordt (Wagner, 2008). Apoptose speelt een belangrijke rol in de tumorbiologie, enerzijds omdat verlies van het vermogen tot apoptose tot tumorgroei kan leiden en anderzijds omdat het werkingsmechanisme van veel chemotherapeutica en van radiotherapie ten minste ten dele het aanschakelen van apoptose omvat (Bosman & Van Krieken, 2004).

Gezwellen zijn wat hun groei betreft in meer of mindere mate autonoom en reageren niet adequaat op de groeiregulerende mechanismen waaraan de overige weefsels van de drager van de tumor onderworpen zijn. Een tumor of gezwel kan gedefinieerd worden als een weefsel dat ongecontroleerd toeneemt in celaantal en afmetingen. Een kanker is een kwaadaardige tumor, met de karakteristieke eigenschap van ongecontroleerde groei die leidt tot ongelimiteerde expansie. Kankercellen kunnen nabijgelegen weefsels binnendringen of zich verspreiden via de bloedstroom of het lymfenvatenstelsel (metastase) (Wagner, 2008). Kanker is niet één ‘ziekte’, maar moet beschouwd worden als een verzamelnaam voor een grote verscheidenheid aan ‘ziekten’, die per orgaan sterk verschillen van origine, celtype, biologisch gedrag, behandeling en prognose (Bosman & Van Krieken, 2004).







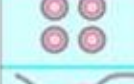







**Verschillende kankertypes** De verschillende kankers kunnen ondergebracht worden in een van de volgende types (Wagner, 2008):

- Carcinoma, het meest voorkomende type kanker, komt voort uit externe en interne lichaamsoppervlakken. Long, borst- en darmkanker zijn van dit type.
- Sarcoma is een kanker van ondersteunend weefsel, zoals bot, kraakbeen, vetweefsel, bindweefsel en spierweefsel.
- Lymphoma is een kanker die zijn oorsprong vindt in lymfeknopen of het immuunsysteem.
- Leukemie is kanker van niet volgroeide bloedcellen uit het beendermerg, die de neiging hebben te accumuleren in de bloedstroom.

**Eigenschappen van kankercellen** Kankerweefsel heeft een typisch uitzicht onder een microscoop. Het bevat een groot aantal onregelmatig gevormde delende cellen,

## 1. Kanker, weefselengineering en weefselgroeimodellen

variatie in grootte en vorm van de celkern, variatie in celgrootte, verlies van gespecialiseerde celkenmerken, een verlies aan normale weefselorganisatie en een vage afbakening van de tumor (Wagner, 2008) (zie figuur 1.1).

Normale cel	Tumorcel	
		<b>Groot aantal onregelmatig gevormde delende cellen</b>
		<b>Grote kernen met een variërende vorm</b>
		<b>Een klein cytoplasmatisch volume t.o.v. de kern</b>
		<b>Variatie in celgrootte en celvorm</b>
		<b>Een verlies van normale gespecialiseerde ceileigenschappen</b>
		<b>Verlies van structuur</b>
		<b>De tumor heeft geen sterk afgeijnde grens</b>

Figuur 1.1: De verschillen tussen een normale cel en een tumorcel (Wagner, 2008).

**Groei** De tijd die een tumor nodig heeft om zijn volume te verdubbelen, kan afhankelijk van het tumortype en de omstandigheden variëren van dagen tot jaren. Deze volumetoename is afhankelijk van de tijd die verloopt tussen twee celdelingen, de groeifractie (het percentage cellen dat actief groeit) en het aantal cellen dat in een bepaalde periode afsterft. De groeisnelheid van tumoren *in vivo* is niet eenvoudig uit de groeifractie en de celcyclusduur af te leiden omdat er belangrijk celverlies is door necrose en/of apoptose (Bosman & Van Krieken, 2004).

Het belang van celcyclusregulators in de oncologie is groot: bij veel vormen van kanker is het evenwicht verstoord waardoor de cellen ongehinderd blijven prolifereren. Veel nieuwe vormen van medicamenteuze kankertherapie zijn dan ook gericht op celcyclus regulerende eiwitten (Bosman & Van Krieken, 2004).

### 1.1.2 Tumorigenese

Het uitvallen van de normale regulatiemechanismen in weefsels is meestal te wijten aan accidentele wijzigingen in het DNA (mutaties). Sommige gemuteerde cellen kunnen de regulatiemechanismen die celproliferatie controleren omzeilen. Hierdoor kunnen ze een excessieve proliferatie ondergaan, waardoor een cluster gemuteerde cellen ontstaat, een tumor (Alberts *et al.*, 2004, Lambie, 2007).

Initieel zijn tumoren veelal avasculair, ze krijgen geen bloedtoevoer, en zijn voor de aanvoer van nutriënten en afvoer van afvalstoffen afhankelijk van diffusie door het omliggende weefsel. Dit heeft tot gevolg dat een tumor in de avasculaire fase maar tot een beperkte grootte (enkele millimeters) kan uitgroeien, bepaald door de beperkte af- en aanvoerflux van nutriënten en afvalstoffen (Nordmark *et al.*, 1994, Helmlinger *et al.*, 1997, Busini *et al.*, 2007). Veelal ontwikkelt er zich in het centrum van de tumor een necrotische kern van dode cellen (ten gevolge van het gebrek aan nutriënten en/of de overmatige aanwezigheid van afvalstoffen). Dit heeft te maken met diffusiebeperkingen, m.a.w. via diffusie kan het transport van nutriënten en afvalstoffen niet snel genoeg gebeuren, zodat afvalstoffen zich opstapelen en de aanvoer van nutriënten niet vlot genoeg verloopt (Venkatasubramanian *et al.*, 2006). Rond deze kern van dode cellen bevindt zich nog een tussenlaag van quiescente cellen (cellen in rustfase, de  $G_0$ -fase van de celcyclus) en nog een buitenste dunne laag van zich prolifererende cellen (Brown, 2000). Chemotherapeutische bestanddelen zijn niet effectief tegen quiescente cellen, en daardoor is deze manier van kankertherapie niet efficiënt bij tumoren met een sterk quiescent karakter (Venkatasubramanian *et al.*, 2006).

Na een initiële groeiperiode bereikt de tumorcelmassa een stationaire fase. Hierna kan de tumor in twee richtingen evolueren. Een eerste is de blijvende stabilisatie van de celmassa, wat een goedaardige tumor genoemd wordt. Anderzijds, bij kwaadaardige tumoren (ook kanker genoemd), is er verdere proliferatie van de tumorcellen. Dit is enkel mogelijk bij overgang naar de vasculaire fase (Carmeliet & Jain, 2000). Dit betekent dat er een bloedvatennetwerk gevormd wordt tussen bestaande bloedvaten en de tumor. De tumor bevindt zich dan niet langer in een geïsoleerde positie temidden van lichaamsweefsel, maar komt in contact met de bloedsomloop. Dit zorgt voor verhoogde af- en aanvoermogelijkheden van nutriënten en afvalstoffen en verdere groei van de tumor. Tevens kunnen tumorcellen nu in de bloedbaan terecht komen en zich nestelen in omliggende weefsels ter vorming van nieuwe tumoren (metastase) (Lambie, 2007).

Aan de basis van ongecontroleerde celproliferatie liggen een aantal factoren die



niet steeds eenduidig te definiëren zijn. Zo is er de invloed van de leefomgeving (aanwezigheid van schadelijke chemicaliën, infecties, roken, straling), erfelijke overdraagbaarheid van bepaalde mutaties, aandoeningen zoals obesitas, enz. De ontwikkeling van een tumor vindt zijn oorspong in de accumulatie van mutaties die overgebracht worden op de dochtercellen bij deling van de moedercel. Meestal gaat het niet om een enkele mutatie maar om een aantal mutaties. Deze geven de cel mogelijk een competitief voordeel ten opzichte van niet-gemuteerde cellen. Dikwijls muteert het genoom van de kankercellen nog verder bij verdere uitgroei van de tumor: bijvoorbeeld door selectiedruk, geïnduceerd door zuurstofgebrek, met uitgroei van de meest competitieve cellen tot gevolg (Lambie, 2007).

### 1.1.3 De derde dimensie brengt nieuwe uitdagingen

*In vitro* systemen worden als testsysteem gebruikt om *in vivo* situaties na te bootsen en inzicht te verwerven in de mechanismen die betrokken zijn in de groei van celpopulaties, omdat ze eenvoudig te manipuleren zijn, in tegenstelling tot *in vivo* systemen (Müller-Klieser, 1987, Sutherland, 1988). Ze laten toe systematische studies uit te voeren op de groeidynamica van celpopulaties zoals tumoren (Drasdo, 2005). Een vaak toegepaste experimentele techniek is de monolaag cultuur, waarbij cellen groeien in een petrischaal gecoat met specifieke eiwitten, zoals ECM componenten, en een vloeibaar medium met een specifieke samenstelling (o.a. voedingsstoffen en groeifactoren) (Balkovetz, 1999, Freshney, 1983). De meeste cellen zijn echter niet aangepast om te leven in suspensie; ze moeten verankerd zijn aan een vast oppervlak om te kunnen groeien en delen (Assoian, 1997, Klekotka *et al.*, 2001). Bijgevolg stoppen veel cellen met prolifereren wanneer ze uit de monolaag groeien (Klekotka *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2003, Warchol, 2002). Dit fenomeen wordt ‘contactinhibitie van groei’ of ‘densiteitsbeperking van groei’ genoemd. Naast groeifactoren en cel-substraat adhesie, cel-cel adhesie (Aplin *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2003, Warchol, 2002) en apoptose (Stupack & Cheresch, 2002), is selectieve geprogrammeerde celdood bij een verlies van cel-substraat contact een belangrijke factor in groeiconrole (Drasdo, 2005). Sommige kankercellijnen verliezen controlemechanismen, zoals contactinhibitie, verankeringafhankelijke proliferatie en apoptose, wat hen toelaat om te groeien in bolvormige aggregaten in suspensie, zonder substraatcontact (Künz-Schughart, 1999, Santini *et al.*, 2000).

Chemotherapeutische middelen die veelbelovende resultaten geven in studies met monolaag weefselculturen zijn veel minder effectief in tumoren, omwille van uitge-

## 1. Kanker, weefselengineering en weefselgroeimodellen

sproken diffusiebeperkingen in basisnutriënten als glucose en zuurstof, waardoor de binnenste regionen necrotisch worden in *in vivo* tumoren (Venkatasubramanian *et al.*, 2006).

*In vitro* sferoïdale celaggregaten kunnen echter wel een goede nabootsing van de heterogene micro-omgeving van *in vivo* driedimensionele weefsels zijn, iets wat in monolaagculturen niet voorkomt (Künz-Schughart, 1999, Sutherland, 1988). Cellen die groeien in driedimensionele matrices verschillen van reguliere celculturen qua adhesiecontacten, communicatiemechanismen en andere responsen (Cukierman *et al.*, 2002).

## 1.2 Weefselengineering

**Inleiding** De stijgende levensverwachting, in combinatie met de steeds hogere eisen die gesteld worden aan de levenskwaliteit, plaatsen de gezondheidszorg voor nieuwe uitdagingen. Veroudering is immers onherroepelijk verbonden met degeneratie van weefsels en organen. De vervanging hiervan door hetzij (lichaamsvreemde) implantaten, hetzij donorweefsels of organen, houdt echter belangrijke beperkingen in. Zo zijn organen niet onbeperkt beschikbaar waardoor elk jaar duizenden patiënten sterven, wachtend op een orgaantransplantatie. Artsen hebben al pogingen ondernomen om de functie van falende organen over te laten nemen door synthetische vervangmiddelen, maar deze bieden meestal slechts een tijdelijke oplossing. Bovendien is er steeds een potentieel risico op afstotingsverschijnselen en infecties. Een nieuwe, hoogtechnologische aanpak lijkt de enige duurzame oplossing. Een belangrijke bijdrage hiertoe kan geleverd worden door weefselengineering (Schrooten, s.d.).

**Weefselengineering** Weefselengineering heeft als doel om met (lichaamseigen) cellen, al dan niet in combinatie met artificiële structuren, weefselherstel mogelijk te maken en uiteindelijk zelfs *ex vivo* reserve-organen aan te maken. Weefselengineering is een snelgroeiend, multidisciplinair, hoogtechnologisch onderzoeksdomein dat inzichten uit biologie, geneeskunde en ingenieurswetenschappen combineert en integreert. Via weefselengineering kan op een revolutionaire manier de gezondheid en de levenskwaliteit van miljoenen mensen verbeterd worden door op een gecontroleerde manier biologische weefsels te herstellen en aan te maken (Sittinger *et al.*, 2004). Weefselengineering reikt also oplossingen aan die complementair zijn aan de meer klassieke behandelingswijzen, of die op (middel)lange termijn deze behandelingswijzen kunnen vervangen. Naast de therapeutische toepassing kan weefselengineering ook leiden tot de ontwikkeling van nieuwe *ex vivo* methoden om de doeltreffendheid en toxiciteit van medicijnen te testen, als (gedeeltelijk) alternatief voor dierexperimentele en preklinische studies (Schrooten, s.d.).

**Lastdragende botdefecten** Een patiënt met een groot lastdragend botdefect (> 3 cm), zoals een deel van een arm of een been, kan op dit moment niet optimaal worden geholpen. De huidige producten voor grote defecten vergen een lange revalidatie- en fixatieperiode en/of laten geen stabiel lange termijngedrag toe, zijn te duur en weinig patiëntgericht (Schrooten, s.d.). Weefselengineering biedt mogelijkheden voor een optimaal alternatief.

**Onderzoekstopics in de weefselengineering** Onderzoek in weefselengineering omvat de volgende domeinen (Sittinger *et al.*, 2004):

- Biomaterialen: onderzoek naar nieuwe biomaterialen, ontworpen om de organisatie, groei en differentiatie van cellen te controleren (zowel via chemische als fysische weg) in het productieproces van functioneel weefsel.
- Cellen: nieuwe methodologieën zoeken voor de proliferatie en differentiatie van cellen.
- Biomoleculen: onderzoek naar angiogenetische factoren, groeifactoren, differentiatiefactoren en ‘bone morphogenetic proteins’.
- ‘Engingeering Design’: onderzoek naar tweedimensionele expansie van cellen, driedimensionele weefselgroei, bioreactoren, cel- en weefselstockage en transport ervan.
- Biomechanische ontwerpaspecten: onderzoek naar de eigenschappen van natuurlijke weefsels, identificatie van de vereiste eigenschappen van gekweekte weefsels, mechanische signalen die weefsels beïnvloeden en de veiligheid en doeltreffendheid van gekweekte weefsels.
- Informatica die weefselengineering ondersteunt: gen- en eiwitsequencing, gen- en eiwitexpressie analyse, kwantitatieve weefselanalyse, weefsel- en celmodellering, ...

## 1.3 Modellen voor weefselgroei

### 1.3.1 Waarom modelleren?

Kanker is nog steeds een van de meest voorkomende doodsoorzaken in geïndustrialiseerde landen, ondanks de snelle vooruitgang van de geneeskunde en de ontwikkeling van nieuwe behandelingsstrategieën. De huidige behandelingen omvatten chirurgie, chemotherapie, radiotherapie, immunotherapie en gentherapie. De laatste decennia zijn er ook enorme vorderingen geboekt in het begrijpen van de moleculen die de controle van celproliferatie waarnemen. Opgeloste mitogenen, niet-opgeloste extracellulaire matrix (ECM) moleculen, groeifactor-receptoren op het celoppervlak, integrines, signaaldoorgevende moleculen en eiwitten die de kern vormen van de celcyclusmachinerie zijn allemaal geïdentificeerd en geïsoleerd (Huang & Ingber, 1999).

Een mogelijke manier om kankerbehandeling te optimaliseren is het selecteren van efficiënte therapiecombinaties. Aangezien het niet mogelijk is alle combinaties van therapieën te testen op patiënten is het noodzakelijk om te zoeken naar alternatieve wegen om goede kandidaat-therapiecombinaties te selecteren, om die daarna op patiënten te kunnen toepassen. Hierin kunnen mathematische modellen een belangrijke bijdrage leveren, aangezien ze het mogelijk maken om verschillende hypothesen in welgedefinieerde imitaties van biologische experimenten te testen, vrij van ongekende en oncontroleerbare invloeden (die wel steeds aanwezig zijn in experimenten uitgevoerd in het laboratorium) (Drasdo, 2005). Modellen kunnen nuttig zijn in het blootleggen van de achterliggende principes van weefselgroei en in het onderscheiden van relevante en minder relevante parameters in de ontwikkeling van tumoren (Drasdo & Höhme, 2003). Wanneer deze gecombineerd worden met goede experimentele gegevens, kunnen deze predictieve modellen de rol van gids spelen voor de ontwikkeling van verbeterde chemotherapeutische strategieën (Venkatasubramanian *et al.*, 2006, Drasdo *et al.*, 2007, Feng & Chien, 2003).

Zulk een mathematisch model moet niet enkel de experimenteel waargenomen groei van weefsels in diverse omstandigheden kwalitatief kunnen beschrijven, het moet ook kwantitatieve voorspellingen kunnen doen. Het is niet voldoende dat de simulatieresultaten van een model overeenkomen met experimentele data. Het model moet een voldoende nauwkeurige beschrijving bevatten van de mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de geobserveerde tumormorfologie. Indien dit niet het geval is, zal het model niet in staat zijn om waarheidsgetrouwe voorspellingen te doen in nieuwe parameterregimes en nieuwe biologische situaties (Drasdo & Höhme, 2003, Bu-

sini *et al.*, 2007). Nochtans kan ook hier het model nuttig zijn: op het punt waar de simulatieresultaten van het model beginnen af te wijken van experimentele resultaten, kan het zijn dat de ceileigenschappen door actieve regulering of door differentiatie gewijzigd zijn (Drasdo *et al.*, 2007). Zo krijgt men een idee in welke situaties cellen zich gedragen als meer dan louter fysische partikels.

### 1.3.2 Validatie van wiskundige modellen

De experimentele mogelijkheden om informatie te verzamelen over biofysische, celbiologische en celkinetische eigenschappen zijn de laatste jaren sterk uitgebreid. Voorbeelden hiervan zijn (Drasdo *et al.*, 2007):

- Proliferatie-activiteit kan bepaald worden door de ‘merkers’ Ki-67, BrdU of thymidine (Schiffer *et al.*, 2003, Alison & Sarraf, 1998).
- Apoptose kan onderzocht worden via ‘Tunnel assay’ (Schiffer *et al.*, 2003, Sayan *et al.*, 2001).
- De diffusieconstante van cellen kan bepaald worden door het traceren van gelabelde cellen (Mombach & Glazier, 1996).
- De elasticiteitsmodulus van cellen kan bepaald worden door optische ‘stretchers’ (Guck *et al.*, 2001) en ‘atomic force microscopy’ (AFM) (Alcaraz *et al.*, 2003) of akoestische microscopie (Laforsch *et al.*, 2005).
- De sterkte van cel-cel en cel-substraat adhesie kan eveneens gemeten worden via AFM (Chesla *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2004).
- De experimentele kwantificatie van het ruimtelijk-temporele labelpatroon in weefsels nodig voor de vergelijking met wiskundige modellen is mogelijk door cytometrische methodes (Galle *et al.*, 2006) en reconstructiemethodes (van tweedimensionele seriële secties naar 3D) (Braumann *et al.*, 2005).

### 1.3.3 Overzicht van de verschillende modeltypes

De mathematische modellen die weefselgroei beschrijven zijn ofwel corpusculair ofwel niet-corpusculair. Corpusculaire modellen beschouwen een tumor als opgebouwd uit verschillende kleine entiteiten met elk hun specifieke eigenschappen. Niet-corpusculaire

modellen beschouwen de celpopulatie als een biofase met globaal gedefinieerde eigenschappen. Corpusculaire modellen worden ook individuele cel gebaseerde of ‘single-cell based’ (SCB) modellen genoemd. Niet-corpusculaire modellen zijn continuümmodellen. De indeling van de modellen in deze twee categorieën is weergegeven in figuur 1.2.

### **SCB modellen**

‘Single cell based’ modellen zijn modellen waarin het gemodelleerde weefsel beschouwd wordt als samengesteld uit individuele entiteiten, de cellen. De individuele cel gebaseerde modellen kunnen verder onderverdeeld worden in drie klassen: cellulaire automaatmodellen (CA) waarbij elke cel voorgesteld wordt door één roosterpunt (Dormann & Deutsch, 2002, Eden, 1961, Kansal *et al.*, 2000, Moreira & Deutsch, 2002), cellulaire automaatmodellen waarbij elke cel wordt voorgesteld door meerdere roosterpunten (Glazier & Graner, 1993, Hogeweg, 2000, Stott *et al.*, 1999) en roostervrije modellen (OLM<sup>1</sup>) (Drasdo, 2003). Cellulaire automaatmodellen waarbij elke cel wordt voorgesteld door meerdere roosterpunten laten toe complexe cellvormen en fysische mechanismen te modelleren, zoals bijvoorbeeld cel-cel en cel-substraat adhesie, maar het is moeilijk de modelparameters direct te verbinden met experimentele waarden op cellulaire en subcellulaire schaal (Drasdo, 2005). In roostervrije modellen worden cellen als Voronoi polygonen (Honda *et al.*, 2000, Meineke *et al.*, 2001), als quasi-sferische deeltjes die vervormen tijdens de celdeling (Drasdo & Höhme, 2005, Drasdo *et al.*, 1995, Galle *et al.*, 2003) of als vervormbare ellipsvormige deeltjes (Palsson & Othmer, 2000) gemodelleerd.

### **Continuümmodellen**

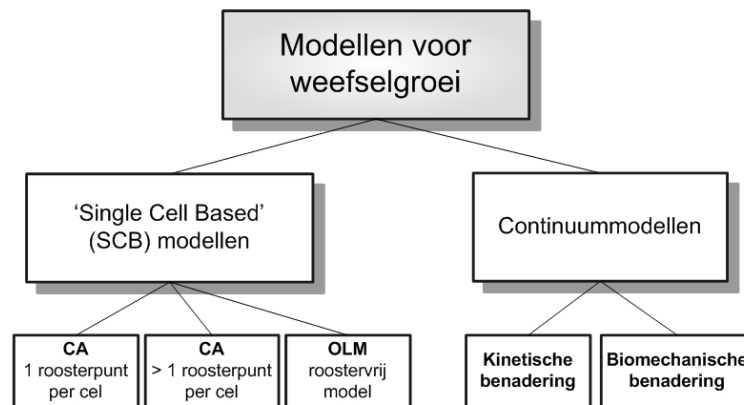
Continuümmodellen zijn modellen waarbij het weefsel als een geheel wordt beschouwd, zonder de cellen afzonderlijk te beschouwen. Er is enerzijds de kinetische (Bertuzzi *et al.*, 2002, Chaplain, 1996, Ward & King, 1997) en anderzijds de biomechanische benadering (Byrne *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2001b, Jones *et al.*, 2000). De eerste benadering is gebaseerd op reactie-diffusievergelijkingen, zonder incorporatie van biomechanische<sup>2</sup> aspecten. Van de biomechanische modellen bestaan twee klassen: een benadering waarbij de buitenste prolifererende laag voorgesteld wordt als een elas-

---

<sup>1</sup>Off-lattice modellen.

<sup>2</sup>In de biomechanica worden wetten uit de natuurkundige mechanica specifiek toegepast om (de beweging van) biologische organismen, weefsels en cellen te beschrijven.

tisch omhulsel (Chaplain, 1996, Greenspan, 1976) en een andere benadering waarbij een tumor in het model beschouwd wordt als een tweefasig fluïdum; de ene fase is de tumor, de tweede het vloeibaar medium rond de tumor (Chen *et al.*, 1997). Er bestaan ook hybride modellen die een SCB beschrijving koppelen aan continuumbeschrijving van moleculen zoals glucose, zuurstof en angiogenesefactoren (Dormann & Deutsch, 2002, Drasdo & Höhme, 2005).



Figuur 1.2: Een overzicht van de verschillende types modellen. CA: cellulair automaatmodel; OLM: off-lattice model.

### 1.3.4 Mogelijkheden en beperkingen van de verschillende modeltypes

Cellulaire automaatmodellen zijn eenvoudig te implementeren en draaien snel op de computer, zodat er grotere systemen gesimuleerd kunnen worden. Ruimtelijk-temporele fluctuaties kunnen beschreven worden in het geval van heterogene celpopulaties (Anderson, 2005) of wanneer celdood-processen optreden tijdens de behandeling (Dhont, 1996, Düchting *et al.*, 1996). Celgebaseerde automaatmodellen geven een stochastische benadering, zowel op cellulair (Kimmel & Axelrod, 1991, Smolle & Stettner, 1993, Qi *et al.*, 1993, Kansal *et al.*, 2000, Dormann & Deutsch, 2002) als op subcellulair niveau (Düchting, 1990, Düchting *et al.*, 1996). Dit betekent dat het gedrag van cellen in eenzelfde situatie licht verschilt van cel tot cel, wat realistischer is dan een deterministische benadering (waarbij alle cellen in een gegeven toestand op eenzelfde wijze reageren). In werkelijkheid is er immers steeds biologische variabiliteit aanwezig.

Het nadeel van CA modellen is dat ze niet rechtstreeks gebaseerd zijn op een fysi-



sche representatie van individuele cellen, waardoor bepaalde fysische effecten over het hoofd kunnen gezien worden. Biomechanische effecten zoals compressie en relaxatie van cellen zijn bijvoorbeeld moeilijk in deze modellen te incorporeren (Drasdo, 2005).

Roostervrije modellen laten toe op kleinere lengteschaal te werken en kunnen beschouwd worden als analoog aan de moleculaire simulaties in de statistische fysica. De rekentijd die deze modellen vereisen beperkt echter hun gebruik tot systemen van maximaal  $10^5$  à  $10^6$  cellen, wat overeenkomt met een driedimensioneel aggregaat van ongeveer 1 à 2 mm groot. Dit is veel kleiner dan de typische grootte van een tumor in zijn klinisch voorkomen (Drasdo, 2005).

Continuümmodellen kunnen veel grotere systemen beschrijven, maar het blijkt moeilijk om de vergelijkingen en parameters zo te kiezen dat relevante informatie op cellulair niveau kan ingebracht worden. Het zou een belangrijke vooruitgang zijn wanneer men de voordelen van een roostervrij model zou kunnen combineren om de juiste regels voor een roostermodel te kunnen definiëren, op zo'n manier dat de CA-benadering alle relevante eigenschappen van het systeemgedrag van een roostervrij model op individuele cel-niveau bewaart. Op die manier kunnen grotere systemen beschreven worden met een groot bereik van parameterwaarden. Zowel roostervrije als CA modellen kunnen bijdragen tot het afleiden van een continuümtheorie (Drasdo, 2005).

Mechano-chemische en biomechanische modellen beschrijven de fysische druk en de krachten tussen cellen en de ECM (Chaplain & Sleeman, 1993, Tracqui, 1995). Deze modellen zijn in staat om de tumorstructuur op weefselniveau te verklaren, maar ze falen op cellulair niveau, en zeker op subcellulair niveau. Deze beperking is van kritische aard, aangezien er geen verband kan gelegd worden met het onderzoek van experimentele biologen. Ook al zijn deze modellen mathematisch geldig, ze zijn moeilijk om experimenteel te testen, en dus is hun impact gelimiteerd (Quaranta *et al.*, 2005).

### 1.3.5 Reeds voorgestelde modellen voor weefselgroei

Een gemeenschappelijk doel van de verschillende modellen voor tumorgroei is om de vorming van drie celklassen, die dikwijls in *in vivo* tumoren voorkomen, te voorspellen, namelijk (Venkatasubramanian *et al.*, 2006, Drasdo & Höhme, 2003):

1. prolifererende cellen aan de buitenzijde van de tumor (een laag tot 15 cellen dik), waar de gunstige nutritionele omstandigheden leiden tot een snelle groei en deling;

## 1. Kanker, weefselengineering en weefselgroeimodellen

2. quiescente cellen iets dieper in de tumor, waar nutriëntconcentraties geen significante proliferatie mogelijk maken, maar wel celoverleving waarborgen;
3. necrotische cellen binnenin de sferische tumor, die gestorven zijn na een te lange blootstelling aan te lage nutriëntconcentraties.

Verskillende modellen zijn reeds ontwikkeld om de diffusie van voedingsstoffen en groeifactoren alsook van inhibitoren tussen de tumoromgeving en de tumor te beschrijven (Araujo & McElwain, 2004). Deze modellen zijn typisch gebaseerd op de aanname van een enkele groeilimiterende stof (Venkatasubramanian *et al.*, 2006). Groeimodellen die diffusievergelijkingen combineren met reactie-convectievergelijkingen voor het expanderende weefsel, zijn eveneens voorgesteld (Adam & Maggelakis, 1989, Adam & Maggelakis, 1990, Chaplain & Britton, 1993, Greenspan, 1976), zelfs voor verschillende celtypes (Pettet *et al.*, 2001, Sherratt & Chaplain, 2001, Ward & King, 1997). In een recentere studie werd de rol van een lage pH op de groei en invasiviteit van cellen in tumoren (zowel vasculair als avasculair) onderzocht (Smallbone *et al.*, 2005).

Tumorgroeimodellen zijn ook gebruikt geweest bij de studie van de effecten van diffusie van geneesmiddelen en medicatie-geïnduceerde celdood op tumorgroei (Bertuzzi *et al.*, 2003, Jackson & Byrne, 2000, Ward & King, 2003). Deze modellen geven nuttige inzichten in de groeidynamica van tumoren. Ze zijn echter gebaseerd op overgesimplifieerde beschrijvingen van het celmetabolisme, wat hun efficiëntie als predictief model sterk limiteert. Er is wel een model voorgesteld waarin getracht werd een uitgebreide beschrijving van het celmetabolisme te combineren met tumorfysiologie (Casciari *et al.*, 1992), maar het model veronderstelde eenzelfde groeisnelheid voor alle cellen, wat een behoorlijke beperking is (Venkatasubramanian *et al.*, 2006).

Deterministische reactie-diffusievergelijkingen worden gebruikt om de ruimtelijke spreiding van tumoren te modelleren (Ward & King, 1999, Sherratt & Nowak, 1992). De typische oplossingen in al deze modellen geven een beeld van binnendringende bewegende golven van kankercellen (Orme & Chaplain, 1996, Gatenby & Gawlinski, 1996, Perumpanani *et al.*, 1996, Byrne *et al.*, 1999).

Recent worden meer en meer wiskundige modellen ontworpen om mogelijke verklaringen over de rol van biomechanica in de controle van morfogenese en weefselgroei te onderzoeken (Byrne *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2001b, Schwarz *et al.*, 2002, Byrne & Preziosi, 2003, Bischofs & Schwarz, 2005). Ook relevant voor celgebaseerde modellen van kankerinvasie zijn de studies van bacteriële motiliteit en chemotaxis van Cummings en medewerkers (Frymier *et al.*, 1993, Duffy *et al.*, 1995).

### **Het model van Anderson *et al.***

Anderson *et al.* (1997) hebben een hybride modelleerbenadering ontwikkeld, waarbij cellen als individuen beschouwd worden in een continue densiteit (het weefsel). Dit wordt de hybride discreet-continuüm (HDC) techniek genoemd (Quaranta *et al.*, 2005, Anderson, 2003). Hun model incorporeert experimentele metingen van beweging van cellen. Het voordeel van het HDC model van Anderson (2005) is dat het eenvoudig te begrijpen is, en dat het intuïtief de link legt met de experimentele biologie, waardoor validatie gemakkelijk kan verlopen. De structuur van het HDC model maakt de incorporatie van parameters op cellulair, subcellulair en moleculair niveau mogelijk. Uitbreiding van dit model moet op termijn een nauwkeurige beschrijving van de complexe weefselgroei mogelijk maken (Quaranta *et al.*, 2005).

### **Model van Venkatasubramanian *et al.***

Een recent model van Venkatasubramanian *et al.* (2006) is gebaseerd op de hypothese dat door diffusiebeperkingen ruimtelijke voedingsstoffengradiënten ontstaan, waardoor wijzigingen in het lokale energiemetabolisme (en dus ook de groeisnelheid) plaatsvinden, en waardoor uiteindelijk de fysiologie van de tumor in zijn geheel bepaald wordt. De incorporatie van het primair energiemetabolisme in een reactie-diffusiemodel van tumorgroei zou volgens hen geobserveerde nutriëntconcentratieprofielen kunnen verklaren, evenals de tumorfysiologie zoals hypoxie en centrale necrose. In hun model zijn echter geen groeifactoren opgenomen, omdat verondersteld wordt dat hun diffusie en gebruik niet de limiterende factor is, en dat celdood vooral te wijten is aan de gelimiteerde aanvoer van voedingsstoffen. Het model van Venkatasubramanian *et al.* is een uitgebreide versie van het model van Ward & King (1997), wat betreft de beschrijving van tumormorfologie en groei. De celpopulatie is onderverdeeld in intacte levende cellen (prolifererend en quiescent) en dode (necrotische) cellen met vaste volumes. Het vernieuwende aan hun model is dat de diffusie van verschillende voedingsstoffen (glucose, zuurstof en lactaat) gekoppeld is aan een metabolismemodel dat rekening houdt met glycolyse, de citroenzuurcyclus en lactaatproductie en -consumptie. De celgroei en overlevingsgraad worden geparametriseerd in functie van de ATP productie uit het metabolismemodel (Venkatasubramanian *et al.*, 2006).

### **Model van Drasdo & Höhme**

In het model van Drasdo & Höhme (2003) voor avasculaire *in vitro* tumoren wordt een cel als eenheid beschouwd, in tegenstelling tot veel andere modellen waarin het tumorweefsel als een geheel wordt beschouwd. Op avasculaire tumoren is reeds veel experimenteel onderzoek verricht. De SCB benadering laat toe de modelparameters te verbinden met experimentele biomechanische en kinetische parameters, en geeft een (op zijn minst gedeeltelijk) kwantitatieve beschrijving van groeistadia van avasculaire tumoren waarbij voorziening van nutriënten en zuurstof niet de limiterende factor is. De groeicurve, afgeleid uit simulaties met het model, werd vergeleken met de experimentele resultaten van Freyer & Sutherland (1985). In de benadering van Drasdo & Höhme (2003) worden cellen beschouwd als elastische, elkaar aantrekkende deeltjes in een viskeuze omgeving, met de capaciteit om te groeien en te delen.

### **Model van Busini *et al.***

Busini *et al.* (2007) stellen voor om twee modellen te combineren tot een hybride model. Het eerste model kan voorspellen hoe de celvermenigvuldiging in de tumor verloopt in functie van de tumordimensies, de substraatconcentratie en de interactie van farmacologisch actieve moleculen. Het tweede model, dat complementair is aan het eerste, laat toe de concentratie van de toegediende geneesmiddelen in de nabijheid van de tumor te berekenen.

### **1.3.6 De uitdagingen in het modelleren**

Ondanks de sterke vooruitgang in de moleculaire biologie, biochemie en biofysica blijft kwalitatieve en kwantitatieve informatie over processen in het onderhoud en de disfunctie van weefsels schaars. Een reden hiervoor is dat multicellulaire organisatie complexe processen omhelst, in een tijdschaal van  $10^{-9}$  s voor moleculaire processen tot  $10^7$  s ( $\approx 100$  dagen) voor de ontwikkeling van een organisme en een lengteschaal van  $10^{-9}$  m voor een molecule tot meer dan 1 m voor een organisme. Het is niet mogelijk en evenmin gewenst om alle details op alle schalen in rekening te brengen. Het komt erop neer een goed onderscheid te maken tussen de relevante en de minder relevant processen (Drasdo, 2005).

Als lokale ruimtelijke inhomogeniteiten in de celdensiteit niet uitgespreid (*Eng: smooth out*) kunnen worden wegens afwezigheid van diffusie of roeren, kunnen de

huidige ‘coarse graining’<sup>3</sup> technieken niet toegepast worden. Dit is vaak het geval in *in vitro* groeiende celpopulaties (Drasdo, 2005).

---

<sup>3</sup>Een techniek waarbij in een model op een hoger niveau zo goed mogelijk de werkelijke kenmerken en het gedrag van het onderzoeksobject overgenomen worden uit een model op een lager niveau. Veelal wordt een model op een hoger niveau gebruikt omwille van een beperkte rekencapaciteit.

# Hoofdstuk 2

## Literatuurstudie celbiologie

Een goed model is gebaseerd op een grondig inzicht in de processen die meespelen in het gemodelleerde systeem. Daarom is een literatuurstudie van elementaire celbiologie onontbeerlijk.

### 2.1 Weefselorganisatie

Het menselijk lichaam bestaat uit tien grote (orgaan)stelsels. Deze stelsels voeren de belangrijkste fysiologische functies uit, zoals ademhaling, vertering en beweging (Palsson & Bhatia, 2004). Een stelsel is opgebouwd uit organen, en elk orgaan bestaat weer uit een verzameling weefsels (zoals epitheelweefsel, bindweefsel, spierweefsel, . . .). De basiscomponenten van een weefsel zijn de cellen en de extracellulaire matrix (ECM). De cellen zorgen voor een voortdurende opbouw en afbraak van de ECM om de geometrische structuur van weefsels te bekomen alsook veel essentiële weefseleigenschappen (Palsson & Bhatia, 2004).

**De ECM** De ECM is een netwerk van verschillende eiwitten en polysacchariden. Cellen veranderen de samenstelling van de ECM, en omgekeerd beïnvloedt de ECM het celgedrag door binding van bepaalde ECM-componenten aan de integrines, een klasse van receptoren in het celmembraan. De bewegingssnelheid van cellen, celadhesie, celvorm en apoptose zijn allemaal functie van de ECM-dichtheid. De samenstelling van de ECM varieert sterk naargelang de plaats in het lichaam. Omdat de macromoleculen (zoals eiwitten en polysacchariden) in de ECM grote moleculen zijn (een molaire massa van  $10^5$  à  $10^6$  g/mol), hebben ze een lage diffusiviteit<sup>1</sup> (Palsson

---

<sup>1</sup>Dit wil zeggen dat deze moleculen slechts langzaam migreren doorheen het fluidum.

& Bhatia, 2004).

**Cellen** Het menselijk lichaam bestaat uit ongeveer  $10^{14}$  cellen (Palsson & Bhatia, 2004) en er bestaan meer dan 200 verschillende menselijke celtypen (Alberts *et al.*, 1998), sterk verschillend qua uiterlijk, eigenschappen en functie. Het aantal basiscategorieën is echter beperkt. Een van de basistypen is de mesenchymale cel, met de fibroblast als meest voorkomende vertegenwoordiger. Mesenchymale cellen kunnen afzonderlijk bestaan, of als kleine, matig geconnecteerde celaggregaten. Ze hebben een bipolaire vorm en kunnen individueel actief bewegen. Hun groei is typisch contact-geïnhibeerd, wat wil zeggen dat ze stoppen met groeien wanneer het celmembraan van een cel het celmembraan van een andere cel raakt (Palsson & Bhatia, 2004).

## 2.2 De extracellulaire matrix

### 2.2.1 Nutriënten en groeifactoren

Cellen hebben aminozurenconcentraties nodig tussen 0,01 en 0,1 mM (Eagle, 1955), en het menselijk lichaamsvocht bevat ongeveer 0.9% aan zouten. Voor vele biochemische laboratoriumtests wordt bloedserum<sup>2</sup> gebruikt, aangevuld met vitamines, anorganische zouten en enkele groeifactoren (Eagle, 1955). IJzer blijkt ook essentieel voor celgroei (Arden & Betenbaugh, 1994) en deling van kankercellen (Scalerandi *et al.*, 1999).

**Zuurstof** De zuurstofconcentratie varieert naargelang de afstand tot het dichtstbijzijnde bloedvat. Het lichaam houdt de cellulaire zuurstofconcentraties binnen een nauwe 'range', omwille van het risico op schade door te hoge concentraties of dood ten gevolge van te weinig zuurstof. Hoge zuurstofconcentraties induceren ook de vorming van vrije radicalen, componenten die genexpressiepatronen kunnen wijzigen (mutaties). Groei wordt geremd door hoge zuurstofconcentraties, maar deze groeibeperking is reversibel, wanneer de zuurstofconcentratie maar voor korte tijd te hoog is. Veranderingen in zuurstofconcentratie hebben pas na 15 à 20 minuten invloed op het celgedrag (Sen, 2003).

---

<sup>2</sup>Serum is de vloeistof die overblijft als men bloed laat stollen en het stolsel afcentrifugeert.

**Glucose** Glucose is de belangrijkste energiebron voor een cel (Alberts *et al.*, 1998). De fysiologische concentratie van glucose is 5,5 mM (D'Souza *et al.*, 2003).

**TGF- $\beta$**  Transforming Growth Factor- $\beta$  is een wijdverspreid cytokine en komt in zoogdieren voor in drie isovormen (De Caestecker, 2004, Bachman & Park, 2005). Deze spelen een belangrijke rol in groeiregulering en ontwikkeling en ze worden door de meeste celtypes gesecreteerd, meestal in een latente vorm (L-TGF- $\beta$ ), zodat activatie nodig is vooraleer ze biologisch actief worden (Lawrence, 1996, Khalil, 1999, Williams *et al.*, 1996). De huidige literatuur ondersteunt een heel aantal biologische en biochemische stoffen die L-TGF- $\beta$  *in vitro* en *in vivo* kunnen activeren, wat doet vermoeden dat er waarschijnlijk geen universeel activatiemechanisme van TGF- $\beta$  bestaat (Khalil, 1999). TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 en TGF- $\beta$ 3 inhiberen proliferatie van de meeste cellen, maar kunnen de groei van sommige mesenchymale cellen stimuleren. Verder bevorderen ze de vorming van de extracellulaire matrix (Herpin *et al.*, 2004). Groei-inhibitie door TGF- $\beta$ 's wordt veroorzaakt door blokkering van de celcyclus in de late G<sub>1</sub>-fase<sup>3</sup> (Lawrence, 1996).

### 2.2.2 Diffusie van nutriënten en groeifactoren

In de literatuur zijn een aantal verschillende mogelijkheden voorgesteld om diffusie van nutriënten te beschrijven (Martins *et al.*, 2007, Byrne & Gourley, 1997, Jones *et al.*, 2000). Het model van Martins *et al.* (2007) bestaat uit een weefsel gevoed door een haarvat. Dit haarvat ligt aan de rand van het model en is de enige bron van waaruit nutriënten diffunderen doorheen het weefsel naar de verschillende individuele cellen. Martins *et al.* beschouwen drie celtypes: normale, kanker- en necrotische cellen (deze laatste ontstaan door een gebrek aan zuurstof en nutriënten). Ze maken ook een onderscheid tussen essentiële nutriënten en niet-essentiële nutriënten. Hun diffusievergelijking voor nutriënten is van de vorm:

$$\frac{\partial N(\vec{x}, t)}{\partial t} = D\nabla^2 N(\vec{x}, t) - \gamma N(\vec{x}, t)\sigma_n(\vec{x}, t) - \lambda_N \gamma N(\vec{x}, t)\sigma_c(\vec{x}, t), \quad (2.1)$$

met  $N$  de plaats- en tijdsafhankelijke nutriëntconcentratie,  $D$  de diffusiecoëfficiënt,  $\gamma$  en  $\lambda$  schaalfactoren en  $\sigma_n$  en  $\sigma_c$  de populatie van respectievelijk normale cellen en kankercellen. De eerste term beschrijft de migratie van nutriëntmoleculen van een plaats met hogere concentratie naar een plaats met lagere concentratie, de

---

<sup>3</sup>Zie sectie 2.8.1.



tweede term de consumptie van nutriënten door normale cellen en de laatste term de consumptie van nutriënten door kankercellen.

In hun model worden ook groeifactoren in rekening gebracht, die diffunderen volgens de vergelijking:

$$\frac{\partial G}{\partial t} = D_G \nabla^2 G - k^2 G + \Gamma \sigma_c N (G_M - G). \quad (2.2)$$

De eerste term beschrijft de groeifactordiffusie volgens de concentratiegradiënt, de tweede term beschrijft de natuurlijke degradatie van de groeifactor (met een karakteristieke lengte  $\sim 1/k$  voor groeifactordiffusie) en de laatste term is een productieterm, die lineair stijgt met de lokale nutriëntconcentratie tot aan de saturatiewaarde  $G_M$ .  $G$  is de groeifactorconcentratie en  $D_G$  is de groeifactordiffusiecoëfficiënt. Diffusiecoëfficiënten van groeifactoren en inhibitoren variëren tussen  $10^{-6}$  en  $10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{h}$  (Jiang *et al.*, 2005).

Als men een sferische tumor beschouwt, kan de nutriëntconcentratie ook uitgedrukt worden in functie van de afstand  $r$  tot het tumorcentrum (Byrne & Gourley, 1997). De reactie-diffusievergelijking wordt dan:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \frac{D}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial N}{\partial r} \right) - \Gamma. \quad (2.3)$$

$N$  staat weer voor de nutriëntconcentratie,  $D$  voor de diffusieconstante en  $\Gamma$  voor de consumptiesnelheid.

**Viscositeit van de ECM** De migratie van stoffen doorheen de ECM gaat gepaard met een uitgesproken grote weerstandskracht, zowel door wrijving tussen een vaste fase en een vloeistof als door de viscositeit van het fluïdum (Mow *et al.*, 1999). Er is aangetoond dat de eerstgenoemde factor 1000 tot 100000 keer groter kan zijn dan de viskeuze wrijving (Hou *et al.*, 1989).

### 2.2.3 Numerieke waarden van concentraties en diffusiecoëfficiënten

Numerieke waarden van concentraties en diffusiecoëfficiënten van enkele stoffen worden overzichtelijk weergegeven in tabellen 2.1 en 2.2. Er worden verschillende waarden gegeven die in de literatuur beschikbaar zijn. Er zit variatie op de waarden, omdat ze betrekking hebben op verschillende cellijnen. Eerder dan gedetailleerde informatie te geven over de numerieke waarden met betrekking tot specifieke cellij-

nen, wordt er getracht een beeld te geven van de ordegrrootte van concentraties en diffusieconstanten.

Stof	Typische concentratie	referentie
zuurstof	0,5-10%	(Sen, 2003)
	$8 \cdot 10^{-5}$ M	(Freyer, 1988)
glucose	$5,5 \cdot 10^{-3}$ M	(D'Souza <i>et al.</i> , 2003)

Tabel 2.1: Concentraties van zuurstof en glucose.

Stof	Diffusieconstante	Referentie
zuurstof	$1,82 \cdot 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> /s	(Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2006)
	$1,65 \cdot 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> /s	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)
	$5,15 \cdot 10^{-8}$ cm <sup>2</sup> /s	(Busini <i>et al.</i> , 2007)
	$4,15 \cdot 10^{-10}$ cm <sup>2</sup> /s	(Busini <i>et al.</i> , 2007)
glucose	$1,05 \cdot 10^{-6}$ cm <sup>2</sup> /s	(Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2006)
	$4,2 \cdot 10^{-7}$ cm <sup>2</sup> /s	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)
	$1,12 \cdot 10^{-10}$ cm <sup>2</sup> /s	(Busini <i>et al.</i> , 2007)
	$3,22 \cdot 10^{-13}$ cm <sup>2</sup> /s	(Busini <i>et al.</i> , 2007)
afvalstoffen	$5,9 \cdot 10^{-7}$ cm <sup>2</sup> /s	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)
groefactoren	$2,8 \cdot 10^{-10}$ cm <sup>2</sup> /s	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)
inhibitoren	$2,8 \cdot 10^{-10}$ cm <sup>2</sup> /s	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)

Tabel 2.2: De diffusieconstante van enkele belangrijke stoffen.

## 2.2.4 Cultuurmedia

De vloeistof waarin cellen *in vitro* in groeien, wordt een (cultuur)medium genoemd. Het voorziet in de nodige nutriënten e.d. De samenstelling ervan is verschillend voor elk celtype. Met het medium tracht men een fysiologische omgeving na te bootsen, zoals een juiste pH en osmolariteit. Andere bestanddelen zijn overvloediger aanwezig dan in het lichaam (hormonen, nutriënten) en het medium bevat ook enkele niet-fysiologische ingrediënten (kleurstoffen, antibiotica) (Berthiaume, 1998). In tabel 2.3 staat een overzicht van de typische samenstelling van een cultuurmedium.

<b>Bestanddeel</b>	<b>Hoeveelheid</b>	<b>Functie</b>
NaCl	6-8 g/l	regulatie van de osmotische druk
anorganische zouten	0,8-1 g/l	zorgt voor een elektrolytbalans vergelijkbaar met die van bloed
NaHCO <sub>3</sub>	2-3 g/l	zorgt voor pH-buffercapaciteit
D-glucose	1 g/l	energiebron, koolstofbron
aminozuren	1 g/l	stikstofbron voor eiwitsynthese
vitamines	0,01 g/l	cofactoren in verschillende intracellulaire biochemische reacties
fenolrood	0,01 g/l	visuele pH-indicator
serum (zie tabel 2.4)	1-20% v/v	zorgt voor celgroei, aanhechtingsfactoren, hormonen en 'carrier' proteïnen
groeifactoren, hormonen	1-10 µg/l	groeistimulatie, celfuncties
antibiotica	1-50 µg/l	vermijden van contaminatie door micro-organismen

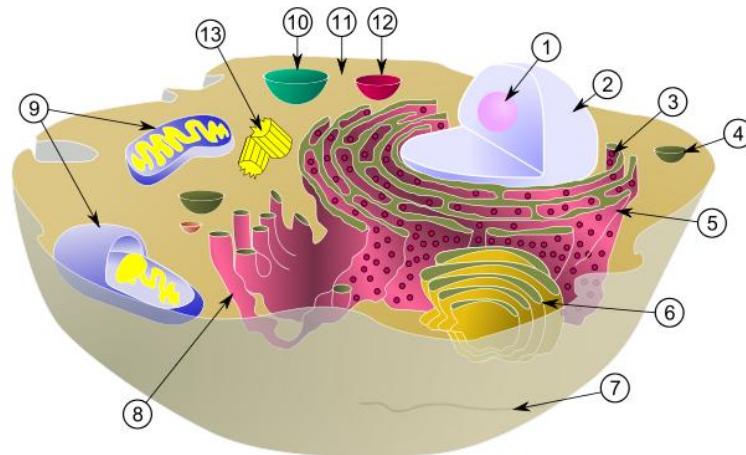
Tabel 2.3: De belangrijkste bestanddelen van media voor weefselculturen (Palsson & Bhatia, 2004).

<b>Bestanddeel</b>	<b>Effect op cellen</b>
albumine, globulines, transferrine	'carriers' voor vetzuren, ijzer, ...
fibronectine, fetuïne	aanhechtingsfactoren
α <sub>2</sub> -macroglobuline	protease-inhibitor
groeifactoren, groeihormoon	promoten celproliferatie
hormonen (insuline, corticosteroiden, ...)	stimulatie van opname van glucose en aminozuren; wijziging van de groeisnelheid
koolstof- en stikstofbronnen	nutriënten
mineralen en sporenelementen	essentieel voor de activiteit van metallo-enzymes
inhibitoren	inhiberen celproliferatie

Tabel 2.4: De hoofdbestanddelen van serum (Palsson & Bhatia, 2004).

## 2.3 De cel

Cellen zijn kleine eenheden, gevuld met een geconcentreerde waterige oplossing van chemische stoffen, omsloten door een membraan. Ze zijn in staat een kopie van zichzelf te maken door te groeien en in twee te delen. Een cel heeft typisch een diameter van 5 à 20  $\mu\text{m}$  (Alberts *et al.*, 1998). De massadichtheid van (rode bloed)cellen is bij benadering 1,139 g/cm<sup>3</sup> (Godin *et al.*, 2007). Er wordt een onderscheid gemaakt tussen prokaryote (zonder celkern) en eukaryote cellen (met een celkern). Bacteriële cellen zijn prokaryoot, plantaardige en dierlijke cellen zijn eukaryoot. In een cel bevinden zich allerlei structurele eenheden, de celorganellen (zie figuur 2.1). Ze worden kort besproken in de volgende sectie.



Figuur 2.1: Een typische dierlijke cel - 1. Nucleolus - 2. Nucleus (celkern) - 3. Ribosomen - 4. Blaasje (vesikel) - 5. Ruw endoplasmatisch reticulum (RER) - 6. Golgi-apparaat - 7. Microtubulus - 8. Glad endoplasmatisch reticulum (SER) - 9. Mitochondriën - 10. Peroxisoom - 11. Cytoplasma - 12. Lysosoom - 13. Centriolen (Bron: Wikipedia - GNU Free Documentation License)

### 2.3.1 Celorganellen

**De nucleus of celkern** is meestal het belangrijkste organel in een eukaryote cel. Deze kern wordt omgeven door twee concentrische membranen die samen het kernmembraan vormen, en bevat het DNA - lange polymeren die de genetische specificaties van een organisme coderen (Alberts *et al.*, 1998).

**Mitochondriën** zijn worst- of wormvormige organellen met een lengte van een tot enkele micrometers. Ze produceren een energierijk molecuul, ATP, door oxidatie van

voedselmoleculen (zoals suikers), en leveren zo de nodige energie voor cellulaire activiteiten. Bij dit proces, cellulaire ademhaling genoemd, verbruiken de mitochondriën zuurstof en geven ze koolstofdioxide vrij.

**Het endoplasmatisch reticulum** is een wirwar van ruimtes, omgeven door een membraan. Hierin worden de meeste membraancomponenten gemaakt, alsook materialen bestemd om geëxporteerd te worden vanuit de cel.

**Het Golgi-apparaat of Golgi-complex** bestaat uit opeengestapelde, door een membraan omgeven zakjes, waarin de producten van het endoplasmatisch reticulum terechtkomen en al dan niet gewijzigd worden doorgegeven naar de buitenkant van de cel of naar andere locaties.

**Lysosomen** zijn kleine, onregelmatige organellen waarin de intracellulaire vertering plaatsvindt, met afgifte van nutriënten en afbraak van ongewenste moleculen, bestemd voor recyclage of excretie.

**Peroxisomen** zijn kleine membraanomgeven blaasjes die een beschermde omgeving bieden voor reacties waarin waterstofperoxide, een gevaarlijk reactieve chemische stof, gevormd en weer afgebroken wordt.

Daarbuiten zijn er nog vele kleine blaasjes/vesikels, betrokken bij het transport van materialen tussen membraanomgeven organellen.

### 2.3.2 Cytosol

De matrix waarin alle organellen zich bevinden, de cytosol, bevat een massa kleine moleculen. De concentratie aan opgeloste stoffen is zo hoog dat de cytosol zich meer als een watergebaseerde gel gedraagt, dan als een vloeistof. De (dynamische) viscositeit van de cytosol bedraagt 1,2 à 1,4·10<sup>-3</sup> Pa.s, wat niet veel hoger is dan de viscositeit van water (1,06·10<sup>-3</sup> Pa.s) (García-Pérez *et al.*, 1999, Periasamy *et al.*, 1992). Metingen van de migratiesnelheid van kleine intracellulaire metabolieten wijzen echter op een grotere (schijnbare) viscositeit. Dit doet veronderstellen dat er nog andere factoren een rol spelen dan de zuivere viscositeit van de vloeistoffase. De schijnbare viscositeit van het cytoplasma bedraagt 2 à 20·10<sup>-3</sup> Pa.s (García-Pérez *et al.*, 1999). Cellen kunnen materialen uit een extern medium vangen in

blaasjes die uitstulpen uit het plasmamembraan. De blaasjes versmelten daarna met lysosomen, waar de intracellulaire vertering gebeurt. Omgekeerd kunnen cellen op een gelijkaardige manier afvalstoffen verwijderen uit de cel (Alberts *et al.*, 1998).

### 2.3.3 Cytoskelet

De cytosol is geen structuurloos mengsel van chemische stoffen. In de cel bevindt zich een netwerk van lange, fijne eiwitfilamenten. Vaak zitten deze aan een uiteinde vast aan het plasmamembraan of aan een centrale plek dicht bij de kern (het centrosoom). Dit systeem van filamenten wordt het cytoskelet genoemd. De dunste filamenten zijn actinefilamenten, de dikste zijn de microtubuli. In delende cellen vervullen microtubuli een bijzondere functie: ze trekken gedupliceerde chromosomen uit elkaar en verdelen ze over twee gelijke dochtercellen. Filamenten met een middelmatige dikte geven de cel mechanische sterkte. Deze drie types filamenten vormen, samen met andere eiwitten die zich aan de filamenten vasthechten, een systeem van draagbalken, touwen en motoren die de cel mechanische sterkte geven, haar vorm controleren, en haar bewegingen drijven en controleren (Alberts *et al.*, 1998).

## 2.4 Morfogenese

De morfogenese beschrijft de evolutie en ontwikkeling van de vorm. Initieel is een bevruchte eicel min of meer bolvormig, en dus geometrisch symmetrisch, maar bij maturatie ontwikkelen zich vorm en functie. Dit proces komt tot stand door de gecoördineerde activiteit van een veelheid aan cellen. Met morfogenese bedoelt men meestal de structurele wijzigingen die geobserveerd worden tijdens de ontwikkeling en het uitklaren van de onderliggende mechanismen (Palsson & Bhatia, 2004).

## 2.5 Celdifferentiatie

Differentiatie is het proces waarbij een cel omgevormd wordt tot een gespecialiseerd celtype (Palsson & Bhatia, 2004). Een bespreking hiervan valt buiten het bestek van dit werk.

## 2.6 Cellulaire processen

‘Cellular Fate Processes’ (CFP) zijn de processen die de toekomst/het lot van een cel bepalen (Palsson & Bhatia, 2004), de meest fundamentele aspecten van celgedrag (Sulic *et al.*, 2005). Het is ook via deze processen dat de cellen communiceren en hun activiteiten coördineren. Deze processen zijn:

- celgroei (toename in celvolume);
- celdeling (toename in aantal cellen);
- celdifferentiatie (verandering in genexpressie en opnemen van een bepaalde functie);
- beweging van cellen (naar een bepaalde niche of locatie);
- apoptose (geprogrammeerde celdood);
- celadhesie (fysische binding van een cel met de naaste omgeving, bijvoorbeeld een andere cel, een extracellulaire matrix (ECM) of een artificieel oppervlak).

Deze processen bepalen de weefseldynamica, die op zijn beurt kan onderverdeeld worden in weefselfunctie (homeostase), weefselherstel (heling van wonden) en weefselvorming (morfogenese en ontwikkelingsbiologie) (Palsson & Bhatia, 2004).

## 2.7 Celmigratie

Celmigratie speelt een belangrijke rol in veel fysiologische functies van weefsels alsook in sommige pathologische processen (Friedl *et al.*, 2004, Lauffenburger & Horwitz, 1996). Cellen migreren als reactie op een breed gamma van prikkels (Palsson & Bhatia, 2004). In tabel 2.5 worden een aantal types van celmigratie weergegeven.

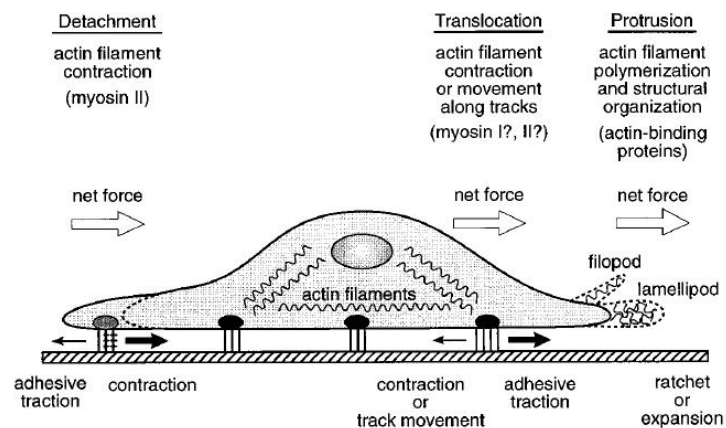
Type	Mechanisme
chemotaxis	concentratiegradiënt van een opgeloste stof
haptotaxis	concentratiegradiënt van een niet-opgeloste stof
galvanotaxis	elektrische stroom
‘contact guidance’	oppervlaktopologie
contactinhibitie	lamellipodium geïnhibeerd door nabijheid van een buur

Tabel 2.5: Types van celmigratie (Palsson & Bhatia, 2004).

Beweging komt tot stand door een gecoördineerd samenspel van verschillende elementen: morfologische polarisatie, membraanextensie, vorming van cel-substraat aanhechting, contractiele krachten en weer verbreken van de aanhechting (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Celmigratie kan aan- en uitgezet worden door kwantitatieve veranderingen in de concentratie van moleculaire componenten, zoals adhesiereceptoren, cytoskeletale bindingsproteïnen en ECM liganden (Huttenlocher *et al.*, 1995). Maar celmigratie kan ook variëren door kwantitatieve veranderingen in fysicochemische eigenschappen, zoals receptor-ligand binding aviditeit (Duband *et al.*, 1991) en de sterkte van receptor-cytoskelet interacties (Kassner *et al.*, 1995). Celmigratie moet dus gezien worden als een fysisch geïntegreerd moleculair systeem waarin het celgedrag bepaald wordt door kwantitatieve wijzigingen in de parameters die de kinetische en mechanische karakteristieken van moleculaire interacties karakteriseren (Lauffenburger & Horwitz, 1996).

### Onderliggende biochemische processen

De laatste jaren heeft men al heel wat moleculaire componenten geïdentificeerd die betrokken zijn bij de verschillende stappen in celmigratie. Van de coördinatie tussen deze componenten is echter nog niet alles bekend (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Celmigratie van een individuele cel kan geconceptualiseerd worden als een proces van 5 stappen (Friedl *et al.*, 2004, Palsson & Bhatia, 2004, Lauffenburger & Horwitz, 1996). Een visualisatie van de processen en krachten betrokken bij celbeweging wordt in figuur 2.2 weergegeven.



Figuur 2.2: Illustratie van de verschillende krachten betrokken bij celmigratie (Lauffenburger & Horwitz, 1996).



- Stap 1: Initiële celpolarisatie, veroorzaakt door intracellulaire actine polymerisatie, leidt tot vorming van membraanlamellopodia.
- Stap 2: Aanhechting aan de matrix via integrines, die een binding maken met het actine cytoskelet. Aan de cel/matrix-interfase worden ‘focal adhesions’ gevormd; dit zijn gespecialiseerde complexen, gereguleerd door de rho subfamilie van de ras familie van GTP-bindingsproteïnen. Hoe deze regulatie gebeurt, is momenteel nog niet bekend.
- Stap 3: Proteolyse (afbraak) van ECM moleculen en andere proteïnen om ruimte te maken voor de voorwaartse expansie van het cellichaam.
- Stap 4: Contractie van het cytoplasma door myosine-gebaseerde motoren. Dit resulteert in een trekkracht op het substraat.
- Stap 5: Loslaten van de achterzijde en celverplaatsing. De kern verplaatst zich naar de voorzijde van de cel. De overblijvende integrines worden gerecycled. De recyclage gebeurt door endocytose in vesikels, gevolgd door intracellulaire diffusie en gericht intracellulair transport of via het celoppervlak naar het voorste uiteinde. Nieuw gesynthetiseerde integrines worden ingebouwd in het plasmamembraan en worden ook naar het voorste uiteinde getransporteerd.

**Morfologische polarisatie** Om te migreren moeten cellen een ruimtelijke asymmetrie aannemen, om zichzelf in staat te stellen intracellulair gegenereerde krachten om te zetten in een netto beweging van de ganse cel. Eén aspect hiervan is polarisatie van de cel, d.w.z. dat er een duidelijk verschil ontstaat tussen de voorzijde en de achterzijde van de cel. Concentratiegradiënten van stimuli zijn niet nodig om deze respons teweeg te brengen (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Een belangrijk gevolg van de polarisatie is dat de extensie van het membraan, met vorming van lamellipodia of filopodia, plaatsgrijpt aan de voorzijde van de cel, zodat richtingsveranderingen slechts geleidelijk tot stand komen. De beweging van een cel neemt een ‘persistent random walk’ karakter aan. Celbeweging zonder de aanwezigheid van stimulus-gradiënten is dus afhankelijk van twee onafhankelijke parameters: de lineaire celbewegingssnelheid en de directionele persistentietijd (zie vergelijking 2.4) (Lauffenburger & Lindermann, 1993).

**Membraanextensie** Lamellipodia zijn brede, platte structuren. Filopodia zijn dunne, cilindrische naaldvormige uitstulpingen van het celmembraan. In deze struc-

turen zitten geen cytoplasmatische organellen, maar wel veel actine en actine-geassocieerde proteïnen. Beide kunnen zich reversibel uitstrekken in drie dimensies, zelfs bij beweging over een tweedimensioneel substraat. Extensie van lamellipodia en filopodia als reactie op migratiestimuli is gekoppeld aan lokale actinepolymerisatie (Lauffenburger & Horwitz, 1996).

**Vorming en stabilisatie van aanhechtingen** Net zoals er meer membraanextensie is aan de voorzijde van de cel, is daar ook een sterkere neiging tot aanhechting. Cdc42, rac en rho, leden van de rho subfamilie van GTP-bindingsproteïnen spelen een belangrijke rol in de regulatie van de vorming van adhesieve bindingen. Vorming van filopodia wordt gereguleerd door cdc42, die van lamellipodia door rac. De interactie tussen deze bindingsproteïnen is echter niet volledig uitgeklaard (Lauffenburger & Horwitz, 1996).

**Contractiele krachten en trekkrachten** Er moeten op zijn minst twee soorten krachten onafhankelijk van elkaar gegenereerd worden in een cel, om beweging mogelijk te maken. De eerste is de kracht nodig voor extensie van het membraan (lamellipodia en filopodia); actinepolymerisatie en organisatie ervan in bundels (filamenten) voorzien in deze kracht. De tweede kracht is een contractiele kracht, nodig voor de voorwaartse beweging van de cel. Deze kracht hangt af van actieve myosinegebaseerde cellulaire motoren. De bewegingssnelheid wordt echter niet volledig getermineerd door de contractiele krachten die in de cel gegenereerd worden, aangezien de lokale kracht van het substraat op de cel via de cel-substraat aanhechtingen ook een invloed heeft. De grootte van deze kracht hangt af van de gevoeligheid van de aanhechtingen voor afbraak (Lauffenburger & Horwitz, 1996).

Myosine II is een lange, staafvormige, tweekoppige molecule die kan polymeriseren in bipolaire filamenten. Myosine I daarentegen heeft slechts een kop, en een korte staart. Beide kunnen binden aan actinefilamenten en ATP-afhankelijke beweging bewerken (Lauffenburger & Horwitz, 1996).

**Losmaken van de achterzijde** Snelle migratie vergt efficiënte mechanismen om adhesieve bindingen aan de achterzijde van de cel weer op te heffen. De losmaking van de achterzijde van de cel kan zelfs in sommige gevallen de netto bewegingssnelheid van de cel bepalen (Chen, 1981). De meeste types tumorcellen bezitten geen sterke intercellulaire bindingen, en prefereren dus groei en migratie als afzonderlijke cellen (Friedl *et al.*, 2004).

**Calcium** speelt een rol in adhesiviteit en beweging(ssnelheid). De fysiologische concentratie van Ca is ongeveer 0,09 mM (Doyle & Lee, 2005). Studies met fibroblasten hebben aangetoond dat cytoskeletale spanning een belangrijke factor is in gecoördineerde celbeweging. Een beweging van de cel wordt namelijk steeds gevolgd door retractie aan het achteruiteinde van de cel (Chen, 1981). De veronderstelling dat cytoskeletale spanning protrusie inhibeert maar retractie faciliteert wordt ondersteund door de bevinding dat deze processen invers proportioneel met elkaar verlopen (Chen, 1979). Intracellulair calcium reguleert veel moleculaire processen die essentieel zijn voor celbeweging, inclusief cytoskeletale dynamica, contractiliteit en verlies van adhesie (Stossel, 1993, Sjaastad & Nelson, 1996, Mandeville *et al.*, 1995).

### Celmigratie mathematisch beschreven

Individuele beweeglijke cellen bewegen volgens een willekeurig pad. Dit kan mathematisch beschreven worden zoals een moleculair diffusieproces. Het voordeel van cellen is echter dat hun migratie kan gemeten worden op individuele basis, omdat cellen veel groter zijn dan moleculen. De beweging kan beschreven worden in termen van celsnelheid ( $v$ ) en de persistentietijd ( $p$ ) (Palsson & Bhatia, 2004). De persistentietijd wordt gedefinieerd als de tijd dat een cel beweegt zonder significant van richting te veranderen. Deze definitie laat nog ruimte voor interpretatie, aangezien ‘significant’ een relatief begrip is. Ook is vastgesteld dat dierlijke cellen geen ‘straight run and random-turn’ patroon beschrijven, zoals microbiële cellen dat doen. In een tweedimensionele geometrie kan de random bewegingscoëfficiënt  $\sigma$  als volgt bepaald worden (Palsson & Bhatia, 2004):

$$\sigma = \frac{1}{2}v^2p. \quad (2.4)$$

Celmigratie kan ook op een andere manier gekarakteriseerd worden door twee onafhankelijke variabelen: de snelheid  $v$  en de migratiehoek  $\varphi$  (Schienbein *et al.*, 1994). Elke variabele kan beschreven worden door een stochastische differentiaalvergelijking, een *Langevin*-vergelijking. Bespreking ervan valt echter buiten het bestek van dit werk.

Chemotaxis is een gerichte beweging van de cel volgens een concentratiegradiënt. Dit systeem kan beschouwd worden als een automatische regelaar met gesloten-kring systeem met terugkoppeling (Schienbein *et al.*, 1994). De reactie van de cel op een concentratiegradiënt bestaat uit een deterministische en een stochastische compo-

nent, waardoor de cel een ietwat kronkelend pad volgt, maar globaal gezien wel duidelijk in een bepaalde richting. Er is experimenteel aangetoond dat tijdelijke fluctuaties in  $v$  en  $\varphi$  onafhankelijk zijn van elkaar, en dat de overheersende snelheid onafhankelijk is van de migratiehoek. De overheersende snelheid wordt bepaald door de celmotor en is evenredig met het aantal receptoren gebonden met chemokinesestimulerende moleculen.

### 2.7.1 Celaggregaten

In collectieve migratie worden stappen 1 t.e.m. 4 van de migratiecyclus van individuele cellen behouden, maar het loslaten van de achterzijde en voorwaarts bewegen (stap 5) verloopt anders. Omdat gepolariseerde cel-matrix interacties en krachtgeneratie enkel voorkomen aan de ‘vrije’ pool van het celaggregaat, ontstaat er een eenpolige leidende rand (lamella). De cellen in deze leidende rand blijven verbonden met hun buurcellen via intercellulaire bindingen (juncties) en trekken deze mee. Tracering van individuele cellen in migrerende celclusters toont aan dat cellen hun positie binnen het celaggregaat precies behouden tijdens de collectieve verplaatsing (Hegerfeldt *et al.*, 2002). De inwendige architectuur van de celcluster wijzigt dus niet (Friedl *et al.*, 2004). Strecking van de leidende rand en retractie aan de achterzijde verlopen gelijktijdig in gekoppelde cellen. Daardoor ontstaat er een verschil tussen de ‘trekkende’ cellen en de daarmee verbonden ‘getrokken’ cellen; er is een voorzijde-achterzijde asymmetrie in de celgroep. Terwijl de cellen van de leidende rand betrokken zijn in cel-ECM interacties en proteolytische ECM hermodellering, wordt het ontstane matrixdefect aan de achterzijde collectief opgevuld met volgcellen zodat er geen gat ontstaat in de celcluster. Dit vereist een voorwaartse beweging van cellen naar de leidende rand of het creëren van nieuwe cellen door celdeling om de extra ruimte op te vullen (Friedl *et al.*, 2004).

In mechanisch contact met andere cellen, oefenen cellen een kracht uit op naburige cellen. Deze buurcellen proberen te ontsnappen aan deze druk door weg te bewegen van de wrijving veroorzaakt door nabije cellen en het extracellulair materiaal. Drasdo (Drasdo, 2007) neemt aan dat de migratie kan gekarakteriseerd worden door een effectieve wrijvingsconstante, zoals voor werkelijke wrijving. Voor elke cel wordt een aparte bewegingsvergelijking opgesteld (Drasdo, 2007). Deze vergelijking is voornamelijk stochastisch. Als de deterministische termen echter veel groter worden dan de stochastische term, kan deze laatste verwaarloosd worden.

## 2.7.2 Numerieke waarden (geïsoleerde cellen)

In afwezigheid van chemotactische signalen voeren geïsoleerde cellen in suspensie of cultuurmedium een willekeurige beweging uit, die gekarakteriseerd kan worden met de celdiffusieconstante  $D$ , met  $D \approx 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$  (Drasdo, 2007).

Mandeville *et al.* (1995) schrijft dat de door hen onderzochte cellen over een tijdsperiode van 6 minuten netto  $16,4 \pm 0,8$  à  $19,9 \pm 1,3 \mu\text{m}$  aflegden. Mombach en Glazier (Mombach & Glazier, 1996) vermelden echter een celverplaatsing van slechts ongeveer een zesde van een celdiameter over een half uur. Dit is  $1,7$  à  $2,1 \mu\text{m}$  per 30 minuten; beduidend lager dan de experimentele bevindingen van Mandeville *et al.* (1995). Endotheelcellen bewegen met een gemiddelde snelheid van  $25$  à  $30 \mu\text{m}/\text{h}$  (Palsson & Bhatia, 2004). Men moet dus besluiten dat celmigratie sterk kan variëren naargelang het celtype en de specifieke omstandigheden. De concentratie van nutriënten in de micro-omgeving van de cel heeft ook een invloed op de celbeweging. Hoe groter de lokale celdensiteit, hoe waarschijnlijker het is dat de cel zal migreren (Martins *et al.*, 2007).

## 2.8 De celcyclus

### 2.8.1 Overzicht van de celcyclus

Een cel reproduceert zichzelf door middel van een geordende opeenvolging van gebeurtenissen waarbij haar inhoud gedupliceerd wordt en ze uiteindelijk in twee deelt. Deze cyclus van duplicatie en deling wordt de celcyclus genoemd (Alberts *et al.*, 1998). De duur van de celcyclus kan gedefinieerd worden als het interval tussen het midden van de mitose (celdeling) in de oudercel en het midden van de daaropvolgende mitose in de dochtercel (Baserga, 1965). De celcyclus is ontdekt door Howard en Pelc (1951).

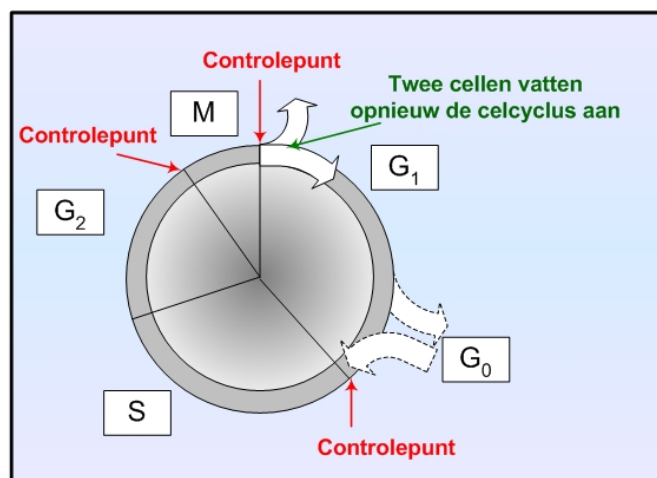
De eukaryotische celcyclus wordt traditioneel onderverdeeld in vier fasen. De meest opvallende gebeurtenissen tijdens de celcyclus zijn de mitose (het delen van de celkern) en de cytokinese (het in twee splitsen van de cel). Samen vormen ze de M-fase<sup>4</sup>. In een typische zoogdiercel neemt deze fase ongeveer een uur in beslag. De periode tussen een M-fase en de daarop volgende M-fase wordt de interfase genoemd. Deze interfase omhelst de drie overige fasen in de celcyclus. Tijdens de S-fase<sup>5</sup> kopieert de cel het DNA dat zich in de kern bevindt. De periode tussen het einde van de

---

<sup>4</sup>M staat voor mitose.

<sup>5</sup>S staat voor synthese.

M-fase en het begin van de S-fase is de  $G_1$ -fase<sup>6</sup>. De  $G_2$ -fase is het interval tussen het einde van de S-fase en de aanvang van de M-fase (Alberts *et al.*, 1998, Bosman & Van Krieken, 2004). In de  $G_1$ -fase en de  $G_2$ -fase grijpt er RNA- en proteïnesynthese plaats (Baserga, 1965). De celcyclus is visueel voorgesteld in figuur 2.3. De duur van de celcyclus kan sterk variëren. De minimumtijd van een celcyclus, gemeten aan cellen in weefselkweek, bedraagt ongeveer 16 uur. *In vivo* is deze voor darmepitheel 12 uur, voor de epidermis 21 dagen en voor de lever 160 dagen (Bosman & Van Krieken, 2004). Sommige cellen, zoals spiercellen en zenuwcellen, delen helemaal niet (Alberts *et al.*, 1998). De celcyclusduur kan experimenteel bepaald worden uit de helling van de groeicurve in de exponentiële groeifase van de populatie (Drasdo *et al.*, 2007).



Figuur 2.3: Schematische weergave van de celcyclus.

Het kan echter ook gebeuren dat een cel van de  $G_1$ -fase naar de  $G_0$ -fase gaat; dit is een soort rustfase. Het schijnt zelfs dan zoogdiercellen slechts prolifereren als en slechts als ze daartoe gestimuleerd worden door signalen van andere cellen, en overgang naar de  $G_0$ -fase dus meer regel is dan uitzondering (Alberts *et al.*, 1998). De cel stapt dan als het ware uit de celcyclus (zie figuur 2.3), voor onbepaalde duur (Alberts *et al.*, 1998). Na een bepaalde periode kan de cel eventueel wel weer de celcyclus hervatten, na een adequate stimulus (Bosman & Van Krieken, 2004). De overgang naar de  $G_0$ -fase is dus reversibel. Ook kunnen een of beide dochtercellen na de mitose differentiëren en niet-delende cellen worden. De meeste weefsels zijn qua celtaantal in dynamisch evenwicht. Dit wil zeggen dat de helft van de nieuw gevormde

<sup>6</sup>G staat voor 'gap'.

cellen een niet-delende cel wordt. Of een cel zal differentiëren, wordt beslist in de interfase, op basis van omgevingsomstandigheden (Baserga, 1965).

### 2.8.2 Duur van de verschillende fasen

De duur van de verschillende fasen is afhankelijk van de micro-omgeving van de cel, het celtypen en het organisme (Baserga, 1965). Fibroblasten in celcultuur hebben een celcyclustijd van ongeveer 20 uur (Alberts *et al.*, 1998). De G<sub>1</sub>-fase duurt ongeveer 8 uur, de S-fase 6 uur, de G<sub>2</sub>-fase 4,5 uur en de mitose 1 uur; de cytokinese duurt slechts enkele minuten (Straight *et al.*, 2003). De G<sub>1</sub>-fase varieert het meest in duur (Baserga, 1965). In tabel 2.6 staat de minimale en maximale tijdsduur van de celcyclusfasen, om een rudimentaire aanduiding te geven van de orde grootte van de geobserveerde variatie.

Fase	Minimale duur	Maximale duur
G <sub>1</sub> -fase	8 uur	maanden
S-fase	4,5 uur	30 uur
G <sub>2</sub> -fase	30 minuten	9 uur
M-fase	30 minuten	2,5 uur

Tabel 2.6: De duur van de verschillende fasen van de celcyclus (zoogdiercellen) (Baserga, 1965).

### 2.8.3 Celcycluscontrole

Celcyclus-overgangen zijn unidirectioneel en worden gecontroleerd door restrictie- of controlepunten ('checkpoints'). Deze zorgen ervoor dat bepaalde biochemische gebeurtenissen in de juiste volgorde aan elkaar worden gelinkt (Palsson & Bhatia, 2004). De toegang tot de celcyclus (overgang van de G<sub>0</sub>- naar de G<sub>1</sub>-fase) en de progressie van een cel doorheen de celcyclus wordt gereguleerd door cytoplasmatische eiwitten, waaronder cyclines, CDK's<sup>7</sup>, CKI's<sup>8</sup> en het anafase bevorderend complex (Jiang *et al.*, 2005, Bosman & Van Krieken, 2004). De cyclines vormen een complex met de cycline-afhankelijke kinasen; voor elk van de fasen van de celcyclus is er een specifiek cycline/CDK-complex. Dit complex activeert door fosforylering transcriptiefactoren, die op hun beurt de genen activeren die essentieel zijn voor de voortgang van

<sup>7</sup>Cycline afhankelijke kinases.

<sup>8</sup>Cycline afhankelijke kinase inhibitoren.

de cel door de celcyclus. De cycline/CDK-complexen worden geremd door CDK-remmers, zoals de eiwitten p21 en p27. Het evenwicht tussen het cycline/CDK-complex en de CDK-remmer bepaalt of de cel verdergaat in de celcyclus (Bosman & Van Krieken, 2004).

**Controle in de G<sub>1</sub>-fase** Oplosbare groeifactoren, onoplosbare ECM-moleculen en mechanische krachten dragen allemaal bij tot de controle van de voortgang van de celcyclus in de G<sub>1</sub>-fase, en elk kan de voortgang een halt toe roepen (Huang & Ingber, 1999). Vooraleer de cel overgaat in de S-fase worden de celafmetingen, bepaalde omgevingsfactoren en de integriteit van het DNA gecontroleerd (Palsson & Bhatia, 2004). Eens een cel deze drempel heeft overwonnen, loopt de celcyclus verder geprogrammeerd af (Bosman & Van Krieken, 2004).

Fibroblasten die niet aan een substraat verbonden zijn blijven hangen in het midden van de G<sub>1</sub>-fase, terwijl dezelfde cellen het restrictiepunt passeren en overgaan naar de S-fase wanneer ze opnieuw kunnen aanhechten aan het ECM substraat (Huang & Ingber, 1999). Maar anderzijds is aangetoond dat epitheel- en endotheelweefselcellen ook kunnen stoppen met groeien, ook al blijven ze verankerd met hun ECM. ECM-verankering is dus geen voldoende voorwaarde voor groei. Wanneer deze cellen het contact met de ECM verliezen, wordt in veel gevallen apoptose geïnitieerd (Wicha *et al.*, 1980). Het feit dat een groeistop wordt vastgesteld wanneer cellen zich in een monolaag verzamelen (dichtheid-afhankelijke groeiïnhibitie) kan ook verklaard worden door wijzigingen in de celvorm, onafhankelijk van intercellulair contact (Folkman & Moscona, 1978).

**Controle in de S-fase en de G<sub>2</sub>-fase** Vooraleer een cel overgaat naar de M-fase wordt de celgrootte gecontroleerd en er wordt nagegaan of de DNA replicatie volledig voltooid is, en het gerepliceerde DNA geen fouten bevat. Wanneer het DNA niet in orde is, treedt apoptose op en sterft de cel (Palsson & Bhatia, 2004, Alberts *et al.*, 1998).

**Overgang naar de G<sub>0</sub>-fase** Experimenten tonen aan dat 85% van de quiescente<sup>9</sup> cellen gestopt werden in de G<sub>1</sub>-fase (Freyer & Sutherland, 1986, LaRue *et al.*, 1998). Slechts in sommige cellijnen kan quiescentie ook optreden in de S-fase of de G<sub>2</sub>-fase (LaRue *et al.*, 1998).

---

<sup>9</sup>Een cel in de G<sub>0</sub>-fase noemt men quiescent, in rust.



**Invloed van de ECM** Hoewel het inzicht in de signaaltransductie en de celcyclusregulatie eerst verworven werd door de analyse van oplosbare mitogenen, is het nu duidelijk geworden dat de extracellulaire matrix een even belangrijke groeiregulator is (Huang & Ingber, 1999). Integrinereceptoren op de celmembraan bewerkstelligen cel-aanhechting aan de ECM en brengen biochemische signalen over naar de kern door dezelfde intracellulaire signalisatiewegen te gebruiken als bij groeifactorreceptoren (Kumar, 1998). Integrinebezetting en clustering leidt tot stimulatie van verschillende mitogenische gebeurtenissen die geassocieerd zijn met de overgang van de  $G_0$ - naar de  $G_1$ -fase van de celcyclus (Huang & Ingber, 1999).

### 2.8.4 Quiescentie van cellen

Een quiescente cel is een cel in de  $G_0$ -fase (de rustfase). Cellen in een sferisch cel-aggregaat vertonen een daling in celvolume wanneer ze in een quiescente toestand komen. Metingen met individuele cellen hebben aangetoond dat zuurstof- en glucoseconsumptie gecorreleerd zijn met celvolume en met de ontwikkeling van niet-prolifererende cellen (Martins *et al.*, 2007). Martins *et al.* (2007) besluiten dat cellen in het quiescente stadium inherent een lager nutriëntverbruik hebben. Het metabolisme verlaagt en de celgroei stopt wanneer een cel quiescent wordt (Jiang *et al.*, 2005).

## 2.9 Celgroei en celdeling

Celgroei en celdeling worden genetisch gereguleerd om ervoor te zorgen dat de weefsels en het organisme de optimale afmetingen hebben en functioneel zijn. Naast de genetische controle worden groei en deling ook beïnvloed door andere factoren, zoals nutriënten en temperatuur in sommige organismen. Verschillende studies hebben uitgewezen dat celgroei en celdeling afzonderlijke processen zijn, doch in de meeste cellen gecoördineerd verlopen (Sulic *et al.*, 2005).

### 2.9.1 Celgroei

De initiële straal van een sferische dochtercel is ongeveer  $5 \mu\text{m}$  (Galle *et al.*, 2005). De massa van een dochtercel ligt in de in de grootte-orde van  $1 \cdot 10^{-8}$  g (Freyer, 1988). Toename in cytoplasma is er voornamelijk in de  $G_1$ -fase (Van Suijlekom, 2006). De hoeveelheid nutriënten (en de kwaliteit ervan) bepaalt hoe snel een cel de  $G_1$ -fase

kan doorlopen. Cellen halen de meeste energie uit glucose en groeien daarom ook het snelst op glucose. De aanwezigheid van nutriënten regelt de snelheid en hoeveelheid van de aanmaak van cyclines (zie sectie 2.8.3), die belangrijk zijn voor de progressie door de celcyclus (Van Suijlekom, 2006).

Bij zoogdiercellen *in vitro* wordt celgroei geblokkeerd bij afwezigheid van voedingsstoffen, groeifactoren of behandeling met translatie-inhibitoren. Deze blokkering van de celcyclus vindt meestal plaats in de G<sub>1</sub>-fase. Anderzijds kan een overvloed aan nutriënten of de activatie van groeiregulerende signaalpathways de celcyclus versnellen (Sulic *et al.*, 2005).

In een intact weefsel is de regulatie nog een stuk complexer, aangezien daar verschillende regulatiemechanismen (cel-cel communicatie, groeifactoren, ‘patterning signals’, hormonen en nutriënten) tegelijkertijd kunnen werken (Sulic *et al.*, 2005).

Drukopbouw door de aanwezigheid van naburige cellen (Helmlinger *et al.*, 1997) en verhoogde vloeistofdruk binnenin een weefsel (Sarntinoranont *et al.*, 2003) blijken groei te inhiberen in sferische celaggregaten en tumoren (Jiang *et al.*, 2005, Drasdo *et al.*, 2007). Epitheelcellen zijn in staat om veranderingen in de micro-omgeving waar te nemen door hun eigen extensie en compressie te voelen, en ze koppelen vormveranderingen aan celmigratie en proliferatie (Gloushankova *et al.*, 1997). Sommige effecten van celcontactvorming en verlies van celcontact kan men dus toeschrijven aan de fysische interactie tussen individuele cellen onderling, en individuele cellen en hun substraat (Galle *et al.*, 2005). Cellen die een sterkere deformatie ondergaan hebben een langere celcyclustijd dan cellen die minder deformatie of compressie ondergaan (Drasdo *et al.*, 2007).

De druk nodig om een standaardvervorming van een cel te bekomen, is eenvoudig te meten. De exacte wiskundige analyse van zulke metingen is echter zeer ingewikkeld (Weiss, 1965). Daarom is het moeilijk om bruikbare kwantitatieve gegevens over de invloed van druk op celgroei te vinden.

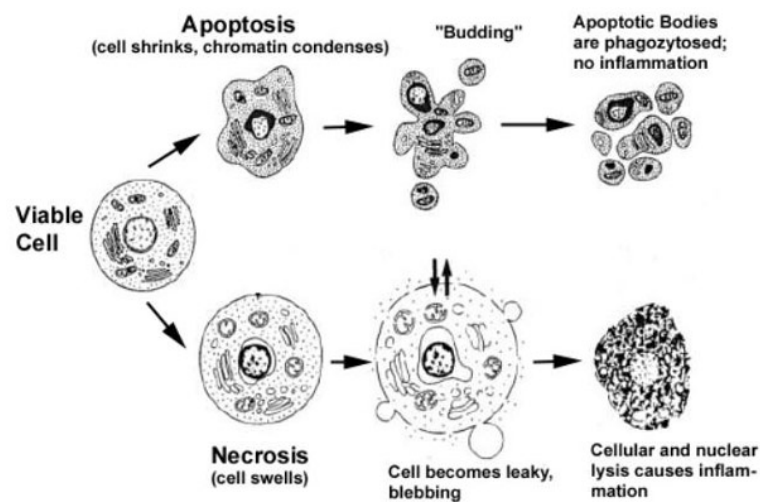
### 2.9.2 Celdeling

Cytokinese (celdeling) is het proces waarbij dochtercellen van elkaar gescheiden worden, na de mitose (kerndeling) (Straight *et al.*, 2003). Tijdens de cytokinese ondergaan het cytoskelet en de membraansystemen van de cel een sterk gecoördineerde reeks van veranderingen in de loop van enkele minuten (Straight & Field, 2000, Glotzer, 2001). Hoe het delingsvlak bepaald wordt is nog niet uitgeklaard (Straight *et al.*, 2003, Hinchcliffe, 2003).

Epitheelcellen in cultuur kunnen enkel delen als ze voldoende in contact zijn met het substraat, en dit komt overeen met *in vivo* bevindingen. Anders treedt anoikis (verankering-afhankelijke apoptose) op (Galle *et al.*, 2005).

## 2.10 Celdood

Celdood komt voor in twee hoofdvormen: necrose en apoptose (zie figuur 2.4). Necrose komt door extreme condities (bijvoorbeeld door zuurstofgebrek, hyperthermie, fysische beschadiging, chemische inwerking, ...) of aanvallen door micro-organismen, waardoor er een verlies van membraanintegriteit ontstaat, met zwelling en lysis (celmembraanbreuk) tot gevolg (Vermes, 2002, Palsson & Bhatia, 2004, Drasdo *et al.*, 2007). Tijdens necrose wordt de celinhoud ongecontroleerd vrijgegeven aan de celomgeving, wat resulteert in schade bij de omliggende cellen en een sterke inflammatoire respons in het weefsel (Leist & Jaattela, 2001). Apoptose is een gereguleerde fysiologische respons veroorzaakt door een niet-lethale stimulus, die echter een cascade van cellulaire reacties activeert die uiteindelijk resulteert in celdood (Arden & Betenbaugh, 1994). Het maakt deel uit van weefselgroei en -functie. In de apoptose krimpen cellen, worden ze dener en vallen uit elkaar in fragmenten. De fragmenten blijven echter aan de celmembraan hangen, zodat ze andere cellen niet beschadigen. Disfunctioneren van apoptose is een deel van tumorvorming (Palsson & Bhatia, 2004).



Figuur 2.4: Vergelijking van apoptose en necrose (Gewies, 2003).

### 2.10.1 Apoptose

Apoptose of geprogrammeerde celdood is een sterk gereguleerd en tegelijkertijd zeer efficiënt celdoodprogramma dat een interactie van een heel aantal factoren vereist. De componenten van het apoptose-sigitaalnetwerk zijn genetisch gecodeerd en worden beschouwd steeds te werken in een cel met een kern, en klaar om geactiveerd te worden door een dood-inducerende stimulus (Ishizaki *et al.*, 1995, Weil *et al.*, 1996). Apoptose kan geïnitieerd worden door allerlei stimuli van zowel buiten als binnen de cel, bijvoorbeeld door binding aan celoppervlakreceptoren, door DNA-schade door defecten in DNA-herstelmechanismen, behandeling met cytotoxische stoffen of straling, door een gebrek aan overlevingssignalen, contradictorische celcyclussignalisatie, ... 'Doodsignalen' van zulke diverse origine activeren desalniettemin een gemeenschappelijke celmachinerie die leidt tot de karakteristieke eigenschappen van apoptotische celdood (Gewies, 2003). Apoptose wordt gekarakteriseerd door een reeks morfologische veranderingen, zoals het krimpen van de cel, fragmentatie in membraangebonden apoptotische lichamen en snelle fagocytose door naburige cellen (Saraste & Pulkki, 2000, Arden & Betenbaugh, 1994), zonder schade voor de omliggende cellen.

#### Biologische beschrijving van apoptose

Celdood voltrekt zich in een tijdsbestek van de grootte-orde van een uur. Het apoptose-proces kan onderverdeeld worden in 3 fasen (Palsson & Bhatia, 2004):

1. *De inductiefase.* Deze hangt af van de specifieke dood-inducerende signalen.
2. *De effector-fase.* Tijdens deze fase wordt de 'centrale uitvoerder' geactiveerd en pleegt de cel zelfmoord.
3. *De degradatiefase.* Tijdens de eindfase van apoptose, komen er grote biochemische en morfologische veranderingen voor.

#### Het onderliggend biochemisch proces

Er zijn drie verschillende manieren waardoor apoptose geïnduceerd kan worden: (1) een extern "moord" signaal, zoals een Fas Ligand binding aan een Fas oppervlak "dood-receptor, (2) een zelfmoordcommando geïnitieerd door een externe stressfactor zoals ultraviolette straling, of (3) verwijdering van een extracellulair 'overlevings-sigitaal' (trofische factoren). Deze 3 'pathways' convergeren naar eenzelfde familie

van enzymen, de caspases. Deze enzymen worden gestockeerd in een inactieve vorm (procaspases). De caspase-familie bestaat uit initiator-caspases en effector-caspases (Palsson & Bhatia, 2004).

### 2.10.2 Anoikis

Anoikis is een speciaal type van selectieve geprogrammeerde celdood die voorkomt wanneer cellen contact verliezen met het substraat (namelijk intacte ECM-proteïnen) (Drasdo *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 1997, Stupack & Cheresch, 2002). Deze cellen ondergaan dan apoptose na een periode van enkele uren (Drasdo *et al.*, 2007). Veel epitheelcelpopulaties zijn gevoelig voor anoikis en groeien bijgevolg in een celcultuur tot een gelijkmatige monolaag van cellen (Li *et al.*, 2003, Warchol, 2002, Klekotka *et al.*, 2001).

### 2.10.3 Necrose

Wanneer een cel sterft door necrose, produceert de cel inhibitiefactoren en afvalstoffen, gedurende een periode van 24 uur (Jiang *et al.*, 2005).

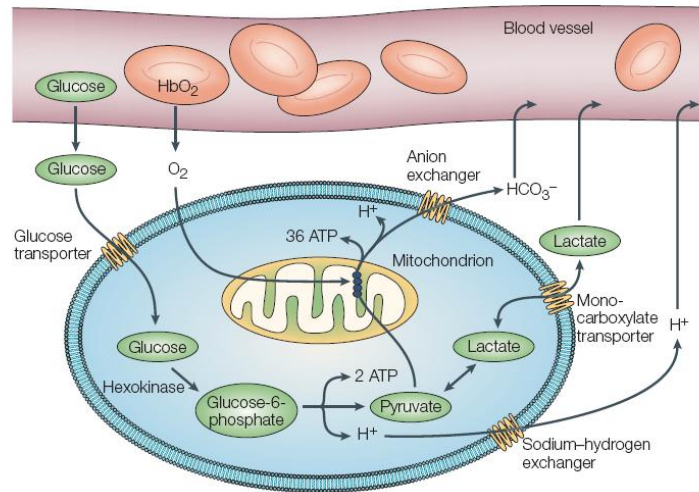
### 2.10.4 Regulatie van celdood

Volgens een recente opvatting zouden alle cellen van een multicellulair organisme intrinsiek geprogrammeerd zijn voor zelfdestructie en ze zouden onmiddellijk sterven, tenzij de dood continu onderdrukt zou worden door overlevingssignalen, die door andere cellen voorzien worden, zoals groeifactoren, hormonen en voedingsstoffen (Gewies, 2003). Deze overlevingssignalen zouden de expressie en/of activiteit van anti-apoptotische regulatiemoleculen versterken, en zo de activatie van pro-apoptotische factoren beletten (Ameisen, 2002, Raff *et al.*, 1993). Deze veronderstelling wordt bevestigd door de identificatie van verschillende anti-apoptotische moleculen en mechanismen en van pro-apoptotische factoren (Gewies, 2003).

## 2.11 Metabolisme

Het glucosemetabolisme is voorgesteld in figuur 2.5. Het kan onderverdeeld worden in glycolyse, fermentatie en de citroenzuurcyclus & de elektronentransportketen.

Glucose en zuurstof diffunderen van het bloedvat naar de cel. Glucose wordt omgezet in pyruvaat, met vrijzetting van 2 moleculen ATP. In aanwezigheid van zuurstof



Figuur 2.5: Glucosemetabolisme in zoogdiercellen. Glucose en zuurstof diffunderen van het bloedvat naar de cel. Glucose wordt omgezet in pyruvaat, met vrijzetting van 2 moleculen ATP. In aanwezigheid van zuurstof wordt pyruvaat geoxideerd tot  $\text{HCO}_3^-$  met generatie van (in theorie) 36 moleculen ATP; in afwezigheid van zuurstof wordt pyruvaat gereduceerd tot lactaat, dat verwijderd wordt uit de cel (Gatenby & Gillies, 2004).

wordt pyruvaat geoxideerd tot  $\text{HCO}_3^-$  met generatie van (in theorie) 36 moleculen ATP; in afwezigheid van zuurstof wordt pyruvaat gereduceerd tot lactaat, dat verwijderd wordt uit de cel (Gatenby & Gillies, 2004). Uit berekeningen blijkt dat cellen slechts voldoende zuurstof kunnen krijgen wanneer ze zich minder dan  $150 \mu\text{m}$  van een bloedvat bevinden (Krogh, 1919). Empirische studies hebben uitgewezen dat levende tumorcellen niet voorkomen op afstanden groter dan  $160 \mu\text{m}$  van bloedvaten (Thomlinson & Gray, 1955), wat overeenkomt met de berekeningen van Krogh. Experimentele studies in diermodellen hebben aangetoond dat de partiële zuurstofdruk ( $p\text{O}_2$ ) quasi nul is op afstanden groter dan  $100 \mu\text{m}$  van een bloedvat (Dewhirst *et al.*, 1994, Helmlinger *et al.*, 1997). De beperkte diffusiesnelheid van glucose en vooral van zuurstof resulteert dus in een lokale gradiënt in voedingsstoffen, wat zijn weerslag heeft op het lokale metabolisme.

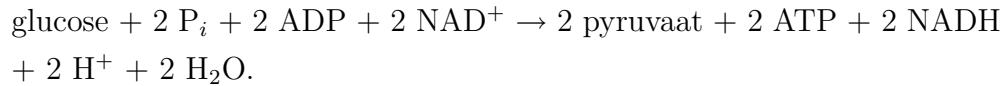
### 2.11.1 Glycolyse

Glycolyse is de opeenvolging van reacties waarbij een molecule glucose wordt gemetaboliseerd in twee moleculen pyruvaat, met netto vrijzetting van energie onder de vorm van twee moleculen adenosinetrifosfaat ( $\text{ATP}$ )<sup>10</sup>. Dit proces vereist geen

<sup>10</sup>ATP kan beschouwd worden als de munteenheid voor energie binnenin de cel.

zuurstof. Onder anaerobe condities kan pyruvaat verder omgezet (gefermenteerd) worden in lactaat. In aerobe condities kan pyruvaat verder omgezet worden (cellulaire ademhaling) in koolstofdioxide (CO<sub>2</sub>), met generatie van heel wat meer ATP dan bij fermentatie.

De netto reactievergelijking van de verschillende stappen in de glycolyse is:



### 2.11.2 Fermentatie tot lactaat

De omzetting van pyruvaat tot lactaat (onder anaerobe omstandigheden) en vice versa komt voor in tumorcellen (Jiang *et al.*, 2005) en verloopt volgens de reactievergelijking:



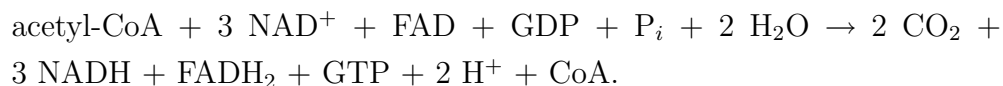
### 2.11.3 De citroenzuurcyclus en de elektronentransportketen

Zoals hierboven beschreven kan pyruvaat (het eindpunt van de glycolyse) verder omgezet worden in lactaat (fermentatie) of CO<sub>2</sub> (ademhaling), afhankelijk van de beschikbaarheid van zuurstof.

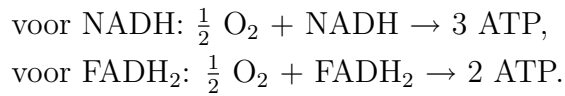
Pyruvaat decarboxylatie door het pyruvaat dehydrogenase complex geeft acetyl-CoA. Hierbij wordt onder andere 1 molecule NADH gegenereerd:



Aerobe ademhaling bestaat uit twee processen: de Krebs-cyclus (of TCA-cyclus of citroenzuurcyclus) en de elektronentransportketen (ETK) (Alberts *et al.*, 1998). De stoechiometrie van de citroenzuurcyclus gaat als volgt:



De NADH en FADH<sub>2</sub> die gevormd worden in de glycolyse en de citroenzuurcyclus zijn energierijke molecules aangezien ze een elektronendoublet hebben met een hoge transfertpotentiaal. Wanneer deze elektronen gebruikt worden om moleculaire zuurstof om te zetten in water, komt er een grote hoeveelheid van energie vrij, die gebruikt kan worden om ATP te vormen. Dit proces noemt men oxidatieve fosforylatie (Berg *et al.*, 2002) en de stoechiometrie ervan is als volgt:



### De globale energiewinst

De globale reactievergelijking van de volledige oxidatie van glucose (in aerobe omstandigheden) kan als volgt geschreven worden<sup>11</sup>:



#### 2.11.4 mTOR

Het proteïne mTOR<sup>12</sup> is een serine/threonine kinase dat celgroei controleert op basis van de nutriëntstatus, naast celmigratie, celoverleving, proteïnesynthese en -transcriptie (Schieke *et al.*, 2006, Hay & Sonenberg, 2004, Sulic *et al.*, 2005, Tokunaga *et al.*, 2004). Er is verrassend weinig bekend over welke parameters en mechanismen het intrinsieke stofwisselingsniveau van een organisme bepalen. Ook op celniveau en moleculaire regulatie van mitochondriële activiteit is nog niet alles uitgeklaard (Schieke *et al.*, 2006).

#### 2.11.5 Numerieke waarden

De (maximale) opname van zuurstof en glucose door de cel zijn overzichtelijk weergegeven in tabel 2.7.

Stof	Opnamesnelheid	Referentie
zuurstof	$7,16 \cdot 10^{-17} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{cel})$	(Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2006)
	$2,42 \cdot 10^{-15} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{cel})$	(Busini <i>et al.</i> , 2007)
glucose	$1,33 \cdot 10^{-16} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{cel})$	(Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2006)
	$6,17 \cdot 10^{-16} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{cel})$	(Busini <i>et al.</i> , 2007)

Tabel 2.7: De maximale opnamesnelheid van voedingsstoffen.

Jiang *et al.*(2005) drukken de opname van zuurstof, glucose en de productie van afvalstoffen uit in mM per uur per kubieke centimeter weefsel. Voor een prolifererende cel zijn de getalwaarden respectievelijk 108, 162 en 240 wat betreft zuurstofopname, glucose-opname en afvalstoffenproductie. De respectievelijke waarden voor

<sup>11</sup>In theorie levert deze reactie 38 moleculen ATP. Uit metingen blijkt echter dat de ATP-opbrengst in praktijk iets lager is ( $\pm 30$  moleculen ATP).

<sup>12</sup>Mammalian Target Of Rapamycin. Rapamycine of sirolimus is een molecule van bacteriële oorsprong, en heeft een anti-proliferatief effect, aangezien het bindt aan het mTORC1 complex. Daarom kan rapamycine mogelijks gebruikt worden in de behandeling van kanker (Huang & Houghton, 2001).



quiescente cellen zijn 50, 80 en 110. Necrotische cellen nemen geen nutriënten op en produceren geen afvalstoffen.

## 2.12 Cellulaire communicatie

### 2.12.1 Intercellulaire communicatie

Cellen ondergaan verschillende processen die hun bestemming bepalen, de zogenaamde ‘cellular fate processes’. Cellen initiëren of ondergaan deze processen niet in isolatie, maar gebaseerd op verschillende signalen uit de celomgeving. Cellen kunnen communiceren via verschillende wegen om hun activiteiten te coördineren. Cellen in weefsels communiceren met elkaar via drie belangrijke wegen (zie figuur 2.6) (Palsson & Bhatia, 2004):

1. Ze scheiden opgeloste stoffen af, typisch kleine proteïnen bekend als cytokines en chemokines.
2. Ze scheiden niet-oplosbare stoffen af die de fysische of chemische samenstelling van de micro-omgeving wijzigen door modificaties van de extracellulaire matrix.
3. Ze raken elkaar aan en communiceren via direct cel-cel contact.

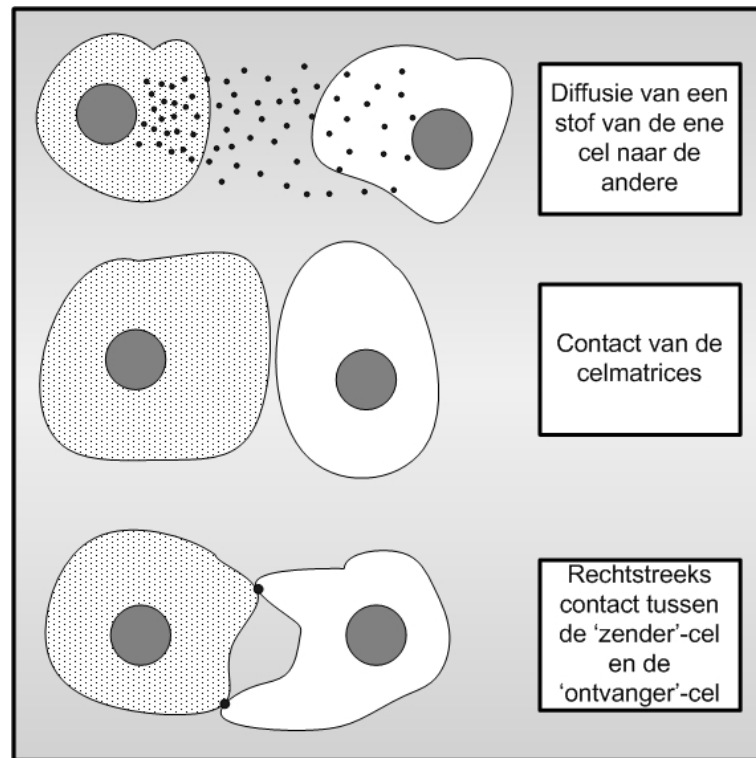
Daarbuiten reageren cellen ook op mechanische stimuli in hun micro-omgeving op een gelijkaardige manier als hoe ze reageren op biochemische stimuli. De middelen waarmee cellen in weefsels interageren met hun micro-omgeving verschillen qua karakteristieke tijds- en lengteschaal en qua specificiteit. Elk signaaltype is geschikt om een bepaalde boodschap over te brengen (Palsson & Bhatia, 2004). De verschillende types van signaaloverdracht worden in de volgende paragrafen besproken.

### 2.12.2 Oplosbare signalen

Groefactoren zijn kleine proteïnen in de grootteorde van 15.000 à 20.000 dalton<sup>13</sup>. Ze zijn chemisch relatief stabiel, tenzij ze specifiek afgebroken worden. Groefactoren worden geproduceerd en uitgescheiden door een communicerende cel om een doelcel te bereiken, via een van volgende wegen: autocrien (de cel scheidt groefactor af en boodschapt zichzelf), paracrien (de uitgescheiden groefactor bereikt een naburige cel

---

<sup>13</sup>Een dalton is equivalent aan de massa van een waterstofatoom.



Figuur 2.6: Drie mechanismen van intercellulaire communicatie. Naar Palsson & Bathia (2004).

via diffusie), of endocrien (de cel scheidt een groeifactor af in de bloedstroom, die de groeifactor naar de doelcel transporteert) (Palsson & Bhatia, 2004).

De afgelopen jaren werden heel wat groeifactoren, die bij verschillende celtypes een variatie aan 'cellular fates' bewerken, geïsoleerd en gekarakteriseerd. Cytokines zijn groeifactoren die proliferatie of differentiatie beïnvloeden, terwijl chemokines celmigratie veroorzaken. Slechts zelden gebeurt het dat een cel reageert op een enkele groeifactor. Bijna elke cel heeft een combinatie van groeifactoren nodig en de juiste micro-omgeving om te reageren (Palsson & Bhatia, 2004).

### Een paracrien signaal uitsturen

Een cel die een paracrien signaal uitstuurt moet een signaalmolecule produceren en ze secreteren. De signaalmolecule beweegt dan van de zendercel naar de doelcel door moleculaire diffusie. Moleculaire diffusie is een willekeurig proces. Eens er voldoende signaalmoleculen gebonden zijn aan receptoren van de doelcel, wordt een signaaltransductieproces geïnduceerd. De kwantitatieve parameters van deze processen kunnen benaderd worden (Palsson & Bhatia, 2004).

De maximale secretiesnelheid van proteïnen kan afgeleid worden aan de hand van de maximale transcriptie- en translatiesnelheid. Zulke schatting geeft voor immunoglobulines 2000 tot 8000 antilichaam moleculen per cel per seconde (Savinell *et al.*, 1989). De meeste groeifactoren zijn echter tien keer kleiner dan immunoglobuline, zodat hun secretiesnelheid ook 10 keer hoger kan liggen. Gemeten secretiesnelheden zullen echter maar een fractie zijn van deze maximale snelheid, aangezien een cel verschillende types proteïnen tegelijkertijd produceert (Palsson & Bhatia, 2004).

### **Consumptie van een groeifactor door de doelcel**

In veel gevallen wordt het receptor-ligandcomplex geïnternaliseerd en het signaalmolecule wordt gescheiden van de receptor, en de receptor wordt gerecycleerd naar het celmembraan. Een typische tijdsconstante voor dit hele proces ligt in de orde van 15 à 30 minuten. De opname van bepaalde groeifactoren ligt in de grootte-orde van  $10^{-14}$  tot  $10^{-13}$  g per cel per dag (Zandstra *et al.*, 1997). Er is ook aangetoond dat 10.000 tot 70.000 groeifactormoleculen opgenomen moeten worden om celdeling in complexe celculturen te stimuleren (Koller *et al.*, 1995). Om de gewenste reactie te verkrijgen bij de doelcel moet er een continue flux van signaalmoleculen worden gecreëerd door de zendercel over een bepaalde periode, aangezien de doelcel het signaal (gedeeltelijk) opneemt en dus vernietigt (Palsson & Bhatia, 2004).

Een cel is ongeveer 10  $\mu\text{m}$  groot. Een chemotactisch bewegende cel moet een idee hebben van de concentratiegradiënt om correct op het signaal te reageren. Omdat de cel erg klein is, en de concentratie van signaal heel laag (soms minder dan 1000 moleculen per celvolume), is het voor de cel vaak heel moeilijk tot onmogelijk om een concentratiegradiënt over het cellichaam waar te nemen. De cel kan dan podia gebruiken om een groter meetbereik te bekomen (Palsson & Bhatia, 2004).

### **Een signaal verwerken**

De binding van een groeifactor aan zijn receptor zet een complex signaaltransductieproces in gang. Dit proces kan een gecoördineerd en intergeconnecteerd proces van signaaldetectie, -transmissie en -versterking omvatten. Typisch gebeurt het dat de binding van een groeifactor op zijn receptorcomplex veranderingen teweegbrengt, zodat zijn intercellulaire component katalytisch actief wordt (Palsson & Bhatia, 2004).

### 2.12.3 Cellulaire communicatie via de ECM

De extracellulaire matrix (ECM) bevat complexe weefsels, bindstoffen, structuurelementen en gels die alle cellen in een weefsel en hun cytoskelet bijeenhouden. De ECM is multifunctioneel; het geeft weefsels mechanische steun, cellen met een substraat waarop de cellen kunnen migreren, en een plaats voor signaaloverdracht. De ECM is dynamisch en wordt voortdurend gewijzigd. Zo worden bijvoorbeeld ECM componenten afgebroken door metalloproteasen. De ECM is niet homogeen. Aan het contactoppervlak met cellen zijn er een heel aantal adhesie- en ECM receptor moleculen die cel-ECM communicatie bevorderen en mogelijk maken. Deze signalen kunnen instructies zijn om te migreren, te delen, te differentiëren, of apoptose te induceren. Welk signaal het is, wordt bepaald door de samenstelling van de ECM, en deze samenstelling kan dan weer gewijzigd worden door de cellen in het weefsel. De signalen in de ECM zijn stabiel, en vaak specifieker en sterker dan signalen van diffunderende groeifactoren (Palsson & Bhatia, 2004).

#### Binding aan de ECM

Cellen binden aan de extracellulaire matrix door integrines, een klasse van heterodimerische proteïnes. Er zijn drie types van integrine-gebaseerde koppelingen: hemidesmosomen, focale contacten en fibrillaire contacten. Hemidesmosomen zijn intracellulaire proteïne 'plaques' die teruggevonden worden in epitheelweefsel dat het basaal membraan (een ECM-structuur) met behulp van integrines verbindt met de middelste filamenten van het cytoskelet. Focale en fibrillaire contacten zijn gespecialiseerde adhesiecomplexen, of proteïneclusters, die *in vitro* vaak geobserveerd worden. Experimenten wijzen uit dat de cellulaire respons in tweedimensionele extracellulaire matrices sterk verschilt van deze in hun driedimensionele tegenhangers (hydrogels) (Palsson & Bhatia, 2004).

#### Modificatie van de ECM

Cellen produceren en breken de ECM af in hun omgeving, wat leidt tot een wisselwerking in het lot van de cel en zijn functie. ECM-moleculen zijn relatief grote biomoleculen, en hebben dus een lage diffusiviteit. Bijgevolg is de tijdschaal voor ECM modificatie rond een cel relatief groot en de afstandsschaal typisch redelijk klein (Palsson & Bhatia, 2004).

## Storingen in de ECM signalisatie

De signalen van de ECM reguleren celgedrag en orkestreren de functies van cellen in het functioneren van weefsels en homeostase. De driedimensionele organisatie van de ECM en zijn samenstelling en hermodellering zijn belangrijke factoren in de signalisatie in de micro-omgeving. Deze signalisatie bepaalt celvorm, beweeglijkheid, overleving, groei en differentiatie. Storingen in de cel-ECM-signalisatie leiden tot verschillende pathologische toestanden, zoals degeneratieve, kwaadaardige en hemostatische afwijkingen, alsook storingen in ontwikkeling en het immuunsysteem (Lukashev & Werb, 1998).

Mutaties in genen die ECM-proteïnen, ECM hermodellering proteïnen en ECM receptors veroorzaken ziektes in diverse weefsels. Deze mutaties wijzigen de structurele eigenschappen van de ECM componenten en de functie van de proteïnen die de ECM afbreken. Een deel van deze mutaties bevinden zich in de matrix metalloprotease familie. Zowel structuur als dynamische veranderingen in de ECM zijn dus belangrijk in het onderhouden van de normale weefselfunctie (Palsson & Bhatia, 2004).

Matrix metalloproteases (MMP's) vormen een belangrijke component van het netwerk dat verantwoordelijk is voor de dynamische interacties tussen cellen en hun ECM omgeving. In pathologische situaties is er een grote interesse in MMP's omwille van hun rol in de ontwikkeling van kanker. Zoals de dynamische afbraak en synthese van chondrocyten en hun omgeving demonstreren, is er een gevoelige balans tussen de enzymes verantwoordelijk voor de modificatie van de extracellulaire omgeving. Pathologische situaties kunnen ontstaan wanneer dit evenwicht verstoord wordt (Palsson & Bhatia, 2004).

### 2.12.4 Rechtstreeks cel-cel contact

Aan het celoppervlak bevinden zich proteïnen die rechtstreeks cel-celcontact mogelijk maken. Deze interacties zijn zeer specifiek en laten rechtstreekse en uiterst specifieke communicatie tussen twee cellen toe, in tegenstelling tot de signalen van de extracellulaire matrix en van opgeloste stoffen. De signaalmoleculen die instaan voor de cel-cel signalisatie komen voor in twee vormen: deze die mechanisch contact tussen de twee cellen toestaan, en deze die verbindingen vormen tussen de cellen, via dewelke moleculen rechtstreeks kunnen bewegen van de ene cel naar de andere (Palsson & Bhatia, 2004).

## Celjunctions in weefsels

Een karakteristiek kenmerk van weefselorganisatie is de nauwe structurele en functionele interactie van de cellen van het weefsel. Tijdens de ontwikkeling wordt deze interactie tot stand gebracht door een bindingscomplex dat snel gevormd wordt tussen naburige cellen, waardoor cel-cel contact mogelijk wordt (Pasdar & Nelson, 1988). Dit bindingscomplex is betrokken in het onderhouden van de cel-cel adhesie en functionele interacties tussen naburige cellen. Het bindingscomplex zorgt voor cel- en weefsel-specificiteit in de expressie van verschillende bindingscomponenten. In eenvoudige epithelia kan het complex bestaan uit (maximaal) 5 componenten (Farquhar & Palade, 1963): de *zonula occludens* (of *tight junction*) (Stevenson & Goodenough, 1984, Stevenson *et al.*, 1986), de *zonula adherens* (of *adherens junction*) (Geiger *et al.*, 1985), cel-adhesiemoleculen (Edelman, 1985), *gap-junctions* en desmosomen (Arnn & Staehelin, 1981, Farquhar & Palade, 1963, Garrod, 1986).

### 2.12.5 Interacties tussen signaalmechanismen

‘Cellular fate’ en celfunctie worden typisch beïnvloed door combinaties van de drie types signalisatiemechanismen (namelijk opgeloste stoffen, cel-ECM contact en cel-cel contact). Een klassiek voorbeeld van zulke combinaties is het synergetisch effect van opgeloste groeifactor en ECM-signalisatie. Het is bijvoorbeeld aangetoond dat endotheelcellen de celcyclus doorlopen onder invloed van verzadigde hoeveelheden groeifactoren, enkel en alleen wanneer de cellen verspreid zijn op een laminine-gecoat oppervlak. Zonder groeifactor doorlopen cellen de celcyclus niet. Op een gelijkaardige manier ondergaan cellen die niet aangehecht zijn aan een ECM-bedekt oppervlak, maar wel blootgesteld worden aan groeifactoren, apoptose eerder dan groei (Palsson & Bhatia, 2004).

De interactie tussen cel-cel adhesie en cel-matrix adhesie speelt een belangrijke rol in morfogenese. Celaggregaten ontstaan meteen *in vitro* wanneer een hoge graad van cel-celadhesie gecombineerd wordt met een lage graad van cel-matrix adhesie (Palsson & Bhatia, 2004).

### 2.12.6 Reactie op mechanische stimuli

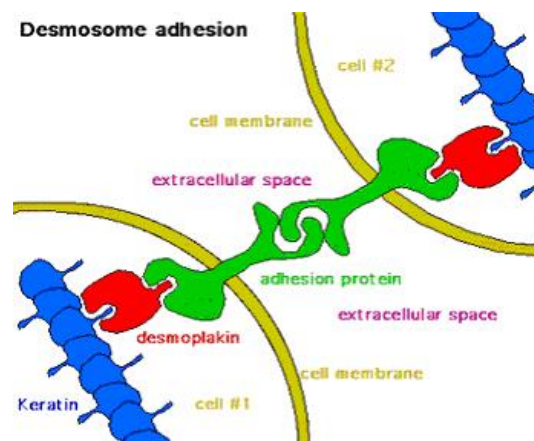
Cellen en weefsels reageren op mechanische stimuli zoals schuifspanningen, druk en trekspanningen. Cellen zijn verankerd aan de extracellulaire matrix door integrinereceptoren. Op die manier functioneren integrines als mechanische binding tussen

de ECM en het cellulair cytoskelet en zijn ze ideale kandidaten om een belangrijke rol te spelen als krachtoverdragers (Palsson & Bhatia, 2004). De exacte moleculaire mechanismen van de transductie van mechanische stimuli naar biologische gebeurtenissen (mechanochemische transductie) zijn echter nog niet uitgeklaard. Toch is het duidelijk dat schuifspanningen endotheel-genexpressie wijzigen, dat drukkrachten het chondrocyt-matrixmetabolisme doen veranderen en dat vloeistofstroming cellen kan doen uitlijnen op een tweedimensioneel oppervlak (Chen *et al.*, 2001a).

Celadhesie-organellen, zoals desmosomen, worden vaak beschouwd als statische structuren, die enkel het weefsel meer bestand maken tegen mechanische stress. Dit is zeker een belangrijke functie, maar celjuncties fungeren ook als signalisatiecentra (Cheng *et al.*, 2005).

Cellen kunnen door mechanische stress hun eigen groeisnelheid en de groeisnelheid van andere cellen in een weefsel aanpassen (Shraiman, 2005). Er zijn verschillende manieren waarop een cel haar fysische eigenschappen kan regelen en mechanisch kan communiceren naar haar omgeving (Huang & Ingber, 1999). Een cel kan bijvoorbeeld haar cytoskelet reorganiseren en zo haar vorm en mechanische rigiditeit wijzigen, of ze kan het aantal, de plaatsing en de specificiteit van adhesiemoleculen (die zorgen voor aanhechting aan het substraat en voor contactvorming met andere cellen) regelen (Lodish *et al.*, 2004, Drasdo *et al.*, 2007).

Een desmosoom is een structuur in de celmembraan die ervoor zorgt dat cellen aan elkaar kunnen hechten. Een desmosoom bestaat uit cadherine-eiwitten die door de celmembraan heensteken (zogenaamde transmembraanproteïnen) en eiwitten die de structuur aan het cytoskelet in de cel verankeren (zie figuur 2.7).



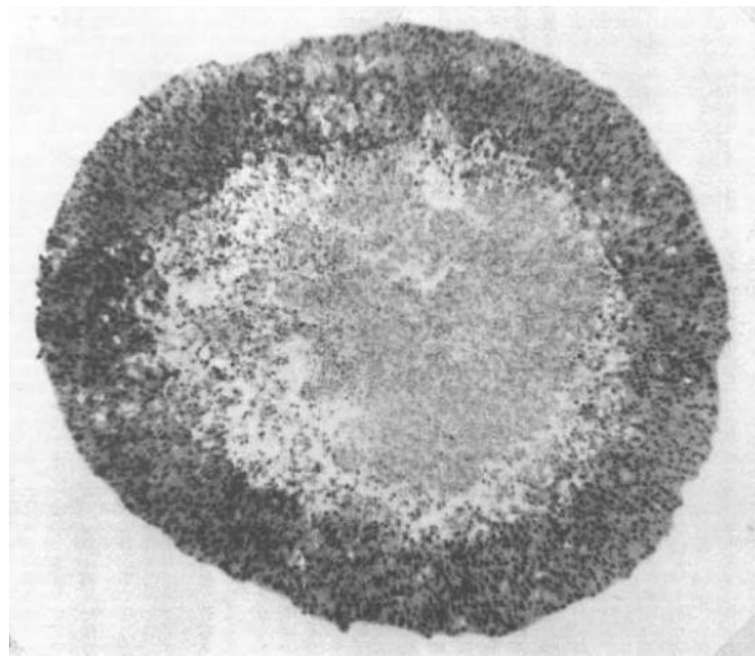
Figuur 2.7: Een desmosoom. (Bron: Wikipedia - GNU Free Documentation License)

## 2.13 Tumorweefsel

### 2.13.1 Tumormorfologie

In een eerste stadium bestaan tumoren uit delende, levende cellen. Wanneer de tumor groeit, daalt de concentratie van nutriënten in de tumorkern, aangezien nutriënten door diffusie migreren. Wanneer de zuurstofconcentratie onder een bepaalde limiet zakt, worden de cellen quiescent en kunnen ze, in hypoxische omstandigheden, nog overleven voor een korte tijd door gebruik te maken van de zuurstof uit de glucosemoleculen (Jiang *et al.*, 2005). Wanneer ook de glucoseconcentratie onder een bepaalde limietwaarde zakt, sterven de cellen af door necrose (Busini *et al.*, 2007). De cellen aan de buitenkant blijven echter prolifereren, waardoor de tumor blijft toenemen in omvang (Jiang *et al.*, 2005).

Er ontstaat dus na verloop van tijd een necrotische kern binnenin de tumor (zie figuur 2.8). Door het cellulair metabolisme en/of door necrose secreteren cellen groei-inhibitoren en apoptosepromotoren, die dan accumuleren in de tumor en voor verdere uitbreiding van de necrotische kern zorgen. Uiteindelijk treedt er een dynamisch evenwicht op tussen het ontstaan van nieuwe cellen in de prolifererende buitenste laag en celdood, waardoor de tumorafmetingen niet meer zullen toenemen (Jiang *et al.*, 2005).



Figuur 2.8: Een tumor met een necrotische kern (Sherratt & Chaplain, 2001).



### 2.13.2 Groei

De proliferatiesnelheid van tumorcellen is hoog, maar meestal lager dan die van normale foetale cellen en regenererende cellen (Bosman & Van Krieken, 2004, Baserga, 1965). De volumetoename van een tumor blijkt bijna zonder uitzondering langzamer te verlopen dan verwacht zou worden op grond van de delingsactiviteit van de tumorcellen. Dat wordt verklaard door celverlies. Bij snelgroeïende tumoren treedt veelal in het tumorcentrum door onvoldoende bloeddorstrooming weefselnecrose op. Belangrijker is vermoedelijk tumorcelverlies door apoptose. Deze fysiologische vorm van celdood treedt in alle weefsels op en is normaal in evenwicht met celaanmaak. Van een apoptotische cel condenseert de kern, wordt in een energiegebruikend specifiek proces het DNA afgebroken en wordt het celrestant afgevoerd (veelal via fagocytose door macrofagen) (Bosman & Van Krieken, 2004). Tumorcellen kunnen ook soms jarenlang in  $G_0$  in weefsels verborgen blijven (dormant), om plotseling onder invloed van onbekende groeïstimuli metastasen te vormen (Bosman & Van Krieken, 2004).

### 2.13.3 Anoikis

Tumorcellen verschillen van normale cellen in gedrag. Zo kunnen tumorcellen groeien, los van een substraat of andere cellen (Weinberg, 2007, Huang & Ingber, 1999), terwijl normale cellen dan in substraatafhankelijke apoptose gaan (anoikis) (Drasdo *et al.*, 2007).

### 2.13.4 Metabolisme van tumorcellen

Een vreemde, doch vaak waargenomen eigenschap van invasieve kankers is hun gewijzigde glucosemetabolisme (Gatenby & Gillies, 2004). Tumorcellen consumeren opmerkelijk meer glucose dan normale cellen in identieke omstandigheden (News-holme & Leech, 1983). Wanneer tumorcellen een deel van de opgenomen glucose doen oxideren, wordt een grote fractie daarvan omgezet in lactaat (melkzuur). Analyse van de interstitiële vloeïstof suggereert dat de citroenzuurcyclus verzadigbaar is, wat de hoge mate van lactaatproductie kan verklaren (Helmlinger *et al.*, 2002). Omdat tumorcellen sneller groeien dan de bloedvatproductie, ontstaan anaerobe omstandigheden (bloedvaten zorgen voor de aanvoer van voedingsstoffen en zuurstof). Bijgevolg wordt het in de glycolyse geproduceerde pyruvaat hoofdzakelijk omgezet in lactaat (Berg *et al.*, 2002). Twee onafhankelijke klinische studies hebben uitgewezen

dat hoge lactaatconcentraties (Brizel *et al.*, 2001, Walenta *et al.*, 1997, Walenta *et al.*, 2000) en lage zuurstofconcentraties (Brizel *et al.*, 1996) in *in vivo* tumoren allebei gecorreleerd zijn met een verhoogde kans op metastasering, recidivering en een verkleinde overlevingskans voor de patiënt.

In de glycolyse wordt glucose omgezet naar pyruvaat en dan verder naar het afvalproduct lactaat (zie sectie 2.11.1). De aanwezigheid van zuurstof belet echter deze laatste stap, en in plaats daarvan wordt pyruvaat in de mitochondriën geoxideerd tot koolstofdioxide en water (oxidatieve fosforylatie) (Racker, 1974). In tumorcellen, en dit in tegenstelling tot hun normale tegenhangers, blijkt echter aerobe glycolyse voor te komen; dit is de omzetting van glucose naar lactaat, in aanwezigheid van zuurstof (Warburg, 1956, Semenza *et al.*, 2001, Shaw, 2006). Het vreemde hieraan is dat oxidatieve fosforylatie veel meer energie oplevert per glucosemolecule dan de aerobe glycolyse. De vraag stelt zich dan waarom tumorcellen dan wel aan aerobe glycolyse doen (Gatenby & Gillies, 2004). Gatenby & Gillies (2004) maken de hypothese dat het voorkomen van aerobe glycolyse een aanpassing is aan tijdelijke hypoxische condities in een weefsel. Het is bekend dat een groot deel van deze metabolische omschakeling van oxidatieve fosforylatie naar aerobe glycolyse wordt gecontroleerd door specifieke transcriptie programma's. Recente studies suggereren dat de activatie van 'hypoxia-inducible factor' (HIF) een veel voorkomend gevolg is van een breed scala aan mutaties die aan de basis liggen van kanker. HIF stimuleert de expressie van glycolytische enzymen en verlaagt de afhankelijkheid van mitochondriële oxidatieve fosforylatie in tumorcellen, zelfs in aerobe condities (Shaw, 2006).

### 2.13.5 Numerieke gegevens

De evolutie van tumoren hangt af van voorziening, verspreiding en opnamen van zuurstof, glucose en andere nutriënten en van de productie van groeiregulerende stoffen (Hu & Li, 2007). In de tumor ontstaan tijdens de groei gradiënten in zuurstof- en glucoseconcentratie en extracellulaire pH. Casciari *et al.* (1992) hebben metingen gedaan op multicellulaire sferische tumoraggregaten van muizencellen. Daaruit bleek dat de opname van zuurstof stijgt (met ca. factor 2) wanneer de extracellulaire glucoseconcentratie verlaagd wordt van 5,5 mM tot 0,4 mM. Andersom stijgt ook de glucoseopname met  $\pm 40\%$  wanneer de zuurstofconcentratie daalt van 0,21 mM tot 0,023 mM. Celgroei stopte pas bij een zuurstofconcentratie lager dan 0,0082 mM. In de binnenste regionen van de tumor zijn de nutriëntconcentraties laag genoeg om een significant verschil in opname en celgroei te veroorzaken, doch niet laag genoeg

om groeistop te bewerken. Aangezien er daar quiescente cellen voorkomen, moet de quiescentie een andere oorzaak hebben dan nutriënttekorten (Casciari *et al.*, 1992).

In de simulaties van Jiang *et al.* (2005) van hun tumorgroeimodel varieert de zuurstofconcentratie van 0,08 tot 0,28 mM en de glucoseconcentratie van 1,6 tot 16,5 mM (Freyer, 1988). Lactaatconcentraties boven 8 mM, zuurstofconcentraties onder 0,02 mM en glucoseconcentraties onder 0,06 mM resulteren in necrose in hun model. Deze waarden werden bekomen door te vertrekken van de laagste in experimenten gebruikte concentraties (bijvoorbeeld 0,07 mM zuurstof en 0,8 mM glucose (Freyer & Sutherland, 1986)) en dan de drempelwaarden af te stellen zodat de best mogelijke fit met de experimentele groeicurve werd bekomen.

Gebaseerd op metingen van Freyer en Sutherland (Freyer & Sutherland, 1985) nemen Jiang *et al.* (2005) aan dat in avasculaire tumoren 75% van de geconsumeerde glucose de glycolyse volgt, met lactaat als afvalproduct, terwijl een kwart van de glucose de Krebs-cyclus en aerobe ademhaling volgt, met koolstofdioxide (CO<sub>2</sub>) als afvalproduct. Glucoseconsumptie verloopt dus gekoppeld aan zuurstofconsumptie (Freyer & Sutherland, 1985).

De eerste 5 à 7 dagen is de groei van de tumor exponentieel, daarna vertraagde de groei, tegelijkertijd met het verschijnen van quiescente cellen. Zowel in experimenten als in het model van Jiang *et al.* (2005) stopt de groei na 28 à 30 dagen.

# Hoofdstuk 3

## Het model

### 3.1 Inleiding

In een model moeten de belangrijkste aspecten van het beschreven systeem geïncorporeerd worden, in dit geval: celdeling, celgroei, diffusie van allerlei moleculen in de extracellulaire matrix, nutriëntconsumptie, afvalproductie, groeifactoren en inhibitoren, intercellulaire krachten en de interactie van de cel met haar omgeving (Jiang *et al.*, 2005). Al deze aspecten zitten vervat in het hier voorgestelde model.

**Nauwkeurigheid versus algemeenheid** Een model dat heel algemeen is, geeft vaak een onnauwkeurige beschrijving van de werkelijkheid. Een model dat zeer specifiek is, geeft vaak een nauwkeurige beschrijving, maar is slechts beperkt toepasbaar, en heeft daardoor slechts een beperkte waarde. In de modelkeuze moet men algemeenheid afwegen tegen nauwkeurigheid. Het model is heel algemeen, omdat het om een preliminair model gaat. Het model kan in de toekomst eenvoudig uitgebreid en/of aangepast worden om specifieke celsystemen te beschrijven. Het model is wel specifiek, in die zin dat het de groei van driedimensionele celaggregaten beschrijft, en dit type groei is typisch voor mesenchymale cellen (in tegenstelling tot epitheelcellen, die monolagen vormen).

**Nauwkeurigheid en rekentijd** Daarnaast is de keuze van de tijdstapgrootte niet onbelangrijk. Afhankelijk van de objectieven zal een relatief kleine dan wel grote tijdstapgrootte moeten gekozen worden. Een kleinere tijdstapgrootte laat toe het celgedrag in detail te bestuderen, maar vraagt meer rekentijd. Een grotere tijdstapgrootte laat toe met beperkte reken capaciteit evoluties van cellen en weefsels over

langere periodes (grootte-orde dagen, weken) na te gaan. Met als objectief het beschrijven van het eerste (avasculaire) stadium van tumorgroei wordt geopteerd voor relatief grote tijdstappen: van 10 minuten tot enkele uren. Op celniveau is de cytokinese de kortstdurende ( $\pm 10$  minuten) gebeurtenis. Gebaseerd hierop wordt dan de tijdstap van de tijdsdiscretisatie gekozen. Indien de tijdstap kleiner dan 10 minuten wordt genomen, moet de vorm van de delende cel (geleidelijk overgaand in twee dochtercellen) expliciet berekend en gemodelleerd worden. Dit is mogelijk, en de programmacode om deze berekening (het analytisch oplossen van een derdegraadsvergelijking) uit te voeren werd ook geschreven. Bij een tijdstapgrootte van 10 minuten of meer ontstaan uit een moedercel die gaat delen na 1 tijdstap twee aparte dochtercellen. Tussenstadia met gedeeltelijk ingesnoerd celmembraan komen dan niet voor. Zo kan heel wat rekentijd uitgespaard worden door een tijdstapgrootte van minstens 10 minuten te nemen. De modellering van de tussenstadia in de cytokinese is ook niet van cruciaal belang voor de beschrijving van weefselgroei op celpopulatie-niveau over een termijn van dagen tot weken. Omdat voor een accurate beschrijving van de beweging van cellen een tijdstap van 10 minuten te groot is, wordt de berekening van de intercellulaire krachten en de daaruitvolgende celmigratie vaker uitgevoerd (tijdstap van 1 minuut). Om een onderscheid te maken tussen beide tijdstappen, wordt in het vervolg van de modelbeschrijving de tijdstap van 10 minuten aangeduid met de naam *tijdstap* en het symbool  $\Delta t$ , en de tijdstap van 1 minuut met de naam *mini-tijdstap* en het symbool  $\delta t$ .

De grootte van de modelruimte blijft beperkt<sup>1</sup> tot enkele honderden à duizenden cellen. Dit komt overeen met een volume van ongeveer  $0,01 \text{ mm}^3$ . Er wordt een *in vitro* weefselgroei-experiment met een duur van een 1 à 2 weken gesimuleerd. In het model wordt steeds gewerkt met SI-eenheden, tenzij anders vermeld.

## 3.2 Modeltype

Het model dat in dit werk wordt voorgesteld, is een ‘off-lattice’ ‘single-cell based’ model (zie sectie 1.3.3). Cellen worden beschouwd als afzonderlijke partikels. Het model is geen Discrete Elementen Model (DEM), maar gebruikt wel enkele technieken uit DEM modellering. De aspecten van DEM modellering die ook in mijn model zitten, worden kort in de volgende paragraaf vernoemd. Het model is bedoeld om

---

<sup>1</sup>Dit is geen rigide beperking, aangezien het model een onbeperkte grootte heeft, en er ook geen limiet staat op het aantal cellen. De beperking heeft eerder te maken met beperkingen in reken capaciteit, en het feit dat avasculaire weefsels steeds een beperkte grootte hebben.

de groei van driedimensionele celaggregaten (enkele tot enkele honderden cellen) van mesenchymale cellen te modelleren, in een *in vitro* cultuur. Er zit geen draagstructuur ('scaffold') in het model. Er wordt aangenomen dat het celaggregaat avasculair is, maar het model kan ook nuttig zijn voor tumoren in de vasculaire toestand, aangezien deze op microschaal (in de regionen tussen de bloedvaten) nog steeds avasculair zijn (Gatenby & Gillies, 2004).

## DEM

DEM is een numerieke techniek voor het modelleren van beweging van een hoop deeltjes die interageren met elkaar door botsingen. De krachten die inwerken op de deeltjes worden gesommeerd en de bewegingsvergelijkingen van Newton worden geïntegreerd om de snelheid en de positie op de volgende tijdstap te berekenen. In DEM - in tegenstelling tot moleculaire dynamica modellen - zijn de deeltjes geen puntmassa's, maar hebben ze eindige afmetingen in twee of drie dimensies (Tijskens *et al.*, 2003). In werkelijkheid zijn de gemodelleerde deeltjes min of meer vervormbaar. Ze worden echter benaderd als rigide structuren. Om de vervormbaarheid in rekening te brengen, wordt toegestaan dat de deeltjes een klein beetje overlappen. Deze overlapping, die enkel in het computermodel bestaat, noemt men een 'virtuele overlapping' (Tijskens *et al.*, 2003).

## 3.3 Modelopbouw

### 3.3.1 Celeigenschappen

In het model wordt een cel als individueel bolvormig deeltje gezien. Een hele reeks individuele celparameters worden bijgehouden tijdens de simulatie en zonodig elke (mini-)tijdstap herberekend. Dit zijn o.a.:

- **cellID**: een unieke celcode (naam), die bovendien toelaat de 'voorouders' van de cel te kennen; in dit ene getal zit a.h.w. de volledige stamboom van de cel vervat (zie hieronder);
- **fase in de celcyclus** (groeifase - fase ter voorbereiding van de celdeling - delingsfase), en hoe lang de cel zich al in deze fase bevindt (in s);
- **positie- en snelheidsvector** (x-, y- en z-coördinaat) van (het centrum van) de cel (respectievelijk in m en in m/s);

- celstraal (in m);
- status: quiescent - prolifererend - necrotisch - apoptotisch;
- hoeveelheid groeifactor, inhibitor, glucose, zuurstof en lactaat in de cel (in aantal moleculen);
- de mechanische stress die de cel ervaart (zie sectie 3.3.4 voor de definitie van deze parameter);
- celsterkte (een dimensieloze grootte die aangeeft hoe goed de cel bestand is tegen uitwendige krachten);
- een lijst van buurcellen.

### CellID

Om elke cel afzonderlijk te kunnen identificeren, werd ervoor gekozen om elke cel een ‘naam’ te geven, meer bepaald een binaire code, de cellID. De eerste cel krijgt de code ‘1’, en daaruit komen 2 dochtercellen voort, namelijk ‘10’ en ‘11’. Wanneer ‘10’ deelt, ontstaan ‘100’ en ‘101’, uit ‘11’ komen ‘110’ en ‘111’ voort. Met andere woorden, in de code van een dochtercel wordt steeds de code van de moedercel behouden, en wordt een ‘0’ of een ‘1’ toegevoegd. Het voordeel van deze naamgeving is, dat elke cel een unieke naam krijgt, en dat deze naam informatie geeft over de ‘voorouders’ van de cel. Dit kan nuttig zijn voor de tracering van individuele cellen bij simulaties. In de programmacode wordt niet de binaire code van de cel bijgehouden, maar wel het decimale equivalent ervan.

### Celsterkte

Niet elke cel is even sterk bestand tegen druk ten gevolge van buurcellen. Om deze biologische variabiliteit in het model te implementeren, wordt aan elke cel een relatieve celsterkte toegekend. In het begin wordt uit een normale verdeling met gemiddelde 1 en standaarddeviatie 0,1 willekeurig een waarde genomen voor de toekenning van de celsterkte. De dochtercellen van een delende cel krijgen een celsterkte, willekeurig gekozen uit een normale verdeling  $N(\text{celsterkte}_{\text{moedercel}}; 0, 1)$ . Hoe groter de celsterkte, hoe minder gemakkelijk de cel zal afsterven ten gevolge van mechanische stress.

### 3.3.2 Cultuurmedium

Het cultuurmedium bestaat in het model uit glucose, zuurstof en groeifactor. Aan het begin van de simulatie wordt het medium geïnitieerd, en daarna niet meer verder aangevuld (hoewel dit perfect mogelijk is). Het medium is initieel volledig homogeen. In plaats van de lokale concentratie van de stoffen te beschouwen en doorheen de tijd te volgen, worden (clusters van) moleculen beschouwd als partikels van die stof. Diffusie van moleculen wordt dan niet berekend door het uitrekenen van diffusievergelijkingen, maar door de random migratie van deze partikels doorheen de extracellulaire matrix. De random beweging wordt zo ingesteld dat deze aanpak min of meer de oplossing van de diffusievergelijking, met toepassing van de in de literatuur beschreven diffusiecoëfficiënten, benadert. Hoeveel moleculen door één deeltje gerepresenteerd worden, is te vinden in de overzichtstabel met modelparameterwaarden (tabel 3.3). Zoals hierboven beredeneerd, is een tijdstap van 10 minuten geschikt voor het beschrijven van celgedrag op celniveau. Voor het beschrijven van diffusie in vloeistoffen op micrometerschaal is een tijdstapgrootte in de orde van minuten echter veel te groot. Daarom kan de formule voor omzetting van een diffusiecoëfficiënt naar een gemiddelde verplaatsingslengte (vergelijking 3.1) niet zomaar gebruikt worden. De diffusiesnelheid wordt overschat bij te grote tijdstappen, daarom dat in dit model de gemiddelde verplaatsingslengte een stuk kleiner werd genomen dan wat ze zou zijn op basis van deze formule:

$$D = \frac{\epsilon^2}{6\Delta t}, \quad (3.1)$$

met  $D$  de diffusiecoëfficiënt (in  $\text{m}^2/\text{s}$ ),  $\epsilon$  de verplaatsingslengte per tijdstap (in m) en  $\Delta t$  de tijdstapgrootte (in s) (Starovoitov & Dzhagarov, 2003).

### 3.3.3 Groeifactoren en inhibitoren

Groeifactoren en inhibitoren zijn signalen die het celgedrag sterk beïnvloeden. Het zijn dikwijls complexe moleculen met een zeer specifieke functie. Op het celmembraan bevinden zich receptoren voor deze moleculen. Er zijn tientallen verschillende groeifactoren en inhibitoren, die in complexe reactiewegen elkaars werking ook nog eens beïnvloeden (Palsson & Bhatia, 2004). Omwille van de eenvoud wordt in het model slechts gewerkt met één (theoretische) groeifactor en één (theoretische) inhibitor. Een groeifactor wordt simpelweg beschouwd als een deeltje dat celgroei en celproliferatie in stand houdt (gebrek aan groeifactor leidt tot celdood) en een in-



hibitor als een stof die, vanaf een bepaalde concentratie, groei inhibeert en celdood initieert. Groeifactoren, zoals TGF- $\beta$ , hebben in werkelijkheid een zeer complexe, en vaak ambigue werking, en de precieze werking ervan is nog niet helemaal uitgeklaard, wat het te moeilijk maakte om de beschrijving van een reële groeifactor te implementeren.

### 3.3.4 Krachtwerking tussen cellen

#### Afstoting

Wanneer cellen in het model elkaar gedeeltelijk overlappen, wordt de afstotingskracht ten gevolge van de botsing van de cellen proportioneel genomen met de grootte van de celoverlapping  $|u|$ . Deze celoverlap wordt eenvoudig bepaald door de formule:

$$u = \|\vec{x}_1 - \vec{x}_2\| - (r_1 + r_2) \quad (3.2)$$

met subscript 1 voor cel 1 en subscript 2 voor cel 2,  $\vec{x}$  de positie van het celcentrum en  $r$  de celstraal. Merk op dat de cellen elkaar overlappen indien  $u < 0$ , en ze elkaar niet overlappen in het geval dat  $u \geq 0$ . Zoals hierboven aangegeven (zie sectie 3.2) overlappen cellen in werkelijkheid niet, ze kunnen wel vervormen. Het gaat dus om een virtuele celoverlapping, nodig om de afstotingskracht tussen cellen te benaderen. In het model kunnen de cellen niet vervormen. In geval van overlapping, definiëren we de vector  $\vec{u}$  als een vector met grootte  $|u|$ , een richting volgens de verbindinglijn tussen de centra van de twee overlappende cellen, en een zin naar het gericht naar de andere cel.

De contactkracht  $\vec{F}_C$  wordt als volgt berekend (analoog aan een veerkracht):

$$\vec{F}_C = -k \cdot \vec{u} \quad (3.3)$$

met  $k$  de veerconstante van de cel (in N/m) en  $\vec{u}$  zoals hierboven gedefinieerd.

#### Adhesie

Aantrekkingskrachten tussen naburige cellen wordt op een enigszins artificiële manier ingebracht in het model. Er wordt een ‘flocking’-kracht  $\vec{F}_{flock}$  ingevoerd, gebaseerd op de ‘flocking’-theorie<sup>2</sup>, zie o.a. Toner & Tu (1998), om celadhesie te benaderen.

---

<sup>2</sup>Deze theorie beschrijft mathematisch hoe groepen van dieren (kuddes, scholen, enz.) bij elkaar blijven, hoewel de groepsleden toch allemaal individueel bewegen.

Indien deze krachtcomponent niet wordt ingebracht, ondervinden cellen enkel een repulsieve kracht en geen contractiele kracht, waardoor de cellen steeds verder uit elkaar zouden bewegen, wat uiteraard niet de bedoeling is, aangezien cellen in realiteit bij elkaar blijven. De ‘flocking’-kracht zorgt ervoor dat de cellen, die allemaal individueel bewegen, toch bij elkaar blijven. De cellen aan de buitenkant van het celaggregaat ondervinden een kracht die hen naar het celaggregaat toetrekt. De kracht wordt proportioneel aan de afstand tussen de cel en het geometrisch middelpunt van de buurcellen van de cel genomen:

$$\vec{F}_{flock} = (\vec{x}_{centrum} - \vec{x}) \cdot k_{flock}, \quad (3.4)$$

met  $k_{flock}$  een evenredigheidsfactor voor ‘flocking’ (in N/m) (vergelijkbaar met een veerconstante).  $\vec{x}_{centrum}$  is het geometrisch middelpunt van de buurcellen van de cel. De lijst met buurcellen wordt elke mini-tijdstap vernieuwd. De cel zelf maakt geen deel uit van haar lijst met buurcellen. Buurcellen zijn alle cellen in een perimeter van  $15 \mu\text{m}$  rond de cel.

### Weerstandskracht

Bij beweging van een cel doorheen een fluïdum ondervindt de cel een weerstandskracht (‘drag force’). Deze kracht kan berekend worden via de wet van Stokes (Simpson *et al.*, 2002):

$$\vec{F}_{drag} = -6\pi r \eta \vec{v} \quad (3.5)$$

met  $r$  de celstraal (in m),  $\eta$  de dynamische viscositeit van de ECM en  $\vec{v}$  de migratiesnelheid van de cel (in m/s). Aangenomen wordt dat de viscositeit van de ECM vergelijkbaar is met die van water  $1,06 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$  (Simpson *et al.*, 2002, Dallon & Othmer, 2004).

### Mechanische stress

De mechanische stress is een celparameter in het model die weergeeft hoe sterk de externe kracht is die een cel ondervindt. Deze parameter is proportioneel aan de som van de celoverlappen  $u$  met alle buurcellen. Zo kan op een heel eenvoudige en intuïtieve manier berekend worden in welke mate de cel drukkrachten ondervindt ten gevolge van naburige cellen. Een mechanische stress van nul betekent dat de cel geen compacterende kracht van nabije cellen ondervindt; de maximale waarde van de mechanische stress is vastgelegd op één. Druk ten gevolge van de ECM wordt niet

in rekening gebracht bij de berekening van de celparameter mechanische stress.

### 3.3.5 Celmigratie

Mandeville *et al.* (1995) schrijven dat de door hen onderzochte cellen over een tijdsperiode van 6 minuten netto  $16,4 \pm 0,8$  à  $19,9 \pm 1,3 \mu\text{m}$  aflegden. Mombach en Glazier (1996) vermelden echter een celverplaatsing van slechts ongeveer een zesde van een celdiameter over een half uur. Dit is  $1,7$  à  $2,1 \mu\text{m}$  per 30 minuten; beduidend lager dan de experimentele bevindingen van Mandeville *et al.* Men moet dus besluiten dat celmigratie sterk kan variëren naargelang het celtype en de specifieke omstandigheden. In het hier voorgestelde model liggen celmigraties tussen de waarden van Mandeville *et al.* enerzijds en die van Mombach en Glazier anderzijds. Uit de krachten die inwerken op de cel kan met behulp van de tweede wet van Newton ( $F = m \cdot a$ ) een snelheidsverandering berekend worden:

$$\delta\vec{v} = \frac{\vec{F}_C + \vec{F}_{flock} + \vec{F}_{drag}}{m} \delta t + \delta\vec{v}_{random}, \quad (3.6)$$

met  $\delta\vec{v}$  de verandering van de snelheidsvector van de cel,  $m$  de celmassa (in kg),  $\delta t$  de grootte van de mini-tijdstap en  $\delta\vec{v}_{random}$  een random-migratie component. De celmassa wordt berekend uit het celvolume en de massadichtheid van de cel  $\rho_{cel}$ , die  $1139 \text{ kg/m}^3$  bedraagt (Godin *et al.*, 2007). Er is geen component die chemotaxis in rekening brengt, aangezien de cel nauwelijks gradiënten kan waarnemen (zie sectie 2.12.2). Bij dode cellen wordt de snelheidsverandering enkel bepaald door  $\delta\vec{v}_{random}$ , daar deze niet actief bewegen.

De positie van de cel op de volgende tijdstap wordt dan eenvoudig afgeleid:

$$\delta\vec{x} = \vec{v} \cdot \delta t, \quad (3.7)$$

met  $\delta t$  de grootte van de mini-tijdstap,  $\vec{x}$  de positievector van het celcentrum en  $\vec{v}$  de snelheidsvector van de cel.

### 3.3.6 Groei

De initiële celdiameter wordt gesteld op  $10 \mu\text{m}$ , in overeenstemming met Galle *et al.* (2005). Dit komt overeen met een initieel celvolume  $V_i$  van  $523 \mu\text{m}^3$ . Tijdens de  $G_1$ -fase (duur:  $\geq 8$  uur) neemt de celdiameter toe, totdat het volume van de cel dubbel zo groot is als het initieel volume net na de deling. De  $G_2$ -fase en de S-fase

worden samen met het begin van de mitose gebundeld in eenzelfde fase, die  $\pm 11,5$  uur duurt ; in deze fase verandert het celvolume (bijna) niet (Van Suijlekom, 2006). Daarna volgt de cytokinese, in het laatste deel van de mitose. Tijdens de cytokinese worden twee nieuwe dochtercellen gevormd. Dit neemt slechts enkele minuten in beslag (Straight & Field, 2000, Glotzer, 2001).

Wat de groeisnelheid van een individuele cel betreft, werd in de literatuur geen beschrijving of model gevonden. Intuïtief kan men veronderstellen dat de groeisnelheid omgekeerd evenredig is met het celvolume, omwille van intracellulaire diffusie, waarvoor meer tijd nodig is naarmate de cel groter is. Daarom wordt een groeimodel voorgesteld waarin de groeisnelheid (verandering van celvolume per tijdseenheid) omgekeerd evenredig is met het celvolume:

$$\frac{\partial V}{\partial t} = \frac{k_g}{V}. \quad (3.8)$$

De parameter  $k_g$  bepaalt hoe snel de cel kan groeien. De waarde ervan wordt in het model gesteld op  $14,23 \cdot 10^{-36} \text{ m}^6/\text{s}$ , wat overeenkomt met een  $G_1$ -fase die 8 uur duurt (zie figuur 3.1).

Vergelijking 3.8 kan herschreven worden tot:

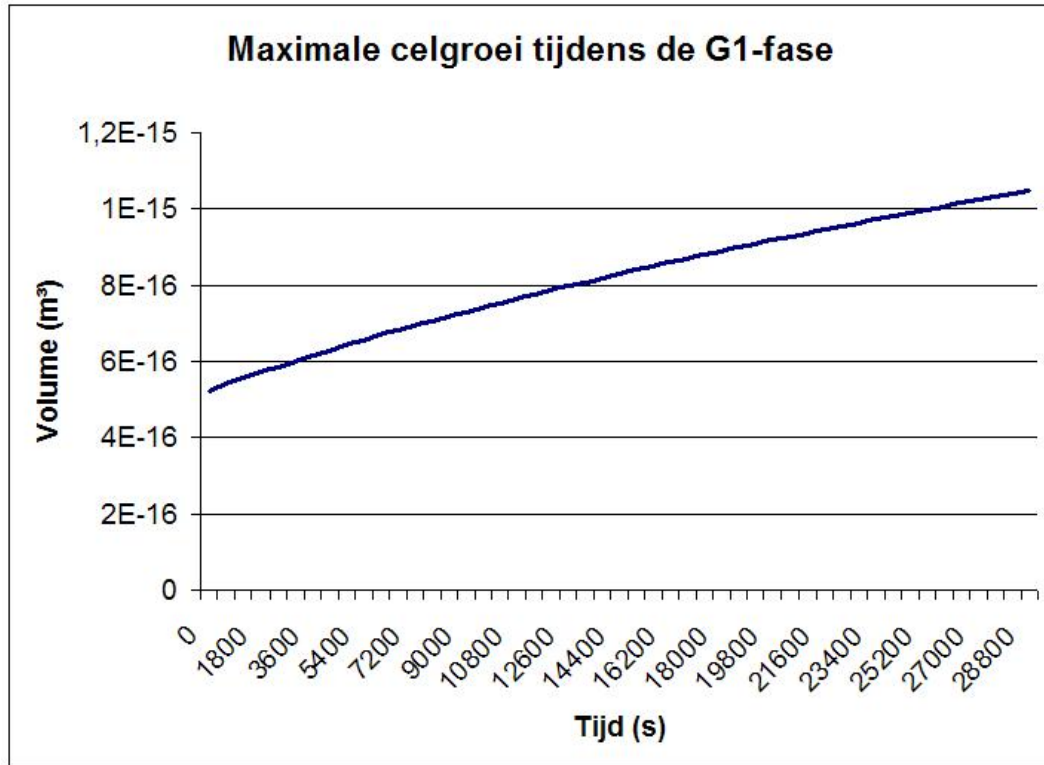
$$V_t = V_{t-1} + \frac{k_g \Delta t}{V_{t-1}}, \quad (3.9)$$

met  $t$  de  $t$ -de tijdstap en  $\Delta t$  de grootte van de tijdstap en  $V$  het volume van de cel.

De ogenblikkelijke groeisnelheid hangt echter ook af van de hoeveelheid beschikbare energie (onder de vorm van ATP) in de cel, evenals van de mechanische stress die een cel ondervindt. Ten slotte kunnen de aanwezigheid van inhibitoren en de afwezigheid van groeifactoren de groei doen stagneren.

Al deze factoren worden verrekend in correctiefactoren op de maximale groei, namelijk  $f_s$ ,  $f_{ATP}$ ,  $f_{gr}$  en  $f_{in}$ , die respectievelijk de mechanische stress, de beschikbare intracellulaire energie, de aanwezigheid van groeifactoren en de aanwezigheid van inhibitoren in rekening brengen. De waarde van al deze correctiefactoren ligt tussen 0 en 1. De waarde van de correctiefactoren wordt beschreven door een karakteristieke functie, die stuksgewijs lineair is. De functies worden hieronder gedefinieerd.

$$f_s = \begin{cases} 1 & \text{mechanische stress} < d_{s,groei} \\ 0 & \text{mechanische stress} \geq d_{s,groei} \end{cases}$$



Figuur 3.1: Groeicurve van een individuele cel tijdens de G<sub>1</sub>-fase, volgens vergelijking 3.9.

met  $d_{s,groei}$  de drempelwaarde van mechanische stress voor groei<sup>3</sup>. Zie sectie 3.3.4 voor een uitleg van de bepaling van deze parameter ‘mechanische stress’.

$$f_{ATP} = \begin{cases} \frac{[ATP]}{d_{ATP}} & \text{als beschikbare hoeveelheid ATP} < d_{ATP,groei} \\ 1 & \text{als beschikbare hoeveelheid ATP} \geq d_{ATP,groei} \end{cases}$$

met  $d_{ATP,groei}$  de drempelwaarde van ATP-hoeveelheid voor maximale groei.

$$f_{gr} = \begin{cases} 0 & \text{als hoeveelheid waargenomen groeifactor} < d_{gr,groei} \\ 1 & \text{als hoeveelheid waargenomen groeifactor} \geq d_{gr,groei} \end{cases}$$

met  $d_{gr,groei}$  de drempelwaarde van groeifactor-hoeveelheid voor groei.

$$f_{in} = \begin{cases} 1 & \text{als hoeveelheid waargenomen inhibitor} < d_{in,groei} \\ 0 & \text{als hoeveelheid waargenomen inhibitor} \geq d_{in,groei} \end{cases}$$

<sup>3</sup>Voor de numerieke waarde van deze en andere drempelwaarden werd waar mogelijk gebruik gemaakt van waarden uit de literatuur, maar waar dit niet mogelijk was, heb ik zelf een waarde berekend of gekozen.

met  $d_{in,groei}$  de drempelwaarde van inhibitor-hoeveelheid voor groei.

Het celvolume op tijdstip  $t$  wordt dan uiteindelijk gegeven door:

$$V_t = V_{t-1} + f_s f_{ATP} f_{gr} f_{in} \left( \frac{k_g \Delta t}{V_{t-1}} \right). \quad (3.10)$$

De groei van tumorcellen wordt niet geïnhibeerd door contact met andere cellen (Künz-Schughart, 1999, Santini *et al.*, 2000), dus wordt in het model de groei van tumorcellen beschreven door de formule:

$$V_t = V_{t-1} + f_{ATP} f_{gr} f_{in} \left( \frac{k_g \Delta t}{V_{t-1}} \right). \quad (3.11)$$

### 3.3.7 Opname van deeltjes

Deeltjes (van voedingsstoffen, afvalstoffen, groeifactoren of inhibitoren) worden beschouwd als opgenomen door de cel vanaf het moment dat ze zich bevinden op een afstand tot het middelpunt van een cel die kleiner is dan de celstraal. De opname in de cel wordt geregistreerd, waarna het deeltje wordt verwijderd uit de modelruimte. Afvalstoffen (lactaat en koolstofdioxide<sup>4</sup>) worden geproduceerd en uitgescheiden door de cellen. Necrotische cellen produceren inhibitoren en goed groeiende cellen produceren groeifactoren.

### 3.3.8 Celmetabolisme

De levende cel neemt nutriëntdeeltjes (zuurstof, glucose, ...) op en produceert afvalstoffen (lactaat en CO<sub>2</sub>). Koolstofdioxide diffundeert heel snel weg, waardoor het niet als afvalproduct hoeft beschouwd te worden (Jiang *et al.*, 2005). Lactaat is dus het enige afvalproduct dat is opgenomen in het model. Numerieke waarden met betrekking tot het celmetabolisme zijn hiervoor reeds gegeven (in sectie 2.11.5). Het metabolisme van quiescente cellen is inherent lager dan dat van prolifererende cellen; quiescente cellen verbruiken bij benadering maar half zoveel nutriënten als prolifererende cellen (Jiang *et al.*, 2005). Dit wordt ook zo in het model geïmplementeerd.

---

<sup>4</sup>Koolstofdioxide wordt niet opgenomen in het model, aangezien het zeer snel wegdiffundeert (Jiang *et al.*, 2005), waardoor het weinig invloed heeft op het celgedrag.

### Het model voor primair energiemetabolisme van Venkatasubramanian *et al.*

In wat volgt wordt een vereenvoudiging van het primair energiemetabolisme door Venkatasubramanian *et al.* (2006) beschreven. Dit model voor energiemetabolisme wordt integraal geïncorporeerd in mijn model, naast een eigen beschrijving van het energiemetabolisme.

De belangrijkste componenten van het primaire energiemetabolisme van cellen zijn de enzymatische basisreacties van de glycolyse en de citroenzuurcyclus (zie figuur 3.2), met drie sleutelmetabolieten: glucose, zuurstof en lactaat. De hoeveelheid beschikbare energie in een cel, onder de vorm van ATP, wordt bepaald door de opname van nutriënten, volgens de stoichiometrie van deze basisreacties. De hoeveelheid ATP is dan weer gerelateerd aan celgroei en celsterfte. De opname van elk van de extracellulaire metabolieten is gebaseerd op de beschikbaarheid ervan (de extracellulaire concentratie) en de stoichiometrische beperkingen van het intracellulaire metabolisme. De opname doorheen het celmembraan volgt een Michaëlis-Menten kinetiek:

$$Q_{i,transmembraan} = \frac{Q_{i,max}c_i}{K_{M,i} + c_i}, \quad (3.12)$$

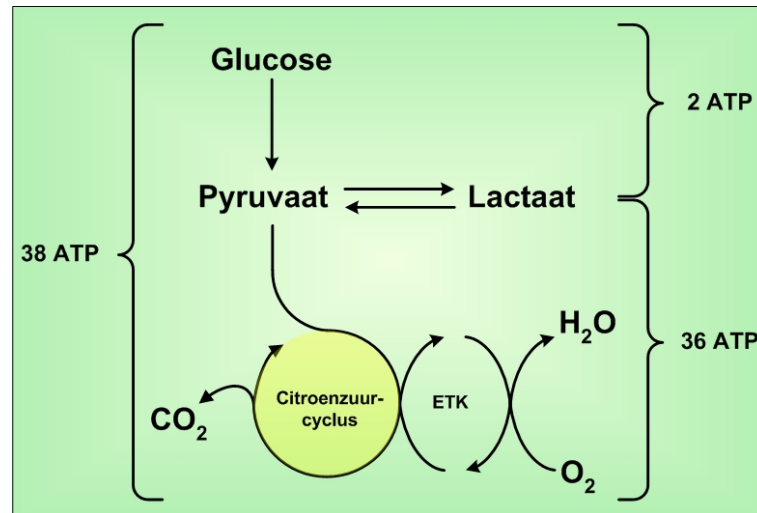
met  $Q$  de opnamesnelheid ('uptake rate'),  $c$  de concentratie van het metaboliet,  $K_M$  de Michaëlis-Menten constante en  $i$  respectievelijk glucose, zuurstof en lactaat.

Wanneer men teller en noemer deelt door het volume van de cel, bekomt men:

$$Q_{i,transmembraan} = \frac{Q_{i,max}n_i}{K_{M,i}V_{cel} + n_i}, \quad (3.13)$$

met  $n$  de stofhoeveelheid in mol en  $V_{cel}$  het celvolume in  $\text{m}^3$ .

Deze eenvoudige hyperbolische functies impliceren dat wanneer een metaboliet niet aanwezig is, deze niet kan opgenomen worden door de cellen, en wanneer de concentratie ervan hoog is, de opnamesnelheid een verzadigingsniveau bereikt. Om de werkelijke metabolische opnamesnelheden te bepalen is de introductie van een aantal randvoorwaarden nodig, dit om de stoichiometrie van de intracellulaire reacties in rekening te brengen. Deze randvoorwaarden zijn gebaseerd op een aantal aannames (Venkatasubramanian *et al.*, 2006):



Figuur 3.2: Een vereenvoudigde voorstelling van het primair energiemetabolisme. Naar Venkatasubramanian *et al.* (2006).

1. Cellen zullen glucose consumeren wanneer dit beschikbaar is.
2. Alle reductantia (NADH en FADH) worden omgezet in ATP via de elektronen-transportketen (ETK).
3. Lactaat (melkzuur) kan als koolstofbron gebruikt worden wanneer de glucose-concentratie laag is en de zuurstofconcentratie hoog.
4. De P:O verhouding<sup>5</sup> is respectievelijk 3 en 2 voor NADH en FADH<sub>2</sub> (News-holme & Leech, 1983).

Gebaseerd op de eerste aanname is de glucose-opname gelimiteerd enkel door het transport doorheen de celmembraan:

$$Q_{gl} = Q_{gl,transmembraan}. \quad (3.14)$$

In tegenstelling tot glucose kan zuurstofopname gelimiteerd worden, hetzij door zijn eigen transmembraantransport, hetzij door transmembraantransport van glucose en lactaat. Wanneer de extracellulaire zuurstofconcentratie laag is, zal de transmembraanopname van zuurstof ( $Q_{ox,transmembraan}$ ) de limiterende factor zijn. Wanneer echter de concentratie van glucose en lactaat laag zijn, zal de stoichiometrie van het intracellulair metabolisme de opname van zuurstof beperken.

<sup>5</sup>Een maat voor de oxidatieve fosforylering. Het is de verhouding van veresterde fosfaatradicalen (die ATP vormen uit ADP) over het aantal zuurstofatomen opgenomen door de mitochondriën.



De NADH en FADH<sub>2</sub> die in de glycolyse en de citroenzuurcyclus vrijkomen, worden in ATP omgezet in de elektronentransportketen (aanname 2). Hierbij wordt zuurstof geconsumeerd en water geproduceerd. Voor de volledige oxidatie van een molecule glucose zijn zes moleculen O<sub>2</sub> nodig, voor de oxidatie van een molecule lactaat in de citroenzuurcyclus drie:

$$Q_{ox} = \min(Q_{ox,transmembraan}, 6Q_{gl} + 3Q_{la,transmembraan}). \quad (3.15)$$

De mate van lactaatconsumptie en/of -productie is afhankelijk van de glucose- en zuurstofopname, en wordt bepaald door de stoichiometrie van de intracellulaire reacties. Een molecule glucose zorgt voor twee moleculen lactaat en de oxidatie van een molecule lactaat vereist drie moleculen zuurstof.

$$Q_{la} = -2Q_{gl} + \frac{Q_{ox}}{3}. \quad (3.16)$$

De stoichiometrische balans beschrijft zowel de productie ( $Q_{la} < 0$ ) als de consumptie ( $Q_{la} > 0$ ) van lactaat. Als de opname van glucose stoichiometrisch groter is dan de opname van zuurstof, zal de overschot aan glucose omgezet worden in lactaat. Omgekeerd, wanneer de opname van zuurstof stoichiometrisch groter is, zal lactaat geconsumeerd worden en geoxideerd als koolstofbron (aanname 3). Merk op dat de opname van zuurstof enkel stoichiometrisch groter kan zijn dan de opname van glucose wanneer lactaat aanwezig is in de omgeving ( $Q_{la,transmembraan} > 0$ ). Deze beperking zit impliciet vervat in vergelijking 3.15. De ATP geproduceerd in de glycolyse, de Krebs-cyclus en de consumptie van lactaat wordt gebruikt om de totale ATP productie te benaderen. Gebaseerd op aannames 2 en 4 zal de omzetting van een molecule glucose in twee moleculen pyruvaat acht moleculen ATP opleveren, aangezien de glycolyse twee moleculen ATP genereert en ook twee moleculen NADH, wat equivalent is aan zes moleculen ATP (aanname 4). Evenzo zal de omzetting van een lactaatmolecule in een pyruvaatmolecule een NADH molecule genereren, goed voor drie moleculen ATP. De volledige oxidatie van een pyruvaatmolecule vereist 3 zuurstofmoleculen en genereert vier moleculen NADH, een molecule FADH<sub>2</sub> en een molecule GTP, samen goed voor 15 moleculen ATP. Elke geconsumeerde zuurstofmolecule zal bij volledige oxidatie van pyruvaat in de Krebs-cyclus vijf ATP moleculen genereren. Wanneer deze relaties gecombineerd worden, blijkt dat 1 molecule glucose equivalent is aan de productie van 38 moleculen ATP.

De netto ATP productie, gerelateerd aan de opname van glucose en zuurstof, kan dan in de volgende eenvoudige vergelijking weergegeven worden:

$$Q_{ATP} = 8Q_{gl} + 3Q_{la} + 5Q_{ox}. \quad (3.17)$$

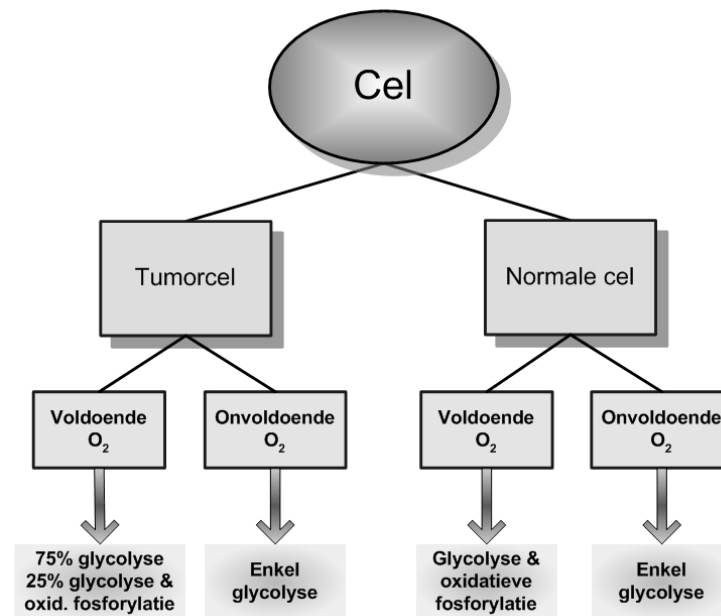
Invullen van vergelijking 3.16 in deze vergelijking geeft ten slotte:

$$Q_{ATP} = 2Q_{gl} + 6Q_{ox}. \quad (3.18)$$

### Een eigen model van het primair energiemetabolisme

Naast de programmacode voor het energiemetabolisme-model van Venkatasubramanian *et al.* (2006), werd ook de code geschreven van een eigen model voor het energiemetabolisme. In dit model worden alle moleculen die zich binnen het bereik van de cel bevinden, opgenomen en in de cel gestockeerd, en slechts een bepaalde fractie ervan wordt echt gebruikt in het metabolisme, de rest wordt bewaard voor gebruik in de volgende tijdstappen. Dit in tegenstelling tot het model van Venkatasubramanian *et al.*, waar het membraantransport ook een limiterende factor kan zijn. In ons model voor energiemetabolisme wordt het gevolgde metabolisme bepaald via het doorlopen van een beslissingsboom, weergegeven in figuur 3.3. Het opvallende hierin is, dat tumorcellen, indien ze zich in een aerobe omgeving bevinden, toch vooral (voor drie kwart van de opgenomen glucosemoleculen (Jiang *et al.*, 2005)) de anaerobe glycolyse volgen. Tumorcellen nemen daardoor doorgaans meer glucose op dan normale cellen (Newsholme & Leech, 1983). Ook dit is geïmplementeerd in het model.

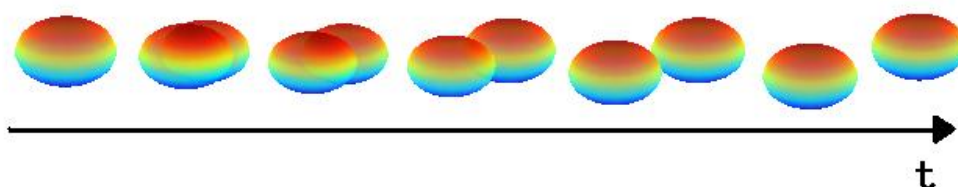
Om de hoeveelheden opgenomen zuurstof en glucose en de hoeveelheid geproduceerde ATP en lactaat te bepalen, werd gebruik gemaakt van vereenvoudigde reactievergelijkingen voor het glucosemetabolisme, zoals beschreven in sectie 2.11. Aangenomen wordt dat alle geproduceerde ATP in het metabolisme wordt opgebruikt (en voor beweging en andere endo-energetische cellulaire processen); ATP wordt immers als dusdanig niet in grote hoeveelheden gestockeerd in de cel (Ophardt, 2003). Het geproduceerde melkzuur (lactaat) wordt nadien vrijgegeven in de omgeving van de cel. De degradatie van groeifactor wordt ook geïmplementeerd, zodat steeds nieuwe groeifactormoleculen nodig zijn om de cel prolifererend te houden. Hetzelfde gebeurt met de inhibitor.



Figuur 3.3: Een beslissingsboom voor het energiemetabolisme.

### 3.3.9 Celdeling

Zoals eerder beargumenteerd, wordt de celgeometrie tijdens de celdeling of cytokinese niet expliciet gemodelleerd, aangezien de gekozen tijdstap groter is dan de duur van de cytokinese. De factoren die bepalen volgens welk vlak de deling zich voltrekt zijn heden nog onvoldoende bekend. Het delingsvlak wordt daarom in het model willekeurig gekozen. De programmacode om celdeling expliciet te beschrijven, is echter wel geprogrammeerd, ze wordt enkel niet toegepast, wanneer de tijdstap groter dan of gelijk aan 10 minuten is. De visualisatie van het verloop van de celdeling is weergegeven in figuur 3.4. De berekening van de straal van de delende dochtercellen is weergegeven in de volgende paragraaf.



Figuur 3.4: Een simulatie van de celdeling.

**Berekenen van de straal van de delende dochtercellen**

Het volume  $V$  van een bol met straal  $r$  wordt gegeven door volgende formule:

$$V_{bol} = \frac{4}{3}\pi r^3. \quad (3.19)$$

Het volume van de doorsnede (intersectie) van twee gelijke sferen<sup>6</sup> wordt bepaald door de afstand tussen het centrum van de twee bollen  $d$  en hun straal  $r$ :

$$V_{intersectie} = \frac{1}{12}\pi(4r + d)(2r - d)^2. \quad (3.20)$$

Tijdens de deling is op elk tijdstip de straal van beide bollen gelijk en de som van de volumes verminderd met het gemeenschappelijke volume is constant. Het totale volume van de twee dochtercellen, wat gelijk is aan het volume waarop de moedercel begint te delen, noemen we  $V_d$ , het volume tijdens de deling.

$$V_d = 2\frac{4}{3}\pi r^3 - \frac{\pi}{12}(4r + d)(2r - d)^2. \quad (3.21)$$

Deze vergelijking wordt geschreven in de algemene vorm van een derdegraadsvergelijking, namelijk:

$$z^3 + a_2z^2 + a_1z + a_0 = 0. \quad (3.22)$$

$$\frac{8}{3}\pi r^3 - \left(\frac{\pi}{3}r + \frac{\pi}{12}d\right)(4r^2 - 4rd + d^2) - V_d = 0$$

↓

$$\frac{8}{3}\pi r^3 - \frac{4\pi}{3}r^3 + 4d\frac{\pi}{3}r^2 - d^2\frac{\pi}{3}r - \frac{\pi}{3}dr^2 + \frac{\pi}{3}d^2r - \frac{\pi}{12}d^3 - V_d = 0$$

↓

$$\frac{4\pi}{3}r^3 + d\pi r^2 - \frac{\pi}{12}d^3 - V_d = 0$$

↓

$$r^3 + \frac{3}{4}dr^2 - \frac{d^3}{16} - \frac{3}{4\pi}V_d = 0 \quad (3.23)$$

De coëfficiënten  $a_2$ ,  $a_1$ ,  $a_0$  hebben dus de volgende waarden:

---

<sup>6</sup>Bron: <http://mathworld.wolfram.com/Sphere-SphereIntersection.html>.

$$\begin{aligned}
 a_2 &= \frac{3}{4}d \\
 a_1 &= 0 \\
 a_0 &= -\frac{1}{16}d^3 - \frac{3}{4\pi}V_d.
 \end{aligned}$$

Er is slechts 1 reële oplossing<sup>7</sup> voor deze derdegraadvergelijking. De twee andere oplossingen van de vergelijking bevatten een imaginair deel, en zijn bijgevolg niet fysisch relevant. De straal van de dochtercellen tijdens de deling moet dus voldoen aan de volgende vergelijking:

$$r = -\frac{1}{3}a_2 + S + T, \quad (3.24)$$

met

$$\begin{aligned}
 S &= \sqrt[3]{R + \sqrt{D}}, \\
 T &= \sqrt[3]{R - \sqrt{D}}, \\
 R &= \frac{9a_1a_2 - 27a_0 - 2a_2^3}{54}, \\
 D &= Q^3 + R^2 \text{ en} \\
 Q &= \frac{3a_1 - a_2^2}{9}.
 \end{aligned}$$

### 3.3.10 Celdood

#### Celdood door necrose

Necrose treedt onder andere op wanneer een cel te hard wordt gecomprimeerd, en het celmembraan onder de druk bezwijkt, of in geval van hypoxie (Vermes, 2002). De condities waarbij in het model necrose optreedt, zijn:

$$\left\{ \begin{array}{l}
 \text{mechanische stress} > d_{s,necrose} \\
 \text{of: lactaatconcentratie} > d_{la,necrose} \\
 \text{of: glucoseconcentratie} < d_{gl,necrose} \\
 \text{of: zuurstofconcentratie} < d_{ox,necrose}
 \end{array} \right.$$

met  $d_{s,necrose}$ ,  $d_{la,necrose}$ ,  $d_{gl,necrose}$  en  $d_{ox,necrose}$  de respectievelijke drempelwaarden voor necrose.

<sup>7</sup>Bron: <http://mathworld.wolfram.com/CubicFormula.html>.

**Verloop van necrose** In het begin van de necrose zwelt de cel een beetje op (Vermes, 2002). Necrose gaat gepaard met membraanbreuk, en dus komt de celinhoud vrij in de omgeving. Tijdens de necrose worden ook inhibitoren geproduceerd. Na ongeveer 24 uur is de necrose voltooid (Palsson & Bhatia, 2004), en is de cel verdwenen.

### Celdood door apoptose

Apoptose is gereguleerde celdood. Het is een manier van multicellulaire organismen om ongewenste of onbruikbare cellen te elimineren (Vermes, 2002). In het model treedt apoptose op in volgende gevallen:

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{mechanische stress} > d_{s,apoptose} \\ \text{of: inhibitorconcentratie} > d_{in,apoptose} \\ \text{of: groeifactorconcentratie} < d_{gr,apoptose} \\ \text{of: er is in de S-fase van de celcyclus een fout opgetreden in de} \\ \quad \text{DNA-replicatie} \\ \text{of: de cel bevindt zich al geruime tijd } (\Delta t_{anoikis}) \text{ in anoikis-} \\ \quad \text{condities (zie verder)} \end{array} \right.$$

met  $d_{s,apoptose}$ ,  $d_{in,apoptose}$  en  $d_{gr,apoptose}$  de respectievelijke drempelwaarden van mechanische stress, inhibitorconcentratie en groeifactorconcentratie voor apoptose. In de S-fase van de celcyclus wordt gecontroleerd of het DNA goed werd gerepliceerd. In het model zijn twee soorten mutaties mogelijk, namelijk mutaties die tumorigenese induceren en mutaties die leiden tot apoptose. Celdood door anoikis is een speciale vorm van celdood; deze wordt besproken in de volgende paragraaf.

Tijdens de apoptose krimpt de cel stelselmatig, totdat ze verdwijnt. Dit proces van lysis, waarbij de intracellulaire componenten (in het model komt dit neer op de opgeslagen glucose, zuurstof en lactaat) worden vrijgegeven in de extracellulaire matrix. Na ongeveer een uur is de cel volledig verdwenen (Palsson & Bhatia, 2004).

### Celdood door anoikis

Anoikis is een type van apoptose, optredend bij gebrek aan contact met het substraatmateriaal (Galle *et al.*, 2005). In het model treedt anoikis op wanneer een cel geen buurcellen heeft, en dit gedurende een bepaalde periode  $\Delta t_{anoikis}$ . Een cel die anoikis ondergaat, volgt in het model dezelfde stappen als een cel in apoptose.

### 3.3.11 Celcyclus

De celcyclus wordt opgedeeld in 3 fasen: (1) de groeifase, (2) de fase ter voorbereiding van de celdeling en (3) de cytokinese of delingsfase. Op fase 3 volgt dan weer fase 1. Om over te gaan naar een volgende fase moet er aan een aantal voorwaarden voldaan zijn. Om over te gaan naar fase 2 moet de cel een bepaald volume bereikt hebben, namelijk het drempelvolume  $V_d$ . Dit drempelvolume wordt voor de eenvoud gelijkgesteld aan het finaal volume  $V_f$  met  $V_f = 2V_i = 1046 \mu\text{m}^3$ . Om over te gaan naar fase 3 moet er voldoende ruimte zijn om 2 dochtercellen te kunnen vormen. Ook kunnen externe signalen zoals inhibitoren of een te hoge afvalstoffenconcentratie de cyclus stoppen, alsook interne signalen (bijvoorbeeld fouten in het kopiëren van het DNA tijdens de S-fase). Ten slotte kan celdood optreden (necrose en apoptose) in geval van extreme omstandigheden (hoge lactaatconcentratie, heel lage nutriëntconcentratie of ernstige mechanische stress).

In het begin van fase 1 wordt gecontroleerd of er voldoende nutriënten beschikbaar zijn om groei mogelijk te maken. Indien dat niet het geval is, zal de cel quiescent worden (overgang naar de  $G_0$ -fase). De overgang van fase 2 naar fase 3 wordt gedeeltelijk stochastisch bepaald. Fase 2 duurt minstens 11,5 uur. Daarna heeft de cel elke tijdstap een kans  $p$  om over te gaan naar fase 3. Deze kans stijgt gradueel naarmate de tijd vordert. Op deze manier wordt er rekening gehouden met het feit dat de snelheid van de celcycluspropagatie voor elke cel verschillend is, en op zo'n manier dat na verloop van tijd de kans op overgang naar fase 3 naar 1 convergeert. In de S-fase van de celcyclus wordt het DNA vermenigvuldigd. Hierbij kunnen fouten optreden (mutaties). Ernstige fouten leiden tot apoptose, en in zeer zeldzame gevallen kan een mutatie optreden die leidt tot het ontstaan van tumorcellen. De overgang van fase 3 naar fase 1 wordt niet gecontroleerd, en verloopt automatisch van zodra de cytokinese voltooid is.

Bij overgang naar de  $G_0$ -fase krimpen de cellen een beetje (Schweitzer & DeKoter, 2004). Cellen in de  $G_0$ -fase kunnen weer in de celcyclus binnentreden wanneer de omstandigheden gunstig zijn (voldoende nutriënten beschikbaar en genoeg ruimte om te groeien).

## 3.4 Programmastructuur

Het model is geïmplementeerd in de programmeertaal C++. In het begin van het programma wordt het medium bepaald (het volume ervan en de concentraties van

glucose, zuurstof en groeifactor), evenals het initieel aantal cellen en hun positie. Zoals vermeld in sectie 3.1 zijn er twee verschillende tijdstappen toegepast in het model.

Elke mini-tijdstap  $\delta t$  gebeurt er achtereenvolgens voor elke cel een bepaling van haar buurcellen, de berekening van de krachten die erop inwerken en het implementeren van celmigratie.

Elke tijdstap  $\Delta t$  gebeurt er een uitvoerigere berekening. Eerst wordt de migratie van de moleculen in de extracellulaire matrix geïmplementeerd, zoals beschreven in sectie 3.3.2. Indien gewenst, kan de positie van de moleculen naar een tekstbestand worden weggeschreven. Daarna doorloopt de cel een uitgebreid algoritme, weergegeven in figuur 3.5. Eerst worden de intercellulaire krachten berekend, waarna de migratie van de cellen kan geïmplementeerd worden. Afhankelijk van de toestand van de cel (prolifererend, quiescent, cel in apoptose, cel in necrose) wordt vervolgens het metabolisme of het afsterven van de cel berekend. Ten slotte wordt op basis van de micro-omgeving van de cel en de toestand van de cel beslist of een cel overgaat naar een andere fase in de celcyclus en/of naar een andere toestand.

Ten slotte worden dan alle gegevens van de cel (positie, snelheid, straal, toestand, fase, enz.) op die tijdstap weggeschreven naar een tekstbestand. Ook wordt er een soort logboek bijgehouden waarin staat hoeveel cellen er gestorven zijn, en wat de doodsoorzaak was, hoeveel celdelingen er hebben plaatsgevonden, enz. Dit is handig bij de interpretatie van de simulatieresultaten. Dit logboek verschijnt op het scherm tijdens de simulatie en wordt eveneens weggeschreven naar een tekstbestand.

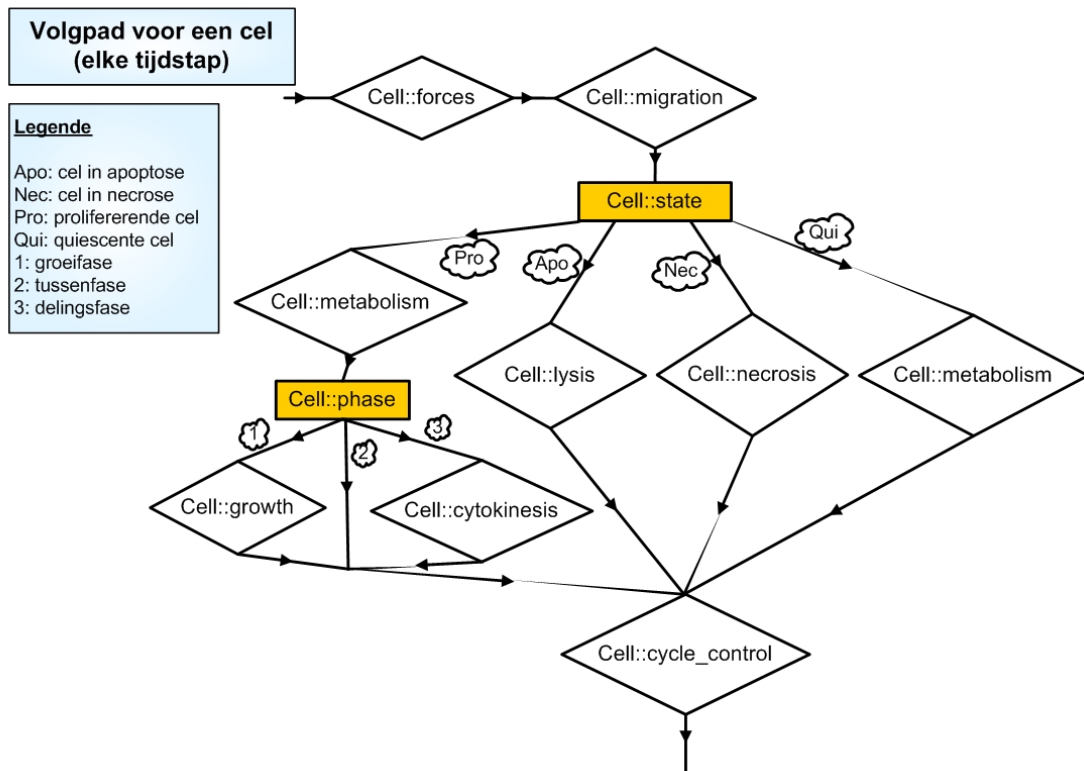
## 3.5 Visualisatie

Na afloop van de simulatie kan het tekstbestand met de simulatiegegevens worden ingelezen in Matlab. Met behulp van een visualisatie-algoritme kunnen de gegevens van de celposities op de diverse tijdstappen omgezet worden in een visueel aantrekkelijk filmpje van het gedrag van het weefselaggregaat doorheen de tijd. In de visualisatie wordt de kleur van een cel bepaald door haar toestand. De kleurcode is weergegeven in tabel 3.1.

Figuur 3.6 is een beeld van een gesimuleerd celaggregaat. De groene cellen zijn prolifererende cellen, de blauwe cel is een cel die in apoptose is gegaan omwille van de hoge mechanische stress door druk van naburige cellen.

Ook de ogenblikkelijke samenstelling van het medium kan worden gevisualiseerd.

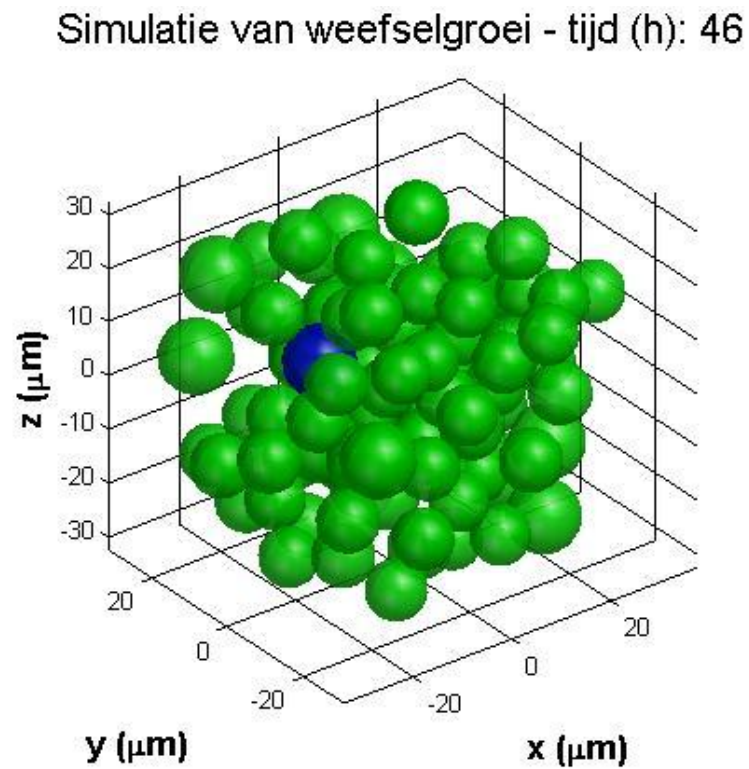




Figuur 3.5: De programmastructuur. De namen van de functies zijn in het Engels, omdat de code (namen van variabelen, commentaar, enz.) in het Engels is opgesteld, om het programma toegankelijker te maken voor een internationaal publiek. ‘Cell::’ voor een functienaam betekent dat deze functie een ‘member’-functie is van de klasse ‘Cell’.

Celltoestand	Kleur
proliferend	groen
quiescent	geel
cel in apoptose	blauw
cel in necrose	rood
cel in anoikis-condities	magenta

Tabel 3.1: Kleurcode bij de visualisatie van cellen.



Figuur 3.6: Beeld van een gesimuleerd celaggregaat. Groene cellen zijn prolifererend, blauwe cellen zijn apoptotisch.

De kleur van de deeltjes<sup>8</sup> wordt bepaald door het soort molecule (de stof), zoals weergegeven in tabel 3.2.

Celtoestand	Kleur
glucose	rood
zuurstof	blauw
lactaat	cyaan
groefactor	groen
inhibitor	geel

Tabel 3.2: Kleurcode bij de visualisatie van het medium.

### 3.6 Modelparameters

In tabel 3.3 worden de belangrijkste parameters uit het model opgesomd, met de waarde ervan, de eenheid, en een korte omschrijving van de betekenis ervan. Deze parameters zijn in de programmacode gegroepeerd in de klasse ‘SimSet’ in een apart ‘header’-bestand. Zo kunnen de waarden van deze parameters gewijzigd worden, zonder de hele programmacode te moeten doorzoeken.

Parameter	Waarde	Eenheid	Omschrijving
$\Delta t$	600	s	grootte van de tijdstap
$\delta t$	60	s	grootte van de mini-tijdstap
$eindtijd$	1	week	gesimuleerde tijd
$cellen_{t=0}$	27	(-)	initieel aantal cellen
$\rho_{cel}$	1139	kg/m <sup>3</sup>	massadichtheid van een cel (Godin <i>et al.</i> , 2007)
$r_i$	$5 \cdot 10^{-6}$	m	initiële celstraal (Galle <i>et al.</i> , 2005)
$V_{medium}$	$1 \cdot 10^{-12}$	m <sup>3</sup>	volume van het medium
$c_{gl,i}$	$5,5^{-3}$	M	initiële glucoseconcentratie (D’Souza <i>et al.</i> , 2003)
$c_{ox,i}$	$1 \cdot 10^{-3}$	M	initiële zuurstofconcentratie
$c_{gr,i}$	$1,75 \cdot 10^{-8}$	M	initiële groefactorconcentratie
$m_{pp_{gl}}$	50000000	(-)	molecules per partikel glucose
$m_{pp_{ox}}$	5000000	(-)	molecules per partikel zuurstof

<sup>8</sup>Een deeltje stelt een groot aantal moleculen voor (zie sectie 3.3.2 en tabel 3.3).

Parameter	Waarde	Eenheid	Omschrijving
$mpp_{la}$	5000000	(-)	molecules per partikel lactaat
$mpp_{gr}$	50	(-)	molecules per partikel groefactor
$mpp_{in}$	50	(-)	molecules per partikel inhibitor
$D_{gl}$	$1,12 \cdot 10^{-10}$	$\text{cm}^2/\text{s}$	diffusieconstante van glucose (Busini <i>et al.</i> , 2007)
$D_{ox}$	$5,15 \cdot 10^{-8}$	$\text{cm}^2/\text{s}$	diffusieconstante van zuurstof (Busini <i>et al.</i> , 2007)
$D_{la}$	$5,9 \cdot 10^{-7}$	$\text{cm}^2/\text{s}$	diffusieconstante van lactaat (Jiang <i>et al.</i> , 2005)
$D_{gr}$	$2,8 \cdot 10^{-10}$	$\text{cm}^2/\text{s}$	diffusieconstante van groefactor (Jiang <i>et al.</i> , 2005)
$D_{in}$	$2,8 \cdot 10^{-10}$	$\text{cm}^2/\text{s}$	diffusieconstante van inhibitor (Jiang <i>et al.</i> , 2005)
$k_{cel}$	$1,24 \cdot 10^{-17}$	N/m	elasticiteitsconstante van de cel
$\delta v_{random}$	$1 \cdot 10^{-12}$	m/s	maximale waarde van de bijdrage van de random beweging van een cel aan de totale verandering van migratiesnelheid
$\eta$	$1,06 \cdot 10^{-11}$	Pa.s	de viscositeit van de ECM
$k_{flock}$	$5 \cdot 10^{-19}$	N/m	elasticiteitsconstante voor inter- cellulaire adhesie
$r_{max,gl}$	2025	molecules/(cel s)	maximale opnamesnelheid van glucose
$r_{max,gl,tumor}$	6075	molecules/(cel s)	maximale opnamesnelheid van glucose voor tumorcellen
$r_{max,ox}$	1350	molecules/(cel s)	maximale opnamesnelheid van zuurstof
$d_{s,groei}$	0,2	(-)	drempelwaarde van mechanische stress voor groei
$d_{ATP,groei}$	$1.29^5$	molecules	drempelwaarde van hoeveelheid ATP voor groei
$d_{gr,groei}$	10	molecules	drempelwaarde van hoeveelheid groefactor voor groei

Parameter	Waarde	Eenheid	Omschrijving
$d_{in,groei}$	30	molecules	drempelwaarde van hoeveelheid inhibitor voor groei
$k_g$	$1,4 \cdot 10^{-35}$	$m^6/s$	groeisnelheidsfactor
$d_{s,necrose}$	0,9	(-)	drempelwaarde van mechanische stress voor necrose
$d_{gl,necrose}$	$6 \cdot 10^{-7}$	M	drempelwaarde van glucoseconcentratie voor necrose
$d_{ox,necrose}$	$2 \cdot 10^{-7}$	M	drempelwaarde van zuurstofconcentratie voor necrose
$d_{la,necrose}$	$8 \cdot 10^{-3}$	M	drempelwaarde van lactaatconcentratie voor necrose (Jiang <i>et al.</i> , 2005)
$d_{s,apoptose}$	0,7	(-)	drempelwaarde van mechanische stress voor apoptose
$d_{in,apoptose}$	10	molecules	drempelwaarde van hoeveelheid groeifactor voor apoptose
$d_{gr,apoptose}$	30	molecules	drempelwaarde van hoeveelheid inhibitor voor apoptose
$\Delta t_{anoikis}$	2	h	tijd waarna bij een cel in anoikistoestand apoptose optreedt
$K_{M,gl}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$	M	Michaëlis-Menten constante voor glucose (Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2006)
$K_{M,ox}$	$4,64 \cdot 10^{-6}$	M	Michaëlis-Menten constante voor zuurstof (Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2006)
$K_{M,ox}$	$5,5 \cdot 10^{-7}$	M	Michaëlis-Menten constante voor lactaat (Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2006)
$Q_{gl,max}$	$1,33 \cdot 10^{-16}$	mol/(cel s)	maximale opnamesnelheid van glucose (Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2006)

Parameter	Waarde	Eenheid	Omschrijving
$Q_{ox,max}$	$7,16 \cdot 10^{-17}$	mol/(cel s)	maximale opnamesnelheid van zuurstof (Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2006)
$Q_{la,max}$	$1 \cdot 10^{-14}$	mol/(cel s)	maximale opnamesnelheid van lactaat (Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2006)

Tabel 3.3: Een overzicht van de belangrijkste parameters van het model.

## 3.7 Mogelijkheden en beperkingen van het model

Voor het opstellen van de beschrijving van al deze processen werd grondig onderzoek gedaan in de beschikbare literatuur, om een zo realistisch (en toch eenvoudig) mogelijk celgedrag na te bootsen. In situaties waar de literatuurkennis ontoereikend was, werden aannames over het celgedrag gedaan. Er werd een onderscheid gemaakt tussen gedrag van normale cellen en tumorcellen. Bij het debuggen van het programma is gebleken dat de verschillende parameterwaarden, die in diverse wetenschappelijke artikels gevonden werden, vaak niet compatibel waren met elkaar. Dit is aannemelijk, aangezien het gaat om gemeten waarden bij diverse celtypes en in verschillende omstandigheden. Er moest dus soms afgeweken worden van de waarden uit de literatuur, om enigzins realistische resultaten te bekomen. Voor een heleboel parameters was er ook helemaal geen waarde in de literatuur te vinden, waardoor deze waarden moesten geschat worden.

### 3.7.1 Mogelijkheden

Met het model kan celgroei in drie dimensies gesimuleerd worden, en het modelleren van anisotrope weefsels is perfect mogelijk, aangezien elke cel individueel verschillend is (er zijn sterke en zwakkere cellen; d.w.z. goed of minder goed bestand tegen mechanische stress), en reageert op haar micro-omgeving, die voor iedere cel ook verschillend is. Het model is uniek in zijn soort, aangezien het zoveel verschillende aspecten van celgedrag beschrijft. Dit gebeurt op een intuïtieve manier, waarin de cel de basiseenheid is, de natuurlijke eenheid waaruit weefsels zijn opgebouwd. Metabolisme, groei, verschillende vormen van celdood, de voortgang door de celcyclus,

de reversibele overgang naar quiescentie, intercellulaire krachten, reactie op de lokale extracellulaire matrix, ... zit allemaal in het model vervat. Het model kan daardoor inzicht geven in de oorzaken van apoptose en necrose in weefsels, welke factoren de celgroei beperken en het gedrag van cellen in het algemeen. Experimenten wijzen uit dat de cellulaire respons in tweedimensionele extracellulaire matrices sterk verschilt van deze in hun driedimensionele tegenhangers (hydrogels) (Palsson & Bhatia, 2004). Er zijn momenteel nog niet zo heel veel modellen die deze driedimensionele groei beschrijven.

Het model beschrijft de groei van weefsels heel gedetailleerd, namelijk op celniveau in plaats van op weefselniveau. De extracellulaire matrix wordt zo mogelijk nog nauwkeuriger beschreven: ook ECM-moleculen worden als deeltjes beschouwd, als individueel bewegende entiteiten, zij het dat een deeltje van een stof in het model meerdere moleculen representeert (semi-moleculair niveau). Op deze manier kan de lokale concentratie (op micrometerschaal en kleiner) rechtstreeks bepaald worden, zonder de noodzaak van het oplossen van diffusievergelijkingen. Aan deze handwijze zit evenwel ook een nadeel: het vraagt heel wat geheugen- en reken capaciteit om van een paar miljoen deeltjes de driedimensionele positie bij te houden, en elke tijdstap de migratie van de moleculen te berekenen.

Het model is nu algemeen gehouden, maar het is eenvoudig aanpasbaar en uitbreidbaar voor het beschrijven van specifieke celsystemen. De moeilijkheid is echter het vinden van realistische waarden voor de verschillende modelparameters voor deze specifieke condities.

### 3.7.2 Beperkingen

Roostervrije modellen, zoals het hier voorgestelde model, laten toe op kleinere lengteschaal te werken. De rekentijd die deze modellen vereisen beperkt echter hun gebruik tot systemen van maximaal  $10^5$  à  $10^6$  cellen, wat overeenkomt met een driedimensioneel aggregaat van ongeveer 1 à 2 mm groot. Dit is veel kleiner dan de typische grootte van een tumor in zijn klinisch voorkomen (Drasdo, 2005). Het uitrekenen van de proliferatie van een celaggregaat van initieel 27 cellen gedurende een week met een tijdstap van 10 minuten (en een mini-tijdstap van 1 minuut), duurt op een Pentium 4 ongeveer drie uur.

De orde grootte van de tijdstap is prima voor het opvolgen van celgedrag, maar is te groot voor een nauwkeurige implementatie van moleculaire processen, zoals de opname van nutriënten, de diffusie van moleculen doorheen de extracellulaire matrix

en de beweging van cellen ten gevolge van intercellulaire krachten. Deze laatste beperking is weggewerkt door het invoeren van een kleinere tijdstap (de mini-tijdstap genoemd) en het berekenen van de intercellulaire krachten op elke mini-tijdstap.

Een grote moeilijkheid bij het modelleren is het vinden van de juiste parameterwaarden voor de modelparameters, omdat experimentele resultaten van *in vitro* driedimensionele groei in suspensie niet gemakkelijk in de literatuur gevonden worden. Parameterwaarden uit de literatuur konden ook niet altijd gebruikt worden, omdat de verschillende waarden uit de literatuur soms niet met elkaar in overeenstemming waren. De parameterwaarden uit de literatuur met betrekking tot processen op moleculair niveau konden niet zomaar gebruikt worden, omdat deze processen een veel kleinere tijdsconstante hebben, zoals hierboven beschreven.

Het model is eerder zwak in de geometrische representatie van de celvorm, aangezien de cellen beschouwd worden als niet-vervormbare bolvormige deeltjes. Ook de berekening van intercellulaire krachten is, omwille van deze vereenvoudiging van de celvorm, niet echt in overeenstemming met de werkelijkheid. Echter, indien men afwijkt van deze vereenvoudigde vorm, worden de berekeningen een stuk ingewikkelder, wat ook weer meer reken capaciteit vraagt.

### 3.7.3 Besluit

Het in dit werk voorgestelde model heeft heel wat mogelijkheden. Hoewel het model zich in een preliminair stadium bevindt, is het duidelijk dat het conceptueel reeds werkt, en dat na een modelvalidatie en verder afstellen van de modelparameters potentieel realistische simulaties van proliferatie van driedimensionele celaggregaten kunnen bekomen worden. Het grootste nadeel van het model is de beperkte omvang van de modelruimte en gesimuleerde tijd, omdat het model rekenintensief is.



# Hoofdstuk 4

## Resultaten & discussie

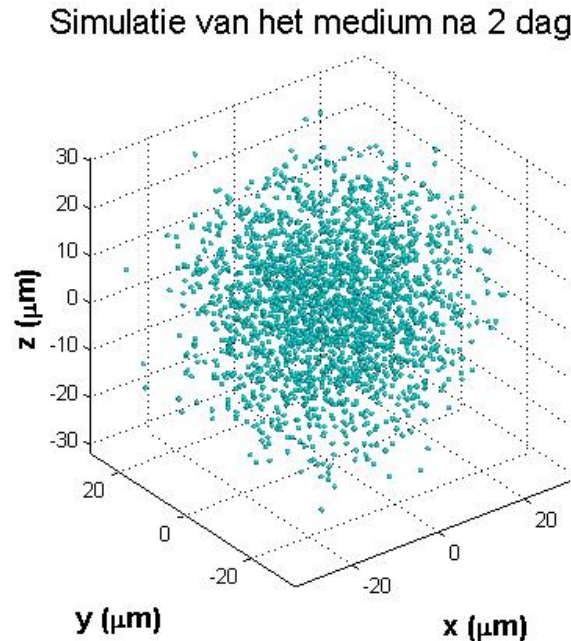
### 4.1 Simulaties

Het doel van het model is het simuleren van weefselgroei in *in vitro* condities. Er zijn een aantal simulaties (virtuele experimenten) uitgevoerd, met verschillende parameterwaarden. Deze simulaties worden kort toegelicht en de resultaten worden bediscussieerd. Er moet vermeld worden dat omzichtig moet omgegaan worden met de interpretatie van deze resultaten, aangezien veel parameterwaarden niet in overeenstemming zijn met de literatuur, en het model niet gevalideerd werd (zie sectie 4.1.3).

#### 4.1.1 Het verschil van groei van normale cellen en tumorcellen

In een eerste simulatie wordt de groei van normale cellen vergeleken met die van tumorcellen. Deze cellen verschillen qua metabolisme (Gatenby & Gillies, 2004); tumorcellen doen vooral aan (anaerobe) glycolyse, ook al is er voldoende zuurstof voorradig in de micro-omgeving. Verder verschillen sommige tumorcellen van normale cellen doordat hun groei niet gestopt wordt door contact met andere cellen (Künz-Schughart, 1999, Santini *et al.*, 2000) en tumorcellen geen anoikis ondergaan (Weinberg, 2007, Huang & Ingber, 1999). Tumorcellen doen meer aan anaerobe glycolyse, en produceren dus veel lactaat, waardoor de pH van de extracellulaire matrix daalt, dit wordt bevestigd in de simulatie. Tumorcellen zijn echter beter aangepast aan het overleven in zure condities (Gatenby & Gillies, 2004). In figuur 4.1 wordt een beeld gegeven van de ruimtelijke spreiding van lactaat in het medium bij een si-

mulatie met tumorcellen. Normale cellen produceerden in dezelfde omstandigheden geen lactaat.



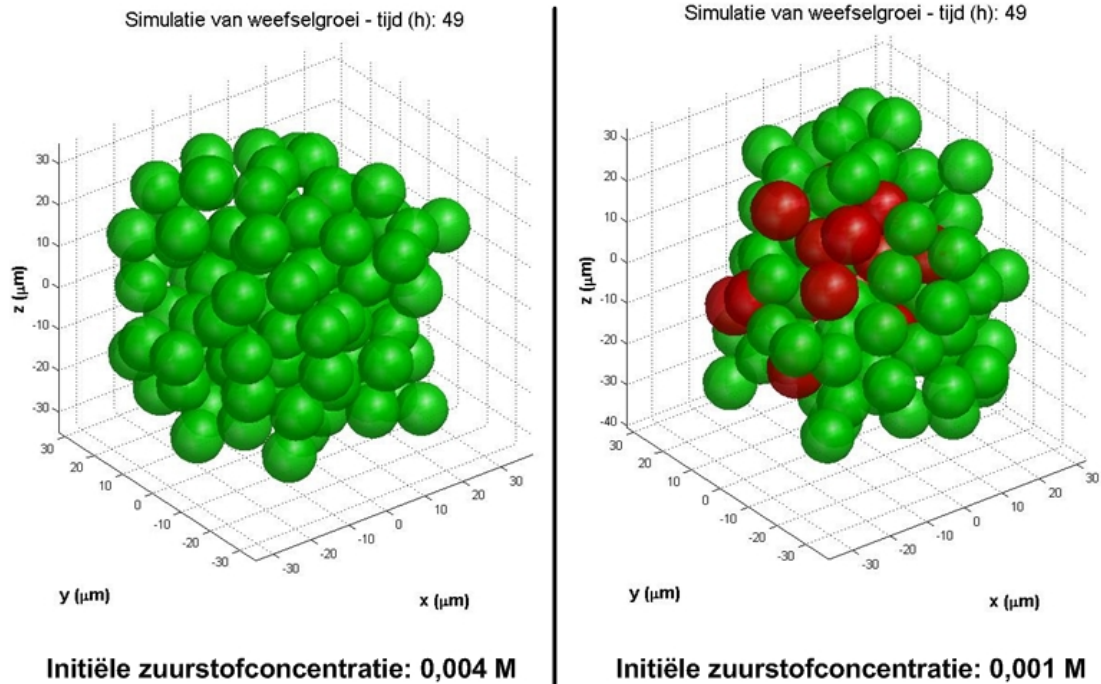
Figuur 4.1: De ruimtelijke spreiding van lactaat in een medium met tumorcellen, na 2 dagen.

#### 4.1.2 Weefselgroei bij verschillende nutriëntconcentraties

Er werden twee simulaties uitgevoerd met een initiële zuurstofconcentratie van respectievelijk 0,001 M en 0,004 M. Een beeld van het celaggregaat na 2 dagen in beide situaties is weergegeven in figuur 4.2. Hierop is zichtbaar dat er een aantal cellen zijn afgestorven (ten gevolge van zuurstofgebrek), in het geval van de lagere initiële zuurstofconcentratie.

#### 4.1.3 Discussie van de resultaten

Omwille van de geringe modelafmetingen (het gaat om microscopische celaggregaten), beperkte toegang tot experimentele gegevens en de beperkte tijd waarin dit werk moest afgewerkt worden, is er geen validatie van het model uitgevoerd. Er werd wel getracht de parameters zo te kiezen dat het model conceptueel goed werkt, en potentieel realistische resultaten genereert. Het model kan eenvoudig aangepast en uitgebreid worden, al naargelang de toepassing. Omdat het model zo uitgebreid



Figuur 4.2: Beeld van het celaggregaat bij verschillende initiële zuurstofconcentraties, na 2 dagen. Groene cellen zijn prolifererende cellen, rode cellen zijn necrotisch.

en gedetailleerd is, heeft het potentieel predictieve kracht in zich, mits de nodige validatie.

Simulaties met het model tonen aan dat de groei en het gedrag van celaggregaten conceptueel kan worden berekend en gevisualiseerd. De visualisatie gebeurde met het softwarepakket Matlab. Uit de simulaties blijkt dat de samenstelling van de extracellulaire matrix sterk plaatsafhankelijk is, zoals beschreven is in de literatuur (Venkatasubramanian *et al.*, 2006). Daarom gedraagt elke cel zich ook verschillend. De hoge graad van detail van het model heeft ook een keerzijde: de grootte van het beschreven celaggregaat is daardoor beperkt. Er moeten zoveel berekeningen uitgevoerd worden, dat het simuleren al gauw enkele uren in beslag neemt, zelfs voor celaggregaten met een beperkte grootte.

# Hoofdstuk 5

## Besluit

Een eerste stap in het modelleren van driedimensionele celaggregaten is gezet. Hiertoe werd een partikel-gebaseerd model geprogrammeerd in C++. Het model bevat o.a. een (elementaire) beschrijving van energiemetabolisme, groei, verschillende vormen van celdood, de voortgang door de celcyclus, de reversibele overgang naar quiescentie, intercellulaire krachten, reactie op de lokale extracellulaire matrix. Cellen worden erin beschouwd als individuele bolvormige deeltjes, die elk reageren op hun micro-omgeving. Ook wordt er een onderscheid gemaakt in celgedrag tussen normale cellen en tumorcellen. De extracellulaire matrix wordt gemodelleerd als een medium waarin clusters van moleculen willekeurig bewegen. De gemodelleerde stoffen zijn glucose, zuurstof, lactaat, een theoretische groeifactor en een theoretische inhibitor. Simulaties met het model tonen aan dat de groei en het gedrag van celaggregaten conceptueel kan worden berekend en gevisualiseerd. Validatie van de resultaten is echter niet gebeurd, wegens het beperkte tijdsbestek. De visualisatie gebeurde met het softwarepakket Matlab.

Uit de simulaties blijkt dat de samenstelling van de extracellulaire matrix sterk plaatsafhankelijk is, zoals beschreven is in de literatuur. Daarom gedraagt elke cel zich ook verschillend. Dit is goed zichtbaar in de visualisaties. Omwille van de hoge graad van detail in het model (weefsel wordt gemodelleerd op celniveau en de extracellulaire matrix op semi-moleculair niveau), is de grootte van het beschreven celaggregaat echter beperkt. Dit heeft te maken met de reken capaciteit van de huidige computers. Er moeten zoveel berekeningen uitgevoerd worden, dat het simuleren al gauw enkele uren in beslag neemt, zelfs voor celaggregaten met een beperkte grootte. Een andere moeilijkheid bij het modelleren is het vinden van de juiste parameterwaarden voor de modelparameters, omdat experimentele resultaten

van *in vitro* driedimensionele groei in suspensie niet gemakkelijk in de literatuur gevonden worden. Parameterwaarden uit de literatuur konden ook niet altijd gebruikt worden, omdat de verschillende waarden uit de literatuur soms niet met elkaar in overeenstemming waren, en omdat de tijdstap van de tijdsdiscretisatie redelijk groot genomen werd. Het model kan aangepast en uitgebreid worden, al naargelang de toepassing. Omdat het model zo uitgebreid en gedetailleerd is, heeft het potentieel predictieve kracht in zich.

# Bibliografie

- Adam, J.A. & Maggelakis, S.A. (1989). Mathematical models of tumor growth. IV. Effects of a necrotic core. *Math. Biosci.*, 97: 121–136.
- Adam, J.A. & Maggelakis, S.A. (1990). Diffusion regulated growth characteristics of a spherical prevascular carcinoma. *Bull. Math. Biol.*, 52: 549–582.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2004). *Essential Cell Biology*. Garland Science, New York. 740 p.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (1998). *Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York. 630 p.
- Alcaraz, J., Buscemi, L., Grabulosa, M., Trepate, X., Fabry, B., Farr, R. & Navajas, D. (2003). Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 84: 2071–2079.
- Alison, M. & Sarraf, C. (1998). *Understanding Cancer*. Cambridge University Press, Cambridge. 277 p.
- Ameisen, J.C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.*, 9: 367–393.
- Anderson, A.R. (2003). A hybrid discrete-continuum technique for individual-based migration models. In: *Polymer and cell dynamics multiscale modeling and numerical simulations*, Alt, W., Chaplain, M., Griebel, M. & Lenz, J., (eds.). Birkhäuser, Basel, p. 251–259.
- Anderson, A.R. (2005). A hybrid mathematical model of solid tumour invasion: the importance of cell adhesion. *Math. Med. Biol.*, 22: 163–186.

- Anderson, A.R.A., Sleeman, B.D., Young, I.M. & Griffiths, B.S. (1997). Nematode movement along a chemical gradient in a structurally heterogeneous environment: II. Theory. *Fundam. Appl. Nematol.*, 20: 165–172.
- Aplin, A.E., Howe, A.K. & Juliano, R.L. (1999). Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11: 737–744.
- Araujo, R.P. & McElwain, D.L. (2004). A history of the study of solid tumour growth: the contribution of mathematical modelling. *Bull. Math. Biol.*, 66: 1039–1091.
- Arden, N. & Betenbaugh, M.J. (1994). Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol.*, 22-4.
- Arnn, J. & Staehelin, L.A. (1981). The structure and function of spot desmosomes. *Int. J. Dermatol.*, 20: 330–339.
- Assoian, R.K. (1997). Anchorage-dependent cell cycle progression. *J. Cell Biol.*, 136: 1–4.
- Bachman, K.E. & Park, B.H. (2005). Duel nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. *Curr. Opin. Oncol.*, 17: 49–54.
- Balkovetz, D.F. (1999). Evidence that hepatocyte growth factor abrogates contact inhibition of mitosis in Madin-Darby canine kidney cell monolayers. *Life Sci.*, 64: 1393–1401.
- Baserga, R. (1965). The relationship of the cell cycle to tumor growth and control of cell division: A review. *Cancer Res.*, 25-5: 581–595.
- Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. Freeman, New York, 974 p.
- Berthiaume, F. (1998). *Laboratory in Molecular and Cellular Sciences*. Center for Engineering in Medicine, Boston.
- Bertuzzi, A., D’Onofrio, A., Fasano, A. & Gandolfi, A. (2003). Regression and re-growth of tumour cords following single-dose anticancer treatment. *Bull. Math. Biol.*, 65: 903–931.
- Bertuzzi, A., Fasano, A., Gandolfi, A. & Marangi, D. (2002). Cell kinetics in tumour cords studied by a model with variable cell cycle length. *Math. Biosci.*, 177-178: 103–125.

- Bischofs, I.B. & Schwarz, U.S. (2005). Effect of poisson ratio on cellular structure formation. *Phys. Rev. Lett.*, 95: 068102.
- Bosman, F.T. & van Krieken, J.H.J.M. (2004). Fundamentele aspecten van kanker. In: *Oncologie*, van de Velde, C.J.H., van Krieken, J.H.J.M. & de Mulder, P.H.M., (eds.). Bohn Stafleu van Loghum, Houten, p. 3–25.
- Braumann, U.D., Kuska, J.P., Einenkel, J., Horn, L.C., Lffler, M. & Hckel, M. (2005). Three-dimensional reconstruction and quantification of cervical carcinoma invasion fronts from histological serial sections. *IEEE Trans. Med. Imaging*, 24: 1286–1307.
- Brizel, D.M., Schröder, T., Scher, R.L., Walenta, S., Clough, R.W., Dewhirst, M.W. & Müller-Klieser, W. (2001). Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 51: 349–353.
- Brizel, D.M., Scully, S.P., Harrelson, J.M., Layfield, L.J., Bean, J.M., Prosnitz, L.R. & Dewhirst, M.W. (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.*, 56: 941–943.
- Brown, J.M. (2000). Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol. Med. Today*, 6: 157–162.
- Busini, V., Arosio, P. & Masi, M. (2007). Mechanistic modelling of avascular tumor growth and pharmacokinetics influence - Part 1. *Chem. Eng. Sci.*, 62: 1877–1886.
- Byrne, H.M., Chaplain, M.A.J., Pettet, G.J. & McElwain, D.L.S. (1999). A mathematical model of trophoblast invasion. *J. Theor. Med.*, 1: 275–286.
- Byrne, H.M. & Gourley, S.A. (1997). The Role of Growth Factors in Avascular Tumour Growth. *Math. Comput. Modelling*, 26-4: 35–55.
- Byrne, H., King, J., McElwain, D. & Preziosi, L. (2001). A two-phase model of solid tumor growth. *Appl. Math. Lett.*, 13: 1–15.
- Byrne, H., King, J., McElwain, D. & Preziosi, L. (2003). A two-phase model of solid tumor growth. *Appl. Math. Lett.*, 16: 567–573.
- Byrne, H. & Preziosi, L. (2003). Modelling solid tumour growth using the theory of mixtures. *Math. Med. Biol.*, 20: 341–366.



- de Caestecker, M. (2004). The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 15: 1–11.
- Carmeliet, P. & Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407: 249–257.
- Casciari, J.J., Sotirchos, S.V. & Sutherland, R.M. (1992). Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH. *J. Cell. Physiol.*, 151: 386–394.
- Chaplain, M. (1996). A vascular growth, angiogenesis and vascular growth in solid tumours: The mathematical modelling of the stages of tumour development. *Math. Comput. Modelling*, 23: 47–87.
- Chaplain, M.A. & Britton, N.F. (1993). On the concentration profile of a growth inhibitory factor in multicell spheroids. *Math. Biosci.*, 115: 233–243.
- Chaplain, M.A. & Sleeman, B.D. (1993). Modelling the growth of solid tumours and incorporating a method for their classification using nonlinear elasticity theory. *J. Math. Biol.*, 31: 431–473.
- Chen, B.P., Li, Y.S., Zhao, Y., Chen, K.D., Li, S., Lao, J., Yuan, S., Shyy, J.Y. & Chien, S. (2001a). DNA microarray analysis of gene expression in endothelial cells in response to 24-h shear stress. *Physiol. Genomics*, 7: 55–63.
- Chen, C.Y., Byrne, H.M. & King, J.R. (2001b). The influence of growth-induced stress from the surrounding medium on the development of multicell spheroids. *J. Math. Biol.*, 43: 191–220.
- Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M. & Ingber, D.E. (1997). Geometric Control of Cell Life and Death. *Science*, 276: 1425–1428.
- Chen, W.T. (1979). Induction of spreading during fibroblast movement. *J. Cell Biol.*, 81: 684–691.
- Chen, W.T. (1981). Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J. Cell Biol.*, 90: 159–187.
- Cheng, X., Den, Z. & Koch, P.J. (2005). Desmosomal cell adhesion in mammalian development. *Eur. J. Cell Biol.*, 84: 215–223.

- Chesla, S.E., Selvaraj, P. & Zhu, C. (1998). Measuring two-dimensional receptor-ligand binding kinetics by micropipette. *Biophys. J.*, 75: 1553–1572.
- Cukierman, E., Pankov, R. & Yamada, K.M. (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14: 633–639.
- Dallon, J.C. & Othmer, H.G. (2004). How cellular movement determines the collective force generated by the *Dictyostelium discoideum* slug. *J. Theor. Biol.*, 231: 203–222.
- Dewhirst, M.W., Secomb, T.W., Ong, E.T., Hsu, R. & Gross, J.F. (1994). Determination of local oxygen consumption rates in tumors. *Cancer Res.*, 54: 3333–3336.
- Dhont, J. (1996). *An Introduction to Dynamics of Colloids*. Elsevier, Amsterdam, 660 p.
- Dormann, S. & Deutsch, A. (2002). Modeling of self-organized avascular tumor growth with a hybrid cellular automaton. *In Silico Biol. (Gedruckt)*, 2: 393–406.
- Doyle, A.D. & Lee, J. (2005). Cyclic changes in keratocyte speed and traction stress arise from  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulation of cell adhesiveness. *J. Cell Sci.*, 118-2: 369–379.
- Drasdo, D. (2003). On selected individual-based approaches to the dynamics of multicellular systems. In: *Multiscale Modeling*, Alt, J.L.W. & Griebel, M., (eds.). Birkhäuser, Basel.
- Drasdo, D. (2005). Coarse graining in simulated cell populations. *Adv. Complex. Sys.*, 8: 319–363.
- Drasdo, D. (2007). Center-based Single-cell Models: An Approach to Multi-cellular Organization Based on a Conceptual Analogy to Colloidal Particles. In: *Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine*, Anderson, A.R.A., Chaplain, M.A.J. & Rejniak, K.A., (eds.). Birkhäuser, Basel, p. 171–196.
- Drasdo, D. & Höhme, S. (2003). Individual-Based Approaches to Birth and Death in Avascular Tumors. *Math. Comput. Modelling*, 37: 1163–1175.
- Drasdo, D. & Höhme, S. (2005). A single-cell based model to tumor growth in vitro: Monolayers and spheroids. *Phys. Biol.*, 2: 133–147.

- Drasdo, D., Höhme, S. & Block, M. (2007). On the Role of Physics in the Growth and Pattern Formation of Multi-Cellular Systems: What can we Learn from Individual-Cell Based Models? *J. Stat. Phys.*, 128-1/2: 287–345.
- Drasdo, D., Kree, R. & McCaskill, J. (1995). Monte-Carlo approach to tissue-cell populations. *Phys. Rev. E*, 52: 6635–6657.
- D’Souza, V.M., Shertzer, H.G., Menon, A.G. & Pauletti, G.M. (2003). High Glucose Concentration in Isotonic Media Alters Caco-2 Cell Permeability. *AAPS Pharm-Sci.*, 5-3. artikel 24.
- Duband, J.L., Dufour, S., Yamada, S.S., Yamada, K.M. & Thiery, J.P. (1991). Neural crest cell locomotion induced by antibodies to beta 1 integrins. A tool for studying the roles of substratum molecular avidity and density in migration. *J. Cell. Sci.*, 98: 517–532.
- Düchting, W. (1990). Tumor growth simulation. *Comput. Graph.*, 14: 505–508.
- Düchting, W., Ulmer, W. & Ginsberg, T. (1996). Cancer: a challenge for control theory and computer modelling. *Eur. J. Cancer*, 32A: 1283–1292.
- Duffy, K.J., Cummings, P.T. & Ford, R.M. (1995). Random walk calculations for bacterial migration in porous media. *Biophys. J.*, 68: 800–806.
- Eagle, H. (1955). The Specific Amino Acid Requirements of a Mammalian Cell (Strain L) in Tissue Culture. *J. Biol. Chem.*, 214: 839–852.
- Edelman, G.M. (1985). Expression of cell adhesion molecules during embryogenesis and regeneration. *Exp. Cell Res.*, 161: 1–16.
- Eden, M. (1961). A two-dimensional growth process. In: *Proc. of the 4th Berkeley Symp. Mathematics and Probability*, Neyman, J., (eds.). University of California Press, Berkeley, p. 223–239.
- Farquhar, M.G. & Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.*, 17: 375–412.
- Feng, S.-S. & Chien, S. (2003). Chemoterapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chem. Eng. Sci.*, 58: 4087–4114.

- Folkman, J. & Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature*, 273: 345–349.
- Freshney, R. (1983). *Culture of Animal Cells*. Alan R. Liss. New York, 672 p.
- Freyer, J.P. (1988). Role of necrosis in regulating the growth saturation of multicellular spheroids. *Cancer Res.*, 48: 2432–2439.
- Freyer, J.P. & Sutherland, R.M. (1985). A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/Ro spheroids during growth. *J. Cell. Physiol.*, 124-3: 516–524.
- Freyer, J.P. & Sutherland, R.M. (1986). Proliferative and clonogenic heterogeneity of cells from EMT6/Ro multicellular spheroids induced by the glucose and oxygen supply. *Cancer Res.*, 46: 3513–3520.
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y. & Tusch, M. (2004). Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int. J. Dev. Biol.*, 48: 441–449.
- Frymier, P.D., Ford, R.M. & Cummings, P.T. (1993). Cellular-dynamics simulations of bacterial chemotaxis. *Chem. Eng. Sci.*, 48: 687–699.
- Galle, J., Aust, G., Schaller, G., Beyer, T. & Drasdo, D. (2006). Individual cell-based models of the spatial-temporal organization of multicellular systems—achievements and limitations. *Cytometry A*, 69: 704–710.
- Galle, J., Löffler, M. & Drasdo, D. (2003). On the temporal-spatial organization of epithelial cell populations in vitro. In: *Mathematical Modelling & Computing in Biology and Medicine*, Capasso, V., (eds.). Marcel Dekker, New York.
- Galle, J., Löffler, M. & Drasdo, D. (2005). Modeling the Effect of Deregulated Proliferation and Apoptosis on the Growth Dynamics of Epithelial Cell Populations In Vitro. *Biophys. J.*, 88: 62–75.
- García-Pérez, A.I., López-Beltrán, E.A., Klüner, P., Luque, J., Ballesteros, P. & Cerdán, S. (1999). Molecular crowding and viscosity as determinants of translational diffusion of metabolites in subcellular organelles. *Arch. Biochem. Biophys.*, 362: 329–338.
- Garrod, D.R. (1986). Desmosomes, cell adhesion molecules and the adhesive properties of cells in tissues. *J. Cell Sci. Suppl.*, 4: 221–237.

- Gatenby, R.A. & Gawlinski, E.T. (1996). A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Res.*, 56: 5745–5753.
- Gatenby, R.A. & Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer*, 4: 891–899.
- Geiger, B., Volk, T. & Volberg, T. (1985). Molecular heterogeneity of adherens junctions. *J. Cell Biol.*, 101: 1523–1531.
- Gewies, A. (2003). Introduction to Apoptosis [on line]. Gewies, A. Beschikbaar op: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf> [datum van opzoeking: 14/02/2008].
- Glazier, J.A. & Graner, F. (1993). Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Phys. Rev. E*, 47-3: 2128–2154.
- Glotzer, M. (2001). Animal Cell Cytokinesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17: 351–380.
- Gloushankova, N.A., Alieva, N.A., Krendel, M.F., Bonder, E.M., Feder, H.H., Vasiliev, J.M. & Gelfand, I.M. (1997). Cell-cell contact changes the dynamics of lamellar activity in nontransformed epitheliocytes but not in their ras-transformed descendants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 879–883.
- Godin, M., Bryan, A.K., Burg, T.P., Babcock, K. & Manalis, S.R. (2007). Measuring the mass, density, and size of particles and cells using a suspended microchannel resonator. *Appl. Phys. Lett.*, 91-12: 123121;1–3.
- Greenspan, H.P. (1976). On the growth and stability of cell cultures and solid tumors. *J. Theor. Biol.*, 56: 229–242.
- Guck, J., Ananthakrishnan, R., Mahmood, H., Moon, T.J., Cunningham, C.C. & Käs, J. (2001). The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophys. J.*, 81: 767–784.
- Hay, N. & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.*, 18: 1926–1945.
- Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Bröcker, E.B. & Friedl, P. (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res.*, 62: 2125–2130.

- Helmlinger, G., Netti, P.A., Lichtenbeld, H.C., Melder, R.J. & Jain, R.K. (1997). Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat. Biotechnol.*, 15: 778–783.
- Helmlinger, G., Sckell, A., Dellian, M., Forbes, N.S. & Jain, R.K. (2002). Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin. Cancer Res.*, 8: 1284–1291.
- Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. & Jain, R.K. (1997). Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.*, 3: 177–182.
- Herpin, A., Lelong, C. & Favrel, P. (2004). Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev. Comp. Imm.*, 28: 461–485.
- Hinchcliffe, E.H. (2003). Cell Cycle: Seeking Permission from the Mother Centriole. *Curr. Biol.*, 13: R646–R648.
- Hogeweg, P. (2000). Evolving mechanisms of morphogenesis: on the interplay between differential adhesion and cell differentiation. *J. Theor. Biol.*, 203: 317–333.
- Honda, H., Tanemura, M. & Yoshida, A. (2000). Differentiation of wing epidermal scale cells in a butterfly under the lateral inhibition model-appearance of large cells in a polygonal pattern. *Acta Biotheor.*, 48: 121–136.
- Hou, J.S., Holmes, M.H., Lai, W.M. & Mow, V.C. (1989). Boundary conditions at the cartilage-synovial fluid interface for joint lubrication and theoretical verifications. *J. Biomech. Eng.*, 111: 78–87.
- Howard, A. & Pelc, S. R. (1951). Nuclear Incorporation of P-32 as Demonstrated by Autoradiographs. *Exptl. Cell Res.*, 2: 178–187.
- Hu, G. & Li, D. (2007). Three-dimensional modeling of transport of nutrients for multicellular tumor spheroid culture in a microchannel. *Biomed. Microdevices*, 9: 315–323.
- Huang, S. & Houghton, P.J. (2001). Mechanisms of resistance to rapamycins. *Drug Resist. Updat.*, 4: 378–391.

- Huang, S. & Ingber, E. (1999). The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nature Cell Biol.*, 1: E131–E138.
- Huttenlocher, A., Sandborg, R.R. & Horwitz, A.F. (1995). Adhesion in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7: 697–706.
- Ishizaki, Y., Cheng, L., Mudge, A.W. & Raff, M.C. (1995). Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Mol. Biol. Cell*, 6: 1443–1458.
- Jackson, T.L. & Byrne, H.M. (2000). A mathematical model to study the effects of drug resistance and vasculature on the response of solid tumors to chemotherapy. *Math. Biosci.*, 164: 17–38.
- Jiang, Y., Pjesivac-Grbovic, J., Cantrell, C. & Freyer, J.P. (2005). A Multiscale Model for Avascular Tumor Growth. *Biophys. J.*, 89-6: 3884–3894.
- Jones, A.F., Byrne, H.M., Gibson, J.S. & Dold, J.W. (2000). A mathematical model of the stress induced during avascular tumour growth. *J. Math. Biol.*, 40: 473–499.
- Kansal, A.R., Torquato, S., Harsh GR, I.V., Chiocca, E.A. & Deisboeck, T.S. (2000). Simulated brain tumor growth dynamics using a three-dimensional cellular automaton. *J. Theor. Biol.*, 203: 367–382.
- Kassner, P.D., Alon, R., Springer, T.A. & Hemler, M.E. (1995). Specialized functional properties of the integrin alpha 4 cytoplasmic domain. *Mol. Biol. Cell*, 6: 661–674.
- Khalil, N. (1999). TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect.*, 1: 1255–1263.
- Kimmel, M. & Axelrod, D.E. (1991). Unequal cell division, growth regulation and colony size of mammalian cells: a mathematical model and analysis of experimental data. *J. Theor. Biol.*, 153: 157–180.
- Klekotka, P.A., Santoro, S.A., Ho, A., Dowdy, S.F. & Zutter, M.M. (2001). Mammary epithelial cell-cycle progression via the alpha(2)beta(1) integrin: unique and synergistic roles of the alpha(2) cytoplasmic domain. *Am. J. Pathol.*, 159: 983–992.
- Koller, M.R., Bradley, M.S. & Palsson, B.O. (1995). Growth factor consumption and production in perfusion cultures of human bone marrow correlate with specific cell production. *Exp. Hematol.*, 23: 1275–1283.

- Krogh, A. (1919). The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J. Physiol. (Lond.)*, 52: 409–415.
- Kumar, C.C. (1998). Signaling by integrin receptors. *Oncogene*, 17: 1365–1373.
- Künz-Schughart, L.A. (1999). Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol. Int.*, 23: 157–161.
- Laforsch, C., Ngwa, W., Grill, W. & Tollrian, R. (2005). An acoustic microscopy technique reveals hidden morphological defenses in daphnia. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 101: 15911.
- Lambie, K. (2007). Mathematische Modellering van Tumorgeïnduceerde Angiogenese. Proefschrift, K.U.Leuven.
- LaRue, K.E.A., Bradbury, M.E. & Freyer, J.P. (1998). Differential Regulation of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors in Monolayer and Spheroid Cultures of Tumorigenic and Nontumorigenic Fibroblasts. *Cancer Res.*, 58: 1305–1314.
- Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84: 359–369.
- Lauffenburger, D.A. & Lindermann, J.J. (1993). *Receptors: Models for binding, trafficking, and signaling*. Oxford University Press, New York, 364 p.
- Lawrence, D.A. (1996). Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur. Cytokine Netw.*, 7: 363–374.
- Leist, M. & Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2-8: 589–598.
- Li, L., Backer, J., Wong, A.S., Schwanke, E.L., Stewart, B.G. & Pasdar, M. (2003). Bcl-2 expression decreases cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell. Sci.*, 116: 3687–3700.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaria, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S. & Darnell, J. (2004). *Molecular Cell Biology*. Freeman, New York, 1084 p.
- Lukashev, M.E. & Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.*, 8: 437–441.



- Mandeville, J.T.H., Ghosh, R.N. & Maxfield, F.R. (1995). Intracellular Calcium Levels Correlate with Speed and Persistent Forward Motion in Migrating Neutrophils. *Biophys. J.*, 68: 1207–1217.
- Martins, M.L., Ferreira Jr., S.C. & Vilela, M.J. (2007). Multiscale models for the growth of avascular tumors. *Phys. Life Rev.*, 4: 128–156.
- Meineke, F., Potten, C. & Loeffler, M. (2001). Cell migration and organization in the intestinal crypt using a lattice-free model. *Cell Prolif.*, 34: 253–266.
- Mombach, J.C.M. & Glazier, J.A. (1996). Single Cell Motion in Aggregates of Embryonic Cells. *Phys. Rev. Lett.*, 76-16.
- Moreira, J. & Deutsch, A. (2002). Cellular automaton models of tumor development: A critical review. *Adv. Complex Syst.*, 5: 247–267.
- Mow, V.C., Wang, C.C. & Hung, C.T. (1999). The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.*, 7: 41–58.
- Müller-Klieser, W.J. (1987). A review on cellular aggregates in cancer research. *Cancer. Res. Clin. Oncol.*, 113: 101–122.
- Newsholme, A.E. & Leech, A.R. (1983). *Biochemistry for the Medical Sciences*. Wiley, Chichester, 952 p.
- Nordsmark, M., Bentzen, S.M. & Overgaard, J. (1994). Measurement of human tumour oxygenation status by a polarographic needle electrode. An analysis of inter- and intratumour heterogeneity. *Acta Oncol.*, 33: 383–389.
- Ophardt, C.E. (2003). Virtual chembook. Glycolysis summary [on line]. Ophardt, C.E. Beschikbaar op: <http://www.elmhurst.edu/chm/vchembook/601glycolysissum.html> [datum van opzoeking: 02/05/2008].
- Orme, M.E. & Chaplain, M.A. (1996). A mathematical model of the first steps of tumour-related angiogenesis: capillary sprout formation and secondary branching. *IMA J. Math. Appl. Med. Biol.*, 13: 73–98.
- Palsson, B.Ø. & Bhatia, S.N. (2004). *Tissue Engineering*. Pearson Prentice Hall Bioengineering, Upper Saddle River, 407 p.

- Palsson, E. & Othmer, H. (2000). A model for individual and collective cell movement in dictyostelium discoideum. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 12: 10448–10453.
- Pasdar, M. & Nelson, W.J. (1988). Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells: temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact. I. Biochemical analysis. *J. Cell Biol.*, 106: 677–685.
- Periasamy, N., Kao, H.P., Fushimi, K. & Verkman, A.S. (1992). Organic osmolytes increase cytoplasmic viscosity in kidney cells. *Am. J. Physiol.*, 263: C901–907.
- Perumpanani, A.J., Sherratt, J.A., Norbury, J. & Byrne, H.M. (1996). Biological inferences from a mathematical model for malignant invasion. *Invasion Metastasis*, 16: 209–221.
- Pettet, G.J., Please, C.P., Tindall, M.J. & McElwain, D.L. (2001). The migration of cells in multicell tumor spheroids. *Bull. Math. Biol.*, 63: 231–257.
- Qi, A.S., Zheng, X., Du, C.Y. & An, B.S. (1993). A cellular automaton model of cancerous growth. *J. Theor. Biol.*, 161: 1–12.
- Quaranta, V., Weaver, A.M., Cummings, P.T. & Anderson, A.R.A. (2005). Mathematical modeling of cancer: The future of prognosis and treatment. *Clin. Chim. Acta*, 357: 173–179.
- Racker, E. (1974). History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol. Cell. Biochem.*, 5: 17–23.
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y. & Jacobson, M.D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, 262: 695–700.
- Santini, M.T., Rainaldi, G. & Indovina, P.L. (2000). Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 36: 75–87.
- Saraste, A. & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.*, 45-3: 528–537.
- Sarntinoranont, M., Rooney, F. & Ferrari, M. (2003). Interstitial stress and fluid pressure within a growing tumor. *Ann. Biomed. Eng.*, 31: 327–335.

- Savinell, J.M., Lee, G.M. & Palsson, B.Ø. (1989). On the orders of magnitude of epigenic dynamics and monoclonal antibody production. *Bioprocess Eng.*, 4: 231–234.
- Sayan, B.S., Ince, G., Sayan, A.E. & Ozturk, M. (2001). NAPO as a novel marker for apoptosis. *J. Cell Biol.*, 155: 719–724.
- Scalerandi, M., Romano, A., Pescarmona, G.F., Delsanto, P.P. & Condat, C.A. (1999). Nutrient competition as a determinant for cancer growth. *Phys. Rev. E.*, 59: 2206–2217.
- Schieke, S.M., Phillips, D., McCoy, J.P., Aponte, A.M., Shen, R.F., Balaban, R.S. & Finkel, T. (2006). The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J. Biol. Chem.*, 281: 27643–27652.
- Schienenbein, M., Franke, K. & Gruler, H. (1994). Random walk and directed movement: comparison between inert particles and self-organized molecular machines. *Phys. Rev.*, 49-6.
- Schiffer, I.B., Gebhard, S., Heimerdinger, C.K., Heling, A., Hast, J., Wollscheid, U., Seliger, B., Tanner, B., Gilbert, S., Beckers, T., Baasner, S., Brenner, W., Spangenberg, C., Prawitt, D., Trost, T., Schreiber, W.G., Zabel, B., Thelen, M., Lehr, H.A., Oesch, F. & Hengstler, J.G. (2003). Switching off HER-2/neu in a tetracycline-controlled mouse tumor model leads to apoptosis and tumor-size-dependent remission. *Cancer Res.*, 63: 7221–7231.
- Schrooten, J. (s.d.) Tissue Engineering [on line]. GBE Beschikbaar op: <http://www.tissue-engineering.be> [datum van opzoeking: 29/03/2008].
- Schwarz, U.S., Balaban, N.Q., Rivelino, D., Bershadsky, A., Geiger, B. & Safran, S.A. (2002). Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization. *Biophys. J.*, 83: 1380–1394.
- Schweitzer, B.L. & DeKoter, R.P. (2004). Analysis of gene expression and Ig transcription in PU.1/Spi-B-deficient progenitor B cell lines. *J. Immunol.*, 172: 144–154.

- Semenza, G.L., Artemov, D., Bedi, A., Bhujwala, Z., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Ravi, R., Simons, J., Taghavi, P. & Zhong, H. (2001). 'The metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis Found. Symp.*, 240: 251–260.
- Sen, C. (2003). Too much oxygen on the cell biology bench? New study suggests so [on line]. Wagner, H. Beschikbaar op: <http://researchnews.osu.edu/archive/toxico2.htm> [datum van opzoeking: 28/01/2008].
- Shaw, R.J. (2006). Glucose metabolism and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 18: 598–608.
- Sherratt, J.A. & Chaplain, M.A. (2001). A new mathematical model for avascular tumour growth. *J. Math. Biol.*, 43: 291–312.
- Sherratt, J.A. & Nowak, M.A. (1992). Oncogenes, anti-oncogenes and the immune response to cancer: a mathematical model. *Proc. Biol. Sci.*, 248: 261–271.
- Shraiman, B.I. (2005). Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 3318–3323.
- Simpson, K.H., Bowden, M.G., Hk, M. & Anvari, B. (2002). Measurement of adhesive forces between S. epidermidis and fibronectin-coated surfaces using optical tweezers. *Lasers Surg Med*, 31: 45–52.
- Sittinger, M, Hutmacher, D., Risbud, M. & Loch, A. (2004). Tissue Engineering Pages [on line]. Sittinger, M., Hutmacher, D., Risbud, M. & Loch, A. Beschikbaar op: <http://www.tissue-engineering.net/> [datum van opzoeking: 29/03/2008].
- Sjaastad, M.D. & Nelson, J. (1996). Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium. *Bioessays*, 19: 47–55.
- Smallbone, K., Gavaghan, D.J., Gatenby, R.A. & Maini, P.K. (2005). The role of acidity in solid tumour growth and invasion. *J. Theor. Biol.*, 235: 476–484.
- Smolle, J. & Stettner, H. (1993). Computer simulation of tumour cell invasion by a stochastic growth model. *J. Theor. Biol.*, 160: 63–72.
- Starovoitov, V.S. & Dzhagarov, B.M. (2003). A diffusion-based approach to geminate recombination of heme proteins with small ligands. *Chem. Phys.*, 292: 1–10.

- Stevenson, B.R. & Goodenough, D.A. (1984). Zonulae occludentes in junctional complex-enriched fractions from mouse liver: preliminary morphological and biochemical characterization. *J. Cell Biol.*, 98: 1209–1221.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S. & Goodenough, D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.*, 103: 755–766.
- Stossel, T.P. (1993). On the crawling of animal cells. *Science*, 260: 1086–1094.
- Stott, E., Britton, N., Glazier, J. & Zajac, M. (1999). Stochastic simulation of benign avascular tumour growth using the Potts model. *Math. Comput. Modelling*, 30: 183–198.
- Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R. & Mitchison, T.J. (2003). Dissecting Temporal and Spatial Control of Cytokinesis with a Myosin II Inhibitor. *Science*, 299: 1743–1747.
- Straight, A.F. & Field, C.M. (2000). Microtubules, membranes and cytokinesis. *Curr. Biol.*, 10-R760-R770.
- Stupack, D.G. & Chersesh, D.A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell. Sci.*, 115: 3729–3738.
- van Suijlekom, G.P. (2006). Trehalose accumulation and the Hxt5-Tps1 complex in *Saccharomyces cerevisiae*. Doctoraatsthesis, Universiteit Utrecht.
- Sulic, S., Panic, L., Dikic, I. & Volarevic, S. (2005). Deregulation of Cell Growth and Malignant Transformation. *Croat. Med. J.*, 46-4: 622–638.
- Sutherland, R.M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*, 140: 177–184.
- Thomlinson, R.H. & Gray, L.H. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br. J. Cancer*, 9: 539–549.
- Tijskens, E., Ramon, H. & De Baerdemaeker, J. (2003). Discrete element modelling for process simulation in agriculture. *J. Sound Vib.*, 266: 493–514.
- Tokunaga, C., Yoshino, K. & Yonezawa, K. (2004). mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313: 443–446.

- Toner, John & Tu, Yuhai (1998). Flocks, herds, and schools: A quantitative theory of flocking. *Phys. Rev. E*, 58-4: 4828–4858.
- Tracqui, P. (1995). From passive diffusion to active cellular migration in mathematical models of tumour invasion. *Acta Biotheor.*, 43: 443–464.
- Venkatasubramanian, R., Henson, M.A. & Forbes, N.S. (2006). Incorporating energy metabolism into a growth model of multicellular tumor spheroids. *J. Theor. Biol.*, 242: 440–453.
- Vermes, I. (2002). Apoptose en bio-engineering: er is leven na de dood. *Ned. Tijdschr. Klin. Chem.*, 27: 207–218.
- Wagner, H. (2008). What is cancer? [on line]. Wagner, H. Beschikbaar op: <http://www.yourcancertoday.com/WhatIsCancer.aspx> [datum van opzoeking: 25/03/2008].
- Walenta, S., Salameh, A., Lyng, H., Evensen, J.F., Mitze, M., Rofstad, E.K. & Müller-Klieser, W. (1997). Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am. J. Pathol.*, 150: 409–415.
- Walenta, S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfor, K., Rofstad, E.K. & Müller-Klieser, W. (2000). High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.*, 60: 916–921.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123: 309–314.
- Warchol, M.E. (2002). Cell density and N-cadherin interactions regulate cell proliferation in the sensory epithelia of the inner ear. *J. Neurosci.*, 22: 2607–2616.
- Ward, J.P. & King, J.R. (1997). Mathematical modelling of avascular-tumour growth. *IMA J. Math. Appl. Med. Biol.*, 14: 39–69.
- Ward, J.P. & King, J.R. (1999). Mathematical modelling of avascular-tumour growth. II: Modelling growth saturation. *IMA J. Math. Appl. Med. Biol.*, 16: 171–211.
- Ward, J.P. & King, J.R. (2003). Mathematical modelling of drug transport in tumour multicell spheroids and monolayer cultures. *Math. Biosci.*, 181: 177–207.

- Weil, M., Jacobson, M.D., Coles, H.S., Davies, T.J., Gardner, R.L., Raff, K.D. & Raff, M.C. (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell Biol.*, 133: 1053–1059.
- Weinberg, R. (2007). *The biology of cancer*. Garland Science, New York & Oxford, 864 p.
- Weiss, L. (1965). Studies on cell deformability. I. Effect of surface charge. *J. Cell Biol.*, 26: 735–739.
- Wicha, M.S., Liotta, L.A., Vonderhaar, B.K. & Kidwell, W.R. (1980). Effects of inhibition of basement membrane collagen deposition on rat mammary gland development. *Dev. Biol.*, 80: 253–256.
- Williams, D.M., Grubbs, B.G., Park-Snyder, S., Rank, R.G. & Bonewald, L.F. (1996). Activation of latent transforming growth factor beta during Chlamydia trachomatis-induced murine pneumonia. *Res. Microbiol.*, 147: 251–262.
- Zandstra, P.W., Conneally, E., Petzer, A.L., Piret, J.M. & Eaves, C.J. (1997). Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94: 4698–4703.
- Zhang, X., Chen, A., Leon, D., Li, H., Noiri, E., Moy, V. & Goligorsky, M. (2004). Atomic forcemicroscopy measurement of leukocyte-endothelial interaction. *Am. J. Physiol. HeartCirc. Physiol.*, 286: H359.