

Speelt oxidatieve stress een rol in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie in Schmidtea mediterranea.

An-Sofie Stevens

promotor :
dr. Karen SMEETS

co-promotor :
Prof. dr. Tom ARTOIS

Inhoudsopgave

Afkortingen	i
Samenvatting	ii
I. Inleiding	1
1. Cadmium.....	1
1.1 Cadmiumvervuiling.....	1
1.2 Cadmiumtoxiciteit.....	1
1.2.1 Cellulaire effecten	1
2. De platworm <i>Schmidtea mediterranea</i>	6
2.1 <i>Schmidtea mediterranea</i> als modelorganisme.....	6
2.2 Het stamcelsysteem en de moleculaire regulatie.....	6
2.3 Cadmiumtoxiciteit bij platwormen	7
2.3.1 Effecten op het neoblastsysteem	7
3. Doelstelling	8
II. Materiaal en methoden	9
1. Modelorganisme en kweekmethode.....	9
2. Opzet van de experimenten	9
3. Cadmiumopname en -gevoeligheid.....	9
3.1 Metaalaccumulatie.....	9
3.2 LC50-test.....	10
3.3 Groottebepaling	10
4. Effect van cadmium op de stamcelproliferatie	10
4.1 Mitosekleuring	10
5. Moleculaire effecten van cadmiumstress	11
5.1 Enzymmetingen.....	11
5.1.1 Enzymextractie.....	11
5.1.2 Enzymanalyse.....	11
5.2 Genexpressie	13
5.2.1 RNA extractie	14
5.2.2 cDNA aanmaak.....	14
5.2.3 Real-time PCR.....	14
5.3 Heat shock respons blokkers.....	15
5.4 Statistiek.....	15

III. Resultaten	16
1. Cadmiumopname en -gevoeligheid.....	16
1.1 Metaalaccumulatie.....	16
1.2 LC50-test.....	17
1.3 Groottebepaling	17
2. Effect van cadmium op de stamcelproliferatie	18
2.1 Mitosekleuring	18
3. Moleculaire effecten van cadmiumstress	18
3.1 Metabolische effecten	18
3.2 Genexpressie	21
4. Cadmiumgevoeligheid bij onderdrukking heat shock respons	24
IV. Discussie	26
1. Cadmiumopname en -gevoeligheid.....	26
2. Effect van cadmium op de stamcelproliferatie	27
3. Moleculaire effecten van cadmiumstress	27
4. Cadmiumgevoeligheid bij onderdrukking heat shock respons	30
Conclusie	31
Dankwoord	32
Referenties	33

Afkortingen

CAT	Catalase
Cd	Cadmium
GPX	Glutathion peroxidase
GST	Glutathion-S-transferase
H₂O₂	Waterstofperoxide
HSF1	Heat shock factor 1
HSP60	Heat shock proteïne 60
HSP70	Heat shock proteïne 70
MAPK	Mitogeen-geactiveerde proteïne kinase
O₂	Zuurstof
O₂^{•-}	Superoxide radicaal
OH[•]	Hydroxylradicaal
ROS	Reactieve zuurstofsoorten
SOD	Superoxide dismutase

Samenvatting

Cadmium is een toxisch metaal dat van nature in het milieu aanwezig is. Antropogene activiteiten hebben echter gezorgd voor een sterke toename van cadmium in het milieu waardoor dit toxisch metaal een mogelijke bedreiging voor de gezondheid van planten, dieren en mensen vormt. De goede oplosbaarheid van cadmium in water zorgt ervoor dat ook aquatische organismen met dit metaal in aanraking komen.

De vrijlevende platworm *Schmidtea mediterranea* is een ideaal studieorganisme om de kennis over cadmiumtoxiciteit uit te breiden. Het biedt de mogelijkheid om de effecten van toxines *in vivo* te bestuderen in een simpel en toegankelijk organisme. *S. mediterranea* beschikt bovendien over een grote en experimenteel toegankelijke populatie somatische stamcellen, de neoblasten, die de enige delende cellen in de adulte worm zijn. Eerdere bevindingen toonden aan dat neoblasten blijven prolifereren onder cadmiumstress in *Macrostomum lignano*. Aangezien oxidatieve stress een belangrijk rol speelt in cadmiumtoxiciteit, is een verstoorde redoxbalans mogelijks betrokken in deze cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie. Dit onderzoek is bedoeld als een eerste screening naar de rol van oxidatieve stress in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie. Zowel de algemene cadmiumtoxiciteit op niveau van het organisme als de onderliggende mechanismen van cadmiumtoxiciteit op moleculair niveau werden bestudeerd. De stamcelproliferatie werd op cellulair niveau gekwantificeerd.

De cadmiumopname en -gevoeligheid werden eerst bepaald. Hieruit bleek dat dit organisme een hoge cadmiumtolerantie heeft in vergelijking met andere invertebratensoorten en dit geen gevolg is van een excretiemechanisme dat cadmium na blootstelling terug uit het lichaam verwijdert. Het opgenomen cadmium had duidelijk effect op de stamcelproliferatie na een langere blootstellingstermijn aan verschillende cadmiumconcentraties. De neoblasten bleven actief delen in alle condities en na 2 weken blootstelling nam het aantal prolifererende neoblasten zelfs toe bij een hogere cadmiumconcentratie. De wormen namen onder invloed van cadmium ook in oppervlakte toe. Om te achterhalen of oxidatieve stress een rol speelt in deze cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie, werd nagegaan of de redoxbalans verstoord was na een korte en lange blootstellingstermijn aan cadmium. Zowel de activiteit van antioxidatieve enzymen (CAT, GST, GPX, SOD) als de expressie van antioxidatieve genen (GPX, SOD) werd geïnhibeerd, hetgeen op de aanwezigheid van oxidatieve stress wijst. Ook de expressie van genen (HSP60, HSP70, MAPKp38 en p53), waarvan geweten is dat ze beïnvloed worden door oxidatieve stress, was verstoord. Samengevat kan de hypothese gesteld worden dat oxidatieve stress inderdaad een rol speelt in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie. Via welk mechanisme een verstoorde redoxbalans uiteindelijk tot stamcelproliferatie leidt, zal verder onderzoek moeten uitwijzen. Een eerste stap werd reeds gezet in deze studie door de rol van heat shock proteïnen (HSPn) in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie verder uit te diepen. Een uitschakeling van de heat shock respons door middel van triptolide, een heat shock factor blokker, veroorzaakte een verhoogde gevoeligheid van *S. mediterranea* voor cadmium. Aangezien HSPn sterk aanwezig zijn in neoblasten, is dit een indicatie van een belangrijke rol van HSPn in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie, mogelijks via een verstoorde redoxbalans, die in toekomstig onderzoek verder bestudeerd kan worden.

I Inleiding

1. Cadmium

Cadmium is een bivalent kation dat behoort tot de niet-essentiële, zware metalen. Het is in de natuur niet terug te vinden in zijn pure vorm, maar is meestal gebonden aan andere elementen zoals zuurstof (cadmiumoxide), chloor (cadmiumchloride) of zwavel (cadmium sulfaat, cadmium sulfide). Cadmium is in zeer lage concentraties aanwezig in de aardkorst (0.2 mg/kg) in ertsen samen met zink, lood en koper [1,2].

1.1 Cadmiumvervuiling

Vulkaanuitbarstingen, bosbranden en erosie zijn verantwoordelijk voor de natuurlijke verspreiding van cadmium in onze omgeving. De grootste hoeveelheid cadmium komt echter in het milieu terecht door antropogene bronnen, zoals via verbranding van zinkertsen of via fosfaatmeststoffen. Bovendien is cadmium op vele vlakken een vitale component van de moderne technologie geworden door zijn gebruik in pigmenten, als stabilisator van plastic en in herlaadbare cadmium-nikkel batterijen. De cadmium productie, consumptie en emissie in de omgeving is bijgevolg wereldwijd dramatisch gestegen tijdens de 20ste eeuw [1,2].

1.2 Cadmiumtoxiciteit

Nadat cadmium de bodem, het water of de lucht is binnengetreten, kan het accumuleren in organismen en ecosystemen. Cadmium is echter niet essentieel voor planten, dieren en mensen en oefent zijn toxische effecten op verschillende niveaus uit [3].

1.2.1 Cellulaire effecten

Cadmium kan via de interactie met essentiële groepen (-SH groepen), via het verplaatsen van essentiële cofactoren of via inductie van oxidatieve stress, de structuur en functie van verschillende moleculen verstoren. In de volgende paragrafen worden verschillende effecten van cadmium op het cellulaire niveau besproken: de inductie van oxidatieve stress en de verdedigingsrespons, de stimulatie/inhibitie van apoptose en de carcinogene effecten.

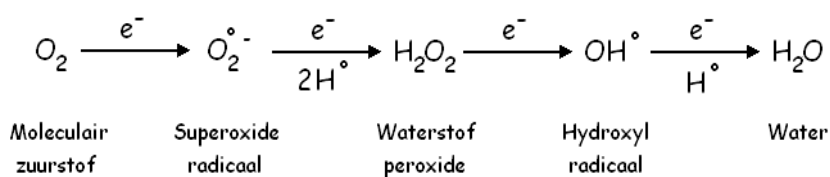
Oxidatieve stress

Zuurstof speelt een fundamentele rol in zowel de overleving als de dood van organismen. Aeroben hebben O₂ nodig voor energieproductie en respiratie, maar hiernaast is O₂ echter ook een toxisch, mutageen gas. Aeroben kunnen enkel overleven omdat ze antioxidatieve verdedigingssystemen hebben ontwikkeld die hen beschermen tegen een overmaat aan partieel gereduceerde, reactieve zuurstofsoorten (ROS). Wanneer deze balans tussen ROS, oftewel pro-oxidanten, en antioxidanten verstoord geraakt en de hoeveelheid ROS de antioxidatieve capaciteit overstijgt, spreekt men van oxidatieve stress. Oxidatieve stress kan het gevolg zijn van een stijging in de ROS productie, een daling in antioxidanten of een combinatie van beiden. ROS kunnen schade veroorzaken aan de bouwstenen van levende organismen: DNA, proteïnen en lipiden [4].

Reactieve zuurstofsoorten

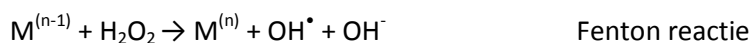
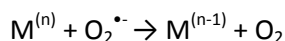
ROS zijn chemisch reactieve moleculen die afgeleid zijn van zuurstof. Het zijn dus niet alleen de zuurstofradicalen, die één of meer ongepaard elektron hebben, maar ook niet-radicalen afgeleiden van zuurstof [4]. ROS worden continu geproduceerd in dieren, hoofdzakelijk als onwelkome bijproducten van verschillende endogene bronnen en processen zoals auto-oxidatie en fotochemische en enzymatische reacties. Het aantal enzymen dat ROS kan genereren is aanzienlijk: cytochroom P450, verschillende oxidasen, peroxidasen, lipoxygenasen en dehydrogenasen. Maar de belangrijkste bron van ROS zijn waarschijnlijk de mitochondria [5,6].

Het merendeel van het opgenomen molecuulair zuurstof wordt in de elektronentransportketen van de mitochondria viervoudig gereduceerd tot water, waarbij ATP geproduceerd wordt (figuur 1).



Figuur 1: De univalente reductie van molecuulair zuurstof tot water.

Molecuulair zuurstof is kinetisch stabiel omwille van de identieke spins van zijn twee uiterste orbitaal elektronen. Wanneer echter de juiste katalysatoren in de buurt zijn (vb. transitie-metalen), ontstaan partieel gereduceerde vormen van zuurstof [7]. De primaire ROS die gevormd wordt in aerobe organismen is het superoxide radicaal ($\text{O}_2^{\bullet -}$), dat ontstaat door reductie van molecuulair zuurstof met één elektron. Verdere reductie van $\text{O}_2^{\bullet -}$ produceert waterstofperoxide (H_2O_2). H_2O_2 heeft enkel gepaarde elektronen en is geen radicaal, maar kan wel verder reageren en het hydroxyl radicaal (OH^\bullet) produceren via de Fenton of Haber-Weiss reactie:



De bovenstaande reactie is afhankelijk van de aanwezigheid van een gepaste, redoxactieve katalysator zoals Fe^{2+} of Cu^{2+} [6,8].

ROS kunnen snel reageren met de meeste biomoleculen, waardoor een kettingreactie van vrije radicaalvorming ontstaat. Om deze kettingreactie te stoppen, moet een nieuw gevormd radicaal ofwel reageren met een ander vrij radicaal en de ongepaarde elektronen elimineren, ofwel reageren met een scavenger van vrije radicalen zoals een antioxidant [9]. De snelheid of hoeveelheid van ROS productie kan verhogen in aanwezigheid van een groot aantal natuurlijke en antropogene xenobiotica zoals dioxines, metaalcontaminanten, UV en hypoxie. Deze contaminanten kunnen ROS productie stimuleren door verschillende mechanismen, zowel direct (vb. UV) als indirect (vb. cadmium) [6].

ROS kunnen reageren met cellulaire macromoleculen zoals lipiden, proteïnen en nucleïnezuren, wat een verstoorde structuur en/of functie tot gevolg heeft. De interactie van ROS met lipiden zorgt voor lipidenperoxidatie. De oxidatie van proteïnen en de grootte van de resulterende schade is afhankelijk van de locatie van de proteïnen ten opzichte van de plaats van ROS vorming en van hun samenstelling en structuur. Oxidatieve schade aan het DNA kan resulteren in modificaties, strengbreuken en DNA-proteïne crosslinks. Er wordt geschat dat ROS verantwoordelijk zijn voor ongeveer 10000 DNA basenmodificaties per cel per dag. Vooral mitochondriaal DNA en telomeren zouden kwetsbaar zijn [4,10].

Ondanks de grote aandacht voor de nadelige effecten van ROS, is ondertussen ook duidelijk geworden dat lage concentraties ROS onmisbaar zijn in verschillende biochemische processen zoals intracellulaire signalisatie, cellulaire differentiatie, groei-inhibitie, apoptose en immuniteit [7]. Variaties in de mitochondriale H₂O₂ productie signaleren aan het cytoplasma en de nucleus wat de mitochondria doen. Dit leidt tot veranderingen in nucleaire gentranscriptie via redoxregulatie en fosforylatie van transcriptiefactoren. Hoewel er altijd meer aandacht is uitgegaan naar fosforylatie en defosforylatie van enzymen en transcriptiefactoren, is regulatie door oxidatie en reductie (redoxregulatie) even belangrijk. Meer nog, de twee systemen communiceren zelfs met elkaar: de redoxstatus van de cel beïnvloedt fosforylatie en omgekeerd

MAPK

Eén van de belangrijkste redoxgevoelige signaaltransductiecascade is de mitogeen-geactiveerde proteïne kinase (MAPK) pathway. Er bestaan drie belangrijke MAPK pathways: extracellulair signaal-gereguleerd kinase (ERK), JUN N-terminaal kinase (JNK) en p38 kinase. In het algemeen wordt ERK geactiveerd door receptoren van groeifactoren en zorgt het voor een stimulatie van celproliferatie, terwijl JNK en p38 worden geactiveerd door genotoxische stoffen en stress. Cadmium is een regulator van alle drie deze pathways en veroorzaakt, afhankelijk van de blootstellingsconcentratie, verschillende effecten in verschillende celtypes. Terwijl ERK hoofdzakelijk anti-apoptotisch is, vergemakkelijken de stress-geactiveerde kinasen JNK en p38 apoptose in cellen die aan omgevingsstress worden onderworpen. Een algemeen mechanisme waarop cadmium de activiteit van vele kinasen verhoogt, is door de concentratie van ROS te verhogen. Dit leidt op zijn beurt tot een oxidatie van thiolgroepen op de kinase-regulerende fosfatasen. Het is echter ook mogelijk dat cadmium direct inwerkt op fosfatasethiolen of dat het veranderingen in de concentraties van second messengers veroorzaakt [11,12].

Deze effecten op signalisatie kunnen ook de respons van de cel op andere toxische effecten van cadmium versterken, zoals ondermeer de directe schade aan enzymen en transporters, de thioloxidatie en de verhoging van ROS concentraties. Op die manier beïnvloedt cadmium de cellulaire functie, de gentranscriptie en genregulatie, wat kan resulteren in celdood en/of herstel en overleving [11].

Verdedigingsmechanismen

De cel heeft degelijke verdedigingsmechanismen nodig die ROS signalisatie onder controle houden en ROS schade voorkomen. Een mogelijk mechanisme is de concentratie van O₂ zo laag mogelijk houden of de omzetting van O₂ naar ROS moeilijker maken. Een ander mechanisme zijn de proteïnen

die metaalionen binden (vb. transferrine) en op die manier verhinderen dat het sterk reactieve hydroxylradicaal via de Fenton reactie wordt gevormd.

Indien bovenstaande mechanismen niet baten en er toch oxidatieve stress optreedt, zullen enzymen en metabolieten van het antioxidatief verdedigingssysteem geactiveerd worden. In geval van schade zullen stressproteïnen (vb. HSPn) tot expressie worden gebracht die de schade aan biomoleculen herstellen [4].

Antioxidatieve verdedigingsmechanismen

Het natuurlijk antioxidatief systeem bestaat uit een reeks antioxidatieve enzymen en endogene antioxidatieve metabolieten die met ROS reageren en het vervolgens inactiveren. Cellen zorgen voor een voorraad antioxidanten, vaak aangeduid als het antioxidatieve potentiaal, via voedselopname en/of de novo synthese. Belangrijke antioxidatieve enzymen zijn onder meer superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxidase (GPX) en glutathion-S-transferase (GST).

Dieren bezitten twee isozymen van SOD: mitochondriaal Mn SOD en cytosolair Cu/Zn SOD. SOD katalyseert de dismutatie van $O_2^{\cdot-}$ naar O_2 en het minder reactieve H_2O_2 : $2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

In tegenstelling tot $O_2^{\cdot-}$, dat dichtbij de plaats van zijn productie blijft, kan H_2O_2 diffunderen over membranen en door het cytosol. Aangezien H_2O_2 een sterk oxiderende stof is, hebben cellen een hoge expressie van enzymen nodig die peroxides inactiveren. CAT en GPX vervullen deze rol.

CAT is een tetramerisch peroxidase enzym dat voorkomt in peroxisomen en mitochondria. Het zet H_2O_2 om in water en moleculair zuurstof: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

GPX is een selenium-bevattend tetramerisch enzym dat H_2O_2 reduceert naar water door glutathion als waterstofdonor te gebruiken: $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$

GST katalyseert de toevoeging van glutathion aan substraten (X) waardoor het minder reactieve glutathion-S-conjugaat wordt gevormd: $RX + \text{glutathion} = HX + R\text{-S-glutathion}$

Naast enzymen zijn er ook veel non-enzymatische antioxidanten zoals glutathion, β -caroteen, ascorbaat (vitamine C) en α -tocopherol (vitamine E) [9].

Schadeherstellende verdedigingsmechanismen

Ondanks alle verdedigingsmechanismen kan er nog altijd oxidatieve schade plaatsvinden. De laatste verdediging tegen de schadelijke effecten van oxidanten is het verwijderen of herstellen van beschadigde moleculen [10]. Wanneer het intracellulair milieu oxidatiever wordt, ten gevolge van oxidatieve stress, kunnen intracellulaire componenten zoals DNA, lipiden en proteïnen een oxidatie ondergaan. Proteïnen die extra gevoelig zijn voor veranderingen in de intracellulaire pH, de redoxstatus en het ionisch milieu kunnen gemakkelijk hun natuurlijke conformatie verliezen en verkeerd vouwen. Een accumulatie van deze onfunctionele, geoxideerde proteïnen kan leiden tot celdood via de activatie van de apoptotische celdood pathway.

Heat shock proteïnen (HSPn) kunnen dankzij hun veelzijdige functies op verschillende niveaus interveniëren na oxidatieve stress. Allereerst spelen sommige HSPn (vb. HSP 70) een cruciale rol in

het sorteren en het controleren van de kwaliteit van proteïnen door afwijkende proteïnen te selecteren en te leiden naar het proteasoom of de lysosomen voor degradatie. HSPn helpen dus bij het verwijderen van beschadigde proteïnen. Verder zijn er HSPn die een antiontstekende werking hebben. Tenslotte zijn er nog HSPn die apoptose inhiberen door te binden aan leden van de apoptosecascade [13].

Apoptose

Apoptose of geprogrammeerde celdood is belangrijk in de ontwikkeling en weefselhomeostase van multicellulaire organismen [14]. Verschillende studies hebben de inductie van apoptose na cadmiumintoxicatie aangetoond. De stijging in apoptotische cellen is hierbij concentratie afhankelijk. Cadmiumgeassocieerde apoptose wordt gekenmerkt door afbraak van de mitochondriale membraanpotentiala, chromatine condensatie en fragmentatie van het DNA en de nucleus [15]. Inductie van oxidatieve stress zou een belangrijk mechanisme zijn dat verantwoordelijk is voor cadmiumgeïnduceerde apoptose [3].

Verschillende groepen hebben aangetoond dat cadmiumgeïnduceerde celdood geassocieerd is met een verhoogd aantal p53 proteïnen en verhoogde p53 mRNA niveaus [15].

Hoewel cadmium apoptose en celdood kan induceren, kan het ook verantwoordelijk zijn voor een populatie van genetisch beschadigde en apoptose-resistente cellen, die een verhoogde proliferatieve capaciteit hebben en kunnen resulteren in een kwaadaardige transformaties en carcinogenese [16].

Carcinogene effecten

Het carcinogeen potentiaal van cadmium is zowel in experimentele als epidemiologische studies naar voren gekomen. Experimentele dieren produceerden tumoren in verschillende organen (prostaat, pancreas,...) na blootstelling aan cadmium. Epidemiologische studies toonden vooral een causaal verband aan tussen cadmium en longkanker, maar ook kankers van de prostaat, de nieren en de pancreas zijn waargenomen in populaties die blootgesteld werden aan cadmium. Het IARC (International Agency for Research on Cancer) heeft cadmium bijgevolg geklasseerd als een humaan carcinogeen klasse I [17].

De onderliggende mechanismen, die betrokken zijn in cadmium carcinogenese, kunnen onderverdeeld worden in vier groepen: afwijkende genexpressie, inhibitie van het DNA schade herstel, inhibitie van apoptose en inductie van oxidatieve stress.

Cadmium kan een gewijzigde expressie induceren in IEG's (immediate early response genes), stress respons genen (vb. heat shock en GSH) en transcriptie- en translatiefactoren. Er zijn verschillende mechanismen verantwoordelijk voor deze cadmiumgeïnduceerde wijziging in genexpressie, waaronder wijzigingen in de concentraties van second messengers als Ca^{2+} en ROS.

Het potentieel van cadmium om het herstel van DNA schade te inhiberen, wordt beschouwd als een belangrijk mechanisme van cadmium carcinogeniteit. Deze inhibitie zou een gevolg zijn van de effecten van cadmium op enzymen die een hoofdrol spelen in herstelprocessen. Verschillende van deze enzymen zijn leden van de zinkvinger familie van proteïnen. Cadmium kan de plaats van zink innemen, wat leidt tot het slecht functioneren van deze enzymen.

De inhiberende rol van cadmium op apoptose en het stimulerend effect op de vorming van ROS werden eerder beschreven [16].

2. De platworm *Schmidtea mediterranea*

De platworm *Schmidtea mediterranea* is een ideaal studieorganisme om de kennis over toxiciteit uit te breiden, aangezien het de mogelijkheid biedt om effecten van toxines *in vivo* te bestuderen op een simpele en toegankelijk manier. Het is een vrijlevende platworm (Turbellaria), behorende tot de familie Dugesidae (Platyhelminthes: Tricladida), die leeft in de stromende zoetwater gemeenschappen van het mediterrane gebied [18,19].

Schmidtea mediterranea bevat verschillende niet-prolifererende, gedifferentieerde celtypes, gemixt met een populatie van stamcellen of neoblasten. Een neoblast is een klein celtype (5-8 microns in diameter) dat sterk ongedifferentieerd is, een grote nucleï en zeer weinig cytoplasma heeft en dat kan differentiëren in elk celtype van de platworm. De neoblasten zorgen ervoor dat platwormen een volledig organisme kunnen regenereren uit kleine lichaamsdelen. Naast hun regeneratieve capaciteit kan de morfologische plasticiteit van platwormen ook worden aangetoond door hun mogelijkheid om te groeien en te krimpen, afhankelijk van de voedselbeschikbaarheid [19,20,21].

2.1 *Schmidtea mediterranea* als modelorganisme

Schmidtea mediterranea is een zeer geschikt organisme voor moleculaire en genetische analyses. Het bezit een stabiel, diploïd ($2n=8$) genoom dat een grootte heeft van slechts 4.8×10^8 basenparen en dat bovendien volledig gesequeneerd en geannoteerd is. Daarnaast is *S. mediterranea* eenvoudig te kweken en te onderhouden in het laboratorium. *S. mediterranea* kan zich sexueel of asexueel, via transverse splitsing, voortplanten. In dit onderzoek wordt met de asexuele stam gewerkt. De grote populatie van neoblasten zorgt ervoor dat reeds 7 dagen na de afsplitsing van het staartstuk zowel het kop- als het startdeel hun missende lichaamsdelen hebben geregenereerd. Door op regelmatige basis individuele wormen te snijden en de resulterende fragmenten de kans te geven om te regenereren, kunnen klonale kolonies van duizenden individuen worden opgezet. Dit heeft als voordeel dat er een uniforme genetische achtergrond ontstaat voor de daaropvolgende moleculaire analyses [20,22].

2.2 Het stamcelsysteem en de moleculaire regulatie

Er wordt intensief onderzoek gedaan naar moleculen die geassocieerd zijn met de regulatie van stamcellen. Een belangrijke beperking in de studie van stamcellen ligt echter in de toegankelijkheid van deze cellen en de moeilijkheid om ze *in vivo* te bestuderen. Deze barrière wordt verergerd door de beperkingen van *in vitro* cultuursystemen, die niet in staat zijn om de micro-omgevingen waarin stamcellen gevestigd zijn te imiteren. Omwille van de complexiteit en relatieve ontoegankelijkheid van embryonale en adulte stamcelpopulaties in vertebraten zoals de muis en de mens, heeft de stamcelstudie er baat bij wanneer eenvoudigere organismen worden bestudeerd. In het verleden heeft het gebruik van de invertebrate modelorganismen *Drosophila melanogaster* en *Caenorhabditis elegans* onschatbare bijdragen geleverd aan onze kennis van genen en pathways die betrokken zijn in tal van menselijke ziektes. Stamcellen in deze organismen zijn echter vooral beperkt tot de gonaden

en noch *D. melanogaster* noch *C. elegans* is in staat om lichaamsdelen te regenereren na schade. Daarom is een eenvoudiger dier met experimenteel toegankelijke stamcellen, die een rol spelen in weefsel homeostase en/of regeneratie, zeer nuttig om de mechanismen, die de stamcelactiviteit regelen, te identificeren en te testen.

De platworm *Schmidtea mediterranea* geeft de mogelijkheid om de somatische stamcelbiologie te bestuderen en hierbij de huidige experimentele beperkingen te omzeilen. Omdat *S. mediterranea* een grote hoeveelheid stamcellen (de neoblasten) en een relatief klein aantal gedifferentieerde celtypes bevat, is het mogelijk om deze stamcelpopulatie *in vivo* te analyseren [23]. Hun stamcelsysteem kan bovendien als uniek worden beschouwd binnen het dierenrijk. Dit is enerzijds omdat hun stamcellen of neoblasten de enige delende cellen in de adulte worm zijn, die instaan voor de celvernieuwing tijdens homeostase, ontwikkeling en regeneratie en anderzijds omdat deze neoblasten vermoedelijk totipotent zijn [24]. Daarnaast zijn platwormen ideale modelorganismen voor de studie van homologe genen die betrokken zijn in het behoud van stamcellen, een proces dat evolutionair veel beter bewaard is dan aanvankelijk werd gedacht. Voorbeelden hiervan zijn genen die betrokken zijn bij de zelfvernieuwing van stamcellen (vb. PIWI, lid van de Argonaute familie) en bij het behoud van de lage differentiatie potentiaal ((vb. Smed-Cbx-1 (Chromobox), Smed-HDAC-1 en Smed-HMGB-1 en -2)) [25,26]. Ten slotte heeft onderzoek met *S. mediterranea* voor belangrijke doorbraken gezorgd in de ontdekking van signaalmoleculen die verantwoordelijk zijn voor neoblastdifferentiatie ((vb. β -catenine, bone morphogenetic protein (BMP) en hedgehog)) [27].

2.3 Cadmiumtoxiciteit bij platwormen

De opname van cadmium in de platworm gebeurt in de meeste gevallen via een passief proces met behulp van een concentratiegradiënt. Cadmium kan echter ook via actief transport, door calcium ionpompen, worden opgenomen [28].

Een blootstelling aan CdCl_2 resulteert bij de platworm *Dugesia etrusca* in een verhoogde mucusproductie. Dit verdedigingsmechanisme bemoeilijkt diffusie van cadmium in de lichaamscompartimenten. Uit studies op verschillende platwormen is gebleken dat een chronische cadmiumblootstelling een verhoogde letaliteit veroorzaakt en dit op een dosisafhankelijke manier. Voor hun dood vertoonden de wormen algemene toxische effecten zoals veranderingen in de lichaamsoppervlakte (vb. oedeem) en zweren. Er was ook een karakteristieke ontbinding van het hoofd waarneembaar. Een chronische cadmiumblootstelling resulteert bovendien in een hogere incidentie van kwaadaardige tumoren. Naast een verhoogde mortaliteit lokt cadmium ook andere fysiologische disfuncties in het zenuwstelsel uit, zoals stoornissen in de voortbeweging en onderdrukking van de voortplanting [29,30].

2.3.1 Effecten op het neoblastsysteem

De invloed van stress op stamcellen werd al in verschillende studies waargenomen. Het effect van cadmiumstress op stamcellen werd bestudeerd bij de platworm *Polycelis felina*. Een blootstelling aan cadmiumsulfaat induceert in *P. felina* een dosisafhankelijke daling in de neoblastdeling ten gevolge van verschillende mitotische en chromosomale afwijkingen en mitotische vertragingen [31]. Verhongering zorgt voor een daling in de mitotische activiteit van de neoblasten bij

Macrostomum lignano. Wanneer de wormen opnieuw gevoed worden, vindt er onmiddellijk proliferatie van de neoblasten plaats [32].

3. Doelstelling

De vrijlevende platworm *Schmidtea mediterranea* bezit een grote populatie somatische stamcellen, de neoblasten. Hoewel deze cellen in dit organisme experimenteel erg toegankelijk zijn, staat het onderzoek ernaar nog in zijn kinderschoenen. Een studie in ons labo gaf aan dat neoblasten blijven repliceren tijdens cadmiumstress in de platworm *Macrostomum lignano*. Omdat de redoxbalans een belangrijk rol speelt in celproliferatie en verstoord is tijdens cadmiumblootstelling, zou deze ook een rol kunnen spelen in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie in *S. mediterranea*. Het doel van mijn thesis is dan ook om een eerste screening naar de rol van oxidatieve stress in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie uit te voeren bij *S. mediterranea*. Er wordt zowel naar de algemene cadmiumtoxiciteit op niveau van het organisme, als naar de onderliggende mechanismen van cadmiumtoxiciteit op moleculair niveau gekeken. De stamcelproliferatie wordt op cellulair niveau gekwantificeerd.

In een eerste fase wordt de cadmiumopname en -gevoeligheid bepaald. Om na te gaan of cadmium, toegediend via het medium, wel degelijk door de wormen wordt opgenomen, wordt een metaalbepaling uitgevoerd. De cadmiumgevoeligheid wordt bepaald door middel van een LC50-test, waarin de mortaliteit wordt nagegaan na een korte blootstellingstermijn (1 tot 3 dagen) en een lange blootstellingstermijn (1 tot 3 weken). De gevoeligheid wordt eveneens nagegaan door de invloed van 0, 2.5, 5 en 10 μM CdCl_2 op de grootte van de worm te bestuderen bij dezelfde blootstellingstermijnen.

In een tweede fase wordt het effect van cadmium op de stamcelproliferatie bepaald. Hiervoor worden dezelfde cadmiumconcentraties gebruikt om het effect van een lange blootstelling op de stamcelproliferatie na te gaan met behulp van een mitosekleuring.

In een derde fase worden ook enkele onderliggende moleculaire mechanismen bestudeerd. Oxidatieve stress wordt enerzijds nagegaan door de activiteit van de antioxidatieve enzymen CAT, GPX, GST en SOD na een korte en lange blootstelling aan 0, 2.5, 5 en 10 μM CdCl_2 te meten met behulp van spectrofotometrie, en anderzijds door het effect van deze cadmiumconcentraties op de expressie van stressgenen, een tumorsuppressorgen, antioxidatieve genen en een kinase betrokken bij regulatiemechanismen te meten met behulp van real-time PCR bij dezelfde blootstellingstermijnen aangevuld door een korte blootstellingstermijn (4 uur en 8 uur).

Op basis van de bekomen resultaten en eerder onderzoek wordt tenslotte een LC50-test uitgevoerd, waarmee wordt onderzocht of er een gewijzigde gevoeligheid voor cadmium ontstaat wanneer de verdedigingsrespons, geregeld door heat shock proteïnen, wordt uitgeschakeld met behulp van triptolide (HSF1 blokker). De mortaliteit wordt hierbij bekeken na een korte en lange blootstellingstermijn.

II Materiaal en methoden

1. Modelorganisme en kweekmethode

Schmidtea mediterranea is een vrijlevende platworm, behorende tot de familie DugesIIDae, die leeft in de stromende zoetwater gemeenschappen van het mediterrane gebied [18,19]. Dit organisme kan zich, dankzij de aanwezigheid van adulte stamcellen, zowel seksueel als asexueel voortplanten. In deze studie werd geopteerd voor de asexueel reproducerende stam, oorspronkelijk afkomstig uit Barcelona (Spanje, labo van Emili Saló), die zich om de 3 à 4 weken splitst. Door de worm dwars door midden te snijden en vervolgens 3 weken te laten regenereren kon er met genetisch identieke lijnen worden gewerkt. De culturen van *S. mediterranea* werden in het laboratorium in een temperatuursgecontroleerde kamer bij 20°C onderhouden in glazen containers gevuld met een zoetwater medium. Dit medium bestond uit dubbel gedestilleerd water dat aangereikt werd met 1.6 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM KCl en 1.2 mM NaHCO₃. De organismen werden één keer per week voor ongeveer 4 uur gevoed met kalfslever en overgeplaatst in vers medium.

2. Opzet van de experimenten

De platwormen, bestemd voor een experiment, werden vooraf drie keer gesneden met telkens een interval van 3 weken. Hiermee wordt getracht de organismen in hetzelfde fysiologische stadium te brengen bij de start van elk experiment. De gesneden wormen werden per 5 individuen overgezet in een petriplaat met medium. Ze werden 2 maal per week gedurende 4 uur gevoed en overgezet in vers medium. Na deze 9 weken waren de wormen klaar voor het experiment en werden ze gerandomiseerd per 10 individuen overgebracht in een petriplaat met 20 ml cadmiumoplossing: CdCl₂*2 H₂O (Aldrich, Duitsland) opgelost in medium. Ook tijdens de blootstellingsperiode werden de organismen 2 maal per week gevoed en overgezet in verse cadmiumoplossing.

De wormen werden blootgesteld aan verschillende cadmiumconcentraties (2.5, 5 of 10 µM CdCl₂) en werden vergeleken met een controlegroep gedurende kortere (1, 2, 3 dagen) en langere (1, 2, 3 weken) blootstellingsperioden. De effecten van cadmium werden vergeleken op verschillende niveaus: op niveau van het organisme, op cellulair niveau alsook op moleculair niveau. Afhankelijk van de analyse werden de blootstellingstermijnen soms aangepast. Voor de metaalbepaling, LC50 en heat shock blokkers werd een aparte experimentele opzet gebruikt.

3. Cadmiumopname en -gevoeligheid

3.1 Metaalaccumulatie

Gesneden wormen werden gedurende 2 of 21 dagen blootgesteld aan 0, 2.5, 10 of 25 µM CdCl₂ (10 wormen/petriplaat). De organismen werden vervolgens uit de petriplaat genomen en tweemaal gewassen in een nieuwe petriplaat met vers medium of dubbel gedestilleerd water. Hierna werd de worm met behulp van tandenstokers op een stukje aluminiumfolie (5x5 mm) geschoven, dat voorafgaand was ondergedompeld in vloeibare stikstof. Op elk stukje aluminiumfolie werden 10

wormen verzameld, waarna het resterende medium werd verwijderd. Alle stukjes aluminiumfolie werden vervolgens in 6-well platen verzameld en de gesloten platen werden gedurende 48 uur in een oven geplaatst bij een temperatuur van 60°C. De massa van de gedroogde stalen kon worden bepaald met behulp van een microbalans (0,001 mg). De wormen ondergingen vervolgens een zuurextractie om de metalen in oplossing te houden en te voorkomen dat ze zouden neerslaan. Hierna werd 12 ml van het staal in de ICP-OES (inductive coupled plasma – optical emission spectrometry) aangebracht. Met behulp van een standaardcurve kon dan de concentratie van het metaal in het staal bepaald worden. Deze resultaten werden uitgedrukt ten opzichte van het drooggewicht van de 10 wormen

3.2 LC50-test

De gevoeligheid van *Schmidtea mediterranea* voor cadmium werd nagegaan met behulp van een LC50-test. Deze test geeft de cadmiumconcentratie waarbij de helft van de testorganismen zal overleven of sterven. De wormen werden per 10 in een petriplaat blootgesteld aan 0, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 50 of 70 µM CdCl₂. De overleving werd gecontroleerd na een korte en lange blootstellingstermijn.

3.3 Groottebepaling

De invloed van een korte en lange cadmiumblootstelling op de lichaamsoppervlakte van *Schmidtea mediterranea*, werd nagegaan met behulp van ImageJ software. Er werden 6 stalen per conditie gemeten.

4. Effect van cadmium op de stamcelproliferatie

4.1 Mitosekleuring

Stamcellen zijn de enige delende cellen in het lichaam van een adulte worm. Het aantal cellen in mitose is daarom een indicatie voor het aantal delende stamcellen. Het primaire bouwblok van chromatine is het nucleosoom, dat opgebouwd is uit DNA gedraaid rond 8 kernhistonen. Fosforylatie ter hoogte van serine 10 van histon H3 is sterk gecorreleerd met de overgang van de G2-fase naar de M-fase en met chromosoom condensatie tijdens de mitose en meiose. Om de stamcelactiviteit te kwantificeren, werd gebruik gemaakt van een immunokleuring met het anti-fosfo-histon H3 (Ser10) antilichaam, dat de endogene niveaus van histon H3 enkel detecteert wanneer het gefosforyleerd is ter hoogte van serine 10.

De wormen werden vooraf voor een lange termijn blootgesteld aan CdCl₂. Er werden 10 wormen per conditie blootgesteld. Na de blootstelling werden de wormen voor 1 minuut in een petriplaat met medium op ijs geplaatst om ze te strekken en te verdoven. Vervolgens werden ze voor 5 minuten gedood in een petriplaat op ijs, gevuld met 2% HCl/Holtfreter 5/8. Nadien werden de wormen gedurende 2 uur op een schudplaat op ijs gezet en gefixeerd met behulp van Carnoy's fixatief (60% ethanol, 30% chloroform en 10% azijnzuur). In de volgende stap werd gedurende een uur in de diepvries het water uit de wormen onttrokken met behulp van methanol (MetOH). De pigmentatie werd verwijderd door de wormen 20 uur in falconbuisjes gevuld met 6% H₂O₂/MetOH onder een koudelamp te bleken. De volgende dag werden de wormen gerehydrateerd door ze

achtereenvolgens telkens 10 minuten in 75%, 50% en 25% MetOH/PBST en PBST op kamertemperatuur te wassen. Vervolgens werden de wormen 3.5 uur geïncubeerd in 1% BSA/PBST om specifieke bindingsplaatsen te blokkeren. Na deze incubatie werd het primair antilichaam (Millipore), het anti-fosfo-histon H3 antilichaam (600 keer verdund in 1% BSA/PBST), toegevoegd waarna de wormen voor 43 uur op ijs op een schudplaat geplaatst werden. Na de incubatie werden ze gedurende 1 uur veelvuldig met PBST gewassen om het niet gebonden primair antilichaam te verwijderen. Vervolgens vond er gedurende 1 uur een incubatie met 1% BSA/PBST plaats. Het secundair antilichaam (Millipore), het rhodamine geconjugeerd affiniteit gezuiverd secundair antilichaam (500 keer verdund in 1% BSA/PBST), werd in het donker toegevoegd en gedurende 24 uur geïncubeerd. De volgende dag werden de wormen tijdens 30 minuten driemaal gewassen met PBST om het niet gebonden secundair antilichaam te verwijderen. Hierna werden preparaten gemaakt met glycol en werd het aantal stamcellen geteld met behulp van de fluorescentiemicroscoop (Nikon Eclipse 80i).

5. Moleculaire effecten van cadmiumstress

5.1 Enzymmetingen

De invloed van cadmium op de activiteit van catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GPX) en glutathion-S-transferase (GST) werd nagegaan met behulp van spectrofotometrie. Er werden 6 stalen per conditie genomen. Na de blootstellingstermijn werd van iedere worm een foto getrokken zodat de grootte van de worm bepaald kon worden met behulp van ImageJ (zie 3.3 groottebepaling). Tijdens de staalname werd de worm overgebracht in een microcentrifuge buisje, dat vervolgens onmiddellijk werd ingevroren in vloeibaar stikstof. In afwachting van de experimenten, werden de stalen bewaard in een -70°C diepvriezer.

5.1.1 Enzymextractie

Elk staal werd gemixt in 1 ml extractiebuffer met behulp van de Mixer Mill (MM 2000, Retsch) en glazen bolletjes. De opgeloste stalen werden vervolgens gedurende 12 minuten op 4°C gecentrifugeerd bij 1200 rpm (MR 22i Jouan). Hierna werden de stalen onmiddellijk op ijs geplaatst.

5.1.2 Enzymanalyse

De enzymactiviteit van CAT, SOD, GPX en GST werd gemeten met behulp van een spectrofotometer (UV-1602, Shimadzu). De enzymactiviteit kan berekend worden via de wet van Lambert-Beer.

Na optimalisatie tijdens deze thesis werden de volgende protocols verkregen:

Catalase

CAT katalyseert de volgende reactie: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

De verandering in $[\text{H}_2\text{O}_2]$, dat maximaal absorbeert bij 240 nm, kan gevolgd worden in de tijd door de verandering in absorbantie (240nm) te meten in functie van de tijd [33].

Aangezien er in het UV-spectrum werd gemeten, werd gebruik gemaakt van UV-cuvetten met een volume van 1 ml. De gebruikte oplossingen en het pipetteerschema worden weergegeven in onderstaande tabellen (tabel 1 en 2). Een blanco met water in plaats van staal diende als negatieve controle.

Tabel 1: Samenstelling oplossingen voor CAT meting.

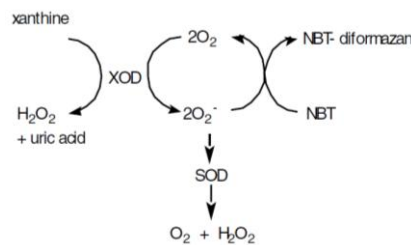
KH₂PO₄-buffer	0.1 M 3.403 g Tris / 250 ml (MM=136.09 g/mol) pH = 7
H₂O₂	5 mM 6 µl H ₂ O ₂ / 1.2 ml H ₂ O

Tabel 2: Pipetteerschema voor CAT meting.

	Blanco	Staal
KH₂PO₄-buffer	780 µl	780 µl
H₂O₂	170 µl	170 µl
water	50 µl	/
extract	/	50 µl

Superoxide dismutase

De SOD activiteit in het staal wordt gemeten op basis van de vermindering in de vorming van NBT-diformazan [34]:



Aangezien NBT-diformazan maximaal licht absorbeert bij 560 nm, werd er op deze golflengte gemeten. De gebruikte oplossingen en het pipetteerschema worden weergegeven in onderstaande tabellen (tabel 3 en 4)

Tabel 3: Samenstelling oplossingen voor SOD meting.

Na₂CO₃-buffer	50 mM 0.52995 g/100 ml (MM= 105.99 g/mol) pH tussen 9.4 en 10.2
NBT	0.75 mM 0.0006132 g/ml (MM= 817.65 g/mol)
Xanthine	3 mM 0.004564 g/10 ml (MM= 152.11 g/mol)
EDTA	3 mM 0.011166 g/10 ml (MM= 372.2 g/mol)
XOD	50 µl/ 1000 µl buffer (16 mg proteïne /ml)

Tabel 4: Pipetteerschema voor SOD meting.

	Blanco	Staal
Na₂CO₃-buffer	768 µl	768 µl
NBT	33 µl	33 µl
Xanthine	33 µl	33 µl
EDTA	33 µl	33 µl
Extract	/	33 µl
Water	33 µl	/
XOD	100 µl	100 µl

Glutathion peroxidase

GPX katalyseert de volgende reactie: $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$

Glutathion reductase (GR) katalyseert vervolgens de reactie: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2 GSH + NADP^+$

De verandering in [NADPH], dat maximaal absorbeert bij 340 nm, kan gevolgd worden in de tijd door de verandering in absorbantie (340 nm) te meten in functie van de tijd [35]. Bij de controle was er ook een daling in absorbantie waar te nemen. Dit is een gevolg van de spontane oxidatie van NADPH, die plaatsvindt wanneer GSH, GR, NADPH en t.BuOOH worden samengevoegd. De gebruikte oplossingen en het pipetteerschema worden weergegeven in onderstaande tabellen (tabel 5 en 6).

Tabel 5: Samenstelling oplossingen voor GPX meting.

Tris-buffer	0,1 M 3.0275 g Tris/250 ml H ₂ O pH = 7
GSH	55.3 mg GSH/4 ml H ₂ O
NADPH	5 mg NADPH/4 ml H ₂ O
GR-oplossing	95 µl buffer + 5 µl G
t. BuOOH	35 % tertiair BuOOH

Tabel 6: Pipetteerschema voor GPX meting.

	Blanco	Staal
Tris-buffer	867 µl	833 µl
GSH	33 µl	33 µl
NADPH	33 µl	33 µl
GR	3 µl	3 µl
extract	/	33 µl
t.BuOOH	67 µl	67 µl

Glutathion-S-transferase

GST katalyseert de toevoeging van glutathion aan substraten, waardoor het minder reactieve glutathion-S-conjugaat wordt gevormd. De meting van de GST activiteit is gebaseerd op volgende reactie: GSH + 1-chloro-, 4-dinitrobenzeen → S-2, 4-dinitrofenylglutathion +HCl

De verandering in [S-2,4-dinitrofenylglutathion], dat maximaal absorbeert bij 340 nm, kan gevolgd worden in de tijd door de verandering in absorbantie (340 nm) te meten in functie van de tijd [36]. De gebruikte oplossingen en het pipetteerschema worden weergegeven in onderstaande tabellen (tabel 7 en 8). Een blanco met water in plaats van staal diende als negatieve controle.

Tabel 7: Samenstelling oplossingen voor GST meting.

Tris-buffer	111 mM 3.365 g Tris / 250 ml H ₂ O (MM= 121.14 g/mol) pH = 7
GSH	60 mM 0.01845 g/ml (MM= 307.3 g/mol)
CDNB	30 mM 0.0061 g/ml (MM= 202.6 g/mol)

Tabel 8: Pipetteerschema voor GST meting.

	Blanco	Staal
Tris-buffer	933 µl	917 µl
GSH	33 µl	33 µl
CDNB	33 µl	33 µl
extract	/	17 µl

5.2 Genexpressie

Het effect van cadmium op de expressie van stressgenen (HSP60, HSP70), een tumorsuppressorgen (p53), antioxidatieve genen (GPX, SOD) en een kinase betrokken bij regulatiemechanismen (MAPKp38), werd met behulp van real-time PCR gemeten. Tijdens de staalname werd de worm overgebracht in een microcentrifuge buisje, dat vervolgens onmiddellijk werd ingevroren in vloeibare stikstof. Er werden 8 stalen per conditie genomen. In afwachting van de experimenten, werden de stalen bewaard in een -70°C diepvriezer.

5.2.1 RNA extractie

De chemische lysis werd gerealiseerd met behulp van een RLT buffer (Qiagen, Venlo, Nederland). Daarenboven werd een mechanische lysis uitgevoerd met behulp van glazen bolletjes en de Mixer Mill (MM2000, Retsch). Om het RNA vervolgens uit het lysaat te isoleren, werd de fenol-chloroform extractie toegepast [37]. Het DNA en het RNA werden gescheiden van de andere celonderdelen door middel van een oplossing van 1: 1 fenol (C₆H₆O, Fluka analytical, VS) en chloroform (CHCl₃, Merck Biosciences, Duitsland). Om een optimale scheiding te verkrijgen, werden nog 2 extra wasstappen met chloroform uitgevoerd. De nucleïnezuren konden hierna neerslaan met behulp van 100% ethanol en 3M natriumacetaat (pH 4.5). Voor een optimale neerslag werd het staal 30 minuten opgeslagen in -70°C. Na centrifugatie werd het bekomen pellet tweemaal gewassen met 80% ethanol, waarna het geëluëerd werd met RNase-vrij water. In een volgende stap werd de RNA concentratie en zuiverheid gecontroleerd door de absorptieratio's van 260/230 en 260/280 met behulp van de NanoDrop spectrofotometer ND-1000 (Isogen Life Sciences, De Meern, Nederland) te meten.

5.2.2 cDNA aanmaak

Om de genexpressie efficiënt te kunnen meten, moet in elk staal dezelfde hoeveelheid RNA aanwezig zijn. Daarom werden sommige stalen verdund tot 200 ng RNA aanwezig was. Vervolgens werd het genomisch DNA uit de stalen verwijderd met behulp van de Turbo DNA free kit (Ambion) in het PCR toestel, de BioRad iCycler.

10 µl van het RNA (supernatant) werd overgebracht naar een nieuw microcentrifuge buisje. De reverse transcriptie vond plaats met behulp van de 'High capacity cDNA reverse transcription kit' (Applied biosystems). Deze kit bestaat uit RT (Reverse Transcriptie) buffer, dNTP mix, RT random primers (oligo-dT's en random hexameren), Multiscribe™ Reverse Transcriptase en RNase inhibitor. Van deze componenten en RNase vrij water werd een mastermix gemaakt en hiervan werd aan elk staal 10 µl toegevoegd. Om het cDNA aan te maken werd het volgende programma opgestart in het PCR toestel: 10 min op 25 °C (binding primers), 120 min op 37 °C (activatie reverse transcriptase) en 5 min op 85 °C (inactivatie reverse transcriptase). Het cDNA werd vervolgens bewaard bij -20°C.

5.2.3 Real-time PCR

Het cDNA wordt vervolgens gebruikt in de real-time kwantitatieve PCR (Q-PCR). Er werd gebruikt gemaakt van SYBR green technologie. SYBR green stuurt een fluorescent signaal uit wanneer het bindt aan dubbelstrengig DNA. Hierdoor kan de cDNA vorming doorheen de tijd continu gevolgd worden. De Fast SYBR green master mix (Applied Biosystems) bestaat uit Fast SYBR green (5 µl/reactie), RNase-vrij water (1.9 µl/reactie) en de forward (0.3 µl/reactie) en reverse primers (0.3 µl/reactie). De primers zijn terug te vinden in tabel 9. In elke well werd 7.5 µl mastermix en 2.5 µl cDNA, dat 10 keer verdund was met water, toegevoegd. Voor elk gen werd er bovendien een NTC (non-template control) gemeten, waarbij de well gevuld werd met 7.5 µl mastermix en 2.5 µl RNase-vrij water. Als er bij NTC's een reactie optreedt, heeft er contaminatie met DNA plaatsgevonden. De 96-well plaat met stalen werd ingezet in het 7500 Fast Real-time PCR toestel (Applied Biosystems) en doorliep het volgende programma: 20 sec op 95 °C (activatie AmpliTaq Gold® DNA polymerase); 40

cycli 3 sec op 95 °C (denaturatie cDNA) en 30 sec op 60 °C (aanhechting primers en extensie cDNA); smeltcurve.

De genexpressie werd genormaliseerd met behulp van de referentiegenen ribosomaal proteïne L13 (RPL13), β-actine (β-act) en cytochroom c oxidasen (ccos) aan de hand van de deltadelta ct-methode. Deze referentiegenen werden door geNorm als stabielste genen aangewezen in de volgende geteste groep referentiegenen: ribosomaal proteïne L13 (RPL13), β-actine (β-actine), cytochroom c oxidasen (ccos), ganglioside GM2 activator proteïne (GM2-AP), glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase (GADPH), cysteïne (cys), β-tubuline (β-tub), caseïne kinase 2 (ck2) en preseniline 1 (ps1).

Tabel 9: De geteste genen met hun primersequenties

	Functie	Forward Primer	Reverse primer
RPL13	Referentiegen	5'-AGGTGTCCCAGCTCCTTATGA-3'	5'-GGCCCAATTGACAGAATTTTC-3'
β-act	Referentiegen	5'-AGAACAGCTTCAGCCTCGTCA-3'	5'-TGGAATAGTGCTTCTGGGCAT-3'
Ccos	Referentiegen	5'-GGGCCTGAGTTACCGAAAAC-3'	5'-CCATTTCGAAGCAACACCAG-3'
HSP70	Stress	5'-TTGTGTTAGTTGGCGGATCAA-3'	5'-GCTGCTTGTACTGCTGCTCC-3'
HSP60	Stress	5'-GTTGCTGAAGATGTTGACGGA-3'	5'-CAAAACCTGGCGCTTTAACAG-3'
P53	Tumor suppressor	5'-TCCCAACGGAGAATTTGATG-3'	5'-CCTCCAATAATGAGGATGAGGT-3'
GPX	Antioxidatief	5'-CCGTAAACGGTATGGTCAA-3'	5'-CATAGGCATGGCTTTTCGTG-3'
SOD	Antioxidatief	5'-TGGGCTTGGTTAGGGTTGAA-3'	5'-AACGTCAAATCCTAGCAACGG-3'
MAPKp38	Signalisatie	5'-TCGTGCGATCAGTGCTAAAGA-3'	5'-CACGTCGACAAATAAGGGAGC-3'
GM2-AP	Referentiegen	5'-CCGTCAGATTAAGCTCGGTT-3'	5'-TTTCGGACATTCGTTACCCAT-3'
GADPH	Referentiegen	5'-GCAAAACATTATTCGGCTTC-3'	5'-GCACTGGAAGCTAAAGGCCA-3'
Cys	Referentiegen	5'-AACTCCATGGCTAGAACCGAA-3'	5'-CCGTCGGGTAATCCAAGTACA-3'
β-tub	Referentiegen	5'-GCTTCAGATTTCTGGCCA-3'	5'-CAAAGGAACAAATCCGGGC-3'
Ck2	Referentiegen	5'-GCTGAAAGCACTCGATTGTTG-3'	5'-TCCCAATCAATGAGCCTTAA-3'
Ps1	Referentiegen	5'-GCCCTCATACTGCTTTTGC-3'	5'-GGACCCAACCAGACCATTG-3'

5.3 Heat shock respons blokkers

De gevoeligheid van *Schmidtea mediterranea* voor cadmium, bij afwezigheid van de heat shock respons, werd gemeten met een LC50-test. Deze waarden werden nadien vergeleken met de LC50-waarden van cadmium (zie 3.2). De wormen werden per 10 in een petriplaat blootgesteld aan 0, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 50 of 70 μM CdCl₂ in combinatie met 1 μM triptolide. Triptolide inhibeert de transcriptionele activiteit van heat-shock factor 1 (HSF1) en zorgt op die manier voor een onderdrukking van de heat shock respons [38]. De overleving werd gecontroleerd na een korte en lange blootstellingstermijn.

5.4 Statistiek

Statistische analyses werden uitgevoerd met SAS v9.2 en Kruskal-Wallis. Wanneer voldaan werd aan normaliteit en homoscedasticiteit, werd gebruik gemaakt van een parametrische éénwegs-ANOVA, gevolgd door een post hoc test (Tuckey) in SASv9.2. Indien niet aan deze voorwaarden werd voldaan, werd een niet-parametrische Kruskal-Wallis test uitgevoerd. De LC50-waarden werden berekend door middel van een probitanalyse in SAS.

III Resultaten

In deze studie werd de rol van oxidatieve stress in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie in *Schmidtea mediterranea* onderzocht. Er werd zowel naar de algemene cadmiumtoxiciteit op niveau van het organisme, als naar de onderliggende mechanismen van cadmiumtoxiciteit op moleculair niveau gekeken. De stamcelproliferatie werd op cellulair niveau gekwantificeerd.

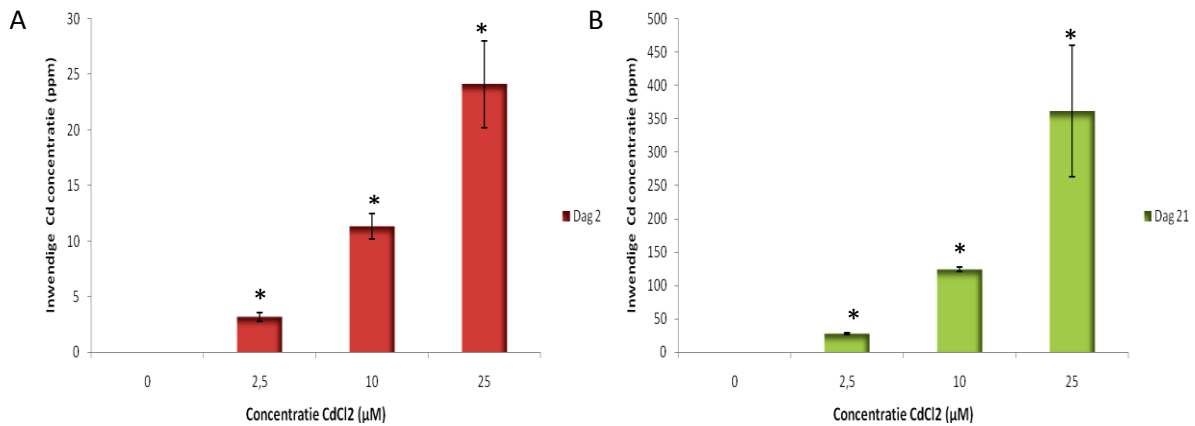
Om na te gaan of cadmium, toegediend via het medium, wel degelijk door de wormen werd opgenomen, werd een metaal bepaling uitgevoerd. De cadmiumgevoeligheid werd bepaald door middel van een LC50-test, waarin de mortaliteit werd nagegaan na een korte blootstellingstermijn (1 tot 3 dagen) en een lange blootstellingstermijn (1 tot 3 weken). De gevoeligheid werd eveneens nagegaan door de invloed van 0, 2.5, 5 en 10 μM CdCl_2 op de grootte van de worm te bestuderen bij dezelfde blootstellingstermijnen. Dezelfde condities werden gehanteerd om het effect van een lange blootstelling op de stamcelproliferatie te bepalen met behulp van een mitosekleuring. Op moleculair niveau werd de rol van oxidatieve stress tijdens (cadmiumgeïnduceerde) stamcelproliferatie enerzijds nagegaan door de activiteit van de antioxidatieve enzymen CAT, GPX, GST en SOD na een korte en lange blootstelling aan 0, 2.5, 5 en 10 μM CdCl_2 te meten met behulp van spectrofotometrie en anderzijds door het effect van deze cadmiumconcentraties op de transcriptie van stressgenen, een tumorsuppressorgen, antioxidatieve genen en een kinase betrokken bij regulatiemechanismen bij dezelfde blootstellingstermijnen, aangevuld door een korte blootstellingstermijn (4 uur en 8 uur), te meten met behulp van real-time PCR. Op basis van de bekomen resultaten en eerder onderzoek werd tenslotte besloten om een LC50-test uit te voeren waarbij werd onderzocht of er een gewijzigde gevoeligheid voor cadmium ontstond wanneer de verdedigingsrespons, geregeld door heat shock proteïnen, werd uitgeschakeld met behulp van triptolide (HSF1 blokker). De mortaliteit werd hierbij bekeken na een korte en lange blootstellingstermijn.

1. Cadmiumopname en -gevoeligheid

1.1 Metaalaccumulatie

De inwendige cadmiumconcentratie werd met nagegaan met behulp van ICP-OES bij wormen die gedurende 2 of 21 dagen werden blootgesteld aan 0, 2.5, 10 of 25 μM CdCl_2 .

Een toename van de cadmiumconcentratie in het medium zorgt voor een significante stijging van de inwendige cadmiumconcentratie, zowel na 2 dagen als 21 dagen blootstelling (figuur 2).



Figuur 2: Cadmiumconcentratie in de worm. De gemiddelde inwendige cadmiumconcentratie met standaardfout bij wormen die 2 dagen (A) of 21 dagen (B) werden blootgesteld aan 0, 2,5, 10 of 25 µM CdCl₂, werd nagegaan met ICP-OES. Bij elke conditie waren 10 biologische herhalingen. De inwendige cadmiumconcentratie wordt uitgedrukt in p.p.m. (aantal cd-atomen per miljoen atomen staal). (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: P < 0.05).

1.2 LC50-test

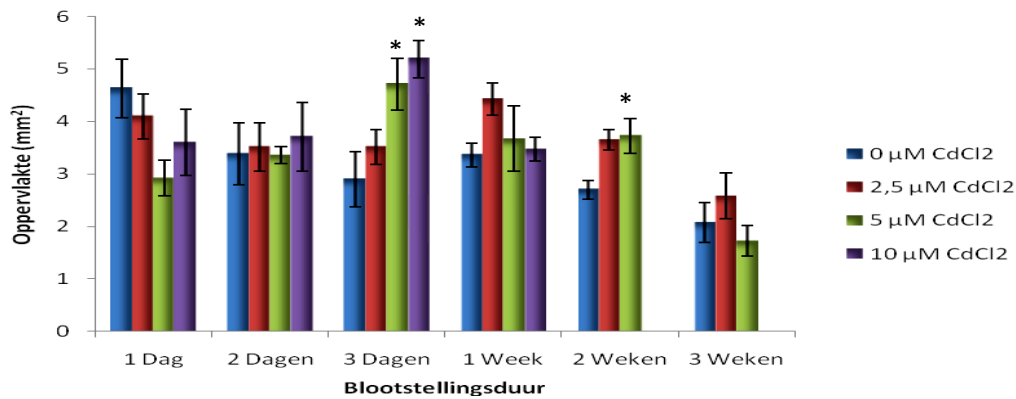
De cadmiumgevoeligheid van de wormen werd nagegaan met behulp van een LC50-test waarbij werd blootgesteld aan 0, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 50 of 70 µM CdCl₂.

De LC50-waarde bedroeg na 1 week blootstelling 46.37 µM, na 2 weken blootstelling 37.50 µM en na 3 weken blootstelling 32.81 µM. Bij een blootstelling korter dan 1 week stierven te weinig wormen om een LC50-waarde te bekomen.

1.3 Groottebepaling

Het effect van cadmium op de lichaamsoppervlakte van de worm werd bepaald met behulp van ImageJ bij wormen die 1, 2, 3 dagen of 1, 2, 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2.5, 5 of 10 µM CdCl₂.

De lichaamsoppervlakte van de gemeten wormen vergroot significant na 3 dagen blootstelling aan een concentratie van 5 µM en 10 µM CdCl₂, in vergelijking met de niet-blootgestelde wormen (controle) op datzelfde tijdstip. Na een blootstelling van 2 weken is een significante toename in lichaamsoppervlakte waar te nemen bij wormen die zijn blootgesteld aan 5 µM CdCl₂ in vergelijking met de controle (figuur 3).



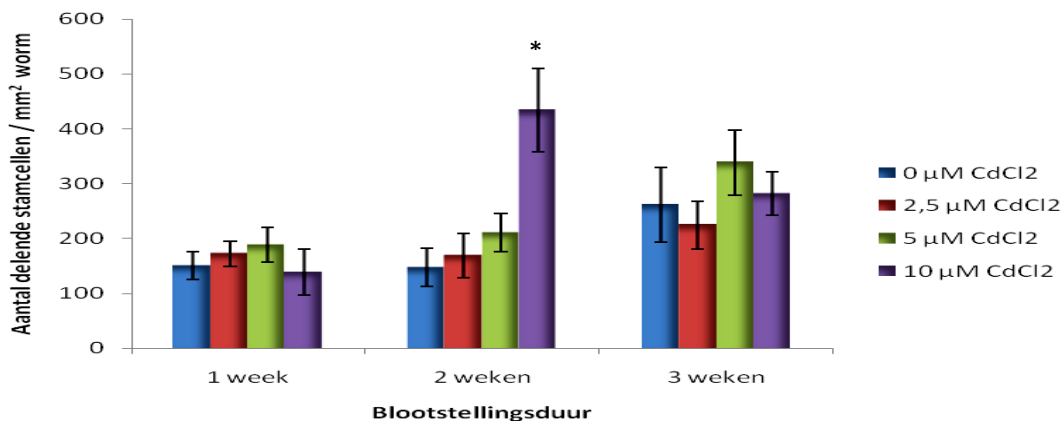
Figuur 3: Invloed van cadmium op de lichaamsoppervlakte van de worm. De gemiddelde lichaamsoppervlakte met standaardfout bij wormen die 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2,5, 5 of 10 µM CdCl₂, werd nagegaan met ImageJ. Bij elke conditie waren 6 biologische herhalingen. De lichaamsoppervlakte wordt uitgedrukt in mm². Na 2 en 3 weken blootstelling aan 10 µM CdCl₂ waren teveel wormen gestorven om nog bruikbare resultaten te bekomen. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: P < 0.05).

2. Effect van cadmium op de stamcelproliferatie

2.1 Mitosekleuring

Het effect van cadmium op het aantal prolifererende stamcellen werd nagegaan met behulp van een mitosekleuring bij wormen die 1, 2 of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2,5, 5 of 10 µM CdCl₂.

Het aantal prolifererende stamcellen per mm² worm stijgt significant na 2 weken blootstelling aan 10 µM CdCl₂ in vergelijking met de controle (0 µM CdCl₂) en 2,5 µM CdCl₂ (figuur 4).



Figuur 4: Invloed van cadmium op het aantal prolifererende stamcellen. Het gemiddeld aantal prolifererende stamcellen per mm² worm met standaardfout bij wormen die 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2,5, 5 of 10 µM CdCl₂, werd nagegaan met een mitosekleuring. Bij elke conditie waren 10 biologische herhalingen. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: P < 0.05).

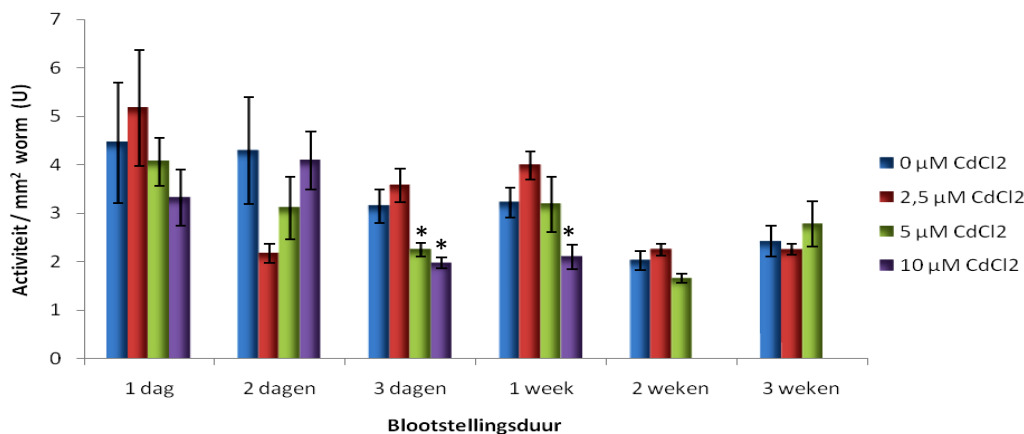
3. Moleculaire effecten van cadmiumstress

3.1 Metabolische effecten

De activiteit van verschillende antioxidatieve enzymen werd met behulp van spectrofotometrie nagegaan bij wormen die 1, 2, 3 dagen of 1, 2, 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2,5, 5 of 10 µM CdCl₂.

Catalase

De enzymactiviteit van catalase (CAT) per mm² worm stijgt significant na 2 dagen blootstelling tussen 2.5 µM CdCl₂ en 10 µM CdCl₂. Na een blootstelling van 3 dagen wordt de activiteit van CAT significant geïnhibeerd bij wormen die zijn blootgesteld aan 5 µM en 10 µM CdCl₂ in vergelijking met de controle (0 µM CdCl₂) op dat tijdstip. De activiteit wordt bij deze blootstellingstermijn eveneens significant geïnhibeerd bij 5 µM en 10 µM CdCl₂ in vergelijking met 2.5 µM CdCl₂. Na een blootstelling van 1 week is er een significante inhibitie van de CAT activiteit bij 10 µM CdCl₂ in vergelijking met zowel de niet-blootgestelde wormen op dat tijdstip als de wormen blootgesteld aan 2.5 µM CdCl₂ (figuur 5).

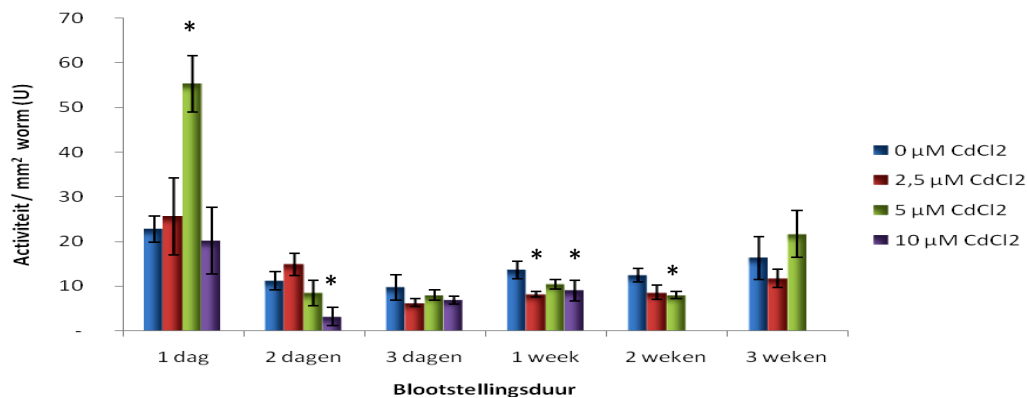


Figuur 5: Invloed van cadmium op de enzymactiviteit van CAT. De gemiddelde enzymactiviteit van CAT met standaardfout bij wormen die 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2.5, 5 of 10 µM CdCl₂, werd spectrofotometrisch bepaald. Bij elke conditie waren 6 biologische herhalingen. De activiteit per mm² worm wordt uitgedrukt in enzym units. Na 2 en 3 weken blootstelling aan 10 µM CdCl₂ waren teveel wormen gestorven om nog bruikbare resultaten te bekomen. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: P < 0.05).

Glutathion-S-transferase

De enzymactiviteit van glutathion-S-transferase (GST) per mm² worm stijgt significant na 1 dag blootstelling aan 5 µM CdCl₂ in vergelijking met de controle (0 µM CdCl₂). Na een blootstelling van 2 dagen wordt de GST activiteit significant geïnhibeerd bij 10 µM CdCl₂ in vergelijking met de controle. De activiteit daalt eveneens significant na 1 week blootstelling bij 2.5 µM en 10 µM CdCl₂ in vergelijking met de controle. Bij een blootstelling van 2 weken wordt de GST activiteit significant geïnhibeerd bij 5 µM CdCl₂ in vergelijking met de controle.

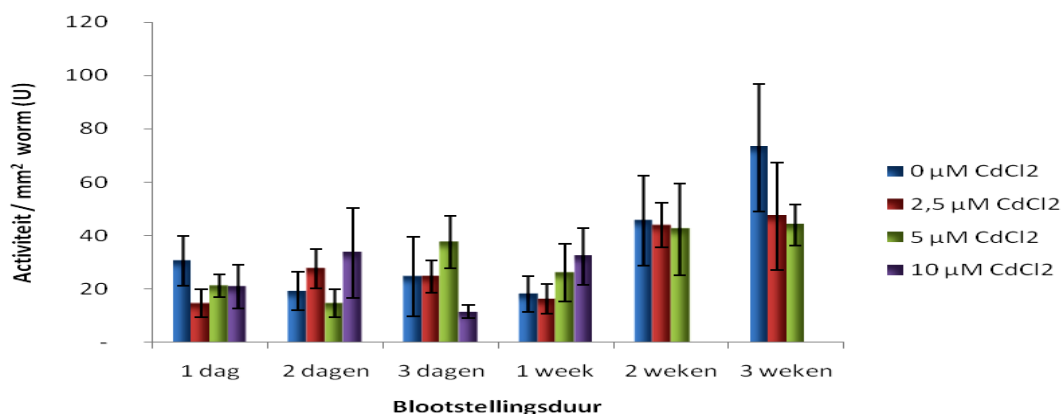
De GST activiteit werd eveneens geïnhibeerd na 1dag blootstelling aan 10 µM in vergelijking met 5 µM CdCl₂ en na 2 dagen blootstelling aan 10 µM in vergelijking met 2.5 µM CdCl₂ (figuur 6).



Figuur 6: Invloed van cadmium op de enzymactiviteit van GST. De gemiddelde enzymactiviteit van GST met standaardfout bij wormen die 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2,5, 5 of 10 μM CdCl₂, werd spectrofotometrisch bepaald. Bij elke conditie waren 6 biologische herhalingen. De activiteit per mm² worm wordt uitgedrukt in enzym units. Na 2 en 3 weken blootstelling aan 10 μM CdCl₂ waren teveel wormen gestorven om nog bruikbare resultaten te bekomen. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: P < 0.05).

Glutathion peroxidase

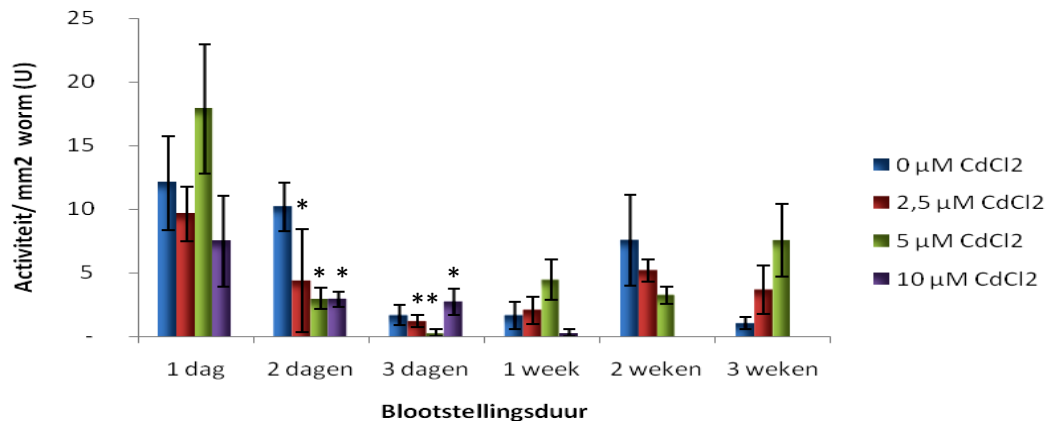
In de enzymactiviteit van glutathion peroxidase (GPX) worden weinig verschillen opgemerkt in de verschillende blootstellingscondities. De GPX activiteit per mm² worm daalt enkel significant na 3 dagen blootstelling aan 10 μM CdCl₂ in vergelijking met 5 μM CdCl₂ (figuur 7).



Figuur 7: Invloed van cadmium op de enzymactiviteit van GPX. De gemiddelde enzymactiviteit van GPX met standaardfout bij wormen die 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2,5, 5 of 10 μM CdCl₂, werd spectrofotometrisch bepaald. Bij elke conditie waren 6 biologische herhalingen. De activiteit per mm² worm wordt uitgedrukt in enzym units. Na 2 en 3 weken blootstelling aan 10 μM CdCl₂ waren teveel wormen gestorven om nog bruikbare resultaten te bekomen.

Superoxide dismutase

De enzymactiviteit van superoxide dismutase (SOD) per mm² worm wordt na een blootstellingstermijn van 2 dagen significant geïnhibeerd bij de blootgestelde wormen in vergelijking met de controle (0 μM CdCl₂) op dat tijdstip. Een blootstelling van 3 dagen geeft significante verschillen in de SOD activiteit tussen de verschillende concentraties (figuur 8).



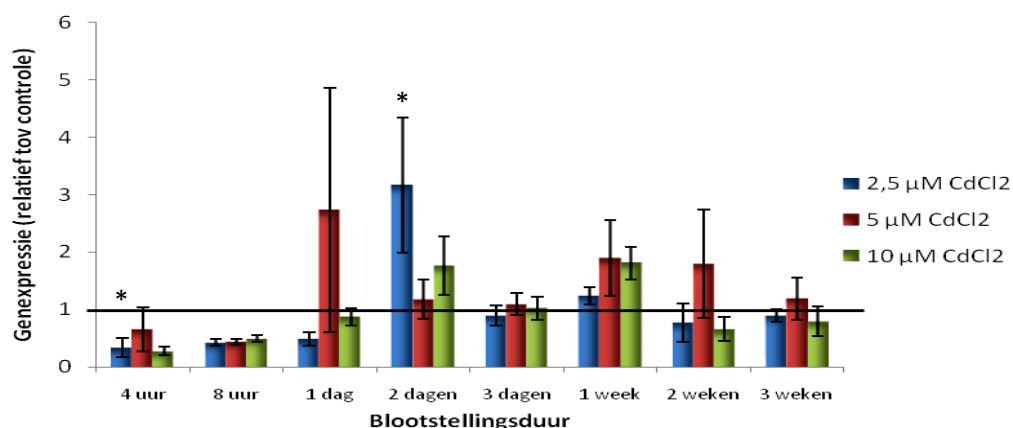
Figuur 8: Invloed van cadmium op de enzymactiviteit van SOD. De gemiddelde enzymactiviteit van SOD met standaardfout bij wormen die 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2.5, 5 of 10 µM CdCl₂, werd spectrofotometrisch bepaald. Bij elke conditie waren 6 biologische herhalingen. De activiteit per mm² worm wordt uitgedrukt in enzym units. Na 2 en 3 weken blootstelling aan 10 µM CdCl₂ waren teveel wormen gestorven om nog bruikbare resultaten te bekomen. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: P < 0.05).

3.2 Genexpressie

Het effect van cadmium op de expressie van stressgenen, een tumorsuppressorgen, antioxidatieve genen en een kinase betrokken bij regulatiemechanismen werd met behulp van real-time PCR nagegaan bij wormen die 4 uur, 8 uur, 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2.5, 5 of 10 µM CdCl₂.

HSP70

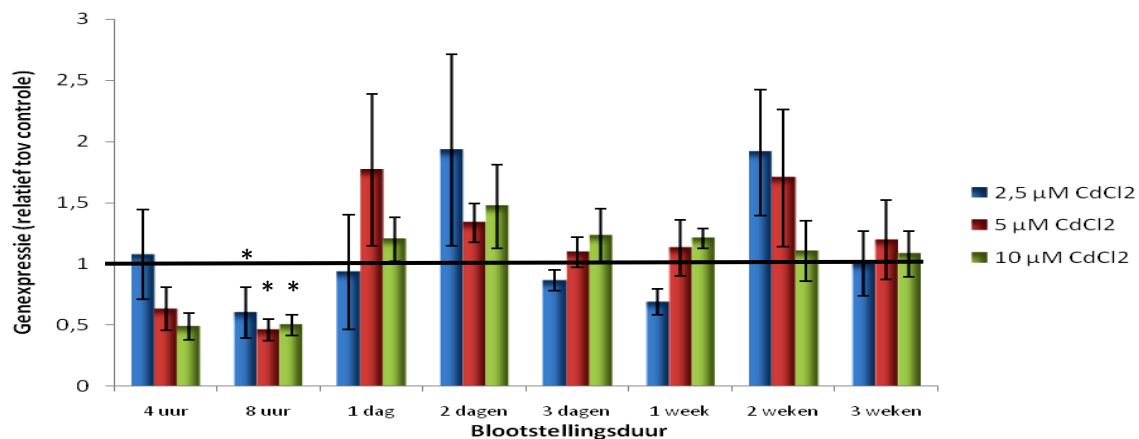
De expressie van HSP70 wordt na 4 uur blootstelling significant gehintereerd bij een concentratie van 2.5 µM CdCl₂ in vergelijking met de controle (0 µM CdCl₂) op dat tijdstip. Wanneer de wormen gedurende twee dagen worden blootgesteld, is een significante stijging van de HSP70 expressie waar te nemen bij 2.5 µM CdCl₂ in vergelijking met de controle (figuur 9).



Figuur 9: Invloed van cadmium op de expressie van HSP70. De gemiddelde genexpressie van HSP70 met standaardfout bij wormen die 4 uur, 8 uur, 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2.5, 5 of 10 µM CdCl₂, werd gemeten met real-time PCR. Bij elke conditie waren 8 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: P < 0.05).

HSP60

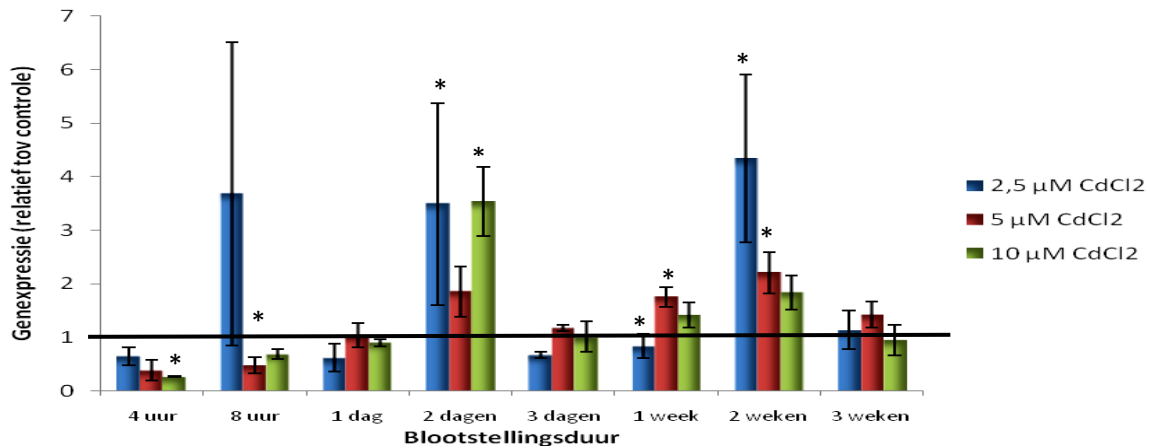
De expressie van HSP60 wordt na een blootstellingstermijn van 8 uur significant geïnhibeerd bij de blootgestelde wormen in vergelijking met de controle (0 μM CdCl_2) op dat tijdstip. Na een blootstelling van 1 week is er een significante stijging in de HSP60 expressie bij 10 μM CdCl_2 in vergelijking met 2.5 μM CdCl_2 (figuur 10).



Figuur 10: Invloed van cadmium op de expressie van HSP60. De gemiddelde genexpressie van HSP60 met standaardfout bij wormen die 4 uur, 8 uur, 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2.5, 5 of 10 μM CdCl_2 , werd gemeten met real-time PCR. Bij elke conditie waren 8 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: $P < 0.05$).

P53

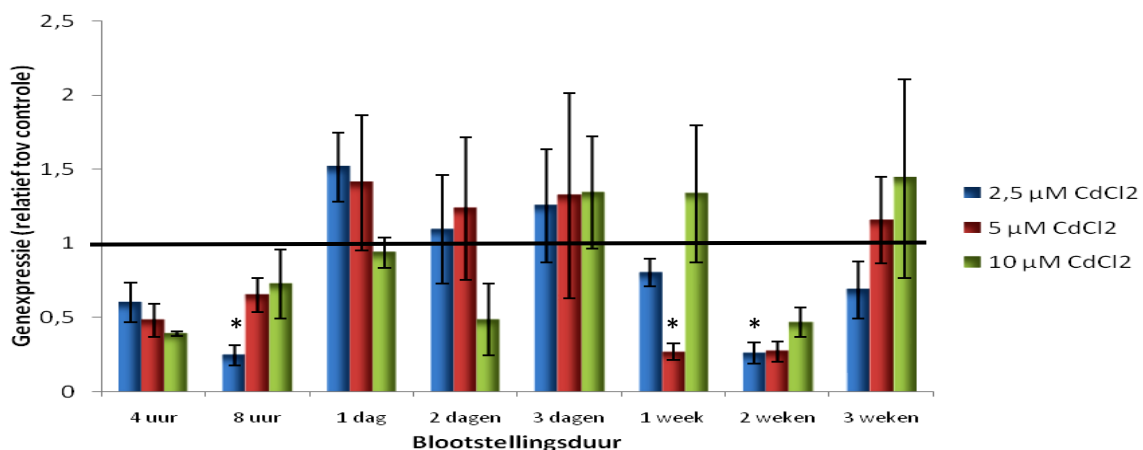
De expressie van p53 wordt na 4 uur blootstelling significant geïnhibeerd bij een concentratie van 10 μM CdCl_2 in vergelijking met de controle (0 μM CdCl_2) op dit tijdstip. Na 8 uur blootstelling wordt de p53 expressie significant geïnhibeerd bij een concentratie van 5 μM CdCl_2 in vergelijking met de controle. Na een blootstelling van 2 dagen is er een significante stijging in de p53 expressie bij 2.5 μM en 10 μM CdCl_2 in vergelijking met de controle. Na 1 week blootstelling verhoogt de p53 expressie bij 5 μM CdCl_2 significant ten opzichte van de controle en 2.5 μM CdCl_2 . De p53 expressie wordt na een blootstelling van 2 weken eveneens significant verhoogd bij 2.5 μM en 5 μM in vergelijking met de controle (figuur 11).



Figuur 2: Invloed van cadmium op de expressie van p53. De gemiddelde genexpressie van p53 met standaardfout bij die wormen 4 uur, 8 uur, 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2.5, 5 of 10 μM CdCl₂, werd gemeten met real-time PCR. Bij elke conditie waren 8 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: $P < 0.05$).

GPX

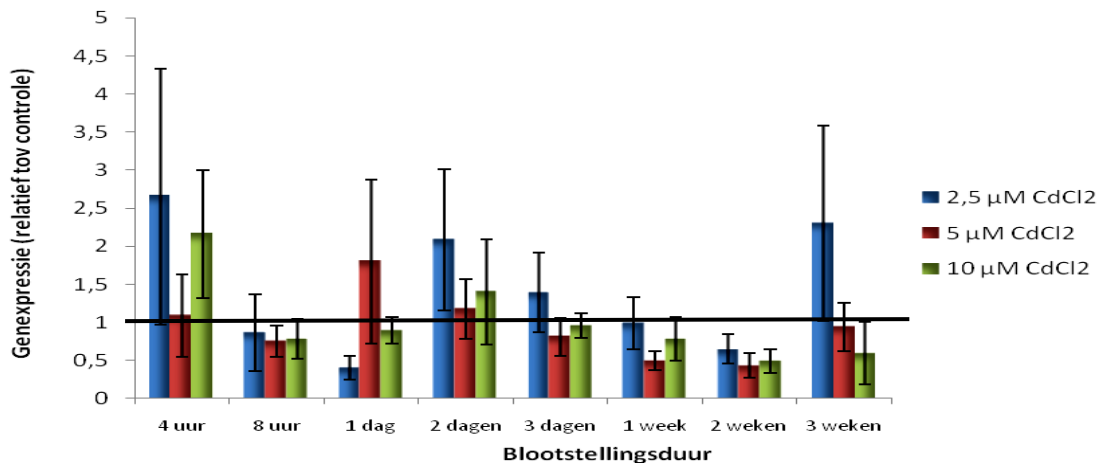
De GPX expressie wordt na 8 uur en 2 weken blootstelling significant onderdrukt bij 2.5 μM CdCl₂ ten opzichte van de controle (0 μM CdCl₂) op dat tijdstip. De GPX expressie na 8 uur blootstelling verschilt significant tussen 2.5 μM en 10 μM CdCl₂. Na 1 week blootstelling is de GPX expressie significant onderdrukt bij 5 μM CdCl₂ in vergelijking met de controle, 2.5 μM en 10 μM CdCl₂ (figuur 12).



Figuur 12: Invloed van cadmium op de expressie van GPX. De gemiddelde genexpressie van GPX met standaardfout bij wormen die 4 uur, 8 uur, 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2.5, 5 of 10 μM CdCl₂, werd gemeten met real-time PCR. Bij elke conditie waren 8 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: $P < 0.05$).

SOD

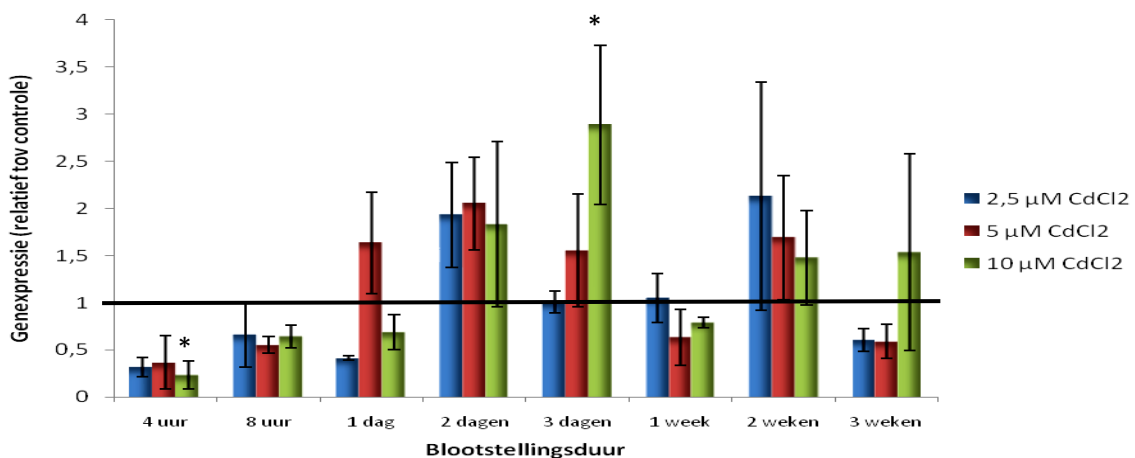
In de genexpressie van SOD worden geen significante verschillen opgemerkt in de verschillende blootstellingscondities. Er is een algemene inhibitie van de SOD expressie ten opzichte van de controle na 8 uur, 1 week en 2 weken en een algemene stimulatie na 4 uur en 2 dagen. Deze bevindingen zijn echter niet significant (figuur 13).



Figuur 3: Invloed van cadmium op de expressie van SOD. De gemiddelde genexpressie van SOD met standaardfout bij wormen die 4 uur, 8 uur, 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken blootgesteld aan 0, 2.5, 5 of 10 µM CdCl₂, werd gemeten met real-time PCR. Bij elke conditie waren 8 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven.

MAPKp38

De expressie van MAPKp38 wordt na 4 uur blootstelling significant onderdrukt bij 10 µM CdCl₂ ten opzichte van de controle (0 µM CdCl₂) op dat tijdstip. Na 3 dagen blootstelling wordt de MAPKp38 expressie significant verhoogd bij 10 µM CdCl₂ ten opzichte van de controle (figuur 14).



Figuur 4: Invloed van cadmium op de expressie van MAPKp38. De gemiddelde genexpressie van MAPKp38 met standaardfout bij wormen die 4 uur, 8 uur, 1 dag, 2 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken of 3 weken werden blootgesteld aan 0, 2.5, 5 of 10 µM CdCl₂, werd gemeten met real-time PCR. Bij elke conditie waren 8 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: P < 0.05).

4. Cadmiumgevoeligheid bij onderdrukking heat shock respons

In dit experiment werd het belang van de verdedigingsrespons, geregeld door heat shock proteïnen, in de cadmiumgevoeligheid van de worm nagegaan door middel een LC50-test waarbij werd blootgesteld aan 0, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 50 of 70 µM CdCl₂ of aan dezelfde cadmiumconcentraties in combinatie met 1 µM triptolide.

De wormen zijn na 1 week, 2 weken en 3 weken blootstelling veel gevoeliger voor cadmium wanneer de heat shock respons is uitgeschakeld (tabel 10). Bij een blootstelling korter dan 1 week stierven te weinig wormen om een LC50-waarde te bekomen.

Tabel 100: LC50-waardes van wormen blootgesteld aan cadmium en cadmium in combinatie met triptolide. De LC50-waardes (μM) na 1, 2 en 3 weken blootstelling aan cadmium of cadmium in combinatie met 1 μM triptolide (HSF1-blokker).

	CdCl_2	CdCl_2 + Triptolide
1 Week	46,37 μM	24,47 μM
2 Weken	37,50 μM	10,97 μM
3 Weken	32,81 μM	10,34 μM

IV Discussie

De vrijlevende platworm *Schmidtea mediterranea* beschikt over een uniek stamcelsysteem. Hun stamcellen of neoblasten zijn namelijk de enige delende cellen in de adulte worm en zijn vermoedelijk totipotent [24]. Een negatief effect van cadmium -en hongerstress op de proliferatie van neoblasten is reeds aangetoond in eerdere studies [31,32]. In eigen onderzoek werd in de platworm *Macrostomum lignano* een toename van stamcellen in de S-fase waargenomen na een blootstelling aan lage cadmiumconcentraties. Aangezien oxidatieve stress een belangrijke rol speelt in de cellulaire cadmiumtoxiciteit, zou het ook betrokken kunnen zijn in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie. Daarom werd in deze studie de rol van oxidatieve stress in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie onderzocht. Als modelorganisme werd *S. mediterranea* gebruikt. Er werd zowel naar de algemene cadmiumtoxiciteit op niveau van het organisme, als naar de onderliggende mechanismen van cadmiumtoxiciteit op moleculair niveau gekeken. De stamcelproliferatie werd op cellulair niveau gekwantificeerd.

In een eerste fase werd de cadmiumopname bestudeerd na blootstelling aan verschillende concentraties. Vervolgens werd de algemene cadmiumtoxiciteit nagegaan door de gevoeligheid van het organisme voor cadmium te bepalen met een LC50-test en groottebepaling na een korte en lange blootstellingstermijn aan lage en hoge cadmiumconcentraties. De invloed van cadmium op de stamcelproliferatie werd bepaald na een lange blootstellingstermijn bij dezelfde condities. Om te achterhalen of stamcelproliferatie een gevolg is van oxidatieve stress, werd op moleculair niveau de activiteit van antioxidatieve enzymen en de expressie van genen, direct of indirect betrokken bij oxidatieve stress, gemeten na een korte en lange blootstelling aan cadmium. Op basis van deze resultaten en eerder onderzoek werd besloten om de rol van heat shock proteïnen in de cadmiumgevoeligheid te bestuderen, door de heat shock respons te blokkeren.

1. Cadmiumopname en -gevoeligheid

De inwendige cadmiumconcentratie stijgt significant bij een korte en lange blootstellingstermijn, naarmate er meer cadmium in het medium aanwezig is. Dit toont aan dat het cadmium, aanwezig in het medium, door de wormen wordt opgenomen en niet onmiddellijk uit het lichaam wordt geëxcreteerd. De LC50-waardes (zie tabel 10) bekomen in dit onderzoek, liggen hoger dan in vroegere experimenten [39]. Fluctuaties in LC50-waarden komen frequent voor en kunnen te wijten zijn aan technische verschillen, een te kleine steekproef of verschillen in de gevoeligheid van de wormen. Daarom is het belangrijk om de LC50-waarde regelmatig te bepalen. Uit deze en eerdere resultaten blijkt dat *Schmidtea mediterranea* een hoog tolerantieniveau voor cadmium heeft in vergelijking met andere invertebratensoorten [39]. Deze resultaten tonen aan dat de hoge tolerantie niet het gevolg kan zijn van een excretiemechanisme dat cadmium uit het lichaam verwijdert vooraleer het zijn toxische effecten heeft uitgeoefend. Andere verklaringen bestaan voornamelijk in het efficiënt opslaan of onschadelijk maken van de cadmiumionen in het organisme.

2. Effect van cadmium op de stamcelproliferatie

Uit de mitosekleuring is gebleken dat de neoblasten in alle condities actief blijven delen en dat bij 2 weken blootstelling het aantal delende stamcellen toeneemt naarmate de cadmiumconcentratie stijgt.

Het effect van cadmiumstress op stamcellen werd eerder bestudeerd bij de platworm *Polycelis felina*. In die studie werd een inhiberend effect van cadmium op de mitotische activiteit van neoblasten aangetoond, hetgeen een gevolg was van mitotische en chromosomale afwijkingen en mitotisch arrest. Deze studie had echter een andere opzet en bekeek de proliferatie bij regenererende platwormen in een herstelfase na cadmiumblootstelling [31]. Bij *Macrostomum lignano*, een verwante plantworm, werd aangetoond dat de ultrastructuur van neoblasten zelfs bij een erg hoge cadmiumblootstelling intact blijft (persoonlijk communicatie Michelle Plusquin). Een studie naar het effect van cadmium op een celcultuur van humane neuroblasten, toonde een verhoogde proliferatie bij blootstelling aan een lage cadmiumconcentratie (10 μM CdCl_2) en een onderdrukking van proliferatie bij een hoge cadmiumblootstelling (100 μM CdCl_2) [40]. Door deze resultaten rijst de vraag of de aanwezigheid van neoblasten verantwoordelijk kan zijn voor de hoge tolerantiegrens in de bestudeerde platwormen. De totipotente stamcellen zouden, in vergelijking met gedifferentieerde cellen, over een hogere basale expressie van specifieke genen kunnen beschikken waardoor ze beschermd worden tegen cadmiumtoxiciteit. Een andere verklaring zou kunnen zijn dat stamcellen prolifereren en/of differentiëren na de opname van toxische stoffen, mogelijk via oxidatieve stress, waardoor de oppervlakte van het dier toeneemt en er een verdunningseffect van de inwendige cadmiumconcentratie optreedt. Uit de resultaten van de groottebepaling blijkt immers dat de oppervlakte van blootgestelde wormen op bepaalde tijdstippen significant groter is dan deze van niet-blootgestelde wormen.

Aangezien oxidatieve stress een belangrijke rol speelt in cadmiumtoxiciteit, zou dit ook verantwoordelijk kunnen zijn voor cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie. Cadmiumgeassocieerde apoptose van gedifferentieerde cellen, ten gevolge van oxidatieve stress, zou aan de basis kunnen liggen van de toename in het aantal prolifererende stamcellen, die het verlies aan cellen willen compenseren [3,15]. Een andere verklaring zou in het carcinogeen potentiaal van cadmium kunnen schuilen. Via productie van ROS kan cadmium zorgen voor een inhibitie van apoptose en een afwijkende signalisatie of genexpressie. Allemaal mechanismen die een ongecontroleerde celdeling in de hand werken [11,16]. Deze hypothesen zouden in toekomstig onderzoek verder kunnen worden uitgediept.

3. Moleculaire effecten van cadmiumstress

Om te achterhalen of oxidatieve stress een rol speelt in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie, werd nagegaan of oxidatieve stress aanwezig was na een korte en lange blootstellingstermijn aan lage en hoge cadmiumconcentraties. Hiervoor werd enerzijds de activiteit van enzymen en genen, die instaan voor antioxidatieve verdediging en dus in rechtstreeks verband staan met oxidatieve stress, gemeten. Anderzijds werd de expressie van genen, waarvan geweten is dat de expressie wijzigt door oxidatieve stress, gemeten.

Op metabolisch niveau zorgt cadmium voor een significante onderdrukking van de CAT (3 dagen en 1 week) en SOD enzymactiviteit (2 dagen en 3 dagen). De inhibitie van SOD kan op genniveau echter niet worden waargenomen. Dit kan ondermeer te wijten zijn aan de aanwezigheid van meerdere isovormen in het genoom. De activiteit van GST wordt eveneens onderdrukt, met uitzondering van een significante verhoging na 1 dag blootstelling aan 5 μM CdCl_2 . In de activiteit van GPX werden weinig verschillen opgemerkt. Dit kan opnieuw een gevolg zijn van het bestaan van meerdere isovormen. Aangezien we de enzymactiviteit in het hele organisme meten, sluit dit resultaat niet uit dat er binnen de stamcellen wel wijzigingen in activiteit waren. De genexpressie van GPX vertoonde een significante onderdrukking zowel na een korte (8 uur) als lange blootstellingstermijn (1 week, 2 weken). In het algemeen kan een inhiberende trend van cadmium op het antioxidatief verdedigingsstelsel worden vastgesteld.

De invloed van cadmium op antioxidatieve enzymen werd al in veel organismen bestudeerd. In deze studies werd eveneens een onderdrukking van de activiteit van antioxidatieve enzymen na een korte termijn blootstelling aan cadmium waargenomen. Een langere blootstelling aan hogere concentraties zou de activiteit terug verhogen, waarschijnlijk via een adaptieve inductie van genen [41]. De onderdrukking kan via verschillende mechanismen bereikt worden. Cadmium kan de activiteit van de gemeten antioxidatieve enzymen rechtstreeks onderdrukken door te reageren met hun thiolgroepen of door essentiële metaalionen, die nodig zijn voor het goed functioneren van het enzym, te vervangen. Cadmium zou ook indirect, via vorming van ROS, een oxidatie en bijgevolg verstoring in de activiteit van CAT, SOD en GST kunnen veroorzaken [42]. De inhibitie van de GPX expressie doet vermoeden dat cadmium, via ROS, de onderdrukking van de enzymactiviteit mogelijk al op genniveau beïnvloedt. Om dit te bevestigen, zouden echter meer antioxidatieve genen gemeten moeten worden onder de bestudeerde condities of zou op meerdere tijdstippen moeten worden gekeken.

De metingen van de antioxidatieve genen en enzymen doen vermoeden dat de worm onderhevig is aan oxidatieve stress bij de gemeten condities. Dit zou dus een eerste indicatie van een mogelijke rol van oxidatieve stress in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie kunnen zijn. In toekomstig onderzoek zou een kwalitatieve of kwantitatieve studie van ROS en een meting van meerdere antioxidatieve verdedigingsstelsels meer duidelijkheid kunnen geven.

Het tumorsuppressorgen p53, betrokken in de regulatie van de celcyclus en apoptose, wordt initieel op transcriptniveau onderdrukt, maar na verloop van tijd terug gestimuleerd. Platwormen beschikken over één enkel p53 gen dat vooral tot expressie komt in pas ontwikkelde stamcelnakomelingen. Wanneer dit gen gesilenced wordt, ontstaat er een hyperproliferatie van stamcellen [43]. Effecten van cadmium op dit gen zouden dus voor een verstoorde proliferatie van stamcellen kunnen zorgen.

P53 induceert apoptose in cellen waarvan het DNA niet meer hersteld kan worden. Inductie van oxidatieve stress zou een belangrijk mechanisme zijn dat verantwoordelijk is voor cadmiumgeïnduceerde apoptose [3]. Apoptose wordt bijgevolg gestimuleerd onder toestanden waarbij antioxidanten onderdrukt worden [44]. Verschillende studies hebben aangetoond dat cadmiumgeïnduceerde apoptose geassocieerd is met een verhoogd aantal p53 proteïnen en verhoogde p53 mRNA niveaus [15]. In dit onderzoek is er eveneens een verhoogde expressie van p53 waargenomen, die bovendien gepaard met een onderdrukking van antioxidatieve enzymen en

hoogst waarschijnlijk dus een gevolg is van oxidatieve stress. P53 kan geactiveerd worden na fosforylatie door onder meer MAPKp38 [45]. De expressie van MAPKp38 toont net zoals de p53 expressie een initieel inhiberende trend die na verloop van tijd overgaat in stimulatie. Cadmium kan MAPKp38 rechtstreeks verhogen door in te werken op fosfatasethiolen of door de concentraties van second messengers te veranderen. Cadmium kan MAPKp38 echter ook indirect, via oxidatieve stress, verhogen. Dit zorgt namelijk voor een oxidatie van de thiolgroepen op de kinase regulerende fosfatasen [11,12].

De expressiepatronen van p53 en MAPKp38 doen vermoeden dat deze genen betrokken zijn bij cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie, vermoedelijk als reactie op de veranderde redoxstatus in de cel. P53 zou apoptose van gedifferentieerde cellen kunnen veroorzaken, waardoor er nieuwe cellen aangemaakt moeten worden.

In dit onderzoek lijkt een inductie van p53 echter niet samen te gaan met een onderdrukking van proliferatie. Integendeel, na een blootstelling van 2 weken is er een stimulerende trend van cadmium op de p53 expressie waarneembaar terwijl de proliferatie van de stamcellen stijgt. P53 zou apoptose van gedifferentieerde cellen kunnen veroorzaken, waardoor de wormen dringend nieuwe cellen moeten aanmaken. Bovendien hangt de cellulaire activiteit van p53 niet alleen af van zijn expressie. De conformatie en interactie met andere proteïnen spelen een belangrijke rol in het uitoefenen van zijn functie. HSP-gerelateerde proteïnen zouden in neoplasten kunnen interageren met p53 en op deze manier de signalisatie ervan onder controle houden, waardoor zij aan celdood kunnen ontsnappen en blijven prolifereren. Dit wordt gezien als een cytobeschermend mechanisme dat stamcellen gebruiken om zichzelf te verdedigen tegen stress en dat aan de basis zou kunnen liggen van kankervorming [46]. Ook in deze studie is er, na een initiële inhibitie van de HSP expressie, na een langere blootstelling een stimulerende trend waarneembaar. Een vorige studie in ons labo op *S. mediterranea* toonde ook een significante inductie van de HSP60 en HSP70 expressie bij een blootstelling op korte en lange termijn aan een cadmiumconcentratie van 10 en 100 μM CdCl_2 [39]. De initiële inhibitie van HSP60 en HSP70 zou kunnen betekenen dat de verdedigingsrespons bij een korte blootstelling aan cadmium wordt uitgeoefend door andere, niet gemeten, heat shock proteïnen of verdedigingsmechanismen. De latere stimulatie van de heat shock expressie na cadmiumblootstelling is opnieuw een aanwijzing van de aanwezigheid van oxidatieve stress. HSPn kunnen geactiveerd via vorming van gedetermineerde of abnormale proteïnen. Deze afwijkende proteïnen kunnen ontstaan door reactie van cadmium met thiolgroepen of verplaatsing van zink of kunnen een gevolg zijn van proteïneoxidaties door oxidatieve stress. ROS kunnen bovendien rechtstreeks de HSP expressie wijzigen [13,41].

De voorgaande metingen lijken er op te wijzen dat, bij de gebruikte cadmiumconcentraties en blootstellingstermijnen, oxidatieve stress in de worm aanwezig is. Dit zou aan de basis kunnen liggen van de stamcelproliferatie. Omdat heat shock proteïnen, door interactie met p53, cadmium-geassocieerde apoptose van neoplasten zouden kunnen verhinderen, zouden zij dus ook een belangrijke actor in stamcelproliferatie onder oxidatieve stress kunnen zijn. Een studie op de platworm *Dugesia japonica* toonde reeds het belang van heat shock proteïnen in stamcellen aan. De HSPn waren enkel gelokaliseerd in de stamcellen en noodzakelijk voor hun levensvatbaarheid, aangezien een uitschakeling van deze genen voor een permanente onderdrukking van

stamcelproliferatie zorgde [46]. Een uitschakeling van HSP90 in gelijklopend onderzoek zorgde eveneens voor een onderdrukking van de stamcelproliferatie na cadmiumblootstelling bij *Macrostomum lignano* [47]. HSP70 speelt bovendien een centrale rol in de tolerantie van hittestress in platwormen, via inductie van stamcelproliferatie bij hoge temperaturen [48]. Ze zouden dus ook belangrijk kunnen zijn in de hoge tolerantie voor cadmiumstress.

Op basis van de stimulatie van HSP60 en HSP70 expressie in dit en eerder onderzoek, de onderdrukking van de stamcelproliferatie na uitschakeling van HSP90 en het feit dat HSPn, mogelijk via p53 regulatie, voor het in standhouden van neoplasten kunnen zorgen, werd besloten om in deze thesis al een eerste stap te zetten in het verdere onderzoek naar de rol van HSPn in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie bij *S. mediterranea*.

4. Cadmiumgevoeligheid bij onderdrukking heat shock respons

Het belang van heat shock proteïnen in de verdedigingsrespons na cadmiumblootstelling, werd nagegaan door de heat shock respons te blokkeren met triptolide en vervolgens de gevoeligheid voor cadmium te bepalen. Triptolide is een inhibitor van de transcriptionele activiteit van heat shock factor 1 (HSF1), dat de heat shock respons coördineert. Aangezien in veel soorten kankers een verhoogde expressie van HSPn werd waargenomen, zou deze HSF1 inhibitor een rol in de genezing van kanker kunnen spelen [38, 49].

Het effect van triptolide op platwormen, blootgesteld aan cadmium, werd nog niet eerder nagegaan. Daarom werd een vergelijkende studie opgezet tussen wormen blootgesteld aan cadmium met of zonder triptolide. Uit deze resultaten blijkt dat de wormen gevoeliger zijn voor cadmium wanneer de heat shock respons verhinderd wordt. Dit is opnieuw een indicatie van een belangrijke rol van HSPn in cadmiumstress.

De rol van HSPn in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie zou in toekomstig onderzoek verder bestudeerd kunnen worden. Zo zou het effect van het blokkeren van de heat shock respons op de stamcelproliferatie en op de expressie van antioxidatieve, apoptose en signalisatiegenen opnieuw gemeten kunnen worden bij meerdere concentraties en blootstellingstermijnen. Dit zou aangevuld kunnen worden met een meting van de expressie van celcyclusgenen en stamcelspecifieke genen in de aan- en afwezigheid van de heat shock respons. Ook het uitschakelen van specifieke HSP genen met behulp van RNAi zou kunnen bijdragen aan een betere kennis van HSPn en hun rol in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie.

Conclusie

In vergelijking met andere invertebratensoorten blijkt *Schmidtea mediterranea* minder gevoelig voor cadmiumstress. Onze resultaten toonden aan dat dit geen gevolg is van een excretiemechanisme dat cadmium uit het lichaam verwijdert. Een mogelijke verklaring ligt in de stressbestendigheid van de neoblasten. Deze bleven actief delen in alle gemeten condities en na 2 weken blootstelling steeg het aantal prolifererende neoblasten zelfs bij hogere cadmiumconcentraties. Bovendien namen de wormen onder invloed van cadmium ook in oppervlakte toe. Aangezien zowel de activiteit van antioxidatieve enzymen (CAT, GST, GPX, SOD) als de expressie van antioxidatieve genen (GPX, SOD) geïnhibeerd werd in onze experimentele opzet, rijst het vermoeden dat een verstoorde redoxbalans een mogelijke rol speelt in bovenstaande bevindingen. Ook de expressie van redox-gereguleerde genen (HSP60, HSP70, MAPKp38 en p53) vertoonden veranderingen in hun expressiepatronen. Vermoedelijk zijn deze genen zelfs rechtstreeks betrokken in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie. Een kwalitatieve of kwantitatieve studie van de verschillende ROS en een meer gedetailleerde analyse van de antioxidatieve verdedigingssystemen in de toekomst zou meer duidelijkheid kunnen geven over de link tussen oxidatieve stress en celproliferatie.

Op basis van de bekomen resultaten en op basis van gelijklopende experimenten in *Macrostomum lignano* werd een poging ondernomen om een belangrijke component, met name de heat shock proteïnen, van deze onderliggende mechanismen verder te bestuderen. Een uitschakeling van de heat shock respons veroorzaakte een verhoogde gevoeligheid van *S. mediterranea* voor cadmium. Omwille van de grote aanwezigheid van HSPn in neoblasten, doen onze bevindingen vermoeden dat HSPn een belangrijke rol zouden kunnen spelen in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie, mogelijk via een verstoorde redoxbalans. In de toekomst zou het effect van het blokkeren van de heat shock respons op de stamcelproliferatie en op de expressie van antioxidatieve, apoptose en signalisatiegenen hierover meer uitsluitsel kunnen geven. Dit zou aangevuld kunnen worden met een meting van de expressie van celcyclusgenen en stamcelspecifieke genen in de aan- en afwezigheid van de heat shock respons. Ook het uitschakelen van specifieke HSP genen met behulp van RNAi zou kunnen bijdragen aan een betere kennis van specifieke HSPn en hun rol in cadmiumgeïnduceerde stamcelproliferatie.

Dankwoord

Deze pagina wil ik gebruiken om enkele mensen te bedanken die hebben bijgedragen in de verwezenlijking van deze thesis.

Ten eerste zou ik mijn promotor Karen Smeets en copromotor Tom Artois willen bedanken om mij de mogelijkheid te geven deze thesis te realiseren. Het onderzoek op platwormen was een gegeerd onderwerp bij de sollicitaties en ik ben dan ook zeer blij dat ik uiteindelijk een heel jaar met deze beestjes heb mogen samenwerken. Ik wil ook Tony Remans bedanken die als 2^{de} beoordelaar dit hele werk zal nalezen.

Verder zou ik mijn begeleidster Michelle Plusquin heel erg willen bedanken voor de goede en enthousiaste begeleiding, het geduldig beantwoorden van al mijn vragen en het nalezen van mijn thesis. Ook na de bevalling maakte ze voldoende tijd voor mij vrij en kwam ze mij regelmatig in het labo ondersteunen.

Dit brengt mij trouwens nog eens bij Karen Smeets die, op momenten dat Michelle er niet was, mijn lijstjes met vragen telkens weer met veel enthousiasme heeft beantwoord en die mij op mindere dagen altijd een boost wist te geven. Ik wil haar eveneens bedanken voor het nalezen van mijn thesis.

Beiden dus bedankt om mijn laatste jaar zo boeiend en leerrijk te maken met deze mooie thesis als afsluiter!

Daarnaast zou ik Olivier Degheselle en Andromeda van Roten willen bedanken omdat ze altijd klaar stonden wanneer ik dringende vragen had, een extra paar handen kon gebruiken en wanneer Excel of SAS weer eens niet wou meewerken.

Ook Natascha Steffanie mag hier niet ontbreken, aangezien ik zonder haar hulp met vuile platen en flessen zou hebben moeten werken, stofjes niet opgelost zou hebben gekregen, het milieu sterk zou hebben vervuild door het verkeerde door de afvoer te gooien en zoveel meer. Bovendien wil ik de hele onderzoeksgroep CMK en Dierkunde bedanken voor de fijne sfeer en de goede hulp tijdens dit thesisjaar.

Ik wil ook mijn medestudenten bedanken die het afgelopen jaar/jaren voor vele fijne momenten hebben gezorgd. In het bijzonder wil ik Véronique Strauven en Chayenne Saeren bedanken om de langere dagen in het labo helemaal op te fleuren. De RNA-extracties samen onder de trekkast lokte hilarische momenten uit die ik niet gemist zou willen hebben. Ook Nicky Pirotte en Dirk Meyssen wil ik nog eens extra bedanken voor hun hulp bij de enzymmetingen en de mitosekleuring. Door hun hulp en gezelschap verliepen alle metingen 10 keer zo vlot.

Ten slotte wil ik mijn ouders bedanken die mij steeds ondersteunen in alles wat ik wil bereiken.

Referenties

1. URL: http://www.euro.who.int/document/aig/6_3cadmium.pdf
2. Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. 2003; 68 (1): 167-182.
3. Cannino G, Ferrugia E, Luparello C, Rinald AM. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*. 2009; 9 (6): 377-384.
4. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 2006; 141: 312-322.
5. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000; 149 (1): 43-50.
6. Livingstone DR. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 2001; 42 (8): 656-666.
7. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2009; 20 (7): 332-340.
8. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*. 2007; 19 (9): 1807-1819.
9. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001; 31 (11): 1287-1312.
10. Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*. 2009; 12 (1): 75-92.
11. Thévenod F. Cadmium and cellular signalling cascades: To be or not to be? *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009; 238 (3): 221-239.
12. Weiqun X, Liu Y, Templeton DM. Pleiotropic effects of cadmium in mesangial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009; 238 (3): 315-326.
13. Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; 61 (4): 310-318.
14. Shih YL, Lin CJ, Hsu SW, Wang SH, Chen WL, Lee MT, Wei YH, Shih CM. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1042: 497-505.

15. Bertin G, Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences. *Biochimie*. 2006; 88 (11): 1549-1559.
16. Joseph P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009; 238 (3): 272-279.
17. URL: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol58/mono58-2.html>
18. Carranza S, Littlewood DT, Clough KA, Ruiz-Trillo I, Bagaña J, Riutort M. A robust molecular phylogeny of the Tricladida (Platyhelminthes: Seriata) with a discussion on morphological synapomorphies. *Proceedings. Biological sciences/ The Royal Society*. 1998; 265 (1396): 631-640.
19. Kiefer JC. Emerging developmental model systems. *Developmental Dynamics*. 2006; 235: 2895-2899.
20. Saló E. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *BioEssays*. 2006; 28: 546-559.
21. Newmark PA, Alvarado AS. Regeneration in planaria. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001.
22. Alvarado AS. Planarian regeneration: Its end is its beginning. *Cell*. 2006; 124 (2): 241-245.
23. Alvarado AS. Stem cells and the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Comptes Rendus Biologies*. 2007; 330 (6-7): 498-503.
24. Ladurner P, Rieger R, Bagaña 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.
25. De Mulder K, Pfister D, Kuaes G, Egger B, Salvenmoser W, Willems M, Steger J, Fauster K, Micura R, Borgonie G, Ladurner P. Stem cells are differentially regulated during development, regeneration and homeostasis in flatworms. *Developmental Biology*. 2009; 334 (1): 198-212.
26. Eisenhoffer GT, Kang H, Alvarado AS. Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell*. 2008; 3 (3): 327-339.
27. Shibata N, Rouhana L, Agata K. Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Development, Growth and Differentiation*. 2010; 52: 27-41.
28. Bouché ML, Habets F, Biagiatti-Risbourg S, Vernet G. Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete, *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000; 46: 246-251.

29. Calevro F, Filippi C, Deri P, Albertosi C, Batistoni R. Toxic effects of aluminium, chromium and cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. *Chemosphere*. 1998; 37 (4):651-659.
30. Best JB, Morita M. Toxicology of planarians. *Hydrobiologia*. 1991; 227: 375-383.
31. 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 (1): 99-107.
32. Nimeth KT, Mahlkecht M, Mezzanato A, Peter R, Rieger R, Ladurner P. *Developmental Dynamics*. 2004; 230: 91-99.
33. Bergmeyer HU, Gawenn K, Grassl M. Enzymes as biochemical reagents. *Methods in enzymatic analysis*. Academic Press. 1974: 425-522.
34. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 1971; 44 (1): 276-287.
35. Kim KK, Whitin JC, Sukhova NM, Cohen HJ. Increase in extracellular glutathione peroxidase in plasma and lungs of mice exposed to hyperoxia. *Pediatric Research*. 1999; 46 (6): 715-721.
36. Kaaya A, Najimi S, Ribera D, Narbonne JF, Moukrim A. Characterization of glutathione S-transferase (GST) activities in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* used as a biomarker of pollution in the Agadir marine bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1999; 62 (5): 623-629.
37. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987; 162 (1): 156-159.
38. Westerheide SD, Kawahara TLA, Orton K, Morimoto RI. Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 9616-9622.
39. Vroonen J, Artois T, Blust R, Cuypers A. Morfologische en moleculaire effecten van blootstelling aan cadmium bij de vrijlevende platworm *Schmidtea mediterranea*. Universiteit Antwerpen. 2009.
40. Gulisano M, Pacini S, Punzi T, Morucci G, Quagliata S, Delfino G, Sarchielli E, Marini M, Vannelli GB. Cadmium modulates proliferation and differentiation of human neuroblasts. *Journal of Neuroscience Research*. 2009; 87: 228-237.

41. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 2003; 192 (2-3): 95-117.
42. Saplakoglu U, Iscan M. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated *in vitro* with cadmium in S-phase of their cell cycles. *Mutation Research*. 1998; 412: 109-114.
43. Pearson BJ, Alvarado AS. A planarian p53 homolog regulates proliferation and self-renewal in adult stem cell lineages. *Development*. 2010; 137: 213-221.
44. Eneman JD, Potts RJ, Osier M, Shukla GS, Lee CH, Chiu JF, Hart BA. Suppressed oxidant-induced apoptosis in cadmium adapted alveolar epithelial cells and its potential involvement in cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 2000; 147: 215-228.
45. Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *The EMBO journal*. 1999; 18: 6845-6854.
46. 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: 109-118.
47. Saeren C, Smeets K, Artois T. Het beschermende effect van heat shock proteïnen in functie van celproliferatie tijdens cadmium blootstelling in *Macrostomum lignano*. Universiteit Hasselt. 2010.
48. 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.
49. Whitesell L, Lindquist S. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2009; 13 (4): 469-478.

Auteursrechtelijke overeenkomst

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

Speelt oxidatieve stress een rol in cadmium-geïnduceerde stamcelproliferatie in Schmidtea mediterranea.

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,

Stevens, An-Sofie

Datum: **15/06/2010**