



***Het beschermende effect van heat shock proteïnen  
in functie van celproliferatie tijdens  
cadmiumblootstelling in *Macrostomum lignano****

**Chayenne Saeren**

promotor :  
dr. Karen SMEETS

co-promotor :  
Prof. dr. Tom ARTOIS

# Inhoudstabel

Lijst met afkortingen .....	i
Samenvatting.....	ii
1 Inleiding.....	1
1.1 Cadmium .....	1
1.1.1 Cadmium in de omgeving .....	1
1.1.2 Cadmiumtoxiciteit .....	1
1.1.3 Cellulaire en moleculaire effecten van cadmium.....	1
1.2 Heat shock proteïnen .....	2
1.2.1 Algemene functies van heat shock proteïnen.....	2
1.2.2 Expressie van heat shock proteïnen tijdens normale fysiologische condities en tijdens stress .....	3
1.2.3 De Heat shock respons .....	3
1.2.4 Heat shock proteïnen tijdens cadmiumstress.....	4
1.3 Het modelorganisme: <i>Macrostomum lignano</i> .....	5
1.3.1 <i>Phylum</i> , uiterlijke kenmerken en model organisme .....	5
1.3.2 <i>Neoblasten</i> .....	6
1.4 Doelstelling thesis.....	6
1.5 Nut van dit onderzoek .....	7
2. Materiaal en methoden .....	8
2.1 Cultuur .....	8
2.2 RNA interferentie .....	8
2.3 Experimentele opzet .....	9
2.4 Genexpressie .....	10
2.4.1 RNA extractie.....	10
2.4.2 Concentratie- en zuiverheidsbepaling van het geïsoleerde RNA .....	10
2.4.3 cDNA aanmaak.....	10

2.4.4 Real-time PCR .....	10
2.5 Mitosekleuring.....	12
2.6 Microscopie .....	13
2.6.1 Micro- en macroscopische effecten .....	13
2.7 Statistische analyse .....	14
3. Resultaten .....	15
3.1 Effecten van HSP downregulatie op stamcellen tijdens cadmiumblootstelling.....	15
3.2 Effecten van HSP knock down tijdens cadmiumstress op het organisme en op ultrastructureel niveau .....	16
3.2.1 Micro- en macroscopische effecten van HSP60 of HSP90 downregulatie tijdens cadmiumblootstelling .....	16
3.2.2 Ultrastructurele analyse van epidermis en neoplasten in <i>M. lignano</i> .....	17
3.3 Effecten van HSP downregulatie tijdens cadmiumblootstelling op de genexpressie .....	22
3.3.1 Voorbehandeling met HSP60 RNAi .....	22
3.3.2 Voorbehandeling met HSP90 RNAi .....	25
4 Discussie .....	27
4.1 Stamcelgerelateerde effecten na HSP downregulatie .....	27
4.2 Morfologische en fysiologische effecten na HSP downregulatie .....	29
4.3 Moleculaire effecten .....	29
Conclusie .....	32
Dankwoord .....	34
Referenties .....	35

## Lijst met afkortingen

ASW	artificieel zeewater
$\beta$ -act	$\beta$ -actine
BSA	bovine serum albumine
Casp3	caspase 3
Cat	catalase
Cd	cadmium
Cdc2	cell division cycle protein 2
Cdc37	cell division cycle protein 37
CdCl <sub>2</sub>	cadmiumchloride
CuZnSOD	koper-zink superoxide dismutase
GADPH	glyceraldehyde-3-fosfaat dehydrogenase
Gm2AP	Gm2 activator proteïne
GPx	glutathion peroxidase
GSH	glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	waterstofperoxide
HSE	heat shock element
HSF	heat shock factor
HSP60	heat shock proteïne 60
HSP70	heat shock proteïne 70
HSP90	heat shock proteïne 90
HSR	heat shock respons
IARC	International Agency for Research on Cancer
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MnSOD	mangaan superoxide dismutase
O <sub>2</sub> '	superoxide
OH'	hydroxylradicaal
P53d	p53 dependent
PBS	phosphate buffered saline
PCDi	programmed cell death interacting
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
Piwi	P-element induced wimpy testis
Pum	pumilio
Rab	ras-like protein in brain
Ran	ras-like nuclear protein
Ras	rat sarcoma gen
ROS	reactive oxygen species
RNA	ribo nucleïnezuur
RNAi	RNA interferentie
Rpl13a	ribosomal protein L13a
TEM	transmissie elektronen microscopie

## Samenvatting

De platworm *Macrostomum lignano* beschikt over een buitengewoon stamcelsysteem waardoor dit organisme een enorme regeneratie capaciteit heeft. Heat shock proteïnen (HSPn) zijn betrokken bij de bescherming van cellen zowel tijdens normale omstandigheden als tijdens stresssituaties. Preliminaire data hebben aangetoond dat verschillende leden van deze HSPn tot expressie komen in de stamcelactieve gebieden van *M. lignano* en dat de transcriptie van deze proteïnen toeneemt tijdens cadmiumstress. Dit leidt tot de hypothese dat de heat shock proteïnen een belangrijk beschermingsmechanisme zijn van de stamcellen (neoblasten) tijdens cadmiumstress.

De rol van zowel HSP60 als HSP90 wordt in deze studie onderzocht met behulp van RNAi technieken. De effecten van HSP60 en HSP90 downregulatie tijdens cadmiumstress werden nagegaan op het niveau van het organisme, op cellulair en moleculair niveau.

Het silencen van deze heat shock proteïnen heeft geen invloed op de oppervlakte en mogelijkheid tot voortplanting van *M. lignano* zowel in controle omstandigheden als tijdens cadmiumblootstelling. Ook op cellulair niveau blijft de ultrastructuur van epidermis en neoblasten onaangetast in RNAi-onbehandelde dieren. Verschillen waren merkbaar in het aantal mitotische stamcellen, dat sterk afneemt neemt tijdens silencing van de heat shock proteïnen. Bovendien kwamen deze mitoses enkel nog voor in de gonaden. Cadmium gaf op deze parameters geen extra effecten.

Op moleculair niveau wordt de genexpressie van verschillende genen (stamcelgenen, antioxidatieve genen, celcyclus gerelateerde genen, apoptotische genen en tumor gerelateerde genen) nagegaan tijdens downregulatie van HSP60 of HSP90 en cadmiumstress. Vooral de upregulatie van HSP70 expressie springt hierbij in het oog. Na HSP90 downregulatie manifesteren de meeste effecten zich na blootstelling aan hoge cadmiumconcentraties, waarbij de genexpressie van nagenoeg alle onderzochte genen afneemt. Downregulatie van HSP60 heeft daarentegen de meeste invloed op de transcriptie van andere genen tijdens controle omstandigheden.

Samengevat kan worden besloten dat dit project bijdraagt tot het beter begrijpen van de manier waarop schadelijke elementen zoals cadmium zich gedragen. Door de effecten van deze stressfactor op neoblasten te onderzoeken, draagt deze studie eveneens bij tot het verwerven van inzichten in de manier waarop stamcellen zich gedragen tijdens stress.

# 1 Inleiding

## 1.1 Cadmium

### 1.1.1 Cadmium in de omgeving

Sinds de Industriële Revolutie is er een wereldwijde toename van pollutanten, zoals zware metalen, in het milieu. Dit fenomeen is voornamelijk te wijten aan de intensivering van antropogene activiteiten. Het zware metaal cadmium (Cd) komt hoofdzakelijk in de omgeving terecht door industriële activiteiten zoals de non-ferro industrie, door de verbranding van afval en door het gebruik van meststoffen in de landbouw [1, 2, 3, 4]. Hiernaast leveren ook natuurlijke bronnen zoals vulkaanuitbarstingen en bosbranden een geringe bijdrage tot de stijgende cadmiumconcentraties in het milieu.

### 1.1.2 Cadmiumtoxiciteit

Het niet-essentiële element cadmium is persistent en oefent al bij lage concentraties een bijzondere negatieve impact op mens en milieu uit [1, 3, 4]. Bij de mens veroorzaakt blootstelling aan cadmium schade aan verscheidene organen. De lever en de nieren, de primaire organen betrokken bij het elimineren van cadmium, zijn zeer gevoelig voor de toxische effecten van cadmium. Tevens worden ook de botten door dit element aangetast waarvan bij blootstelling aan hoge concentraties de itai-itai ziekte het bekendste voorbeeld is [1, 4, 5]. Blootstelling aan cadmium kan ook leiden tot het ontstaan van kanker en dit metaal werd in 1993 dan ook geclassificeerd door het IARC (International Agency for Research on Cancer) als carcinogeen type I [6]. Mensen worden overwegend via twee belangrijke bronnen aan dit zware metaal blootgesteld: via inhalatie van sigarettenrook of gecontamineerd huisstof en via ingestie van gecontamineerd voedsel [3, 4, 7]. Een deel van het vrijgekomen cadmium komt bovendien terecht in water en sedimenten waar een brede waaier aan organismen leeft [1, 3, 8, 9].

### 1.1.3 Cellulaire en moleculaire effecten van cadmium

Op cellulair niveau interageert cadmium met biomoleculen zoals proteïnen en nucleïnezuren, heeft het een effect op enzymactiviteiten en veroorzaakt het wijzigingen in de membraanpermeabiliteit [10]. De mechanismen die betrokken zijn bij cadmiumtoxiciteit kunnen voornamelijk verklaard worden door de moleculaire interacties die ontstaan tussen de cadmium ionen en verscheidene sulfhydryl bevattende moleculen en de vervanging van essentiële zware metaalionen in biomoleculen (vb. zink) [4, 11, 12, 13]. Het element lijkt op  $\text{Ca}^{2+}$  (calcium) in termen van chemische kenmerken, lading en ion radius en kan hierdoor interfereren met talrijke biologische en chemische processen [14]. Een ander belangrijk cellulair mechanisme dat betrokken is bij de cadmiumtoxiciteit is oxidatieve stress [5, 12]. Oxidatieve stress is een verstoring in het evenwicht tussen de concentraties van pro-oxidanten, zoals ROS (reactive oxygen species) en de antioxidante verdedigingsmechanismen. De cellulaire redoxomgeving speelt een belangrijke rol bij celfuncties, waaronder regulatie van proliferatie, differentiatie en celdood [8, 9, 15, 16]. Cadmium is in staat om een verhoging van ROS moleculen te genereren waaronder waterstofperoxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxide ion ( $\text{O}_2^\bullet$ ) en hydroxylradicalen  $\text{OH}^\bullet$  [5, 12]. De inductie van deze oxidatieve stress gebeurt via indirecte processen. De balans kan uit evenwicht gebracht worden door een afname van cellulaire antioxidanten of een stijging van het aantal pro-oxidanten [3, 5, 8, 12]. Een stijging kan ontstaan door een toename van pro-oxidante enzymen zoals NADPH oxidasen en lipoxygenasen, maar ook door

een verstoring in het elektronentransport. Dit laatste kan er namelijk voor zorgen dat de concentratie van ROS moleculen verhoogd wordt. Als gevolg van oxidatieve stress komt de normale intracellulaire gereduceerde omgeving in het gedrang wat leidt tot oxidatie van vitale proteïnen en DNA. Proteïnen kunnen snel hun conformatie verliezen en worden verkeerd gevouwen. Dit resulteert uiteindelijk in het falen van de normale celfunctie. Ook kan oxidatieve stress leiden tot activatie van verschillende signalisatiepathways die leiden tot onder andere celdeling en herstel [5, 12]. Om de balans terug te kunnen herstellen treedt er een antioxidatieve reactie op waarbij verscheidene enzymen en metabolieten betrokken zijn. Een voorbeeld hiervan is glutathion (GSH). GSH is een belangrijke intracellulaire antioxidant en is betrokken bij de eerste lijnsverdediging tegen oxidatieve stress [8]. Bij reductie van GSH is er een overproductie van oxidante moleculen die verantwoordelijk zijn voor een belangrijk deel van de DNA schade, de peroxidatie van lipiden, maar ook voor het ontstaan van verkeerd gevouwen proteïnen [3, 9]. Om de cadmium geïnduceerde schade tegen te gaan, induceren de cellen de transcriptie van genen die coderen voor verdediging en herstelproteïnen [3, 17]. Daarenboven heeft cadmium ook een invloed op de expressieniveaus van verschillende stressgevoelige proteïnen zoals heat shock proteïnen (HSP) en antioxidatieve enzymen [3, 12, 17]. Voornamelijk de denaturatie en oxidatie van proteïnen door cadmium is verantwoordelijk voor de overexpressie van HSP chaperonen [12].

## 1.2 Heat shock proteïnen

De heat shock proteïnen (HSPn) werden voor het eerst beschreven in 1962, nadat Ritossa aantoonde dat hitte stress bepaalde proteïnen induceert in *Drosophila melanogaster* [18]. Sindsdien is de heat shock respons een goed bestudeerd biologisch fenomeen dat alomtegenwoordig is in alle levende cellen en organismen. Bovendien zijn de HSPn sterk geconserveerde proteïnen die een zeer lage variatie tussen soorten vertonen. Hierdoor kan gesuggereerd worden dat ze een belangrijke functie hebben in fundamentele cellulaire processen [19, 20, 21, 22]. Tijdens stress omstandigheden, zoals oxidatieve stress, neemt de inductie van deze proteïnen sterk toe [3, 16, 17]. HSPn worden ingedeeld in subfamilies naargelang hun moleculair gewicht in kilodalton (kDa), zoals kleine HSPn (<30kDa), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 en HSP110 [16, 19, 23].

### 1.2.1 Algemene functies van heat shock proteïnen

De meeste HSPn functioneren als moleculaire chaperonen en zijn dan ook betrokken bij de huishoudfuncties van de cel. Dit gebeurt door middel van het correct vouwen van andere cellulaire proteïnen na de translatie, het migreren naar hun plaats in de cel waar ze verblijven en zullen functioneren en het assembleren in de kwaternaire structuur. Sommige HSPn nemen ook deel aan de degradatie van andere polypeptiden. Dit vindt plaats wanneer deze polypeptiden zo sterk gedegradieerd zijn dat ze niet meer hersteld kunnen worden en een serieuze bedreiging in de cel vormen als ze zouden aggregaten [15, 16, 19, 20, 23, 24, 25]. Deze taken zijn essentieel tijdens normale cellulaire condities, maar de nood ervoor neemt toe tijdens stress omstandigheden als gevolg van verhoogde aanwezigheid van proteïnen met een verkeerde structuur [19, 26]. De heat shock proteïnen worden vaak geassisteerd door andere proteïnen tijdens het uitoefenen van hun functie, namelijk de co-chaperonen. De grote chaperonen hebben een sterk gelimiteerde cliënt selectiviteit, maar de co-chaperonen die ermee geassocieerd worden bieden deze specificiteit. Het zijn namelijk de co-chaperonen van de HSPn die de conformatie en de activiteiten van de cliënt



proteïnen beïnvloeden. Ze spelen dan ook een belangrijke rol bij het beslissen over het lot van de misgevouwen proteïnen [24].

Leden van de HSP familie kunnen ook op verschillende niveaus interageren met de apoptotische pathways [16]. De functie van de HSPn is hier tweezijdig, ze kunnen anti-apoptotisch werken, waardoor de cellen overleven, en pro-apoptotisch, waardoor sterk beschadigde cellen verwijderd kunnen worden [16, 27].

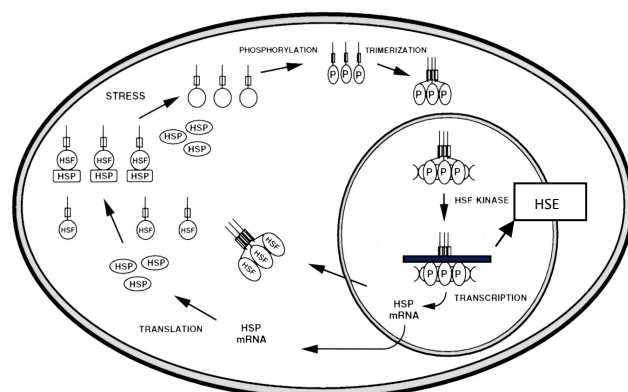
### 1.2.2 Expressie van heat shock proteïnen tijdens normale fysiologische condities en tijdens stress

Het is aangetoond dat de heat shock proteïnen van belang zijn onder normale fysiologische condities zoals celdifferentiatie en regulatie van de celcyclus [16, 19, 21, 22, 28]. Daarnaast spelen HSPn een vooraanstaande rol bij de respons van cellen op een breed gamma van stresscondities die zowel extrinsiek (vb. omgeving) als intrinsiek (vb. genetische stress) van aard kunnen zijn [19]. Een extrinsieke stressor kan van verschillende types zijn: zowel fysisch waaronder vb. temperatuursveranderingen en hypoxie als chemisch zoals zware metalen [16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 29]. Wanneer cellen onderhevig zijn aan stress zoals oxidatieve stress, is er een zeer snelle inductie van de HSP genen waar te nemen [16, 19, 20, 22, 23, 24, 28]. Dit wordt mogelijk gemaakt doordat de HSP genen geen intronen bevatten, waardoor posttranscriptionele modificaties overbodig zijn. De afwezigheid van intronen laat ook een efficiënte transcriptie van de HSP genen toe aangezien de splicing processen geïnhibeerd zouden kunnen worden onder stress condities [22, 23].

### 1.2.3 De Heat shock respons

Zoals hierboven vermeld, nemen de heat shock proteïnen sterk toe tijdens stresssituaties. Deze algemene, gecoördineerde activatie van de HSP expressie wordt de heat shock respons (HSR) genoemd [16]. De aanwezigheid van misgevouwen proteïnen kan ervoor zorgen dat de HSR geïnduceerd wordt via activatie van de heat shock transcriptiefactoren (HSFn) [16, 20].

Tijdens normale omstandigheden binden HSPn aan monomere HSFn waardoor deze inactief zijn [16, 20] (figuur 1). Tijdens stress worden de HSFn gescheiden van de HSPn en kunnen ze gefosforyleerd worden door proteïne kinasen zoals MAPKs (mitogen activated protein kinases) [16, 20]. Vervolgens vormen deze HSFn homotrimeren en verplaatsen ze naar de nucleus waar ze de transcriptie van HSPn kunnen activeren [16, 20]. Dit gebeurt doordat ze binden aan de heat shock elements (HSEs) die zich in de promotor regio van de HSP genen bevinden [20, 30]. Vervolgens vormen de heat shock proteïnen een "schuilplaats" waarin de proteïnen terecht kunnen totdat ze correct gevouwen zijn. Zo kan onder andere aggregatie van gedeneureerde proteïnen voorkomen worden [16].



**Figuur 1:** Activatie van de heat shock proteïnen [Figuur aangepast uit Kiang J.G. and Tsokos G.C., 1998].

#### 1.2.4 Heat shock proteïnen tijdens cadmiumstress

Cadmium kan leiden tot oxidatieve stress al dan niet via inductie van MAPK. Vervolgens kan dit op zijn beurt de HSR aanschakelen [30]. Oxidatieve stress leidt tot oxidatie van vitale proteïnen en DNA en tot activatie van de apoptotische of inflammatoire pathways. Bescherming hiertegen gebeurt onder meer door de HSPn, die daarom vaak beschouwd worden als vroege merkers van oxidatieve stress [15, 16, 29]. Deze proteïnen kunnen ter bescherming van de cel ingrijpen. Ten eerste zijn ze efficiënt in het detecteren van redoxveranderingen in de intracellulaire omgeving en beschermen ze tegen proteïnen misvouwing. Daarenboven kunnen HSPn antioxidante enzymen beschermen door te functioneren als chaperon en kunnen ze de activiteit van bepaalde enzymen zoals glutathion peroxidase (GPx) en glutathion reductase moduleren [15, 27]. Vervolgens zijn de HSPn ook in staat om in te grijpen in apoptotische pathways, bijvoorbeeld door de vrijlating van cytochroom c uit de mitochondriën te inhiberen. Tot slot hebben HSPn ook anti-inflammatoire werkingen die onder andere gemedieerd worden door de inhibitie van NFκB [16].

In deze thesis worden HSP60 en HSP90 tijdens cadmiumstress bestudeerd. Het is geweten dat deze twee families van heat shock proteïnen en ook HSP70 beïnvloed worden door cadmium [3, 17, 30]. Zoals eerder aangehaald is het hun taak om de functie van verscheidene proteïne complexen te beschermen, te behouden en te herstellen. Families van heat shock proteïnen hebben elk hun eigen functie, maar ze kunnen ook onderling samenwerken. Een voorbeeld hiervan is dat HSP70 chaperonen nieuw gesynthetiseerde, ongevouwen proteïnen doorgeven naar leden van de HSP60 familie wat uiteindelijk leidt tot gevouwen proteïnen [20]. De specifieke functies van de verschillende HSPn worden hieronder meer in detail beschreven.

#### Heat shock proteïne 60

De voornaamste functie van HSP60 is helpen bij het vouwen van proteïnen in hun mature vorm [20, 26]. Hiervoor werken ze voornamelijk samen met hun co-chaperonine, HSP10. HSP60 is voornamelijk terug te vinden in de mitochondriën en oefent in deze celorganellen zijn functie uit [20, 27]. De leden van de HSP60 familie worden dan ook beschouwd als moleculaire chaperonen [20, 26]. Om deze taak te kunnen volbrengen is er ATP (adenosinetriphosfaat) nodig [26]. Daarnaast werken HSP60 pro-apoptotisch, waardoor cellen met ernstig beschadigde proteïnen verwijderd kunnen worden [27].

#### Heat shock proteïne 70

HSP70 zijn vaak bestudeerde heat shock proteïnen mede doordat ze sterk induceerbaar zijn tijdens stress [17]. Ze zijn, net zoals HSP60, ATP afhankelijk en komen op verschillende plaatsen in de cel voor, zoals in de nucleus, het cytosol, de mitochondriën en het ER (endoplasmatisch reticulum) [20, 27]. Leden van de HSP70 familie behoren onder andere tot de moleculaire chaperonen. Hiernaast dragen ze bij tot de kwaliteitscontrole van proteïnen door afwijkende proteïnen te selecteren en naar het lysosoom of proteasoom te dirigeren. Op die manier dragen ze bij tot de cytoprotectie [16, 20, 30]. Deze familie van heat shock proteïnen is daarenboven ook betrokken bij het transport en de import van proteïnen in celorganellen [20, 30]. Een laatste functie van deze heat shock proteïnen is dat ze anti-apoptotisch kunnen werken, waardoor cellen overleven [27].

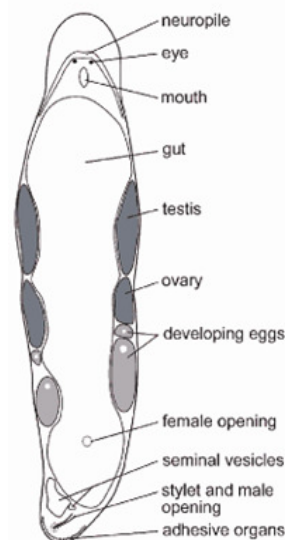
## Heat shock proteïne 90

HSP90 zijn op verschillende plaatsen in de cel gelokaliseerd, namelijk in de nucleus, het cytosol, het endoplasmatisch reticulum en de mitochondriën [20, 25, 27]. Evenals HSP60 en HSP70 zijn ze ATP afhankelijk [25]. HSP90 complexeert met verscheidene cellulaire proteïnen, waarvan de glucocorticoid receptoren en proteïne kinasen de meest bestudeerde zijn. HSP90 bindt aan de glucocorticoid receptoren om deze te stabiliseren in het cytosol. Door binding aan HSP90 worden ze in een inactieve conformatie gehouden totdat ze geactiveerd worden door een hormoon [20, 27]. Verscheidene kinasen vormen ook transiënte complexen met dit heat shock proteïne [25, 31]. Bij het recruteren van proteïne kinasen naar het HSP90 systeem speelt de co-chaperon cdc37 een belangrijke rol. Cdc37 draagt namelijk bij tot proteïne kinase activatie door deze enzymen te targetten naar de HSP90-chaperon machinerie [25, 31]. Daarenboven is HSP90 betrokken bij fundamentele cellulaire processen zoals controle van de celcyclus en speelt het een rol bij de degradatie van substraten [16, 25]. Tot slot werkt HSP90 ook nog anti-apoptotisch [27].

## 1.3 Het modelorganisme: *Macrostomum lignano*

### 1.3.1 Phylum, uiterlijke kenmerken en model organisme

*Macromstomum lignano* is een vrijlevende platworm (Turbellaria) en behoort tot de Macrostromorpha, het meest basale subtaxon van de Platyhelminthes-Rhabditophora [32, 33, 34]. *M. lignano* is hermafrodit en plant zich uitsluitend seksueel voort. Ze zijn symmetrisch en bevatten een gecilieerde epidermis, een primitief zenuwstelsel en gepaarde testes en ovaria [32] (figuur 2).



**Figuur 2:** Een adulte *M. lignano* met zijn belangrijkste ultrastructurele kenmerken [35].

Het modelorganisme *M. lignano* beschikt over verschillende kenmerken die ervoor zorgen dat ze toegankelijke en nuttige studieobjecten zijn. Ze zijn slechts opgebouwd uit  $\pm 25000$  cellen en door hun kleine gestalte kunnen ze gemakkelijk in grote aantallen gekweekt worden [32]. Ze zijn eileggend en hebben een relatief korte generatietijd (drie weken), waardoor dieren met gelijke leeftijd geselecteerd kunnen worden om zo het effect van leeftijd in experimenten uit te sluiten. Bovendien

zijn deze organismen transparant waardoor alle belangrijke weefsels en orgaansysteem makkelijk geobserveerd kunnen worden met behulp van onder meer lichtmicroscopie [32, 36]. Tot slot zijn ze, zoals vele platwormen, het meest gekend om hun enorme regeneratie capaciteit die toe te schrijven is aan hun uniek stamcelsysteem [32, 33, 34, 37, 38].

### 1.3.2 Neoblasten

Het uniek stamcelsysteem van platwormen is opgebouwd uit totipotente, somatische stamcellen, ook neoblasten genoemd [33, 34, 38, 39]. Stamcellen zijn ongedifferentieerde cellen die in staat zijn om zichzelf te vernieuwen en te differentiëren [39]. Totipotente stamcellen kunnen differentiëren in elk celtype in het organisme, kortom in zowel somatische cellen als kiemcellen [39]. Deze neoblasten zijn de enige delende cellen in de volwassen platwormen en zijn dan ook verantwoordelijk voor groei, weefselhomeostase en regeneratie [32, 33, 34, 38, 39]. Het zijn kleine cellen, met een hoog nucleus/cytoplasma ratio [37]. Ze komen voornamelijk in twee laterale banden voor en anterior van de ogen komen ze bijna niet voor [33, 34, 39].

De neoblasten zijn zeer robuuste cellen die goed bestand zijn tegen stress zoals bestraling [36]. Voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat langdurige of intense stress uiteindelijk een invloed heeft op deze stamcellen. Tijdens een uithongeringstudie werd een sterke reductie van mitotische activiteit waargenomen en nam de omvang van de gonaden af [33]. Bij de planaria *Polycelis felina* werd aangetoond dat een hoge blootstelling aan cadmium een negatief effect heeft op de mitotische activiteit van de neoblasten tijdens het herstel na de blootstelling [9]. Deze afname in mitotische activiteit ging gepaard met verscheidene mitotische en chromosomale abnormaliteiten [9]. Bovendien is ook aangetoond dat de HSP genen tot expressie komen in stamcelactieve gebieden en dat de HSPn essentieel zijn voor het behoud van functionele neoblasten [persoonlijke communicatie M. Plusquin, 22, 28, 36]. De HSPn stellen de neoblasten onder andere in staat om celdood te vermijden doordat ze het p53 proteïne onder controle houden [28]. Bovendien hebben preliminaire data aangetoond dat de expressie van de HSPn verhoogd is tijdens cadmiumstress [persoonlijke communicatie M. Plusquin, 36]. Door dit voorgaand onderzoek wordt verwacht dat deze HSPn een belangrijke rol spelen in de neoblasten tijdens cadmiumstress in *M. lignano* en dat ze betrokken zijn bij cadmiumtoxiciteit.

## 1.4 Doelstelling thesis

Het belang van de HSPn in de neoblasten tijdens cadmiumstress wordt onderzocht met behulp van RNA interferentie (RNAi). RNAi is een techniek om de expressie van endogene genen te reduceren op een sequentie specifieke manier [38]. Deze techniek is zeer eenvoudig toe te passen op *M. lignano* doordat deze organismen de RNAi probes via hun epidermis opnemen [38]. In dit project zal RNAi gebruikt worden om heat shock proteïnen te inhiberen, meer bepaald HSP60 en HSP90. Vervolgens zal er gekeken worden naar effecten op de neoblasten en op het organisme zelf tijdens cadmiumstress wanneer deze transcripten uitgeschakeld worden. De doelstellingen kunnen als volgt worden samengevat:

1. De mitotische activiteit van de neoblasten bestuderen tijdens het onderdrukken van HSP60 of HSP90 transcripten en aanwezigheid van CdCl<sub>2</sub> (cadmiumchloride).

2. Onderzoeken of er microscopische of ultrastructurele effecten zijn op de neoblasten, epidermis of *M. lignano* wanneer de HSP60 of HSP90 gen transcripten onderdrukt zijn en de organismen aan CdCl<sub>2</sub> blootgesteld worden.
3. De onderliggende moleculaire mechanismen nagaan door middel van genexpressie analyses. Hierbij worden de transcriptlevels van verscheidene genen zoals stamcel-, antioxidatieve, apoptotische, celcyclus en tumor gerelateerde genen nagegaan wanneer de wormen worden voorbehandeld met RNAi en blootgesteld aan cadmium.

### 1.5 Nut van dit onderzoek

Dit project heeft een toegevoegde waarde in het onderzoek naar cadmium, stamcellen en heat shock proteïnen.

De vervuiling van de aquatische omgeving door spoormetalen, waaronder cadmium is een wereldwijd probleem. Dit is voornamelijk te wijten aan de persistentie en blijvende accumulatie van deze metalen in de omgeving, hoofdzakelijk veroorzaakt door humane activiteiten. Dit project draagt bij tot het beter begrijpen van de manier waarop schadelijke elementen zoals cadmium zich gedragen en om mechanismen van oxidatieve stress te achterhalen.

Hiernaast hebben platwormen zoals *M. lignano* het potentieel om de kennis van de somatische stamcelbiologie uit te breiden en om huidige experimentele beperkingen te overwinnen. De neoblasten van *M. lignano* zijn namelijk essentiële cellen binnen dit organisme en zijn experimenteel relatief makkelijk toegankelijk. Doordat in deze studie het effect van de stressfactor cadmium op deze cellen nagegaan wordt, geeft dit ook meer inzichten in het gedrag van neoblasten tijdens stress omstandigheden.

Tot slot heeft deze studie implicaties voor onder andere biomonitoring. De expressie van HSPn neemt namelijk zeer snel toe na blootstelling aan verschillende stressfactoren. Dit gebeurt voordat er zichtbare negatieve effecten zijn. Hierdoor zouden deze proteïnen een goede vroege biomarker zijn waardoor ze onder andere nuttige info kunnen verlenen in verband met de algemene gezondheidstoestand van onder meer watergebieden [19, 29].

## 2. Materiaal en methoden

### 2.1 Cultuur

De vrijlevende platworm *M. lignano* (Platyhelminthes, Macrostomida) wordt in het laboratorium gekweekt in petriplaten gevuld met f/2 medium. Dit cultuurmedium bestaat uit artificieel zeewater (ASW) met een saliniteit van 32 ‰ (Wiegandt, Krefeld) en bevat per liter: 75 mg NaNO<sub>3</sub>, 5 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O en 25 mg Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (zouten); 4.36 mg C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 3.15 mg FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.18 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.01 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.02 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O en 0.01 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (essentiële zware metalen); 0.1 mg thiamine.HCl, 0.5 mg biotine en 0.5 mg vitamine B12 (vitaminen).

De platwormen worden *ad libitum* gevoed met de diatomee *Nitzschia curvilineata*. De kweekruimte omvat volgende gecontroleerde condities: een temperatuur van 20°C, een vochtigheid van 50 % en een 14/10u dag-/nachtcyclus.

### 2.2 RNA interferentie

HSP60 en HSP90 interferentie wordt uitgevoerd door de probes aan het medium, waarin *M. lignano* zich bevinden, toe te dienen. Het gebruikte protocol werd tijdens deze thesis door optimalisatie bereikt. Door een T7 RNA polymerase promotorsequentie aan de primers toe te voegen worden er twee verschillende templates voor de dsRNA probe gegenereerd: één met een T7 promotor aan het 5' einde ter productie van het sense RNA en de ander met de T7 promotor ter hoogte van het 3' uiteinde ter productie van anti-sense RNA. Volgende primersequenties (tabel 1 en tabel 2) en PCR condities worden hiervoor gebruikt:

**Tabel 1:** De primersequenties die gebruikt worden om dsRNA probes van HSP60 aan te maken. De sequenties zijn weergegeven in 5'-3' richting.

HSP60 anti-sense reverse	GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTT CCA ATT CGT CCT TGA
HSP60 anti-sense forward	AGC AAG AAT GTT CCG CTT TG
HSP60 sense reverse	GGT TTC CAA TTC GTC CTT GA
HSP60 sense forward	GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG CAA GAA TGT TCC GCT TTG

PCR protocol voor dsRNA probes van HSP60: 95°C voor 5 min, 10 cycli (40 sec op 95°C, 40 sec op 50°C, 1 min 30 op 72°C), 30 cycli (40 sec op 95°C, 40 sec op 65°C, 1 min 30 op 72°C), 10 min op 72°C

**Tabel 2:** De primersequenties die gebruikt worden om dsRNA probes van HSP90 aan te maken. De sequenties zijn weergegeven in 5'-3' richting.

HSP90 anti-sense reverse	GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT TGG ACA CGA CCA CCT TCT
HSP90 anti-sense forward	TCC GTG CTC TTC TGT TTG TG
HSP90 sense reverse	GTT GGA CAC GAC CAC CTT CT
HSP90 sense forward	GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTC CGT GCT CTT CTG TTT GTG

*PCR protocol voor dsRNA probes van HSP90:* 95°C voor 5 min, 10 cycli (40 sec op 95°C, 40 sec op 53°C, 1 min 30 op 72°C), 30 cycli (40 sec op 95°C, 40 sec op 69°C, 1 min 30 op 72°C), 10 min op 72°C

De PCR reacties worden uitgevoerd met behulp van de Illustra™PuReTaq™Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare) en de Eppendorf Mastercycler® gradient. De bekomen producten worden gecontroleerd aan de hand van gelelectroforese. Na de PCR reactie worden de sense en antisense stalen opgezuiverd met behulp van een proteïnase K behandeling (Proteïnase K 100 µg/ml, SDS 0,5%, mM Tris-HCl (pH 7,5) en 5 mM CaCl<sub>2</sub>) gevolgd door de QIAquick® PCR purification kit (Qiagen).

Vervolgens worden de dsRNA probes gegenereerd met behulp van een *in vitro* transcriptiesysteem, nl. T7 Ribomax™ Express RNAi System (Promega). De dsRNA probes worden verdund in ASW met de antibiotica Kanamycine en Ampicilline (beiden 50 µg/ml) (Sigma-Aldrich) tot de uiteindelijke concentratie van 20 ng (HSP60 3 weken RNAi + 24 uur 0, 10 en 50µM CdCl<sub>2</sub>) of 30 ng (HSP60 1 week RNAi + 24 uur 0, 10, 50, 100 en 250µM CdCl<sub>2</sub> en HSP90 1 week RNAi + 24 uur 0, 10, 50, 100 en 250µM CdCl<sub>2</sub>) bereikt wordt. De dieren worden in 24-well platen gehouden (10 dieren/well) waarin 250µl van de dsRNA oplossing zit en diatomeeën aanwezig zijn. De dsRNA oplossing wordt elke 24 uur vervangen.

### 2.3 Experimentele opzet

De dieren die gebruikt worden voor experimenten hebben dezelfde leeftijd van 3 weken na eilegging. Deze volwassen organismen worden per 10 in 24-well platen gehouden waar ze aan verschillende concentraties cadmium (0, 10, 50, 100 en 250µM CdCl<sub>2</sub>) en RNAi probes HSP60 of HSP90 (30 ng) blootgesteld worden. De probes worden gedurende 7 dagen toegediend en dagelijks ververs. Op dag 7 worden er verschillende cadmiumconcentraties (0, 10, 50, 100 of 250µM CdCl<sub>2</sub>) met probe toegevoegd gedurende 24 uur. In de controlegroepen worden de dieren gedurende 8 dagen aan 250µl ASW en de antibiotica Kanamycine en Ampicilline (beiden 50µg/ml) blootgesteld en op dag 7 gedurende 24 uur aan een cadmiumoplossing verdund in ASW (0, 10, 50, 100 en 250µM CdCl<sub>2</sub>). Tijdens alle experimenten worden ze *ad libitum* gevoed.

## 2.4 Genexpressie

Tijdens uitschakeling van HSP60 of HSP90 en blootstelling aan cadmium, wordt de genexpressie van stamcelgenen (pumilio, PCNA en piwi), antioxidatieve genen (CAT, CuZnSOD en MnSOD), heat shock proteïnen (HSP60, HSP90, HSP70), celcyclus gerelateerde genen (cdc2 en cdc37), apoptotische genen (casp3 en PCDi), tumor gerelateerde genen (p53d, rab15, ras7 en ran) en referentiegenen (cycline B,  $\beta$ -actine, Gm2AP, rlp13a en GAPDH) nagegaan met behulp van de real-time PCR.

De volwassen dieren bevinden zich in 24-well platen en worden hier aan verschillende concentraties cadmium (0, 10, 50, 100 en 250 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>) en RNAi probes HSP60 of HSP90 (30 ng) blootgesteld (zie 2.3 experimentele opzet). Er worden per conditie 6 stalen blootgesteld. Na 8 aantal dagen worden de wormen per well verzameld in een microcentrifuge buisje waarna het staal onmiddellijk bevroren word door het onder te dompelen in moleculaire stikstof (N<sub>2</sub>). De bevroren stalen worden in afwachting van de experimenten bewaard bij -70°C.

### 2.4.1 RNA extractie

Vervolgens wordt het RNA geïsoleerd met behulp van de RNeasy Mini Kit (Qiagen). Hierbij wordt gebruik gemaakt van selica membraan spin kolommen om het RNA te extraheren. Na chemische lysis met behulp van de RLT buffer (kitje) vindt ook een mechanische lysis plaats (extra toegevoegde stap) door glazen bolletjes aan de epjes met de wormen toe te voegen. Vervolgens worden deze epjes gedurende 1 minuut met een amplitude van 90 gemixt met behulp van de Mixer Mill (MM2000, Retsch).

### 2.4.2 Concentratie- en zuiverheidsbepaling van het geïsoleerde RNA

Om de opbrengst en zuiverheid van het geïsoleerde RNA te bepalen wordt het absorptiespectrum bepaald met behulp van de nanodrop spectrofotometer (ND-1000, Isogen Life Sciences). De concentratie van het RNA wordt gemeten bij een golflengte van 260nm. De zuiverheid van de stalen wordt gecontroleerd aan de hand van de ratio's van de golflengtes 260nm/280nm en 260nm/230nm.

### 2.4.3 cDNA aanmaak

Nadat het RNA geëxtraheerd is, kan er cDNA van gemaakt worden. Het gebruikte protocol bestaat uit twee algemene stappen, een genomisch DNA (gDNA) eliminatie en een reverse transcriptie stap, en wordt uitgevoerd met behulp van de BioRad iCycler. Tijdens de eerste stap wordt ervoor gezorgd dat van alle stalen een gelijke hoeveelheid RNA genomen BioRad iCyclerwordt. Het verwijderen van het overige gDNA gebeurt met behulp van de Ambion® TURBO DNA-free™ Kit (Applied biosystems). Hierbij zorgt het enzym Turbo DNase voor de afbraak van het DNA. Het RNA kan vervolgens vertaald worden in cDNA door middel van de high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied biosystems).

### 2.4.4 Real-time PCR

Kwantitatieve real-time PCR (Q-PCR) wordt uitgevoerd met behulp van de ABI Prism 7000 en de ABI Prism 7500 (Applied biosystems). Hiervoor wordt telkens gebruik gemaakt van de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied biosystems). De primers worden ontwikkeld met behulp van primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). De PCR amplificaties gebeuren in een totaal volume van 10  $\mu$ l. Dit wordt bekomen door 2,5  $\mu$ l cDNA staal, 5  $\mu$ l SYBR® Green PCR Master Mix, 0,3  $\mu$ l forward primer,



0,3 µl reverse primer en 1,9 µl nuclease-vrij H<sub>2</sub>O samen te voegen. De real-time PCR toestellen maken gebruik van onderstaande protocols.

PCR protocol ABIprism 7000:

- 20 sec op 95°C: activatie AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polymerase
  - 1 sec op 95°C: denaturatie van het cDNA
  - 20 sec op 60°C: annealing van de primers en extensie van het cDNA
  - Smeltcurve
- } 40 cycli

PCR protocol ABIprism 7500:

- 20 sec op 95°C: activatie AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polymerase
  - 3 sec op 95°C: denaturatie cDNA
  - 30 sec op 60°C: annealing van de primers en extensie van het cDNA
  - Smeltcurve
- } 40 cycli

De bekomen smeltcurves wordt telkens gecontroleerd op aanwezigheid van primer dimers. Wanneer deze voorkomen, worden de resultaten van het desbetreffende gen niet gebruikt voor analyse. Ook de primerefficiënties worden getest. Indien deze zich tussen 85% en 115% bevinden, worden ze gebruikt voor analyse.

De volgende genen worden geanalyseerd (tabel 3): stamcelgenen (pumilio, PCNA en piwi), antioxidante genen (cat, CuZnSOD en MnSOD), stress genen (HSP60, HSP90 en HSP70), celcyclus gerelateerde genen (cdc37 en cdc2) apoptotische genen (casp3 en PCDi), tumor gerelateerde genen (p53d, rab15, ras7 en ran) en referentiegenen (cycline B, β-actine, Gm2AP, rlp13a en GADPH). De gegevens van de primers (Invitrogen) zijn terug te vinden in tabel 3.

**Tabel 3:** Gebruikte primersequenties van de genen die geanalyseerd worden met behulp van de real-time PCR.

Gennaam	Categorie	Forward primer	Reverse primer
Pumilio	Stamcelgen	GCA TTC AAA GGA CAG GTG GT	CAG CTC CTC CAA CAC TGG TT
Cycline B	Stamcelgen	GCA ATC CTC TGG CTG AAA TC	TGC TCC TCG TCA ATC TCC AT
PCNA	Stamcelgen	GAT GCC GAA CCA AGA GAA AG	CAG CCT TGT AGT CGG TCT CC
Piwi	Stamcelgen	CGA ATT TCG TTC GGA TCA ACA	TGG GCA TCG TTC AGT AGC TTC T
CAT	Antioxidant gen	CCG CTA TCC GTC TTG GAC TCT	GAT TTT GGT CAG ATC GAA TGG ATT
CuZnSOD	Antioxidant gen	TCA TCA GTA TCG GCG TGT ACA AC	CTG GCG TAG AAA TTA CCG ACA AG
MnSOD	Antioxidant gen	AAG CAC CAC GCC ACC TAT GT	CAA TGA TGT CGG AAG CTT TGC
HSP60	Stressgen	CTG CAA GAC AAA TGG CAG AA	AGA AAT CGA CCT AGC CAG CA
HSP90	Stressgen	AGT TCG GCA AGA ACC TGA AG	CCG GAG CTG GTG GAG TAG TA
HSP70	Stressgen	GCA GGC AAA GTG GAG ATC AT	CTC CCA GGT CGA AGA TCA GA
Cdc37	Celdelingsgen	GAC ACG CCC TCG CTG TTC	TTG GTG ACC TGC TTC CAT TC
Casp3	Apoptotisch gen	GGC TGC TTT GTC TGC TTT CTG	GAG CTG AAG GTC TGG GTG ATG
PCDi	Apoptotisch gen	CAG CGG CAG CAT CGA TAC TAA	TCG CAC TAG CAA ACT GCA GAA
P53d	Oncogen	AGG TAG CCT ACA CGG GAC TGA A	AAT CCC ATG ATG TTG GAA GCA
Rab15	Oncogen	AGC AGC GTC AAA TGA GGA AAC	GGC CGA GTG CAA CTG AAA CT
Ras7	Oncogen	ACC AAT TCG TGA ACA GGA AGT TC	ACC CGG TCA TCA ACC ATG AG
Ran	Oncogen	CTC GCG TCA CTT ACA AGA ACG T	ACC TTA TTT CCA ACC AGA ACG ATT
Ccd2	Celdelingsgen	GAA AAA GAT CCG TCT GGA ATG	GAC AGA CAA TGT TGG GAT GCT
β-ACT	Referentiegen	TCG GAG AAC TGA TCG ATG CTC ATG	GTC TAA CCA ATG GCT GAC GAC C
Gm2AP	Referentiegen	TAA TCT TCA ATG CGA CCC TCA AGC	CAT CAC CCT GCC CGA GAT TC
Rpl13a	Referentiegen	TTT CTC GAC GGC CTT GGA GCG AA	CGA GGT CGG CTG GAA ATA CCA
GAPDH	Referentiegen	GAG GCA TTG GAC ACC ACC TTG	GTT ATC ATC TCC GCT CCG TCT G

## 2.5 Mitosekleuring

In dit experiment wordt het effect van cadmium op het aantal mitotische delingen nagegaan wanneer de HSP60 en HSP90 genen uitgeschakeld zijn. De testorganismen worden hier blootgesteld volgens de experimentele opzet beschreven in paragraaf 2.3.

Neoblasten zijn de enige delende cellen in het lichaam van een adulte worm. Om de actieve neoblasten van *M. lignano* aan te kleuren wordt een histon kleuring uitgevoerd. De platwormen worden gestrekt en verdoofd in 7.14% MgCl<sub>2</sub> vervolgens gefixeerd in 4% paraformaldehyde en 3 keer gewassen in *phosphate buffered saline* (PBS). Volgend op de fixatie wordt gedurende 1 uur de slijmlaag op de epidermis opgelost in PBS met 0.1% Triton. Om de specifieke bindingsplaatsen te blokkeren worden de wormen gedurende 30 min blootgesteld aan *bovine serum albumine* (BSA) met 0.1% Triton. Daarna wordt het primaire anti-fosfo-histon H3 antilichaam (Millipore) toegevoegd waarin de wormen overnacht bij 4°C geïncubeerd worden. Dit antilichaam wordt de volgende dag weggewassen met PBS waarna het secundaire antilichaam, rhodamine conjugated affinity purified (Millipore) gedurende 1 uur in het donker wordt toegevoegd. Daarna worden de wormen overgebracht naar een dekglasje en afgedekt worden met vectashield (Vector Laboratories inc.). De cellen in mitose worden bepaald met de fluorescentiemicroscoop Nikon Eclipse 80i.

## 2.6 Microscopie

Tijdens behandeling van de platwormen met RNAi probes en blootstelling cadmium worden de micro- en macroscopische effecten bestudeerd alsook de ultrastructurele effecten op individuele cellen zoals de epidermis en de neoblasten. Ook hier worden de adulte *M.lignano* 8 dagen voorbehandeld met RNAi probes HSP60 of HSP90 (0, 30 ng) en op dag 7 voor een periode van 24 uur aan de probes (0, 30 ng) en cadmium (0, 10, 50, 100 en 250 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>) (zie 2.3 experimentele opzet).

### 2.6.1 Micro- en macroscopische effecten

#### Lichtmicroscopie (squeeze preparaten)

De wormen worden verdoofd in een 1:1 mengeling van f/2 medium en 7,14 % MgCl<sub>2</sub> oplossing. Hierna worden ze dorsoventraal geplaatst tussen een draagglas een dekglas (bezet met een plastic film van 35 $\mu$ m, deze dient om de afstand te standaardiseren). Ieder individu wordt onder de microscoop digitaal gefotografeerd met een vergroting van 40x met een c-mount video camera (DFK41AF02, imaging source) verbonden met een computer. De oppervlakte van de wormen worden geanalyseerd met behulp van de beeld-analyse software Image J (ontwikkeld op de US National Institutes of Health en is beschikbaar op het internet).

#### ROS-kleuring

5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceïn diacetate (Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA) is een permanente celindicator voor reactieve zuurstof deeltjes. Na blootstelling worden de dieren gedurende 15 minuten geïncubeerd in 25 $\mu$ M 5carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA (Image it live Green Reactive Oxygen Species Detection Kit, Invitrogen) opgelost in een 1:1 mengeling van f/2 medium en 7,14 % MgCl<sub>2</sub> oplossing. Daarna worden ze via squeeze preparaten bekeken onder de fluorescentiemicroscoop.

#### Ultrastructurele effecten

De testorganismen (3 per conditie) worden gerelaxeerd in MgCl<sub>2</sub> en vervolgens gefixeerd in 3% glutaraaldehyde en 0,1 M natriumcacodylaatbuffer. Vervolgens worden de weefsels gepostfixeerd in 2% osmiumtetroxide gebufferd in 0,1M natriumcacodylaat. Na dehydratatie met behulp van een aceton gradiëntreeks (50-100 % aceton) worden de weefsels geïmpregneerd en ingebed in araldit. Semi-dunne en ultradunne coupes worden verkregen met behulp van de Leica Ultracut UCT ultramicrotoom. De semi-dunne coupes worden gekleurd met thionine methyleenblauw en de ultradunne coupes met uranylacetaat en lood citraat voor transmissie elektronen microscopie (TEM). Vervolgens worden de coupes bestudeerd met de Phillips 208 elektronenmicroscoop.

## 2.7 Statistische analyse

Om na te gaan of er significante verschillen zijn in de oppervlaktebepaling, de mitotische activiteiten en de genexpressie worden de data geanalyseerd met behulp van een 1-weg (oppervlaktebepaling en mitosekleuring) of 2-weg ANOVA (genexpressie) gevolgd door een post hoc test (TUKEY-KRAMER). Zowel normaliteit als homoscedasticiteit worden gecontroleerd. Indien hieraan niet voldaan wordt, worden transformaties uitgevoerd. Deze statistische analyses worden uitgevoerd met behulp van SAS v9.2. Ingeval er ook hierna geen normaliteit bereikt wordt, wordt de niet-parametrische test, de Kruskal Wallis, toegepast.

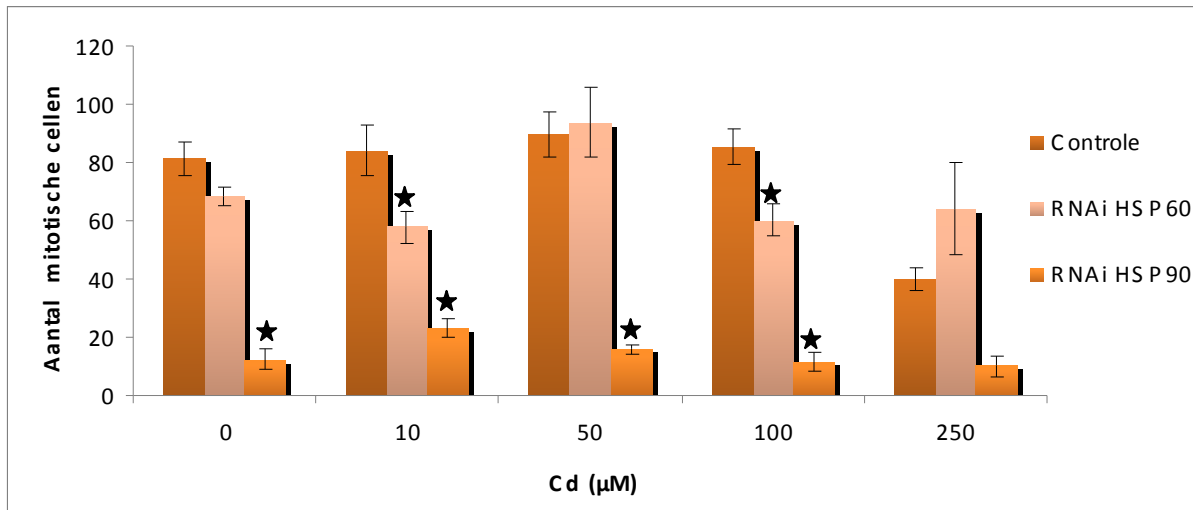
### 3. Resultaten

De effecten van HSP60 en HSP90 knock down tijdens cadmiumblootstelling worden op verschillende niveaus nagegaan. Er wordt zowel gekeken op cellulair niveau, waaronder celproliferatie en ultrastructuur, als op moleculair niveau door middel van genexpressie analyses.

#### 3.1 Effecten van HSP downregulatie op stamcellen tijdens cadmiumblootstelling

De mitotische activiteit van de neoblasten in *M. lignano* tijdens HSP60 of HSP90 silencing en blootstelling aan cadmium (0, 10, 50, 100 of 250 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>) wordt bestudeerd. Enerzijds wordt er nagegaan of er een effect is op het aantal cellen in mitose, anderzijds wordt er gekeken naar de spreiding ervan.

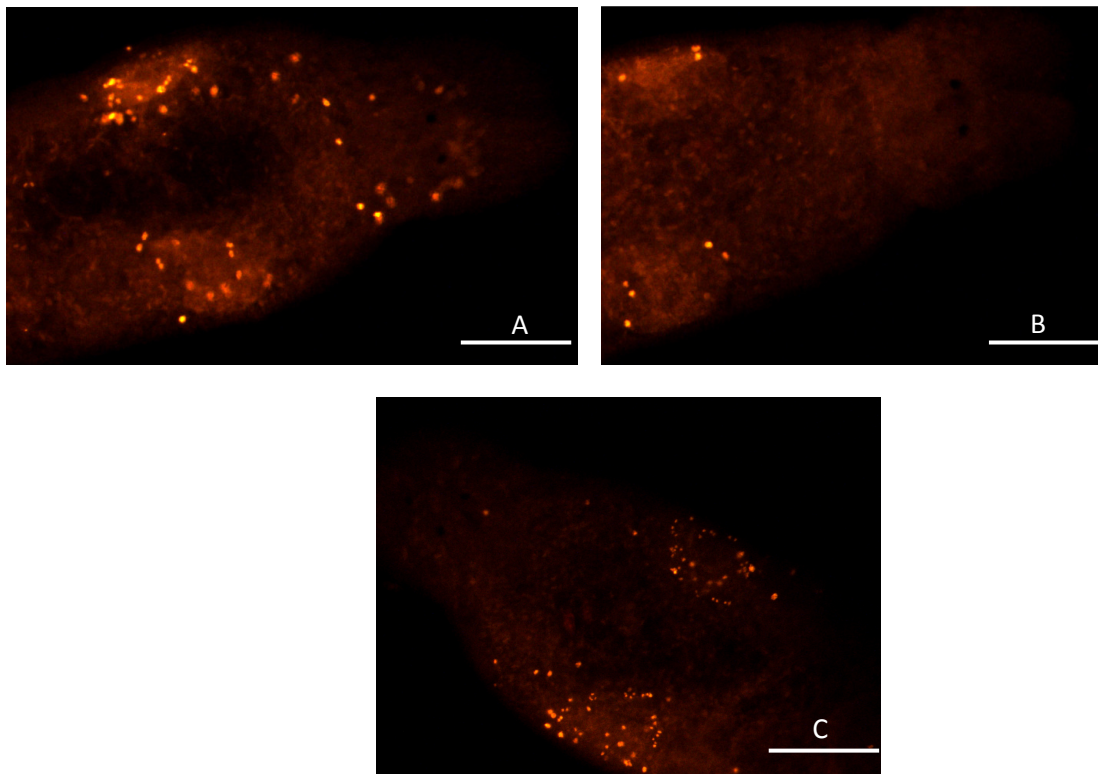
In figuur 3 worden de resultaten weergegeven van het aantal cellen in mitose bij een vermindering van het HSP60 of HSP90 transcriptniveau. Bij voorbehandeling met HSP60 RNAi probes is er een significante afname in het aantal cellen waar te nemen tijdens blootstelling aan 10 of 100 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ). De effecten bij knock down van HSP90 zijn nog duidelijker. Zowel onder controle omstandigheden als bij blootstelling aan lage (10 en 50 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>) en hoge (100 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>) cadmiumconcentraties is er een significante vermindering in het aantal delende cellen waar te nemen ( $p < 0,01$ ).



**Figuur 3:** Aantal cellen in mitose en standaardfout in *M. lignano* na behandeling met HSP60 of HSP90 RNAi probes of controle gedurende 8 dagen. Op dag 7 werd er gedurende 24 uur ook 0, 10, 50, 100 en 250 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> toegediend.

★ : significantie ( $p < 0,05$ ) ten opzichte van de controle per cadmiumconcentratie. Elke balk stelt het gemiddelde van minstens 4 biologische herhalingen voor.

Vervolgens werd ook de spreiding van de cellen in mitose nagegaan tijdens HSP60 of HSP90 inhibitie. In de RNAi-onbehandelde beesten zijn de mitotische cellen verspreid over de gonaden en laterale delen van het lichaam (figuur 4A). Er zijn nagenoeg geen delende cellen zichtbaar in de epidermis, de darm en anterior van de ogen. Wanneer de HSP90 gentranscripten gedownreguleerd zijn, is er een sterke afname van het aantal mitotische cellen zoals hierboven aangegeven. Deze cellen zijn daarenboven hoofdzakelijk in de testes terug te vinden (figuur 4B). Figuur 4C geeft de resultaten weer tijdens HSP60 knockdown. Hier zijn veel cellen terug te vinden die zich voornamelijk in de testes bevinden.



**Figuur 4: Mitosekleuring.** A: De wormen in controle omstandigheden na 24 uur blootstelling aan CdCl<sub>2</sub>. B: RNAi van HSP90 en 24 uur CdCl<sub>2</sub> C: RNAi van HSP60 en 24 uur CdCl<sub>2</sub>. De witte maatstreek komt overeen met 0,25mm.

### 3.2 Effecten van HSP knock down tijdens cadmiumstress op het organisme en op ultrastructureel niveau

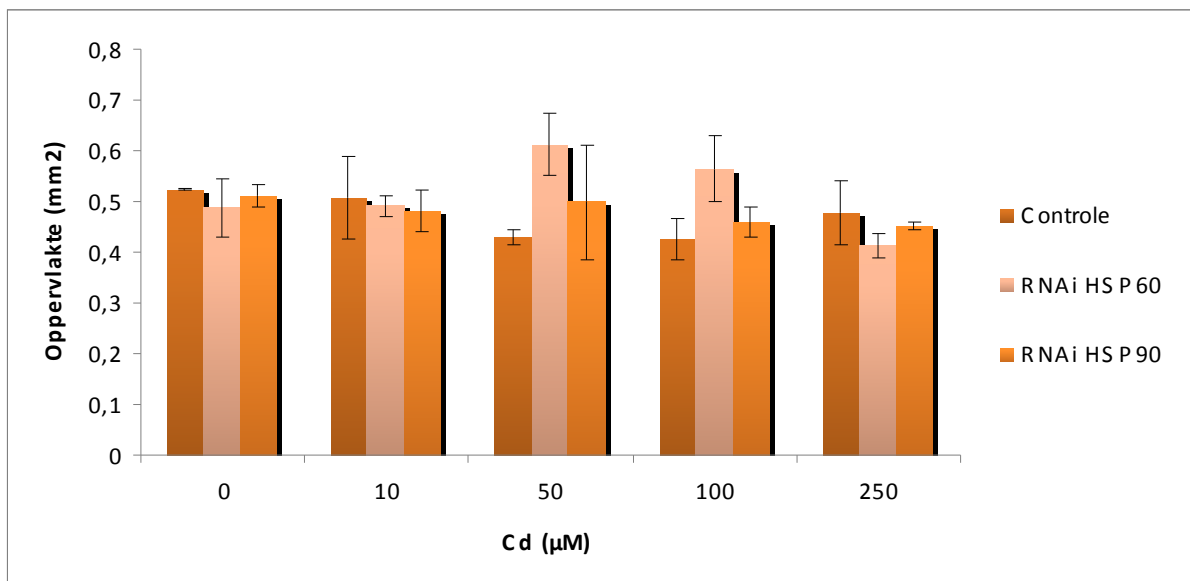
De invloed van HSP60 of HSP90 downregulatie tijdens cadmiumblootstelling wordt ook nagegaan op het organisme en ultrastructureel niveau. De dieren werden gedurende 7 dagen voorbehandeld met RNAi. Op dag 8 werden hier verschillende cadmiumconcentraties (0, 10, 50, 100 of 250µM CdCl<sub>2</sub>) aan toegevoegd.

#### 3.2.1 Micro- en macroscopische effecten van HSP60 of HSP90 downregulatie tijdens cadmiumblootstelling

Tijdens blootstelling aan de HSP60 en HSP90 RNAi probes werden *M. lignano* wormen geobserveerd. Deze organismen blijven in de twee opzetten eitjes blijven leggen. En bovendien komen er juvenielen uit deze eitjes.

Met behulp van de lichtmicroscop werden ook testes en ovaria onderzocht. Hieruit kan afgeleid worden dat zowel de testes als de ovaria, bij downregulatie van HSP60 of HSP90 gen transcripten, duidelijk nog aanwezig zijn. Deze voortplantingsorganen zijn ook zichtbaar tijdens blootstelling van de organismen aan verschillende concentraties cadmium (0, 10, 50, 100 en 250  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ), al dan niet na voorbehandeling met RNAi.

Ook de oppervlakte van de wormen, tijdens de verschillende condities, werd onderzocht. De resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 5. Er zijn hierbij geen significante verschillen te bemerken. Enkele trends kunnen wel waargenomen worden. De controle geeft voornamelijk hetzelfde patroon als de HSP90 RNAi groep. De beesten die aan RNAi HSP60 blootgesteld worden, lijken bij de cadmiumconcentraties van 50 en 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  een grotere oppervlakte te hebben in vergelijking met de controlegroep.



**Figuur 5: Oppervlaktebepaling** en standaardfout (uitgedrukt in  $\text{mm}^2$ ) van *M. lignano* na 8 dagen behandeling met RNAi probes of controle gedurende 8 dagen. Op dag 7 werd er gedurende 24 uur ook 0, 10, 50, 100 en 250  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  toegediend. Elke balk stelt het gemiddelde voor van 3 biologische herhalingen.

Tot slot werd er ook een ROS (reactive oxygen species) kleuring uitgevoerd (data niet weergegeven). Hier werd enkel een verschil waargenomen bij de hoge cadmiumconcentratie van 250  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . Meer cellen worden fluorescent aangekleurd dan bij alle andere cadmiumconcentraties (0, 10, 50 en 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ). Dit werd waargenomen na downregulatie van HSP60 of HSP90 alsook bij de controlegroep.

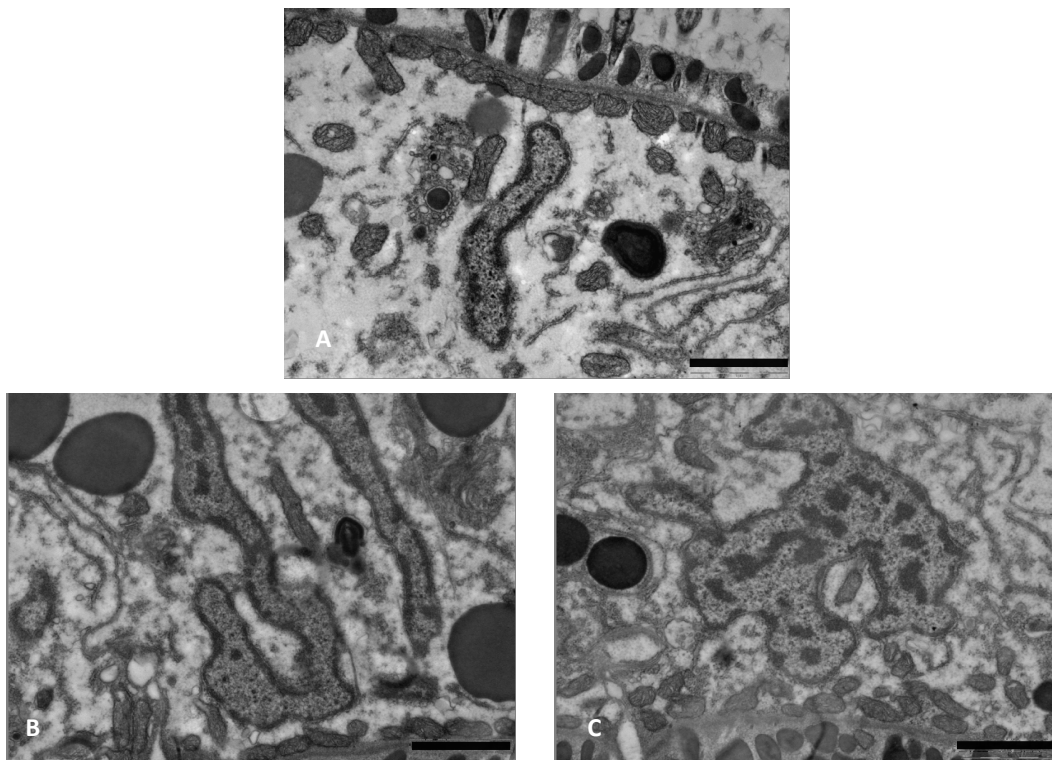
### 3.2.2 Ultrastructurele analyse van epidermis en neoblasten in *M. lignano*

Tijdens voorbehandeling van de organismen gedurende 7 dagen met HSP60 of HSP90 en blootstelling aan cadmium (0, 10 en 250  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ) werd ook de ultrastructuur van de epidermis en de stamcellen onderzocht.

## Epidermis

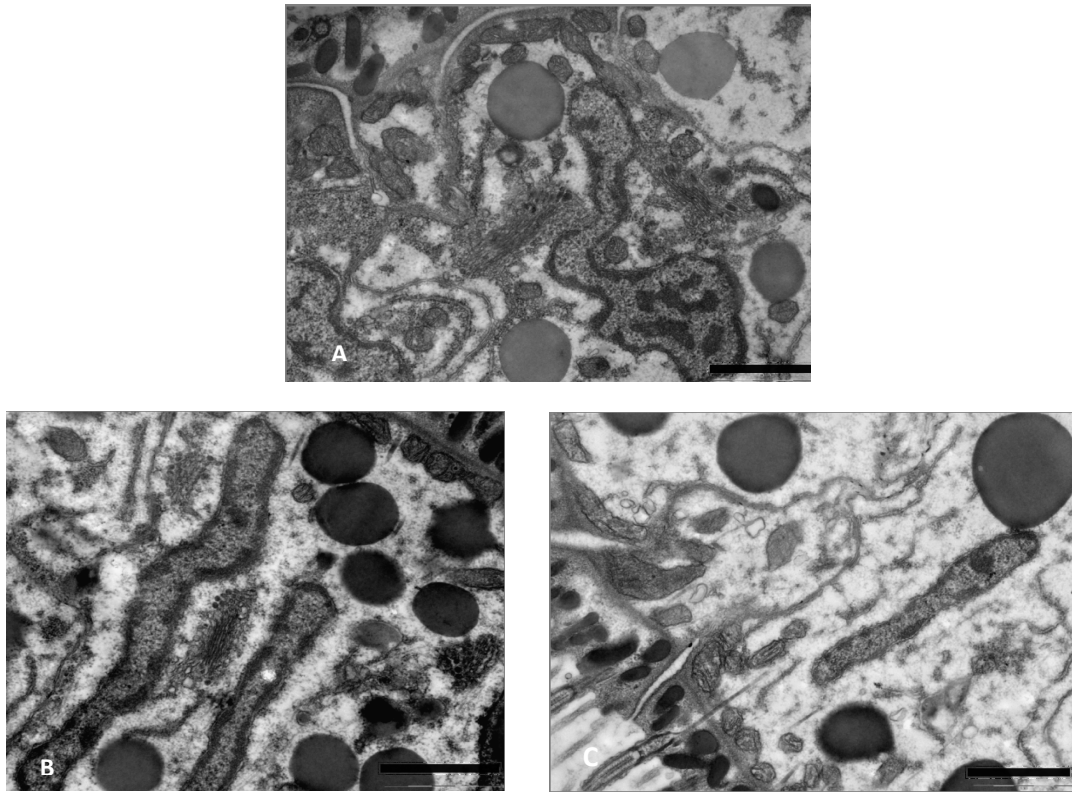
Uit figuren 6, 7 en 8 kunnen de effecten van HSP60 of HSP90 downregulatie tijdens cadmiumstress op de ultrastructuur van de epidermis afgeleid worden.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat er geen effect is van voorbehandeling met RNAi van HSP60 en HSP90 op de ultrastructuur van de epidermis (figuren 6, 7 en 8). Alle organellen vertonen een normale structuur wanneer de organismen niet aan cadmium blootgesteld worden (figuur 6). Tijdens toediening van lage cadmiumconcentraties ( $10\mu\text{M CdCl}_2$ , figuur 7) is er ook geen duidelijk verschil te bemerken tussen de verschillende condities. De ultrastructuur is hier normaal. De epidermis is enkel gevoelig voor blootstelling aan hoge cadmiumconcentraties ( $250\mu\text{M}$ , figuur 8). Zowel na downregulatie van HSP60 of HSP90 alsook bij de controlegroep kan er een effect op de mitochondriën vastgesteld worden. Deze organellen zijn beschadigd wat zich uit in een elektronenlichere matrix en minder cristae dan de controledieren.

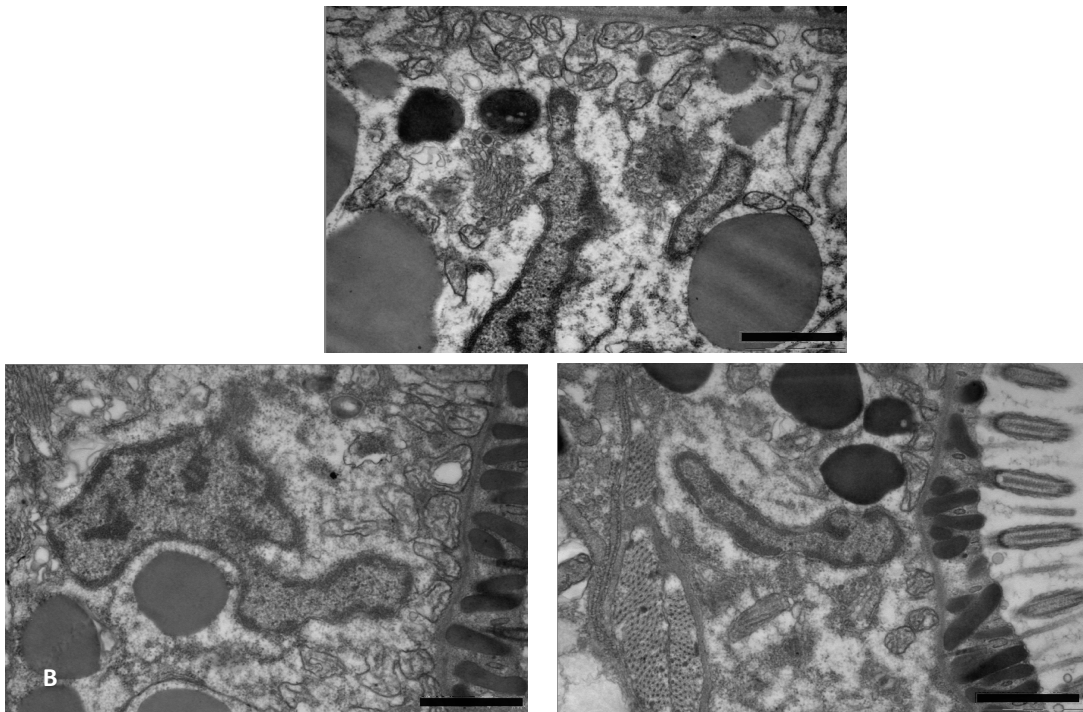


**Figuur 6:** Ultrastructuur van de epidermis van *M. lignano* blootgesteld aan  $0\mu\text{M CdCl}_2$ . A= Controle; B= RNAi HSP60; C= RNAi HSP90. De zwarte maatstreek komt overeen met  $1\mu\text{m}$ .





**Figuur 7:** Ultrastructuur van de epidermis van *M. lignano* blootgesteld aan 10 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. A= Controle; B= RNAi HSP60; C= RNAi HSP90. De zwarte maatstreek komt overeen met 1  $\mu$ m.

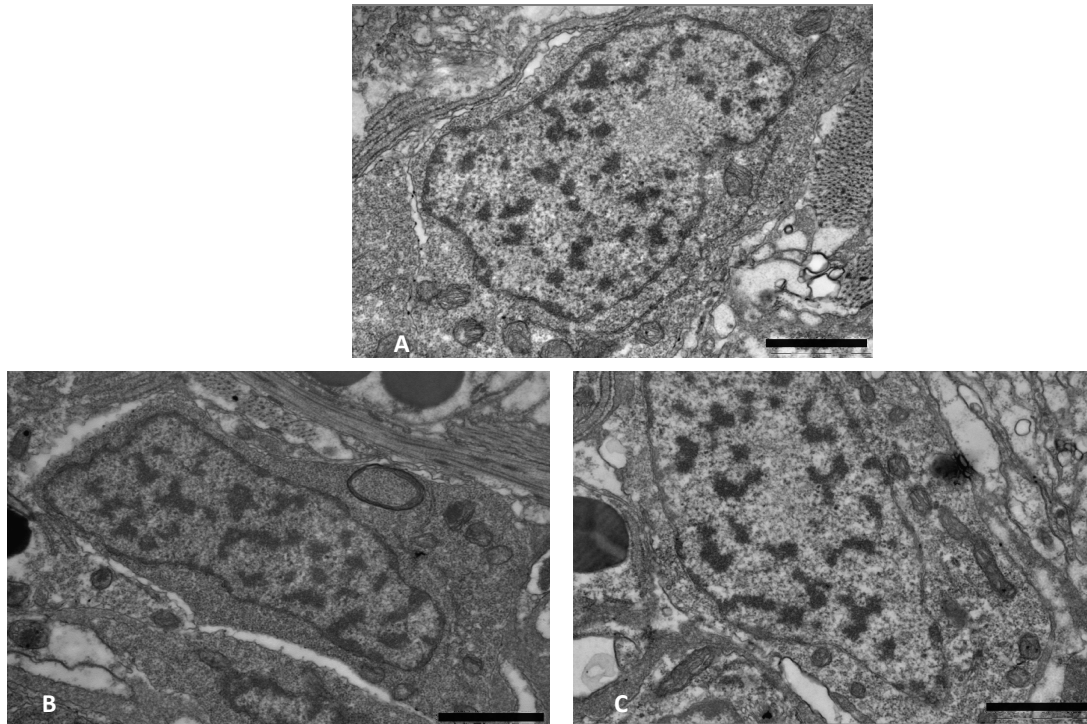


**Figuur 8:** Ultrastructuur van de epidermis van *M. lignano* blootgesteld aan 250 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. A= Controle; B= RNAi HSP60; C= RNAi HSP90. De zwarte maatstreek komt overeen met 1  $\mu$ m.

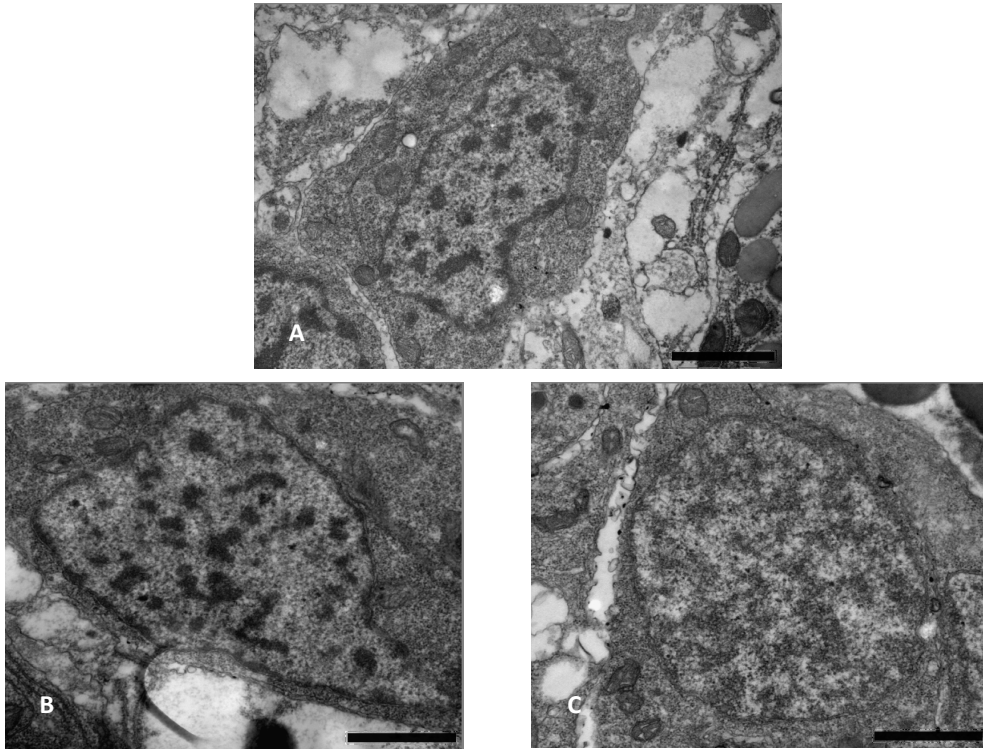
## Neoblasten

De effecten van HSP60 of HSP90 knock down tijdens cadmiumblootstelling op de ultrastructuur van de neoblasten kan uit figuren 9, 10 en 11 afgeleid worden.

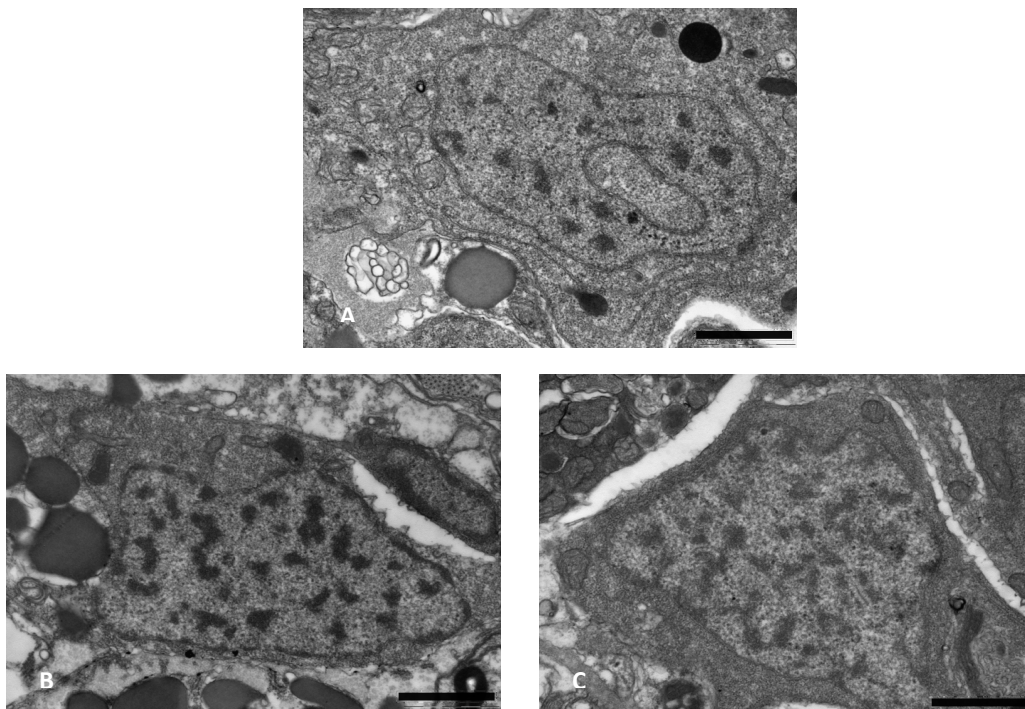
Zowel bij downregulatie van HSP60 of HSP90 als bij de controlegroep zijn er geen effecten op de ultrastructuur van de stamcellen waarneembaar tijdens cadmiumblootstelling. Zelfs bij blootstelling aan 250 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> vertonen de celkern, het endoplasmatisch reticulum en ook de mitochondriën een normale structuur.



**Figuur 9:** Ultrastructuur van de stamcellen van *M. lignano* blootgesteld aan 0  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. A= Controle; B= RNAi HSP60; C= RNAi HSP90. De zwarte maatstreek komt overeen met 1  $\mu$ m.



**Figuur 10:** Ultrastructuur van de stamcellen van *M. lignano* blootgesteld aan 10μM CdCl<sub>2</sub>. A= Controle; B= RNAi HSP60; C= RNAi HSP90. De zwarte maatstreek komt overeen met 1 μm.



**Figuur 11:** Ultrastructuur van de stamcellen van *M. lignano* blootgesteld aan 250μM CdCl<sub>2</sub>. A= Controle; B= RNAi HSP60; C= RNAi HSP90. De zwarte maatstreek komt overeen met 1 μm.

### 3.3 Effecten van HSP downregulatie tijdens cadmiumblootstelling op de genexpressie

Om mogelijke onderliggende mechanismen van HSP downregulatie tijdens cadmiumstress te achterhalen, worden er ook genexpressie analyses uitgevoerd. Tijdens al dan niet voorbehandelen met RNAi en cadmiumblootstelling wordt de transcriptie van stamcelgenen, antioxidatieve genen, heat shock proteïnen, celcyclus genen, apoptotische genen en tumor gerelateerde genen (tabel 3) nagegaan.

#### 3.3.1 Voorbehandeling met HSP60 RNAi

De transcriptlevels van verscheidene genen (stamcelgenen, antioxidatieve genen, heat shock proteïnen, celcyclus genen, apoptotische genen en tumor gerelateerde genen, tabel 3) in *M. lignano* tijdens knock down van de HSP60 gentranscripten en cadmiumstress zijn weergegeven in tabel 4. De organismen werden hierbij aan zowel lage (10µM en 50µM CdCl<sub>2</sub>) als aan hoge cadmiumconcentraties (100µM en 250µM CdCl<sub>2</sub>) blootgesteld.

Uit tabel 4 kan bijgevolg afgeleid worden op welke genen de heat shock proteïnen een invloed hebben tijdens controle omstandigheden en tijdens cadmiumstress. Tijdens downregulatie van HSP60 onder **controle omstandigheden** neemt de transcriptie van tumor gerelateerde genen (p53d, Rab15 en Ras7), MnSOD, cdc2, PCDi en PCNA significant af ten opzichte van de RNAi-onbehandelde groep. Hiernaast is een significante toename in het transcriptniveau van cdc37 en cat waar te nemen. De toename van HSP70 genexpressie tijdens HSP60 knock down is hierbij het vermelden waard. Hier kan een aanzienlijke stijging waargenomen worden, doch niet significant.

Het effect van HSP60 downregulatie na blootstelling aan **lage** cadmiumconcentraties op de genexpressie van de onderzochte genen kan ook uit tabel 4 afgeleid worden. Significante interactie-effecten tussen cadmiumblootstelling en RNAi behandeling zijn terug te vinden in de genexpressie van tumor gerelateerde genen (p53d en ran), cdc37, casp3, cat en pumilio. Opmerkelijk is de forse toename van de HSP70 gentranscripten (niet significant). Deze stijging is zowel bij de RNAi-behandelde als bij de RNAi-onbehandelde dieren telkens hoger tijdens blootstelling aan 50µM CdCl<sub>2</sub> in vergelijking met 10µM CdCl<sub>2</sub>. Genen die anders tot expressie komen bij RNAi behandeling zijn bij 10µM CdCl<sub>2</sub> CuZnSOD en ran en bij 50µM CdCl<sub>2</sub> PCNA, cat, ras7 en ran.

Blootstelling aan **hoge** cadmiumconcentraties tijdens al dan niet HSP60 knock down geeft andere resultaten. Hier zijn significante interactie-effecten terug te vinden in de transcriptlevels van casp3, HSP70 en MnSOD. Genen die anders tot expressie komen bij RNAi behandeling zijn bij 100µM CdCl<sub>2</sub> HSP90 en bij 250µM CdCl<sub>2</sub> cat, CuZnSOD, MnSOD, casp3, ran en cdc2.

**Tabel 4:** Transcriptniveaus van de verschillende genen (stamcelgenen, antioxidantieve genen, heat shock proteïnen, celcyclus genen, apoptotische genen en tumor gerelateerde genen) na blootstelling van *M. lignano* aan HSP60 RNAi probes en 24 uur 0, 10, 50, 100 en 250µM CdCl<sub>2</sub>. Er was een 95% inhibitie van het HSP90 gentranscript ten opzichte van de niet RNAi blootgestelde stalen. In de kolom controle (0 µM CdCl<sub>2</sub>) worden de algemene effecten van RNAi beschreven waarbij de genexpressie van RNAi uitgedrukt wordt ten opzichte van de genexpressie zonder RNAi. Deze 2 kolommen worden bekomen door de gemiddelden te nemen van de twee afzonderlijke experimenten (nl. 0, 10, 50 µM CdCl<sub>2</sub> en 0, 100, 250 µM CdCl<sub>2</sub>). Enkel wanneer er significante verschillen in beide onafhankelijke experimenten waar te nemen zijn, wordt dit aangeduid met kleur. In de daaropvolgende kolommen wordt het effect van cadmium op de geen en wel RNAi-groepen weergegeven in kleur. In de kolommen geen RNAi en RNAi zijn de resultaten steeds uitgedrukt ten opzichte van de controle (0 µM CdCl<sub>2</sub>) die respectievelijk geen of wel RNAi blootstelling hadden. Indien er een interactie-effect tussen cadmiumblootstelling en RNAi is, zijn deze aangeduid in het vet en in de kolom int (interactie). Elke waarde stelt het gemiddelde van 6 biologische herhalingen voor ± standaard error (significantie levels   en   : p<0,01;   en   : p<0,05 voor respectievelijk inductie en inhibitie t.o.v. de respectievelijke controle).

Gen	Controle		Geen RNAi			RNAi			Int	Geen RNAi			RNAi			Int
	RNAi	RNAi	10µM Cd	50µM Cd	10µM Cd	50µM Cd	10µM Cd	50µM Cd		100µM Cd	250µM Cd	100µM Cd	250µM Cd	100µM Cd	250µM Cd	
Pumillo	1 ± 0,173	0,896 ± 0,021	1,095 ± 0,053	1,697 ± 0,089	1,434 ± 0,165	1,550 ± 0,088	1,684 ± 0,282	1,531 ± 0,080	1,509 ± 0,078	1,523 ± 0,093	1,509 ± 0,078	1,523 ± 0,093	1,509 ± 0,078	1,523 ± 0,093	-	
PCNA	1 ± 0,108	0,749 ± 0,055	1,353 ± 0,074	1,513 ± 0,131	1,559 ± 0,060	1,315 ± 0,117	1,277 ± 0,181	1,341 ± 0,057	1,059 ± 0,037	1,253 ± 0,026	1,059 ± 0,037	1,253 ± 0,026	1,059 ± 0,037	1,253 ± 0,026	-	
Piwi	1 ± 0,187	1,057 ± 0,105	1,042 ± 0,061	1,064 ± 0,219	1,244 ± 0,053	1,316 ± 0,196	0,915 ± 0,122	0,998 ± 0,091	1,017 ± 0,041	0,752 ± 0,021	1,017 ± 0,041	0,752 ± 0,021	1,017 ± 0,041	0,752 ± 0,021	-	
Cat	1 ± 0,192	1,336 ± 0,117	1,076 ± 0,119	1,576 ± 0,07	1,304 ± 0,158	1,082 ± 0,109	0,776 ± 0,132	0,612 ± 0,048	0,849 ± 0,076	0,479 ± 0,050	0,849 ± 0,076	0,479 ± 0,050	0,849 ± 0,076	0,479 ± 0,050	-	
CuZnSOD	1 ± 0,054	1,027 ± 0,064	1,105 ± 0,062	1,256 ± 0,106	1,441 ± 0,129	1,239 ± 0,059	1,200 ± 0,109	1,368 ± 0,041	1,149 ± 0,011	1,080 ± 0,043	1,149 ± 0,011	1,080 ± 0,043	1,149 ± 0,011	1,080 ± 0,043	-	
MnSOD	1 ± 0,156	0,634 ± 0,042	0,979 ± 0,066	1,188 ± 0,134	1,236 ± 0,251	1,255 ± 0,087	1,009 ± 0,157	0,750 ± 0,067	0,788 ± 0,021	0,633 ± 0,030	0,788 ± 0,021	0,633 ± 0,030	0,788 ± 0,021	0,633 ± 0,030	Ja	
HSP60	1 ± 0,119	0,059 ± 0,009	1,044 ± 0,063	1,141 ± 0,058	2,038 ± 0,264	1,365 ± 0,081	1,106 ± 0,128	1,380 ± 0,057	1,033 ± 0,169	1,388 ± 0,166	1,033 ± 0,169	1,388 ± 0,166	1,033 ± 0,169	1,388 ± 0,166	-	
HSP90	1 ± 0,059	1,068 ± 0,112	1,230 ± 0,066	2,013 ± 0,189	1,616 ± 0,128	1,896 ± 0,103	1,868 ± 0,129	2,428 ± 0,132	1,466 ± 0,142	2,047 ± 0,081	1,466 ± 0,142	2,047 ± 0,081	1,466 ± 0,142	2,047 ± 0,081	-	
HSP70	1 ± 0,159	16,674 ± 8,692	2,499 ± 0,552	83,259 ± 12,222	3,795 ± 0,532	76,951 ± 4,963	271,96 ± 44,467	2010,792 ± 181,195	22,798 ± 0,142	115,501 ± 15,648	22,798 ± 0,142	115,501 ± 15,648	22,798 ± 0,142	115,501 ± 15,648	Ja	
Casp3	1 ± 0,069	0,924 ± 0,068	0,998 ± 0,127	1,185 ± 0,093	1,541 ± 0,144	1,404 ± 0,059	1,148 ± 0,075	0,897 ± 0,049	0,924 ± 0,097	0,404 ± 0,031	0,924 ± 0,097	0,404 ± 0,031	0,924 ± 0,097	0,404 ± 0,031	Ja	
PCDI	1 ± 0,139	0,834 ± 0,095	1,153 ± 0,108	1,422 ± 0,139	1,572 ± 0,099	1,458 ± 0,049	1,397 ± 0,273	1,335 ± 0,140	1,013 ± 0,029	0,808 ± 0,041	1,013 ± 0,029	0,808 ± 0,041	1,013 ± 0,029	0,808 ± 0,041	-	
Cdc37	1 ± 0,177	1,458 ± 0,072	0,977 ± 0,101	1,640 ± 0,117	1,407 ± 0,167	1,283 ± 0,147	1,955 ± 0,093	1,840 ± 0,121	1,616 ± 0,104	1,608 ± 0,106	1,616 ± 0,104	1,608 ± 0,106	1,616 ± 0,104	1,608 ± 0,106	-	
P53d	1 ± 0,105	0,671 ± 0,061	0,989 ± 0,090	1,549 ± 0,211	1,814 ± 0,282	1,481 ± 0,140	1,108 ± 0,196	1,189 ± 0,053	0,994 ± 0,033	0,878 ± 0,061	0,994 ± 0,033	0,878 ± 0,061	0,994 ± 0,033	0,878 ± 0,061	-	
Rab15	1 ± 0,152	0,522 ± 0,100	1,086 ± 0,240	1,551 ± 0,336	1,995 ± 0,449	2,265 ± 0,488	1,245 ± 0,189	1,159 ± 0,220	0,968 ± 0,120	0,748 ± 0,124	0,968 ± 0,120	0,748 ± 0,124	0,968 ± 0,120	0,748 ± 0,124	-	
Ras7	1 ± 0,1375	0,686 ± 0,087	1,193 ± 0,090	1,682 ± 0,108	1,325 ± 0,239	1,768 ± 0,215	1,539 ± 0,298	1,278 ± 0,099	1,334 ± 0,091	1,531 ± 0,096	1,334 ± 0,091	1,531 ± 0,096	1,334 ± 0,091	1,531 ± 0,096	-	
Ran	1 ± 0,049	0,901 ± 0,066	0,933 ± 0,074	1,122 ± 0,093	1,482 ± 0,045	1,379 ± 0,097	1,154 ± 0,085	1,403 ± 0,067	1,023 ± 0,019	1,198 ± 0,031	1,023 ± 0,019	1,198 ± 0,031	1,023 ± 0,019	1,198 ± 0,031	-	
Cdc2	1 ± 0,082	0,609 ± 0,057	0,992 ± 0,078	1,289 ± 0,116	1,535 ± 0,176	1,675 ± 0,229	1,226 ± 0,179	1,466 ± 0,116	1,096 ± 0,106	1,129 ± 0,066	1,096 ± 0,106	1,129 ± 0,066	1,096 ± 0,106	1,129 ± 0,066	-	

Vervolgens is er ook nagegaan of een langere voorbehandeling met de RNAi probes onder andere zorgt voor een sterkere inhibitie van de HSP gentranscripten. Drie weken HSP60 RNAi behandeling leverde een inhibitie op van meer dan 98%. De effecten van 3 weken behandeling met HSP60 RNAi probes op de transcriptielevels van de verschillende genen (stamcelgenen, antioxidatieve genen, apoptotische genen, tumor gerelateerde genen en heat shock proteïnen) zijn weergegeven in tabel 5.

Wanneer deze resultaten vergeleken worden met die van 1 week voorbehandeling met HSP60 RNAi (tabel 4) kan afgeleid worden dat er meestal dezelfde trend waar te nemen is. Enkel de genexpressie van catalase en cdc37 neemt bij drie weken voorbehandeling significant af terwijl deze toenam bij één week voorbehandeling. Andere verschillen zijn de inhibitie van ran en piwi bij lange voorbehandeling. Opvallend is ook dat tijdens behandeling met RNAi gedurende drie weken het HSP70 significant toeneemt.

**Tabel 5:** Transcriptlevels van de verschillende genen (stamcelgenen, antioxidatieve genen, heat shock proteïnen, celcyclus genen, apoptotische genen en tumor gerelateerde genen) na drie weken voorbehandeling van *M. lignano* aan HSP60 RNAi probes en 24 uur blootstelling aan 10µM CdCl<sub>2</sub>. Er was meer dan 98% inhibitie van het HSP60 gentranscript ten opzichte van de niet RNAi blootgestelde stalen. In de controlesituatie worden de algemene effecten van RNAi beschreven waarbij RNAi uitgedrukt wordt ten opzichte van geen RNAi. In de daaropvolgende kolommen (met cadmium) zijn de resultaten van genexpressie van de cadmiumbehandelingen steeds uitgedrukt ten opzichte van de controle (0 µM CdCl<sub>2</sub>) die respectievelijk geen of wel RNAi blootstelling hadden. De algemene interactie-effecten tussen RNAi en cadmiumbehandeling zijn aangeduid in het vet en in de kolom int (interactie). Elke waarde stelt het gemiddelde van 3 biologische herhalingen voor ± standaard error (significantie levels ■ en ■ :p<0,01; ■ :p<0,05 voor respectievelijk inductie en inhibitie t.o.v. de respectievelijke controle).

Gen	Controle		Geen RNAi	RNAi (20ng)	Int
	-RNAi	RNAi	10µM Cd	10µM Cd	
Pumillo	1 ± 0,132	1,093 ± 0,074	1,024 ± 0,059	0,719 ± 0,103	-
PCNA	1 ± 0,004	0,412 ± 0,062	<b>0,721 ± 0,029</b>	<b>0,938 ± 0,094</b>	Ja
Piwi	1 ± 0,136	0,161 ± 0,026	0,799 ± 0,071	1,862 ± 0,428	-
Cat	1 ± 0,042	0,680 ± 0,100	1,140 ± 0,107	0,879 ± 0,043	-
CuZnSOD	1 ± 0,132	0,941 ± 0,019	1,007 ± 0,058	0,878 ± 0,087	-
MnSOD	<b>1 ± 0,048</b>	<b>0,783 ± 0,098</b>	0,861 ± 0,017	0,809 ± 0,106	-
HSP60	1 ± 0,139	0,018 ± 0,003	<b>1,218 ± 0,307</b>	<b>4,519 ± 0,616</b>	Ja
HSP90	1 ± 0,101	0,885 ± 0,150	1,161 ± 0,106	1,503 ± 0,189	-
HSP70	<b>1 ± 0,709</b>	<b>9,686 ± 2,888</b>	<b>3,455 ± 1,282</b>	<b>3,001 ± 0,225</b>	Ja
Casp3	1 ± 0,051	0,856 ± 0,125	0,750 ± 0,062	0,811 ± 0,079	-
PCDi	1 ± 0,036	0,658 ± 0,052	0,798 ± 0,067	0,947 ± 0,082	-
Cdc37	1 ± 0,513	0,674 ± 0,09	1,779 ± 0,271	2,186 ± 0,312	-
P53d	1 ± 0,076	0,433 ± 0,045	<b>0,728 ± 0,088</b>	<b>1,068 ± 0,037</b>	Ja
Rab15	1 ± 0,297	0,021 ± 0,012	0,604 ± 0,115	1,818 ± 0,509	-
Ras7	1 ± 0,010	0,970 ± 0,031	0,898 ± 0,050	1,020 ± 0,163	-
Ran	1 ± 0,022	0,557 ± 0,073	0,892 ± 0,031	0,982 ± 0,099	-
Cdc2	1 ± 0,065	0,237 ± 0,070	0,834 ± 0,067	1,422 ± 0,250	-

### 3.3.2 Voorbehandeling met HSP90 RNAi

In tabel 6 wordt de genexpressie van stamcelgenen, antioxidatieve genen, heat shock proteïnen, celcyclus genen, apoptotische genen en tumor gerelateerde genen tijdens HSP90 downregulatie en blootstelling aan cadmium (0, 10, 50, 100 en 250 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>) weergegeven. De effecten van HSP90 downregulatie tijdens controle omstandigheden en tijdens cadmiumstress op de mRNA levels van andere genen kunnen hieruit afgeleid worden. Onder **controle omstandigheden** en HSP90 knock down neemt het transcriptlevel van rab15 significant af. Het expressieniveau van HSP70 neemt ook toe tijdens behandeling met HSP90 RNAi. Deze stijging is echter niet significant.

Tijdens blootstelling aan **lage** cadmiumconcentraties zijn er geen significante veranderingen in genexpressie van de onderzochte genen waar te nemen. Er is enkel een stijgende trend in HSP70 expressie bij al dan niet HSP90 downregulatie en blootstelling aan 50 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> waar te nemen.

Wanneer de wormen aan **hoge** cadmiumconcentraties blootgesteld worden, zowel na HSP90 knock down alsook in de controlegroep, zijn er veranderingen in transcriptlevels van vrijwel alle genen zichtbaar. Tijdens deze condities wijzigt de expressie van stamcelgenen (pumilio, PCNA en piwi), antioxidatieve genen (cat, CuZnSOD en MnSOD), heat shock proteïnen (HSP60 en HSP70), apoptose genen (casp3 en PCDi), celcyclusgenen (cdc37 en cdc2) en tumor gerelateerde genen (p53d, ras7 en ran). Genen die anders tot expressie komen bij RNAi behandeling zijn bij 250 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> piwi, CuZnSOD, MnSOD, HSP60, HSP90 en casp3 .

**Tabel 6:** Transcriptlevels van de verschillende genen (stamcelgenen, antioxidantieve genen, heat shock proteïnen, celcyclus genen, apoptotische genen en tumor gerelateerde genen) na blootstelling van *M. lignano* aan HSP60 RNAi probes en 24 uur 0, 10, 50, 100 en 250µM CdCl<sub>2</sub>. Er was een 65% inhibitie van het HSP90 gen transcript ten opzichte van de niet RNAi blootgestelde stalen. In de kolom controle (0 µM CdCl<sub>2</sub>) worden de algemene effecten van RNAi beschreven waarbij de genexpressie van RNAi uitgedrukt wordt ten opzichte van de genexpressie zonder RNAi. Deze 2 kolommen worden bekomen door de gemiddelden te nemen van de twee afzonderlijke experimenten (nl. 0, 10, 50 µM CdCl<sub>2</sub> en 0, 100, 250 µM CdCl<sub>2</sub>). Enkel wanneer er significante verschillen in beide onafhankelijke experimenten waar te nemen zijn, wordt dit aangeduid met kleur. In de daaropvolgende kolommen wordt het effect van cadmium op de geen en wel RNAi-groepen weergegeven in kleur. In de kolommen geen RNAi en RNAi zijn de resultaten steeds uitgedrukt ten opzichte van de controle (0 µM CdCl<sub>2</sub>) die respectievelijk geen of wel RNAi blootstelling hadden. Indien er een interactie-effect tussen cadmiumblootstelling en RNAi is, zijn deze aangeduid in het vet en in de kolom int (interactie). Elke waarde stelt het gemiddelde van 6 biologische herhalingen voor ± standaard error (significantie levels   en  : p< 0,01;  : p< 0,05 voor respectievelijk inductie en inhibitie t.o.v. de respectievelijke controle).

Gen	Controle		Geen RNAi		RNAi			Geen RNAi		RNAi		Int
	RNAi	RNAi	10µM Cd	50µM Cd	10µM Cd	50µM Cd	100µM Cd	100µM Cd	250µM Cd	250µM Cd	Int	
Pumillo	1 ± 0,178	1,204 ± 0,102	0,989 ± 0,108	1,226 ± 0,160	1,185 ± 0,073	1,409 ± 0,103	-	1,866 ± 0,393	2,469 ± 0,347	1,565 ± 0,256	0,635 ± 0,108	Ja
PCNA	1 ± 0,158	1,158 ± 0,060	1,073 ± 0,097	1,031 ± 0,095	1,121 ± 0,122	0,971 ± 0,084	-	1,492 ± 0,352	2,072 ± 0,208	1,175 ± 0,175	0,842 ± 0,117	Ja
Piwi	1 ± 0,137	1,977 ± 0,078	1,044 ± 0,064	0,906 ± 0,087	1,021 ± 0,145	0,899 ± 0,160	-	1,255 ± 0,405	1,668 ± 0,319	0,894 ± 0,145	0,301 ± 0,078	Ja
Cat	1 ± 0,243	2,514 ± 0,275	1,023 ± 0,071	0,949 ± 0,125	0,951 ± 0,093	1,100 ± 0,106	-	0,933 ± 0,299	0,827 ± 0,144	0,439 ± 0,045	0,085 ± 0,021	Ja
CuZnSOD	1 ± 0,182	1,559 ± 0,074	1,138 ± 0,097	1,337 ± 0,106	1,007 ± 0,114	1,199 ± 0,106	-	1,384 ± 0,338	2,052 ± 0,221	0,991 ± 0,116	0,397 ± 0,066	Ja
MnSOD	1 ± 0,115	1,177 ± 0,078	0,923 ± 0,040	0,719 ± 0,124	1,009 ± 0,059	0,929 ± 0,115	-	1,111 ± 0,164	1,249 ± 0,145	0,900 ± 0,099	0,469 ± 0,057	Ja
HSP60	1 ± 0,216	1,382 ± 0,071	0,964 ± 0,0596	0,821 ± 0,150	1,212 ± 0,144	0,842 ± 0,107	-	1,348 ± 0,376	1,973 ± 0,292	0,937 ± 0,156	0,308 ± 0,069	Ja
HSP90	1 ± 0,162	0,345 ± 0,044	1,183 ± 0,0958	1,696 ± 0,949	1,334 ± 0,160	1,689 ± 0,220	Ja	2,108 ± 0,475	3,619 ± 0,345	1,159 ± 0,193	0,566 ± 0,103	Ja
HSP70	1 ± 0,196	6,421 ± 1,359	1,027 ± 0,234	62,188 ± 6,691	1,524 ± 0,314	54,389 ± 8,333	-	357,708 ± 121,896	3040,842 ± 605,627	183,217 ± 37,813	146,942 ± 31,038	Ja
Casp3	1 ± 0,188	1,635 ± 0,114	1,189 ± 0,098	1,510 ± 0,169	0,968 ± 0,122	1,254 ± 0,181	-	1,337 ± 0,318	1,315 ± 0,140	0,865 ± 0,127	0,256 ± 0,029	Ja
PCD1	1 ± 0,151	1,379 ± 0,097	1,189 ± 0,085	1,233 ± 0,114	0,955 ± 0,676	1,191 ± 0,124	-	1,470 ± 0,285	1,979 ± 0,197	1,082 ± 0,178	0,587 ± 0,079	Ja
Cdc37	1 ± 0,257	1,792 ± 0,155	1,089 ± 0,131	1,819 ± 0,214	1,037 ± 0,115	1,295 ± 0,256	-	2,083 ± 0,405	2,599 ± 0,463	1,543 ± 0,212	0,442 ± 0,099	Ja
P53d	1 ± 0,047	1,422 ± 0,110	1,158 ± 0,107	1,258 ± 0,108	0,929 ± 0,104	1,035 ± 0,102	-	1,334 ± 0,310	2,042 ± 0,271	1,116 ± 0,151	0,639 ± 0,077	Ja
Rab15	1 ± 0,268	0,516 ± 0,063	0,741 ± 0,079	0,995 ± 0,137	1,544 ± 0,214	1,169 ± 0,181	-	1,545 ± 0,422	1,851 ± 0,480	0,715 ± 0,122	0,685 ± 0,209	-
Ras7	1 ± 0,162	1,349 ± 0,114	1,171 ± 0,276	1,387 ± 0,226	1,332 ± 0,294	1,268 ± 0,164	-	1,621 ± 0,299	2,147 ± 0,418	1,227 ± 0,199	0,627 ± 0,111	Ja
Ran	1 ± 0,159	1,422 ± 0,080	1,192 ± 0,076	1,103 ± 0,057	1,151 ± 0,095	1,068 ± 0,110	-	1,395 ± 0,363	2,124 ± 0,224	1,136 ± 0,144	0,479 ± 0,095	Ja
Cdc2	1 ± 0,179	0,975 ± 0,078	1,211 ± 0,076	1,303 ± 0,145	1,152 ± 0,178	1,079 ± 0,198	-	1,519 ± 0,419	2,286 ± 0,377	1,072 ± 0,144	0,753 ± 0,175	Ja



## 4 Discussie

Heat shock proteïnen (HSPn) zijn van essentieel belang tijdens normale fysiologische omstandigheden (vb. de celcyclus) alsook in stresssituaties. Ook tijdens blootstelling aan cadmium worden deze proteïnen (transcriptioneel) geïnduceerd. Om de exacte rol van HSPn tijdens cadmiumstress beter te kunnen begrijpen, werd in dit onderzoek gebruik gemaakt van RNA silencing. De effecten van cadmium in zowel HSP60 als HSP90 downgereguleerde organismen werden onderzocht op verscheidene niveaus. Hierbij werd vooral aandacht besteed aan de effecten op de celproliferatie.

### 4.1 Stamcelgerelateerde effecten na HSP downregulatie

De effecten van HSP60 en HSP90 downregulatie (onder onbehandelde omstandigheden) manifesteren zich duidelijk op gebied van celproliferatie. Tijdens voorbehandeling met RNAi is een afname van het aantal celdelingen waar te nemen. De ultrastructuur van epidermis en neoblasten daarentegen, blijft intact tijdens HSP60 of HSP90 knock down. De hypothese dat HSP60 en HSP90 meer betrokken zijn bij celproliferatie dan bij het in stand houden van de structurele integriteit kan hieruit volgen.

De gevolgen van RNAi voorbehandeling op de **celproliferatie** werd hier getest aan de hand van een anti-fosfo-H3 kleuring. Aangezien in *M. lignano* de enige delende cellen in een volwassen organisme de stamcellen zijn, is het aantal cellen in mitose representatief voor de delende stamcelpopulatie. De cellen in S-fase zouden hier evenwel bepaald kunnen worden met behulp van BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) als maat van celdeling. Eerder onderzoek heeft immers aangetoond dat de distributie van S-fase cellen gelijk is aan cellen in mitose [33, 39]. Een mitosekleuring is echter veel praktischer. Het is een snellere kleuring waarbij ook minder stamcellen geteld moeten worden.

Het aantal mitotische cellen is na downregulatie van **HSP90** gentranscripten sterk gereduceerd, al dan niet tijdens cadmiumblootstelling (figuur 3). Dit resultaat is te verwachten aangezien de betrokkenheid van HSP90 bij de regulatie van de celcyclus al eerder aangetoond is [40, 41]. HSP90 is onder andere betrokken bij de chromatine reorganisatie tijdens mitose door middel van interactie met histonen [40]. Dit proces is ook van belang na cellulaire stress en kan verklaren waarom downregulatie van HSP90 ook een belangrijk effect op de mitose vertoont tijdens cadmiumblootstelling [40]. Bovendien wordt het centrosoom, dat een belangrijke rol speelt bij de celdeling, ook geassocieerd met HSP90 [41]. De cellen in mitose zijn voornamelijk terug te vinden in 2 laterale banden in *M. lignano* en zijn afwezig in de epidermis, de darm en op enkele cellen na anterior van de ogen. Deze resultaten komen overeen met die van voorgaand onderzoek op *Macrostomum* door Ladurner et al 2000 [39]. De beperkte aanwezigheid van prolifererende cellen anterior van de ogen is bovendien ook aangetoond in planaria [42].

De mitotische cellen zijn bij HSP90 RNAi voornamelijk terug te vinden in de testes (figuur 4). Dit zou verklaard kunnen worden doordat dit de meest actieve en daarom persistente cellen zijn. Hier vinden sowieso veel delingen plaats omwille van de gameetproductie. Een andere verklaring zou kunnen zijn dat het door ons gemanipuleerde HSP90 meer nodig is voor somatische stamcellen en minder in de gonadale stamceldelingen waardoor deze toch grotendeels kunnen plaatsvinden tijdens

HSP90 RNAi. Deze hypothese kan ondersteund worden door het feit dat de HSP90 familie uit meerdere leden bestaat die op verschillende plaatsen in een organisme tot expressie kunnen komen [43, 44]. Aangezien er in deze studie op mRNA niveau gewerkt wordt, wordt slechts één specifiek HSP90 gentranscript uitgeschakeld. Hierdoor zou het kunnen dat de gebruikte RNAi probe tegen HSP90 een lid van deze familie uitschakelt dat voornamelijk in somatische stamcellen voorkomt. De gebruikte sequenties zijn gebaseerd op een EST datbank en een volledige genbank is nog in de maak, hierdoor kan nog geen uitsluitel gegeven worden over welke andere HSP leden er nog aanwezig zijn in het transcriptoom.

**HSP60** knockdown geeft eveneens effecten op de mitotische activiteit van de neoblasten, hoewel minder uitgesproken dan bij HSP90. Ook dit resultaat is niet onverwacht aangezien het geweten is dat HSP90 een belangrijke rol speelt bij de controle van de celcyclus [40, 41]. HSP60 heeft daarentegen voornamelijk een chaperon functie [20, 26]. Desondanks heeft ander onderzoek de betrokkenheid van dit proteïne bij de celproliferatie gedemonstreerd [45]. Bovendien heeft men op levercellen aangetoond dat HSP60 overwegend tijdens mitose tot expressie komt [46]. De levercellen zijn echter gedifferentieerde cellen. Hierdoor kan niet uitgesloten worden dat de betrokkenheid van HSP60 bij de celdeling van somatische stamcellen van minder belang is.

Het aantal mitotische cellen neemt bij downregulatie van HSP60 echter wel significant af tijdens stress. Hierdoor kan vermoed worden dat HSP60 tijdens stress omstandigheden belangrijk is voor de celdeling. Uit de spreiding kan afgeleid worden dat de cellen in mitose hoofdzakelijk in de testes voorkomen. Ook hier is het mogelijk dat deze gedownreguleerde HSP60 niet zo belangrijk is in gonadale stamcellen. Van HSP60 bestaan er ook isovormen [47]. Ander onderzoek bevestigt de expressie van HSP60 in spermatogonia, wat actief delende cellen zijn [48]. Dit toont aan dat dit HSP betrokken is bij de spermatogenese dat binnen *M. lignano* in de testes plaatsvindt.

Hoewel de proliferatie van de neoblasten beïnvloed wordt tijdens voorbehandeling met RNAi blijkt uit de ultrastructurele analyse dat HSP60 of HSP90 knock down geen invloed heeft op de **structurele integriteit**. Uit de ultrastructurele analyse van epidermis en neoblasten kan geconcludeerd worden dat er na hoge cadmiumblootstelling voornamelijk een effect is op de cellen van de epidermis, de stamcellen blijven nagenoeg onaangetast. Dit kan verklaard worden door het feit dat – in tegenstelling tot de stamcellen – de epidermis vrijwel rechtstreeks in contact staat met CdCl<sub>2</sub> in het medium.

In de epidermis is er na hoge cadmiumblootstelling voornamelijk schade aan de mitochondriën op de merken (figuur 8). Downregulatie van de HSPn lijkt hier geen invloed op te hebben. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat het zwellen van het membraan van de mitochondriën één van de vroegste effecten van cadmium is [49]. Het is mogelijk dat de 24u blootstelling in deze studie te kort was om ook schade aan andere organellen te veroorzaken. [49].

Er zijn op ultrastructureel niveau geen verschillen waar te nemen tussen de RNAi-behandelde en RNAi-onbehandelde organismen in de neoblasten en de epidermis. Dit zou verklaard kunnen worden doordat de dieren die voorbehandeld zijn met RNAi een gelijkaardig stressniveau ondervinden als de controledieren waardoor de beschadiging nagenoeg hetzelfde is. De resultaten van de ROS kleuring lijken dit te bevestigen. Er zijn hierbij niet meer fluorescente cellen zichtbaar in de RNAi-groep dan in de controlegroep. Bovendien zijn er bij de ROS-kleuring enkel bij 250µM CdCl<sub>2</sub> meer fluorescente cellen te zien dan bij alle andere concentraties cadmium. Dit zou kunnen verklaren waarom er enkel

bij blootstelling aan 250µM CdCl<sub>2</sub> en niet bij blootstelling aan 10µM CdCl<sub>2</sub> een effect op de ultrastructuur op te merken is.

#### 4.2 Morfologische en fysiologische effecten na HSP downregulatie

Downregulatie van HSP60 of HSP90 al dan niet tijdens cadmiumstress blijkt weinig invloed te hebben op de grootte en de mogelijkheid tot voortplanting van *M. lignano*. De **oppervlakte** van de organismen is een goede maat voor de grootte. Met de squeeze preparaten wordt een constante druk op de wormen uitgevoerd waardoor de gemeten oppervlakten met elkaar vergeleken kunnen worden. Tijdens controle omstandigheden en tijdens voorbehandeling met RNAi vertoonden de oppervlakten geen significante verschillen (figuur 5). Met behulp van de ROS kleuring kon er geen verschil opgemerkt worden tussen dieren die voorbehandeld zijn met RNAi dan de controledieren. Aangezien stresssituaties (zoals uithongering) een reductie in grootte zou kunnen veroorzaken, zijn dieren die meer stress ervaren vaak kleiner [33]. In dit experiment is er mogelijk geen verschil omdat de RNAi dieren een gelijkaardig niveau van stress ondervinden dan de niet RNAi dieren. In de toekomst is het nuttig om het effect van langdurige voorbehandeling met RNAi op de oppervlakte na te gaan. Uit de mitosekleuring blijkt dat de celproliferatie afneemt tijdens HSP60 en HSP90 knock down, dit zou uiteindelijk een invloed op de grootte van het organisme kunnen hebben. Het is mogelijk dat tijdens 8 dagen voorbehandeling met RNAi het totaal aantal cellen hetzelfde blijft, maar het aantal delende cellen verminderd. Wanneer de celproliferatie verhinderd wordt en de cellen niet meer vervangen kunnen worden, kan het aantal cellen op termijn afnemen. Hierdoor zou de grootte van de organismen ook beïnvloed kunnen worden.

HSP60 of HSP90 knockdown heeft geen invloed op de mogelijkheid tot **voortplanting** van deze platwormen. Tijdens voorbehandeling met RNAi leggen *M. lignano* immers nog eitjes waaruit levensvatbare juvenielen komen. Dit wordt bevestigd doordat met behulp van lichtmicroscopische observatie aangetoond is dat testes en ovaria duidelijk aanwezig zijn na downregulatie van HSP60 en HSP90 alsook bij controlegroepen. De aanwezigheid van deze voortplantingsorganen kan mede verklaard worden aan de hand van de spreiding van de mitosen. Hieruit is gebleken dat zowel bij HSP60 als bij HSP90 knockdown de mitotische cellen voornamelijk in de testes plaatsvinden. Aangezien er hier nog celdelingen voorkomen, zou het kunnen dat er nog spermatogenese optreedt waardoor de voortplanting niet in het gedrang komt. Ook de gonadale stamcelgenen vertonen geen verandering in genexpressie wat mede kan verklaren waarom de testes intact blijven (cfr infra).

#### 4.3 Moleculaire effecten

De effecten van HSP60 of HSP90 knock down manifesteren zich duidelijk op gebied van de celproliferatie, terwijl de ultrastructuur hierdoor niet beïnvloed wordt. Door middel van genexpressie analyses kan deze observatie op een verder niveau nagegaan worden. Er zijn enkele **overeenkomsten** tussen downregulatie van HSP60 en HSP90. Bij beiden is er onder andere een significante afname in expressie van rab15. Dit gen behoort tot de ras familie en is betrokken bij de celproliferatie. De effecten van voorbehandeling met RNAi op het aantal cellen in mitose kunnen mede hierdoor verklaard worden.

Hiernaast kan het voorkomen van testes en ovaria bij RNAi behandelde organismen ook gekoppeld worden aan de resultaten van de genexpressie analyses. Uit tabellen 4 en 6 is af te leiden dat er bij de RNAi-voorbehandelde organismen nagenoeg geen effect op de stamcelgenen waar te nemen is in vergelijking met de controle organismen. Deze genen zijn belangrijk voor het goed functioneren van onder andere gonadale stamcellen. Andere studies hebben aangetoond dat uitschakeling van piwi resulteert in steriliteit [50]. Ook heeft eerder onderzoek het belang van pumilio in de gonadale stamcellen aangehaald [51]. Vermits er geen significante effecten op deze genen waar te nemen zijn, kunnen deze belangrijke processen doorgaan waardoor de voortplanting niet verhinderd wordt.

Bovendien is er na voorbehandeling met HSP60 en HSP90 RNAi-probes een stijgende trend in HSP70 genexpressie waar te nemen. Deze upregulatie van HSP70 zou een interne compensatie kunnen zijn en verklaart ondermeer waarom er geen effecten op de ultrastructuur waar te nemen zijn. Het is namelijk geweten dat HSP70 nodig is voor de cytoprotectie [52]. Ook het feit dat de testes nog aanwezig zijn, kan verduidelijkt worden door de toename in HSP70 expressie. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat HSP70 beschermt tegen weefselschade in de testes [52].

Bovendien vormen HSP90 en HSP70 in normale omstandigheden een multichaperon complex dat betrokken is bij verscheidene processen. Voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat HSP90 inhibitie door middel van inhibitoren zoals geldamycine resulteert in een upregulatie van HSP70 [53]. Vaak wordt deze upregulatie verklaard aan de hand van de heat shock factoren. Deze zouden bij inhibitie van het HSP90 meer vrijkomen waardoor ze de expressie van andere HSPn zouden induceren. De studie van Taylor et al. toonde echter aan dat de upregulatie van HSP70 niet enkel via de HSFs gebeurt [53].

Naast de hierboven aangehaalde gelijkenissen tussen HSP60 en HSP90 downregulatie zijn er voornamelijk veel **verschillen** waar te nemen in de genexpressie analyses. In het algemeen kan uit tabellen 4 en 6 afgeleid worden dat uitschakeling van HSP90 tijdens blootstelling aan hoge cadmiuconcentraties schade aan de organismen toebrengt. Blootstelling aan 250µM CdCl<sub>2</sub> tijdens HSP90 knock down zorgt voor een dalende trend in alle bestudeerde genen, behalve HSP70 zoals eerder aangehaald. Bij downregulatie van HSP60 zijn er voornamelijk verschillen tussen RNAi-onbehandelde en RNAi-behandelde organismen in controle omstandigheden. Hieruit zou de hypothese afgeleid kunnen worden dat HSP90 cruciaal is tijdens extreme stresssituaties en dat HSP60 voornamelijk tijdens normale fysiologische omstandigheden belangrijk is.

Het expressie niveau van cdc37 neemt significant toe tijdens blootstelling aan **HSP60** RNAi (tabel 4). Hierdoor zou mede verklaard kunnen worden waarom het aantal mitosen bij HSP60 RNAi organismen nagenoeg vergelijkbaar is met controle organismen (figuur 3). Cdc37 is namelijk essentieel voor mitose aangezien een defect in dit gen zorgt voor een verstoring van dit proces [54]. In deze resultaten is er echter een upregulatie van cdc37 is, zodat de celdeling kan doorgaan.

Ook de genexpressie van een ander celcyclusgerelateerd gen, het cdc2, werd bepaald. Hier was een significante afname in expressie waar te nemen. De celcyclusgerelateerde genen geven dus niet allemaal hetzelfde patroon. Er is meer onderzoek nodig om een duidelijk beeld te kunnen vormen over de effecten van RNAi behandeling op deze genen.

Bij **HSP90** RNAi is er geen significant effect op de celcyclus gerelateerde genen. Cdc37 wordt vaak geassocieerd met HSP90, hoewel dit heat shock proteïne niet essentieel is voor het goed

functioneren van *cdc37* [55]. Daarom is het mogelijk dat dit celcyclus proteïne tijdens reductie van de HSP90 gen transcripten nog normaal kan functioneren. Desalniettemin is er in deze studie een reductie in het aantal mitotische cellen waargenomen bij blootstelling aan HSP90 RNAi. Het is dan ook mogelijk dat andere genen die essentieel zijn voor mitose beïnvloed worden door HSP90 die hier niet geanalyseerd zijn.

Bovendien is er een stijgende trend waar te nemen in transcriptlevels van *casp3* bij HSP90 dieren in vergelijking met niet voorbehandelde dieren (tabel 6). Dit proteïne is betrokken bij het mitochondriaal apoptose pathway. Aangezien het expressieniveau hier toeneemt, kan dat wijzen op een verhoging van het aantal cellen in apoptose. Het zou dan ook kunnen dat de cellen bij HSP90 knock down eerder de neiging hebben om in apoptose te gaan dan in mitose. Dit kan gelinkt worden aan de afname van delende cellen tijdens HSP90 knockdown in controle omstandigheden (figuur 3).

Bij HSP90 RNAi is er een stijgende trend in antioxidatieve genen waar te nemen. Hierdoor zou het kunnen dat de organismen in deze groep het meeste stress ondervinden waardoor deze genen upgereguleerd moeten worden. De ROS kleuring spreekt dit echter tegen. Hoewel de ROS kleuring het aantal ROS moleculen weergeeft en deze kunnen net omwille van de stijging in de antioxidatieve enzymen verminderen zodat het totaal aantal moleculen hetzelfde is als de controlegroep. Niettegenstaande zou het kunnen dat de dieren bij silencing van HSP90 meer stress ondervinden waardoor onder andere het aantal mitotische cellen afneemt.

### Vergelijking korte en lange voorbehandeling met RNAi op moleculair niveau

In deze thesis werd ook nagegaan wat het effect van langdurigere HSP60 RNAi blootstelling was op de transcriptlevels van het HSP60 gen. Wanneer *M. lignano* voor 3 weken aan HSP60 RNAi werden blootgesteld, was er 92% downregulatie van het HSP60. Na 1 week blootstelling aan de probes kon er een inhibitie van bijna 95% waargenomen worden. Het verschil in expressie is dan ook minimaal tussen de blootstellingperiodes. Een gen kan met behulp van RNAi niet volledig uitgeschakeld worden. Wanneer het nodig is om de effecten van volledige uitschakeling van een gen te onderzoeken, kan er daarom beter gebruik gemaakt worden van mutanten.

Een opmerkelijk contrast kan opgemerkt worden in de genexpressie van catalase in tabellen 4 (1 week) en 5 (3 weken). Bij blootstelling van de organismen aan HSP60 RNAi probes gedurende 1 week is de expressie van dit gen significant upgereguleerd bij RNAi-behandelde dieren. Tijdens 3 weken blootstelling aan deze probes zijn de transcriptlevels van catalase echter verlaagd in de RNAi-behandelde groep. Bij blootstelling aan RNAi gedurende 1 week kan er oxidatieve stress ontstaan waardoor catalase upgereguleerd wordt om hier bescherming tegen te bieden. Na 3 weken RNAi blootstelling zou het kunnen dat de ROS moleculen ervoor zorgen dat de expressie van het catalase gen onderdrukt wordt. In ander onderzoek is namelijk aangetoond dat langdurige blootstelling aan ROS kan zorgen voor een downregulatie van het catalase [56].

Na 3 weken lijken de stamcel- en celcyclusgenen ook minder tot expressie te komen bij silencing van HSP60. Daarom is het nuttig om de effecten van langdurige behandeling met RNAi op het organisme na te gaan. Tijdens controle omstandigheden zou er dan misschien wel een significant effect waar te nemen zijn op het aantal mitotische cellen en de testes.

## Conclusie

Heat shock proteïnen (HSPn) zijn van belang onder gewone fysiologische omstandigheden en hun beschermende rol neemt sterk toe tijdens stresssituaties. In deze thesis wordt nagegaan wat er op verschillende niveaus afspeelt wanneer de HSP transcripten downgereguleerd worden tijdens cadmiumstress in de platworm *Macrostomum lignano*. Dit onderzoek concentreert zich op 3 niveaus, nl. op niveau van het organisme, de cel en op moleculair niveau.

Het inhiberen van HSP60 en HSP90 gentranscripten blijkt geen invloed te hebben op het organisme in zijn geheel en op de voortplanting ervan. Er kon geen verschil in oppervlakte opgemerkt worden tussen de RNAi-behandelde en RNAi-onbehandelde organismen. De aanwezigheid van testes, ovaria en eitjes in beide groepen en het daaropvolgend constateren van levensvatbare juvenielen leidt tot de conclusie dat ook de reproductie van *M. lignano* niet in het gedrang komt.

Op **cellulair** niveau werd er gekeken naar celproliferatie en ultrastructuur. Het downreguleren van HSP60 of HSP90 had hierbij geen zichtbaar effect op de **ultrastructuur**. De stamcellen en epidermis van RNAi behandelde dieren waren vergelijkbaar met die van RNAi-onbehandelde dieren. Daarentegen had HSP60 of HSP90 knock down een grote impact op de **celproliferatie**. Vooral bij het silencen van HSP90 verminderde het aantal stamcellen in mitose drastisch onder zowel controle omstandigheden als onder cadmiumstress, deze cellen verschenen hier daarenboven voornamelijk in de testes.

Door middel van real time PCR werden de onderliggende **moleculaire** effecten van HSP60 of HSP90 knock down nagegaan. Vooral de toenemende transcriptlevels van HSP70 na silencen van HSP60 of HSP90 gentranscripten springen hierbij in het oog. De cytoprotectieve rol van HSP70 zou kunnen verklaren waarom de ultrastructuur van de epidermis en stamcellen onaangetast is tijdens HSP60 of HSP90 downregulatie. Een ander opvallend fenomeen is te zien bij de combinatie van hoge cadmiumconcentraties met het silencen van HSP90. Hierbij kan er een dalende trend in de genexpressie van alle onderzochte genen (stamcelgenen, antioxidatieve genen, celcyclus gerelateerde genen, apoptotische genen en oncogenen), behalve HSP70, geobserveerd worden. Om die reden zou het kunnen dat HSP90 vooral betrokken is bij het beschermen van de cel tijdens stresssituaties. Downregulatie van HSP60 lijkt daarentegen voornamelijk tijdens controle omstandigheden een effect te hebben op de transcriptlevels van andere genen. Hierbij is er een significant effect op de antioxidatieve genen (cat, MnSOD), tumor gerelateerde genen (p53d, rab15, ras7), celcyclusgenen (cdc37, cdc2), PCNA en PCDi.

Omwillen van deze resultaten kan geconcludeerd worden dat de heat shock proteïnen belangrijk zijn voor het organisme onder zowel controle omstandigheden als in stresssituaties. Het beschermende effect komt voornamelijk op gebied van stamcelproliferatie tot uiting.

In de toekomst is het nuttig om de effecten van HSP70 downregulatie al dan niet gecombineerd met andere HSPn na te gaan aangezien dit heat shock proteïne sterk upgereguleerd wordt tijdens het silencen van HSP60 of HSP90 gentranscripten. Op deze manier kan het 'beschermende' effect van HSP70 teniet gedaan worden en kan worden nagegaan of HSP70 daadwerkelijk de ultrastructuur van de cellen beschermt. Ook is het nuttig om de effecten van langdurige behandeling met RNAi op het

niveau van het organisme na te gaan. Uit de mitosekleuring blijkt namelijk dat de celproliferatie afneemt tijdens HSP60 of HSP90 knock down. Eveneens geven de resultaten van de genexpressie aan dat langdurig silencing van HSP60 de transcriptlevels van celcyclus- en stamcelgenen doet afnemen.

## Dankwoord

Deze thesis zou niet tot stand gekomen zijn als ik geen hulp en steun gekregen had van vele mensen, zowel binnen als buiten het labo.

Als eerste zou ik mijn promotor, dr. Karen Smeets, en mijn co-promotor, Prof. Dr. Tom Artois willen bedanken om mij de mogelijkheid te geven om met de meest interessante dieren te kunnen werken. Vervolgens wil ik mijn tweede beoordelaar dr. Tony Remans bedanken voor de tijd die hij besteed heeft aan het lezen en beoordelen van dit werk. Ook wil ik hem bedanken voor zijn enthousiasme en grappige gesprekken in het labo. Verder bedank ik mijn begeleidster Michelle Plusquin voor alle tijd die ze aan mij besteedde om vragen te beantwoorden, technieken aan te leren, experimenten op te volgen, mijn thesis te verbeteren tot in de late uurtjes,... Maar ook om samen testpopulaties te maken, het was altijd zoveel leuker met twee!!

Karen zou ik ook nog eens extra willen bedanken voor het opzetten van experimenten, het nalezen van mijn thesis, het helpen bij het interpreteren van de resultaten, het oplossen van probleempjes, haar oneindige enthousiasme,... Dankjewel om altijd zo positief te blijven en mij gerust te stellen!! Daar heb ik echt veel aan gehad! Vervolgens is er nog iemand die ik heel hard wil bedanken, Natascha. Bedankt voor de hulp bij de licht- en elektronenmicroscopische coupes, de real-time PCR platen, de opzet van experimenten, de fijne babbels,...en nog veel meer! Ik vond het echt heel fijn om samen te werken! Olivier, Andromeda en Albrecht zou ik ook willen bedanken voor het aanleren van technieken, de hulp bij de fluorescentiemicroscopie, het helpen oplossen van problemen, het beantwoorden van mijn vragen, de statistische analyse,... Maar ook voor de leuke sfeer die ze in het labo brachten. Ook wil ik Frank bedanken voor de hulp bij de elektronenmicroscopie en de interpretatie van de resultaten ervan. Verder bedank ik nog iedereen van de groep Dierkunde om telkens te helpen bij het oplossen van problemen en het beantwoorden van mijn vragen.

Tot slot wil ik de mensen bedanken die het dichtst bij mij staan. Eerst wil ik mijn vriendinnetjes, An-Sofie, Nicky en Véronique, bedanken voor alle leuke momenten die we samen in het labo gehad hebben. Maar ook voor de geruststellende babbels die mij veel steun gaven. Heel erg bedankt! Vervolgens wil ik mijn vriend Maarten bedanken om mij altijd op te vrolijken na alweer een vermoeiende stagedag! Bedankt, zo kon ik 's avonds even al mijn zorgen vergeten en een nieuwe dag vol positiviteit tegemoet gaan! Als laatste zou ik heel graag mijn moeke, mama en papa bedanken voor alle steun ALTIJD! Ik kon de voorbije jaren altijd bij jullie terecht. Meermaals hebben jullie mij moeten troosten als mijn stressniveau weer eens de overhand nam. Dankzij jullie steun ben ik altijd op mijn pootjes terechtgekomen! Mama wil ik nog eens speciaal bedanken voor de ontelbare koffietjes en koekjes die ze mij gebracht heeft wanneer ik hard voor school aan het werken was ☺. Ook nog eens dankjewel aan mijn moeke voor de fijne pauzes! Mijn broer, Chiron, zou ik eveneens willen bedanken voor het veelvuldig lenen van zijn snelle laptop ;). Als allerlaatste wil ik iemand speciaal bedanken, mijn vake. Hoewel hij er niet meer is, heb ik tijdens de laatste 2 jaar van mijn studies meermaals 'doe je best eh' "gehoord". Awel, dat heb ik altijd geprobeerd!



## Referenties

1. Jarup, L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. Br. Med. Bull., 68, 167-182.
2. URL: [http://www.euro.who.int/document/aiq/6\\_3cadmium.pdf](http://www.euro.who.int/document/aiq/6_3cadmium.pdf)
3. Hsiu-Chuan Liao V., Freedman JH. Cadmium-regulated genes form the nematode *Caenorhabditis elegans*. The Journal of Biological Chemistry 1998; 273(48): 31962-31970
4. Zalups RK., Ahmad S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. Toxicology and Applied Pharmacology 2003; 186: 163-188
5. Liu J., Qu W., Kadiiska MB., Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. Toxicology and Applied Pharmacology 2009; 238: 209-214
6. International Agency for Research on Cancer. Cadmium and cadmium compounds. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1993: 119–220.
7. Nawrot T., Plusquin M., Hogervorst J., Roels HA., Celis H., Thijs L., Vangronsveld J., Van Hecke E., Staessen JA. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. Lancet Oncology 2006; 7: 119-126
8. Wang L., Yan B., Liu N., Li Y., Wang Q. Effects of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. Chemosphere 2008; 74: 51-56
9. Kalafatic M., Kopjar N., Besendorfer V. The impairments of neoblast division in regenerating planarian *Polycelis felina* (Daly.) caused by in vitro treatment with cadmium sulfate. Toxicology in vitro 2004; 18: 99-107
10. Sanita di Toppi, L., Gabbrielli, R. Response to cadmium in higher plants. Environmental and Experimental Botany 1999; 41: 105–130.
11. Smeets K., Ruytinx J., Semane B., Van Belleghem F., Remans T., Van Sanden S., Vangronsveld J., Cuypers A. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. Environmental and Experimental Botany 2008; 63: 1-8
12. Bertin G., Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie 2006; 88: 1549-1559
13. Sharma S.K., Goloubinoff P., Christen P. Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. Biochemical and Biophysical Research Communications 2008; 372: 341-345
14. Şaplakoğlu U., İşcan M., 1998. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated in vitro with cadmium in S phase of their cell cycles. Mutation Research 412, 109-114.
15. Guo S., Wharton W., Moseley P., Shi H. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. Cell Stress & Chaperones 2007; 12(3): 245-254

16. Kalmar B., Greensmith L. Review: Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009; 61: 310-318
17. Gaubin Y., Vaissade F., Croute F., Beau B., Soleilhavoup JP., Murat JC., Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 human lung cell-line. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1495: 4-13
18. Ritossa, F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature and DNP in drosophila. *Experientia* 18, 571-573.
19. Sørensen JG., Kristensen TN., Loeschcke V. Review: The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* 2003; 6: 1025-1037
20. Kiang JG., Tsokos GC. Heat shock protein 70kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacology Therapeutics*. 1998; 80(2): 183-201
21. Yoshimi T., Odagiri K., Hiroshige Y., Yokobori SI., Takahashi Y., Sugaya Y., Miura T. Induction profile of HSP70-cognate genes by environmental pollutants in *Chironomidae*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2009; 28: 294-301
22. Ma KX., Chen GW., Lou H. Fei LN. Cloning and expression analysis of hsp70 gene from freshwater planarian *Dugesia japonica*. *Biologia* 2009; 64(5): 1018-1024
23. Franzellitti S., Fabbri E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochemical and biophysical research communications* 2005; 336: 1157-1163
24. Macario AJL., Lange M., Ahring BK., De Macario EC., Stress genes and proteins in the Archaea. *Microbiology and molecular biology reviews* 1999; 63(4): 923-967
25. Scheibel T., Buchner J. The hsp90 complex- a super-chaperone machine as a novel drug target. *Biochemical Pharmacology* 1998; 56: 675-682
26. Saibil H.R., Chaperone machines in action. *Current Opinion in Structural Biology* 2008; 18: 35-42
27. Stolzing A., Scutt A. Effect of reduced culture temperature on antioxidant defenses of mesenchymal stem cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2006; 41:326-338
28. Conte M., Deri P., Isolani ME. Mannini L, Batistoni R. A mortalin-like gene is crucial for planarian stem cell viability. *Developmental biology* 2009;334(1): 109-118
29. Sanchez Navarro B., Michiels NK., Kohler HR., D'Souza TG. Differential expression of heat shock protein 70 in relation to stress type in the flatworm *Schmidtea polychroa*. *Hydrobiologia* 2009; 636(1): 393-400
30. Abe T., Gotoh S., Higashi K. Attenuation by glutathione of hsp72 gene expression induced by cadmium in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 1999; 58: 69-76
31. Pearl LH. Hsp90 and Cdc37- a chaperone cancer conspiracy. *Current Opinion in Genetics & Development* 2005; 15:55-61

32. Ladurner P., Schärer L., Salvenmoser W., Rieger RM. A new model organism among the lower Bilateria and the use of digital microscopy in taxonomy of meiobenthic Platyhelminthes: *Macrostomum lignano*, n. sp. (Rhabditophora, Macrostomorpha). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 2005; 43(2): 114-126
33. Nimeth KT., Mahlnecht M., Mezzanato A., Peter R., Rieger R., Ladurner P. Stem cell dynamics during growth, feeding and starvation in the basal flatworm *Macrostomum sp.* (Platyhelminthes). *Developmental Dynamics* 2004; 230: 91-99
34. Nimeth KT., Egger B., Rieger R., Salvenmoser W., Peter R., Gschwentner R. Regeneration in *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes): cellular dynamics in the neoblast stem cell system. *Cell and tissue research* 2007; 327(3): 637-646
35. Ladurner P., Egger B., De Mulder K., Pfister D., Kualess G., Salvenmoser W., Schärer L. The stem cell system of the basal flatworm *Macrostomum lignano*. In: stem cells: from hydra to man. Ed. Thomas Bosch, Springer Verlag. 2008; p. 77
36. Pfister D., De Mulder K., Philipp I., Kualess G., Hroudá M., Eichberger P., Borgonie G., Hartenstein V., Ladurner P. The exceptional stem cell system of *Macrostomum lignano*: Screening for gene expression and studying cell proliferation by hydroxyurea treatment and irradiation. *Frontiers in Zoology* 2007; 4:9
37. Salvetti A., Rossi L., Bonuccelli L., Lena A., Pugliesi C., Rainaldi G., Evangelista M., Gremigni V. Adult stem cell plasticity: Neoblast repopulation in non-lethally irradiated planarians. *Developmental Biology* 2009; 328: 305-314
38. Pfister D., De Mulder K., Hartenstein V., Kualess G., Borgonie G., Marx F., Morris J., Ladurner P. Flatworm stem cells and the germ line: Developmental and evolutionary implications of macvasa expression in *Macrostomum lignano*. 2008; 319: 146-159
39. Ladurner P., Rieger R., Bagun J. Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine Platyhelminth *Macrostomum sp.*: A bromodeoxyuridine analysis. *Developmental Biology* 2000; 226: 231-241
40. Schnaider T., Oikarinen J., Ishiwatari-Hayasaka H., Yahara I., Csermely P. Interactions of Hsp90 with histones and related peptides. *Life sciences* 1999; 65(22); 2417-2426
41. Lange BMH. Bachi A., Wilm M., Gonzalez C. Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates. *EMBO Journal* 2000; 19(6): 1252-1262
42. Newmark PA., Alvarado AS. Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Developmental biology* 2000; 220: 142-153
43. Vamvakopoulos NO. Tissue-specific expression of heat-shocks 70 and 90: potential implication for differential sensitivity of tissues to glucocorticoids. *Molecular and cellular endocrinology* 1993; 98(1): 49-54
44. Gruppi CM., Wolgemuth DJ. HSP86 and HSP84 exhibit cellular specificity of expression and co-precipitate with an HSP70 family member in the murine testis. *Developmental Genetics* 1993; 14(2): 119)126

45. Zhang L., Pelech SL., Mayrand D., Grenier D., Heino J. Uitto VJ. Bacterial heat shock protein-60 increases epithelial cell proliferation through the ERK1/2 MAP Kinases. *Experimental Cell Research* 2001; 266: 11-20
46. Martinez-Diez M., Santamaria G., Ortega AD., Cuezva JM. Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs. *Plos One* 2006; 1(1): e107
47. Giambiagi-DeMarval M., Souto-Padro T., Rondinelli E. Characterization and cellular distribution of heat-shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* 1996; 83: 335-345
48. Lachance C., Fortier M., Thimon V., Sullivan R., Bailey JL., Leclerc P. Localization of Hsp60 and Grp78 in the human testis, epididymis and mature spermatozoa. *International Journal of Andrology* 2010; 33: 33-44
49. Braeckman B., Brys K., Rzeznik U., Raes H. Cadmium pathology in an insect cell line: ultrastructural and biochemical effects. *Tissue and Cell* 1999; 31(1): 45-53
50. Kuramochi-Miyagawa S., Kimura T., Ijiri TW., Isobe T., Asada N., Fujita Y., Ikawa M., Iwai N., Okabe M., Deng W., Lin H., Matsuda Y., Nakano T. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 2003; 131: 839-849
51. Parisi M., Lin H. The *Drosophila pumilio* gene encodes two functional protein isoforms that play multiple roles in germline development, gonadogenesis, oogenesis and embryogenesis. *Genetics* 1999; 153: 235-250
52. Mukhopadhyay I., Saxena DK., Bajpai VK., Chowdhuri DK. Argemone oil induced cellular damage in the reproductive tissues of transgenic *Drosophila melanogaster*: Protective role of 70 kDa heat shock protein. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2003; 17(4): 223-234
53. Taylor DM., Tradewell ML., Minotti S., Durham HD. Characterizing the role of Hsp90 in production of heat shock proteins in motor neurons reveals a suppressive effect of wild-type Hsf1. *Cell Stress & Chaperones* 2007; 12(2): 151-162
54. Lange BMH., Rebollo E., Herold A., González C. Cdc37 is essential for chromosome segregation and cytokinesis in higher eukaryotes. *The EMBO Journal* 2002; 21: 5364-5374
55. Turnbull EL., Martin IV., Fantes PA. Cdc37 maintains cellular viability in *Schizosaccharomyces pombe* independently of interactions with heat-shock protein 90. *Febs Journal* 2005; 272(16): 4129-4140
56. Min JY., Lim SO., Jung G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Letters* 2010; 584: 2427-2432

## **Auteursrechtelijke overeenkomst**

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

**Het beschermende effect van heat shock proteïnen in functie van celproliferatie tijdens cadmiumblootstelling in *Macrostomum lignano***

Richting: **master in de biomedische wetenschappen-milieu en gezondheid**

Jaar: **2010**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

**Saeren, Chayenne**

Datum: **15/06/2010**