

2011
2012

GENEESKUNDE

master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid

Masterproef

Stamceldynamiek na blootstelling aan cadmium en hexavalent chroom in Schmidtea mediterranea: regenererende vs. intacte wormen

Promotor :
dr. Karen SMEETS

Dorien Deluyker

Masterproef voorgedragen tot het bekomen van de graad van master in de biomedische wetenschappen , afstudeerrichting milieu en gezondheid

De transnationale Universiteit Limburg is een uniek samenwerkingsverband van twee universiteiten in twee landen:
de Universiteit Hasselt en Maastricht University



Universiteit Hasselt | Campus Diepenbeek | Agoralaan Gebouw D | BE-3590 Diepenbeek
Universiteit Hasselt | Campus Hasselt | Martelarenlaan 42 | BE-3500 Hasselt



2011
2012

GENEESKUNDE

master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid

Masterproef

Stamceldynamiek na blootstelling aan cadmium en hexavalent chroom in Schmidtea mediterranea: regenererende vs. intacte wormen

Promotor :
dr. Karen SMEETS

Dorien Deluyker

Masterproef voorgedragen tot het bekomen van de graad van master in de biomedische wetenschappen , afstudeerrichting milieu en gezondheid

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	i
Voorwoord	iii
Samenvatting	v
Abstract.....	vii
<i>I Introductie.....</i>	<i>1</i>
1. <i>Schmidtea mediterranea</i>	1
1.1 <i>Schmidtea mediterranea</i> als modelorganisme	1
1.2 Stamcellen.....	2
2. Regeneratie versus carcinogenese.....	2
3. Carcinogene stressfactoren.....	4
3.1 Cadmium	4
3.2 Hexavalent chroom	5
4. <i>Schmidtea mediterranea</i> als toxicologisch modelorganisme.....	5
5. Doelstelling	7
<i>II Materiaal en Methoden.....</i>	<i>9</i>
1. Modelorganisme en kweekmethode	9
2. Experimentele set-up	9
3. LC50-test.....	10
4. Histon H3 kleuring	10
5. Genexpressie	11
5.1 RNA-extractie	11
5.2 cDNA aanmaak	12
5.3 Real-time PCR.....	12
6. Proteomics.....	13
6.1 Eiwitextractie	13
6.2 1D SDS-PAGE	14
7. Statistische analyse	14
<i>III Resultaten.....</i>	<i>15</i>
1. LC50-test.....	15

2. Histon H3 kleuring	16
3. Genexpressie	17
3.1 CuZnSOD.....	17
3.2 Msh2.....	18
3.3 Hsp60.....	19
3.4 Hsp70.....	19
3.5 PCNA.....	20
3.6 MCM2.....	20
3.7 Smedinx-11.....	21
3.8 Smedwi-2.....	21
4. Proteomics.....	22
4.1 Eiwitextractie	22
4.2 1D SDS-PAGE	22
<i>IV Discussie</i>	<i>25</i>
1. LC50-test.....	25
2. Histon H3 kleuring	26
3. Genexpressie	27
4. Proteomics.....	29
<i>V Conclusie.....</i>	<i>31</i>
Referenties	33

Voorwoord

Het einde van mijn thesisjaar is inzicht dus wordt het hoog tijd om enkele mensen te bedanken.

In de eerste plaats wil ik mijn promotor dr. Karen Smeets bedanken omdat ze mij de mogelijkheid heeft gegeven om met platwormen te mogen werken. Ik wil haar eveneens bedanken voor het nalezen van mijn thesis. Als 2^{de} beoordelaar wil Prof. dr. Tom Artois bedanken, die deze thesis zal nalezen. Degene die ik zeker hier in de bloemetjes wil zetten is Andromeda!! Ze heeft me de afgelopen 7 maanden geholpen met het schrijven van mijn thesis (misschien wel de zwaarste opdracht voor mij), opzetten van experimenten, helpen bij het bestuderen van de data, en zoveel meer ☺. Ze had ook altijd enorm veel vertrouwen in mij en ik kon altijd bij haar terecht met al mijn vragen. Tussendoor hadden we het over voetbal want toeval of niet we zijn beide supporters van Racing Genk!! Andromeda, héél fel bedankt voor alles ☺ !!!

Verder wil ik iedereen van de dierkunde groep bedanken voor de leuke sfeer en begeleiding.

Mijn klasgenoten waren een grote steun tijdens deze periode. Tijdens de middag konden we bij elkaar elkaars frustatie kwijt (en dan vooral Eline toen Nele in het verre Amerika zat!!).

En natuurlijk mag ik Karen en Nathalie niet vergeten!! De avonden dat we op kot zaten en alle drie dachten van: 'Dit komt nooit goed' maar dat we elkaar dan toch oppepten om door te zetten!! En onze party snack avonden zorgden altijd voor leuke (soms wel tot buikpijn toe :s) momenten ☺ !!

Dankzij mijn zussen – Valerie en Sofie – kon ik af en toe alle zorgen van mijn thesis vergeten door voor hun te supporteren. Zonder mij als trouwe supporter zouden jullie nooit kampioen zijn geworden daar ben ik héél zeker van ;-)!!! Ten slotte wil ik mijn mama en papa en bedanken voor alle steun!! Jullie zijn heel belangrijk geweest om deze studie tot een goed einde te kunnen brengen.

Samenvatting

Introductie: *Schmidtea mediterranea* beschikt over een enorme populatie totipotente stamcellen, neoblasten genoemd. Deze cellen omvatten 30% van het totaal aantal cellen in dit organisme en het zijn bovendien de enige delende cellen in *S. mediterranea*. Aangezien vele kankers ontstaan door een defect regulatiemechanisme van de (stam)celdeling, is *S. mediterranea* een zeer geschikt modelorganisme voor het bestuderen van carcinogene processen. Eerder werd aangetoond dat blootstelling aan cadmium (Cd) en hexavalent chroom (Cr(VI)) de stamcelproliferatie verhoogt in deze platworm. Het is echter nog niet geweten of deze metaal-geïnduceerde stamcelproliferatie gelinkt kan worden aan schade (kanker) of aan een herstelmechanisme. De onderliggende mechanismen van Cd- en Cr(VI)-geïnduceerde stamcelproliferatie en de rol van stamcellen hierin kan worden onderzocht via een open proteoomscreening.

Doel: Het doel van deze thesis kadert binnen de onderzoeksvraag die deze stress-geïnduceerde (stam)celproliferatie probeert te karakteriseren, waarbij ik de condities voor de proteoomscreening tracht te bepalen in functie van de verschillen tussen Cd en Cr(VI) enerzijds intacte en regenererende wormen anderzijds. Hiervoor werd een LC50-test, histon H3 kleuring en een genexpressie experiment uitgevoerd. De condities, waarin de duidelijkste verschillen ten opzichte van de controlesituatie werden waargenomen, werden gekozen voor de proteoomscreening. Ter voorbereiding op deze open proteoomscreening werd een eiwitextractie voor volledige wormen uitgetest en werd het eiwitpatroon van *S. mediterranea* mét en zonder mucuslaag vergeleken.

Resultaten: Uit de LC50-test blijkt dat regenererende organismen gevoeliger zijn voor Cr(VI) dan voor Cd. Verder is de Cd- en Cr(VI)-toxiciteit verschillend tussen intacte en regenererende wormen. De histon H3 kleuring bevestigt een stijging in stamcelproliferatie voor beide groepen na blootstelling aan Cd en Cr(VI). Waar er bij intacte organismen, echter na 2 weken een stijging wordt waargenomen, wordt er bij regenererende organismen al na 1 week een stijging vastgesteld. De genexpressie levels van herstel genen zijn verschillend tussen intacte en regenererende wormen na blootstelling aan beide metalen. De expressie van stamcel specifieke genen daarentegen was gelijkaardig tussen beide groepen, zowel na blootstelling aan Cd als aan Cr(VI).

Conclusie: Intacte en regenererende wormen reageren verschillend in stresssituaties veroorzaakt door Cd- of Cr(VI)-blootstelling op moleculair niveau en op niveau van het organisme, terwijl dezelfde responsen worden waargenomen op cellulair niveau. Hoewel er zowel bij intacte als regenererende wormen wordt gekeken in een situatie van celproliferatie, lijken de onderliggende mechanismen van deze proliferatie tussen de verschillende groepen te verschillen.

Abstract

Introduction: *Schmidtea mediterranea* has an enormous population of accessible, totipotent stem cells, i.e. neoblasts. A neoblast is a unique cell type of which is the only dividing cell type in planarians. Since many cancers arise due to a defective regulation mechanism of the stem cell proliferation, this characteristic makes *S. mediterranea* a very interesting model organism for studying carcinogenesis. It has been proven that exposure to cadmium (Cd) and hexavalent chromium (Cr(VI)) increases the stem cell proliferation in this flatworm. However, it is unknown whether this metal-induced stem cell proliferation is linked to carcinogenic processes or a defense mechanism. The underlying mechanisms of Cd and Cr(VI) induced stem cell proliferation and the role of the stem cells will be examined through an open proteome screening.

Objective: The aim of this thesis is a part of the research question that characterizes stress-induced (stem) cell proliferation, whereby I determine the conditions for the open proteome screening. These conditions are determined in function of differences between the two metals and differences between intact and regenerating organisms. To achieve this, we study the Cd- and Cr(VI)- toxicity on regenerating worms, as well as the stem cell dynamics and the transcriptional effects of exposure in intact and regenerating worms. A LC50-test, histone H3 staining and a gene expression experiment was therefore conducted. The conditions, in which the most obvious differences were observed compared to the control situation, were chosen for the proteome screening. Furthermore in preparation for the open proteome screening, a protein extraction protocol for whole animals was tested and the protein pattern of *S. mediterranea* was studied with and without mucus layer.

Results: The LC50 shows that regenerating organisms are more sensitive to Cr (VI) than Cd. The Cd- and Cr(VI)-toxicity is different between intact and regenerating worms. The histone H3 staining confirms an increase in stem cell proliferation in both groups after exposure to Cd and Cr (VI). Unlike intact organisms, that have an increased stem cell proliferation after 2 weeks, regenerating worms already show after 1 week an increase. The gene expression levels of repair genes are different between intact and regenerating worms after exposure to both metals. The expression of stem cell specific genes after exposure to Cd or Cr (VI) was similar between both groups.

Conclusion: Intact and regenerating worms react different in stress situations induced by Cd- or Cr(VI)-exposure at molecular level and at level of the organism, while same responses are observed at cellular level. Although both intact and regenerating worms are examined in a situation of cell proliferation, it appears that the underlying mechanisms of this proliferation between the two groups differ.

I Introductie

1. *Schmidtea mediterranea*

Schmidtea mediterranea is een vrijlevend organisme dat behoort tot het fyllum Platyhelminthes. Platyhelminthes zijn bilaterale symmetrische organismen, die zijn opgebouwd uit drie kiemlagen namelijk endoderm, ectoderm en mesoderm. Dit soort platwormen ontwikkelt geen respiratoir en circulair systeem en is afhankelijk van diffusie voor het transport van onder andere zuurstof. Hun zenuwstelsel bestaat uit tweelobbige cerebrale ganglia aan de anterieure kant en twee longitudinale zenuwbanen. Hun gastrointestinaal stelsel bestaat uit één prefaryngeaal darmkanaal en twee postfaryngeale darmkanalen. Planaria bevatten ook enkele sensorische structuren zoals fotoreceptoren, chemoreceptoren and rheoreceptoren, die zich voornamelijk in het anterieure deel van het organisme bevinden ^[1, 2]. *Schmidtea mediterranea* is 2 – 8 mm groot en leeft in stromende zoetwater habitats van het mediterrane gebied. Er bestaan zowel seksuele als asexuele stammen van *S. mediterranea*. Asexuele organismen planten zich uitsluitend voort via transversale fissie ^[3, 4].

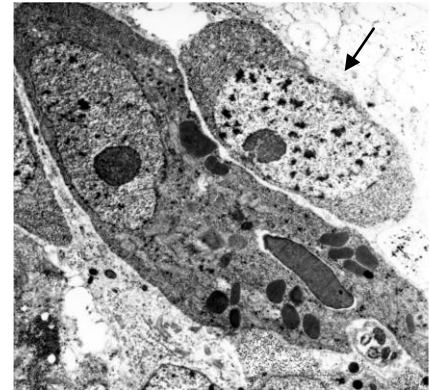
1.1 *Schmidtea mediterranea* als modelorganisme

Omwillen van tal van eigenschappen is *Schmidtea mediterranea* een zeer geschikt modelorganisme in moleculair onderzoek. Het beschikt over een klein ($4,8 \times 10^8$ bp), stabiel diploïd ($2n=8$) genoom dat volledig gesequeneerd en geannoteerd is ^[5]. De huisvesting van planaria in het labo gebeurt in petriplaten of in plastieke of glazen bakken in een gekoelde kweekruimte (18°C) en is daarenboven zeer goedkoop en gemakkelijk door hun grootte. *Schmidtea mediterranea* heeft een korte generatietijd (± 3 weken) wat de mogelijkheid biedt om verschillende experimenten uit te voeren in een korte tijdsperiode. In dit onderzoek wordt er gebruik gemaakt van de asexuele stam van *S. mediterranea*, die zich enkel voortplant via transversale fissie. Hierdoor is het mogelijk om te werken met genetisch identieke nakomelingen ^[4]. Verder is de epidermis van dit organisme zeer permeabel waardoor het gemakkelijk stoffen kan opnemen ^[2, 6].

Verder lijkt *Schmidtea mediterranea* ook een ideaal modelorganisme om carcinogene processen te bestuderen. Planaria vertonen de belangrijkste kenmerken van chemisch-geïnduceerde carcinogenese in vergelijking met zoogdieren, namelijk de initiatie- en promotiefase van de neoplastische vorming. Bovendien bieden moleculaire overeenkomsten met andere organismen extra voordelen voor *S. mediterranea* als modelorganisme. Zo zijn al vele kandidaat genen zoals Msh2 en P53 en signalisatie pathways geïdentificeerd in planaria, die geassocieerd worden met abnormale celgroei ^[6-9].

1.2 Stamcellen

Schmidtea mediterranea is gekend omwille van zijn enorme plastische en regeneratieve capaciteit. Het organisme is in staat om vanuit een uitermate klein lichaamsdeel, $1/279^{\text{ste}}$ van hun lichaam, te regenereren tot een compleet organisme. Dit buitengewoon regeneratievermogen heeft het te danken aan een populatie totipotente stamcellen, neoblasten ^[10]. Neoblasten zijn niet alleen verantwoordelijk voor hun regeneratievermogen, ze staan eveneens in voor de fysiologische celturnover onder normale omstandigheden. Een neoblast is een relatief klein (ten opzichte van gedifferentieerde cellen), ongedifferentieerd celtype ($\varnothing$ 5 – 8 μm) met een hoge nucleus/cytoplasma ratio (figuur 1) ^[11]. Het cytoplasma bevat vrije ribosomen, slechts enkele mitochondriën en een beperkt tot geen endoplasmatisch reticulum ^[12]. Neoblasten worden gekenmerkt door unieke cytoplasmatische structuren gekend als chromatoïde lichamen ^[13, 14]. Ze vertegenwoordigen ongeveer 25 tot 30% van het totaal aantal cellen in dit organisme. Neoblasten liggen verdeeld over de gehele lengte van het dier, maar zijn afwezig in de farynx en in de regio boven de fotoreceptoren. Ze zijn ook de enige actief delende cellen in planaria en kunnen differentiëren naar ongeveer 40 verschillende celtypes gevonden in adulte organismen, inclusief de geslachtscellen ^[4, 6].



Figuur 1. Een elektronen microscopisch beeld van neoblasten. Een enkele neoblast (rechtsboven) langs een gedifferentieerde cel (midden in beeld) in *Schmidtea mediterranea*.

2. Regeneratie versus carcinogenese

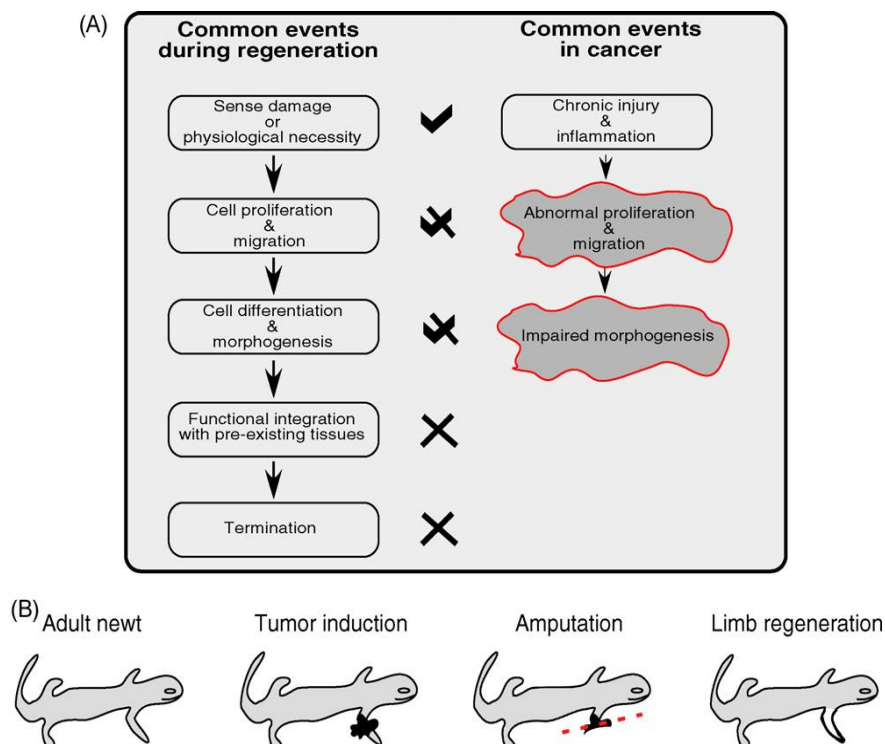
Neoblasten zijn verantwoordelijk voor de enorme regeneratieve capaciteit van *Schmidtea mediterranea*. Regeneratie in planaria kan worden onderverdeeld in twee verschillende processen: morfallaxis en epimorfose ^[1, 9]. Na het afsplitsen of verlies van een lichaamsdeel, treedt eerst het sluiten van de wonde op (morfallaxis) ^[15]. Hierna wordt ter hoogte van de wonde het blastema gevormd bestaande uit neoblasten. Het blastema zal zorgen voor het herstel van het verloren weefsel door migratie en differentiatie van de neoblasten uit het blastema (epimorfose) ^[13, 15].

Regeneratie voorkomt en corrigeert abnormale celgroei enerzijds, anderzijds zorgt regeneratie voor herstel van verloren lichaamsdelen. Het is uiterst noodzakelijk dat het regeneratiemechanisme nauw wordt gereguleerd. Een foutief verlopen regeneratieproces zal leiden tot abnormale celproliferatie en verslechtere morfogenese wat kan leiden tot de vorming van een tumor ^[16].

Seilern-Aspang en Kratouchwil waren de eersten die de relatie tussen regeneratie en tumorvorming bestudeerden. Ze formuleerden twee hypothesen hieromtrent: 'De vorming van kwaadaardige tumoren is afkomstig van een slecht of onvoltooid regeneratieproces.' (figuur 2A) en 'Regeneratie is in staat om abnormale groei van kwaadaardige cellen onder controle te brengen.' (figuur 2B).

De eerste hypothese is voornamelijk gebaseerd op observaties in zoogdieren, waar blootstelling van epitheliale oppervlakten aan chronische schade, hypoxische condities en ontsteking leidt tot abnormaliteiten in groei. Deze hypothese geldt dus niet voor alle types van kanker en zal waarschijnlijk meer voorkomen in tumoren van bijvoorbeeld epitheliale oorsprong. Abnormaliteiten tijdens het regeneratieproces worden gekarakteriseerd door verlies van weefselvorming, morfogenese en terminatie signalen terwijl de mechanismen om schade op te merken en celproliferatie te activeren niet worden aangetast ^[9]. Wanneer het regeneratieproces slecht wordt gecontroleerd, zullen cellen met abnormale celproliferatie en beschadigde morfogenese niet herkend worden door het herstelmechanisme, waardoor er geen terminatie signalen worden uitgezonden en het regeneratieproces niet voltooid kan worden. Dit verschijnsel zal in vele gevallen leiden tot het ontstaan van kanker (figuur 2A).

De tweede hypothese veronderstelt dat cellulaire proliferatie tijdens regeneratie wordt gevolgd door morfogenese processen. Op deze manier bezit regeneratie het vermogen om abnormale celgroei te voorkomen en maligniteiten onder controle te brengen en morfogenese terug te winnen (figuur 2B) ^[9].



Figuur 2. Link tussen regeneratie en kanker. (A) Regeneratie kan steeds opnieuw herhaald worden zonder de vorming van kwaadaardige transformaties terwijl bij kanker het regeneratieproces foutief verloopt en uiteindelijk zal leiden tot een continue celdeling. (B) Regeneratie heeft het vermogen om abnormale celgroei te neutraliseren.

3. Carcinogene stressfactoren

Tal van omgevingsfactoren zoals UV-straling, roken en pollutie worden gezien als carcinogene stressfactoren. In dit onderzoek worden cadmium (Cd) en hexavalent chroom (Cr(VI)) beschouwd als stressfactor. Beide metalen komen in verhoogde concentratie voor in onder andere industriegebieden zoals 'Genk Zuid' ^[17]. Zowel Cd als Cr(VI) worden door het internationaal agentschap voor kankeronderzoek (IARC) geclassificeerd als humaan carcinogeen, groep 1.

3.1 Cadmium

Cadmium kan in het milieu terechtkomen via natuurlijke processen zoals erosie, bosbranden en vulkaanuitbarstingen. Bij productie van ijzer, staal en non-ferro metalen, bij de verbranding van fossiele brandstoffen en bij toepassing van fosfaat houdende meststoffen komt ook Cd vrij in de natuur. Deze antropogene processen zorgen voor verhoogde concentraties van dit metaal in het milieu. Uiteindelijk kan het uitgestoten Cd in de voedselketen terecht komen door opname via planten ^[18, 19].

Cadmium staat geclassificeerd als humaan carcinogeen, groep 1 (IARC) ^[20]. De onderliggende mechanismen van Cd carcinogenese zijn multifactorieel. De belangrijkste mechanismen betrokken in Cd carcinogenese zijn het verstoren van de genregulatie, inductie van oxidatieve stress, verstoring van cadherines, inhibitie van DNA herstel en interfereren in apoptose ^[21, 22].

Cadmium kan de genexpressie van genen zoals immediate early response genen (onder andere c-jun, c-myc en c-fos), stress repons genen (ondere andere heat shock proteïnen) en transcritiefactoren (onder andere AP-1) ontregelen. Aangezien het geen fenton metaal is, kan het enkel indirect oxidatieve stress induceren. Cadmium-geïnduceerde productie van 'reactive oxygen species' (ROS) kan worden veroorzaakt via onderdrukking van glutathion, inhibitie van enzymen (zoals catalase) of door indirecte mechanismen waarin de vervanging van fenton metalen in eiwitten betrokken is. De door Cd geproduceerde oxidatieve stress kan leiden tot verschillende types van DNA-schade zoals cross-links, strand breaks en DNA adducts (zoals 8-hydroxy-2-deoxyguanosine) ^[23]. Inhibtie van het DNA herstelsysteem is mogelijk doordat Cd de enzymen betrokken in het DNA herstel, zoals DNA mismatch repair enzymen, modificeert. Het kan eveneens zink vervangen bij de familie van de zinkvinger eiwitten, waardoor deze minder goed functioneren. Cadmium is in staat

om de balans tussen apoptose en celproliferatie te verstoren. De richting van deze verstoorde balans is afhankelijk van de Cd concentratie en het weefseltype^[21, 22, 24].

3.2 Hexavalent chroom

Chroom komt zelden voor als vrij metaal in de natuur. In de aardkorst komt Cr voornamelijk voor onder de vorm van chromiet $[(\text{Mg}, \text{Fe}^{2+}) (\text{Al}, \text{Cr}, \text{Fe}^{3+})_2\text{O}_4]$ en in de atmosfeer kan het reageren met zuurstof tot de vorming van chroom(III)oxide (Cr_2O_3). De oxidatietoestand, waarin het voornamelijk voorkomt, is in trivalente of hexavalente vorm. Cr(III), zoals het voorkomt in Cr_2O_3 , is de stabielste oxidatietoestand, terwijl Cr(VI) sterk oxiderend is^[25].

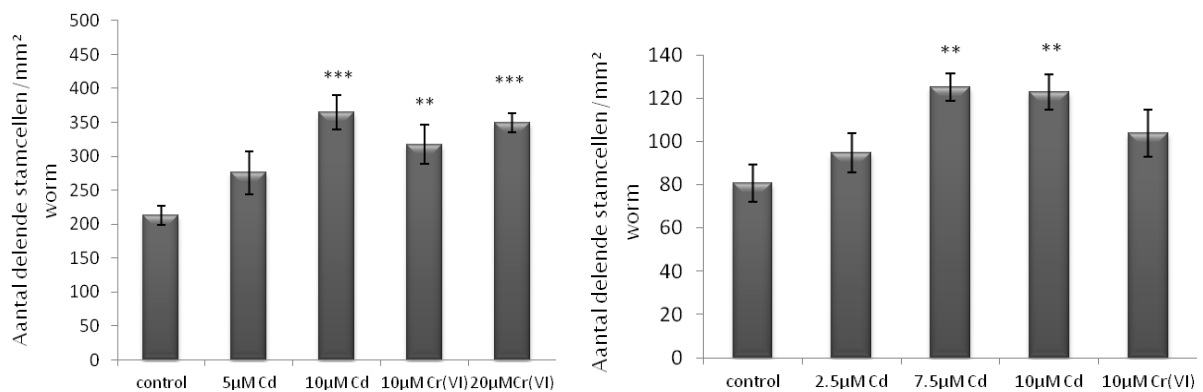
Chroom concentreert zich voornamelijk in de aardkorst (100 mg/kg) maar het kan van nature ook voorkomen in gesteenten, bodems, water en de atmosfeer door onder andere vulkaanuitbarstingen^[18]. Verwerking van gesteenten en bodems draagt in kleine mate bij aan de concentratie van Cr in de natuur. De veel gebruikte chroom toepassingen in de metaal- en chemie industrie hebben geleid tot verhoogde concentraties ervan in het milieu. Zo worden Cr(VI) componenten op grote schaal gebruikt als corrosie-inhibitoren, bij de vervaardiging van kleurstoffen, in metaal afwerking, in de productie roestvrij staal, tijdens het looien van leer en in houtbewaringsmiddelen^[26].

Cr(VI) staat geclassificeerd als humaan carcinogeen, groep 1 (IARC). In tegenstelling tot Cd is Cr(VI) wel een redox-actief element dat reactieve zuurstof soorten kan produceren door interactie van O_2 met vrije elektronen afkomstig van de reductie van Cr(VI) tot Cr(III)^[27, 28]. Deze direct geïnduceerde ROS kan aanleiding geven tot een grote verscheidenheid van DNA letsels zoals eiwit-DNA crosslinks, chromosoom afwijkingen, enkelstrengige breuken en DNA interstrand cross-links. Deze laatste twee types van DNA letsels worden snel hersteld en zullen niet bijdragen aan de Cr(VI)-geïnduceerde carcinogenese. De intracellulaire reductie van Cr(VI) kan gestimuleerd worden door thiolen zoals glutathion tot de vorming van DNA reactieve vormen zoals Cr(V), Cr(IV) en glutathion thiyl radicalen, wat op hun beurt leidt tot verschillende soorten van DNA-schade zoals eerder beschreven^[29]. Verder kan Cr integenstelling tot Cd wel rechtstreeks bindt aan DNA tot vorming van Cr-DNA adducten^[30]. Al deze Cr geïnduceerde DNA-schade kan resulteren in veranderde genexpressie, wat een onderliggend mechanisme lijkt te zijn voor de carcinogene eigenschappen van Cr(VI)^[20, 27].

4. *Schmidtea mediterranea* als toxicologisch modelorganisme

In de onderzoeksgroep 'Dierkunde: Biodiversiteit en toxicologie' wordt er reeds verschillende jaren uitgebreid toxicologisch onderzoek gevoerd gebruik makende van *Schmidtea mediterranea* als testorganisme. Planaria kunnen hun lichaamsgrootte reguleren en wijzigen naargelang

omgevingsveranderingen. Uit onderzoek blijkt onder andere dat er een correlatie bestaat tussen de lichaamsgrootte en de stresssituatie waarin dit organisme zich bevindt ^[31]. Blootstelling aan Cd heeft een negatief effect op de lichaamsgrootte. Een daling in de enzymactiviteit van superoxide dismutase, catalase en glutathion, alsook een tijdelijke upregulatie van de heat shock proteïnen 60 en 70, wijzen er op dat Cd-blootstelling oxidatieve stress kan induceren ^[31]. Verder is uit voorgaand onderzoek gebleken dat Cd en Cr(VI) een verhoogde stamcelproliferatie kunnen induceren bij *Schmidtea mediterranea* (figuur 3). De stamcelproliferatie stijgt significant na 1 week blootstelling in regenererende wormen en na 2 weken bij intacte dieren. De stamcelproliferatie werd gekwantificeerd met behulp van een histon H3 kleuring, waarbij enkel de cellen in mitose aangekleurd worden.



Figuur 3: Het effect van Cd en Cr(VI) op de stamcelproliferatie in *S.mediterranea*. Het gemiddelde aantal delende stamcellen per mm² wordt weergegeven samen met de standaardfout voor regenererende wormen en intacte wormen, die respectievelijk 1 week en 2 weken werden blootgesteld aan verschillende concentraties Cd (R : 0 - 5 - 10 en G: 2,5 – 7,5 – 10) en Cr(VI) (R: 0 – 10 – 20 µM en G: 0 - 10). Iedere conditie bevat 6 biologische herhalingen. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip *** p-waarde < 0,01 en ** p-waarde < 0,05)

Aangezien de plaats van deze stamcelproliferatie in het kader van schade (kanker) of een herstelmechanisme niet gekend is, is het wetenswaardig om een open screening uit te voeren om dit te achterhalen. Dit kan zowel op transcriptoom als op proteoomniveau. Aangezien een combinatie van beide een beter beeld kan schetsen, kiezen we eerst om een kleine screening op transcriptoomniveau uit te voeren vooraleer er een open proteoomscreening zal worden uitgevoerd. Een open screening op proteoomniveau kan worden uitgevoerd door middel van een 2D-DIGE (2D-difference gel electrophoresis). 2D-DIGE is een techniek waarbij eiwitten worden gescheiden op basis van twee onafhankelijke kenmerken. In een eerste dimensie stap worden de proteïnen gescheiden volgens hun isoelektrisch punt (de isoelektrische focusing stap). Eiwitten zijn amfoterische moleculen, wat wil zeggen dat ze zowel een positieve, negatieve of zero netto lading kunnen dragen afhankelijk van de pH van hun omgeving. Het isoelektrische punt is de specifieke pH

op een 'immobilized pH gradients' (IPG) strip waar de netto lading van het eiwit nul is. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is de tweede dimensie stap, die de proteïnen zal gescheiden volgens hun moleculair gewicht. Deze 2D-elektroforese resulteert in verschillende spotjes op een 2D-gel waarbij één spotje gelijk is aan één eiwit. Het verschil tussen 2D-DIGE en de klassieke 2D-elektroforese is dat de eiwitstalen voor de 2D-elektroforese gelabeld worden met fluorescente kleurstoffen. Doordat er drie verschillende kleurstoffen (Cy2, Cy3 en Cy5) worden gebruikt, is het mogelijk om binnen dezelfde 2D-gel drie verschillende stalen te onderscheiden ^[32-34].

5. Doelstelling

Schmidtea mediterranea bezit een toegankelijke populatie totipotente stamcellen waardoor het een zeer geschikt testorganisme om stamcellen *in vivo* te gaan bestuderen onder stress. Voorgaand onderzoek binnen de onderzoeksgroep heeft aangetoond dat blootstelling aan carcinogene elementen zoals Cd en Cr(VI) leidt tot een verhoogde stamcelproliferatie ten opzichte van een controlesituatie. Aangezien celproliferatie een kenmerk is van kanker en beide elementen carcinogeen zijn, kan deze metaal-geïnduceerde stamcelproliferatie gelinkt zijn aan carcinogene processen. Het is eveneens mogelijk dat deze stamcelproliferatie wordt geïnduceerd door een herstelmechanisme dat optreedt na blootstelling aan Cd en Cr(VI). In een groter geheel wordt er getracht de onderliggende mechanismen van Cd- en Cr(VI)-geïnduceerde stamcelproliferatie te bestuderen via een open proteoomscreening. Het doel van mijn thesis kadert binnen deze onderzoeksvraag, waarbij ik de condities voor deze proteoomscreening tracht te bepalen. Deze condities worden bepaald in functie van de verschillen tussen beide metalen (niet-genotoxisch vs. genotoxisch) enerzijds tussen intacte en regenererende organismen anderzijds. Hiervoor werd de toxiciteit van beide metalen op organismaal niveau nagegaan voor regenererende individuen, en vergeleken met de reeds bekende toxiciteit ervan in intacte organismen. De stamceldynamiek, alsook effecten van blootstelling op transcriptieniveau werden bestudeerd in zowel intacte als regenererende wormen.

In eerste instantie wordt de Cd- en Cr(VI)-toxiciteit van regenererende wormen bepaald via een 'lethal concentration' (LC50) test.

Hierna wordt er een herhaling van de histon H3 kleuring uitgevoerd om de vorige resultaten te bevestigen. Tijdens deze kleuring worden intacte wormen gedurende 2 weken blootgesteld aan 0 en 20 µM Cr(VI) en regenererende wormen werden voor 1 week blootgesteld aan 0 µM, 10 µM Cd en 20 µM Cr(VI).

Vervolgens wordt een genexpressie experiment uitgevoerd op wormen blootgesteld aan Cd of Cr(VI) waarbij er gekeken wordt naar stamcel specifieke genen en herstel genen. Tijdens dit experiment zal er eveneens een onderscheid gemaakt worden tussen intacte en regenererende wormen. Hierdoor wordt het mogelijk om eventueel verschillende stress responsen op transcriptie niveau tussen de verschillende groepen en tussen beide metalen te vergelijken en zal ik kunnen specificeren welke condities interessant zijn om mee verder te werken op proteoomniveau. De intacte organismen zullen gedurende 2 weken blootgesteld worden aan (7,5 μ M of 10 μ M) Cd of (10 μ M of 20 μ M) Cr(VI). De regenererende dieren worden voor 1 week blootgesteld aan (5 μ M of 10 μ M) Cd of (10 μ M of 20 μ M) Cr(VI). De condities voor beide experimenten zijn gebaseerd op resultaten van voorgaande histon H3 kleuringen, waarin mitotische stamcellen worden gedetecteerd.

Tot slot werd de eiwitextractie voor volledige organismen getest en werd er onderzocht via een 1D SDS-PAGE of er een verschil zichtbaar is in het eiwitpatroon van *S. mediterranea* wanneer de mucuslaag van de wormen verwijderd wordt met cysteine chloride.

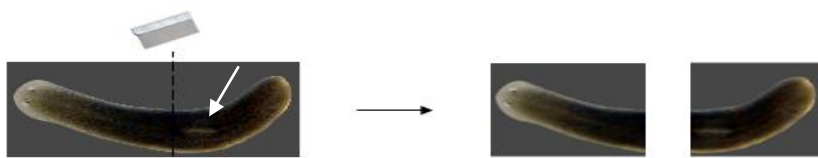
II Materiaal en Methoden

1. Modelorganisme en kweekmethode

In dit onderzoek werd het effect van Cd en Cr(VI) op verscheidene niveaus bestudeerd in de asexuele stam van *Schmidtea mediterranea*. Het organisme werd gekweekt in gestandaardiseerde omstandigheden bij een temperatuur van 18°C en een dag- en nachtritme van 16 uur licht en 8 uur donker. Metaaloplossingen werden aangemaakt vanuit een stockoplossing van CdCl₂ (1000 µM, Aldrich, München; Duitsland) en K₂Cr₂O₇ (1000 µM, Aldrich, München; Duitsland) in dubbel gedestilleerd water, verdund met gestandaardiseerd medium bestaande uit: 1.2 mM NaHCO₃, 1.6 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄·nH₂O, 0.1 mM MgCl₂·6H₂O, 0.1 mM KCl. De wormen werden 1 keer per week gedurende 4 uur gevoed met kalfslever, waarna het medium werd ververs. Omwille van hun negatieve fototaxisch gedrag werden ze van het licht afgeschermd.

2. Experimentele set-up

Er werd met 2 verschillende set-ups gewerkt enerzijds met intacte wormen en anderzijds met regenererende organismen. Intacte wormen zijn organismen die gedurende 1 week zijn geregenereerd, wat wil zeggen dat ze 1 week voor de start van de blootstelling werden gesneden. De regenererende organismen werden bekomen door ze een half uur voor blootstelling te snijden. Het snijden van de organismen gebeurt telkens voor de farynx (figuur 4). De organismen werden tot 1 week voor staalname eenmaal per week gevoed gedurende 4 uur met kalfslever.



Figuur 4: Het snijden van *S. mediterranea* voor de farynx. Farynx wordt aangegeven door de witte pijl.

Intacte en regenererende wormen werden blootgesteld aan verschillende concentraties Cd of Cr(VI). Intacte organismen werden blootgesteld aan 7,5 en 10 µM Cd of aan 10 en 20 µM Cr(VI) gedurende 2 weken. Gedurende 1 week werden regenererende wormen blootgesteld aan 5 en 10 µM Cd of 10 en 20 µM Cr(VI). Blootstelling aan deze metalen gebeurde steeds in petriplaten gevuld met 25 ml oplossing. De controle oplossingen (0 µM) bestonden uit kweekmedium zoals beschreven in 1. Modelorganisme en kweekmethode. Wormen, die spontaan splitsten, werden uit het experiment verwijderd.

Voor de LC50 werd een aparte experimentele set-up gebruikt zoals hieronder beschreven.

3. LC50-test

De toxiciteit van *Schmidtea mediterranea* voor Cd en Cr(VI) werd nagegaan met behulp van een LC50-test. Deze test geeft de Cd- en Cr(VI)-concentratie aan waarbij de helft van de wormen zal sterven. Er werden 15 wormen per conditie blootgesteld in 6-wellplaten aan 0 – 10 – 15 – 25 – 35 – 45 – 55 – 65 – 75 – 95 μM Cd of 0 – 5 – 10 – 15 – 25 – 35 – 45 – 60 – 75 – 95 μM Cr(VI). De overleving werd nagegaan na een korte (1, 2 en 3 dagen) en lange blootstellingstermijn (1, 2 en 3 weken).

4. Histon H3 kleuring

Er werden 4 intacte en 6 regenererende wormen per conditie blootgesteld. Na blootstelling werden de wormen eerst gedurende 1 minuut op ijs gehouden om te verdoven. Vervolgens werd de slijm laag permeabel gemaakt door ze 5 à 6 minuten op ijs te houden in een 2% HCl/Holtfreter 5/8 oplossing. Hierna werden de organismen voor 2 uur gehouden op ijs in carnoy, bestaande uit 60% ethanol, 30% chloroform en 10% azijnzuur. De wormen werden gedehydrateerd in methanol (MetOH) gedurende 1 uur in de diepvries bij -20°C . Ten slotte werden de wormen gebleekt gedurende 20 uur onder een koude lamp KL 1500 LCD (Schott, Mainz; Duitsland) in een 6% H_2O_2 /MetOH-oplossing. De volgende dag werden de wormen gerehydrateerd door ze gedurende 10 minuten te wassen op kamertemperatuur in 75% MetOH/PBST, 50% MetOH/PBST en 25% MetOH/PBST en PBST (Aldrich, München; Duitsland). Vervolgens werden ze voor 3 uur geïncubeerd met 1% BSA/PBST om aspecifieke binding te voorkomen. Ten slotte werd op deze dag het primaire antilichaam (Millipore, Billerica; USA), een anti-fosfo-histon $\text{H}_3(\text{Ser}10)$ antilichaam (1/600 maal verdund in 1% BSA/PBST) toegevoegd. Na incubatie van 44 uur op 4°C werd het overtollige antilichaam geweggewassen met PBST. Hierna werden de stalen gedurende 7 uur geïncubeerd met 1% BSA/PBST om aspecifieke binding te voorkomen. Het secundaire antilichaam (Millipore, Billerica; USA), een rhodamine geconjugeerd antilichaam (1/500 maal verdund in 1% BSA/PBST) werd toegevoegd aan de welletjes. Na 16 uur incubatie van het secundaire antilichaam op 4°C in het donker werd het overtollige antilichaam geweggewassen met PBST. Deze stap gebeurde ook in het donker zodat de intensiteit van de fluorofoor niet werd beschadigd. Vervolgens werden microscopische coupes gemaakt met behulp van glycerol. Het aantal neoblasten werd bepaald met behulp van de Nikon eclipse 80i fluorescentiemicroscopie (Nikon, Melville; USA). De TRITC filter met excitatiegolflengte van 540 nm zal het rhodamine, geconjugeerd aan het secundaire antilichaam, doen exciteren waardoor er een rode kleur werd waargenomen door de lenzen. Het aantal cellen werd genormaliseerd ten opzichte van de lichaamsoppervlakte met behulp van het programma Image J.

5. Genexpressie

Het effect van Cd en Cr(VI) op de genexpressie van verschillende groepen van genen werd gemeten met behulp van real-time PCR. Op deze manier werd getracht de verschillen bloot te leggen tussen intacte en regenererende wormen enerzijds en Cd en Cr(VI) anderzijds. De genexpressieprofielen van stamcel specifieke genen zoals proliferating cell nuclear antigen (pcna), mini-chromosome maintenance 2 (mcm2), smedinx-11 en smedwi-2, antioxidatief gen zoals koper/zink super dismutase (CuZnSOD), mismatch herstel gen zoals Msh2 en stressgenen zoals heat shock proteïne 60 (hsp 60) en heat shock proteïne 70 (hsp 70) werden bepaald.

Tijdens de staalname werden de wormen overgebracht in een 2 ml epje waarna het staal onmiddellijk werd bevroren in vloeibare stikstof. Per conditie werden er 6 stalen genomen. De bevroren stalen werden bewaard bij -70°C.

5.1 RNA-extractie

RNA-extractie werd uitgevoerd met behulp van het fenol chloroform principe beschreven door Chomczynski P. en Sacchi N. in "Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". Met behulp van 200 µl lysisbuffer (RLT) (Qiagen, Venlo; Nederland) werden de wormen chemisch gelyseerd. Vervolgens werd 200 µl toegevoegd van een oplossing 1:1 fenol (Fluka analytical, VS) en chloroform (Merck Biosciences, Duitsland) toegevoegd aan de stalen, waarna deze 5 minuten homogeniseerden op kamertemperatuur. Hierna werden de stalen voor 5 minuten op maximale snelheid (13200 rpm) gecentrifugeerd op 4°C. Hierdoor ontstaat er een scheiding van het RNA en DNA met andere celcomponenten zoals eiwitten. De waterfase werd vervolgens overgebracht in een epje met 200 µl chloroform en 2 minuten gecentrifugeerd op 4°C. Deze stap werd dan nogmaals herhaald. Uiteindelijk werd de waterfase overgebracht in een leeg epje wat 3 minuten op maximale snelheid werd gecentrifugeerd bij 4°C. Vervolgens werd het overgebracht in een epje met 2 volumes 100% ethanol. Door toevoeging van 1/10 volume 3M natriumacetaat (pH =4,5) kon het RNA neerslaan. Hierna werden de stalen voor 30 minuten bewaard op -70°C. Na centrifugatie (15minuten, 4°C) werd het verkregen pellet tweemaal gewassen met 80% ethanol. Vervolgens werd het pellet gedurende 5 minuten gedroogd in een oventje ([ECHO]therm; Torrey Pines scientific) op 37°C waarna het met behulp van 15 µl RNase vrij water werd geëluëerd. Ten slotte werd de hoeveelheid en de zuiverheid van het RNA bepaald met behulp van de nanodrop spectrofotometer ND-1000 (Isogen Life Sciences, De Meern; Nederland).

5.2 cDNA aanmaak

Om de genexpressie efficiënt te kunnen meten, moest er in elk staal een gelijke hoeveelheid RNA aanwezig zijn. Voor intacte wormen was deze concentratie 450 ng RNA en 250 ng RNA voor regenererende wormen. Hierna werd het genomisch DNA uit de stalen verwijderd met behulp van Turbo DNA-free kit van Ambion (Applied biosystems, Lennik; België) in de thermal cycler Techne TC-5000 (Applied biosystems, Lennik; België). Vervolgens werd 6,5 µl van het supernatans overgebracht in een nieuw pcr buisje. De reverse transcriptie werd uitgevoerd met behulp van PrimeScript RT reagent Kit van Taraka (Westburg, Leusden; Nederland). Aan elk staal werd 3,5 µl mastermix toegevoegd, bestaande uit 5X PrimeScript Buffer, PrimeScript RT Enzyme Mix I, Oligo dT Primer (50 µM) en random hexamers (100 µM). Ten slotte werden alle stalen gecentrifugeerd en in de cycler geplaatst, waarna het TaKaRa Revtran programma werd voltooid (37°C voor 15 min, 85°C voor 5 min, houden op 4°C).

5.3 Real-time PCR

Real-time PCR werd uitgevoerd in een optische 96-well plaat in het 7900 Fast Real-time PCR toestel (Applied Biosystems, Lennik; België) en doorliep het volgende programma: 10 minuten op 95°C, 40 cycli van 15 sec op 95°C en 60 sec op 60°C. De Fast SYBR green master mix bestaat uit SYBR Green (Applied Biosystems, Lennik; België), 0,3 µM gen specifieke forward en reverse primer, 2,5 µl cDNA voor elke reactie van 10 µl. Voor elk gen werd er een negatieve controle (non-template control) genomen, bestaande uit RNase vrij water in plaats van cDNA. Wanneer er bij de negatieve controle een reactie optreedt, heeft er contaminatie met DNA plaatsgevonden. De genexpressie werd genormaliseerd met behulp van de referentiegenen cystatine (cys), glyceraldehyde-3-posphate dehydrogenase (GAPDH) en peptidylprolyl isomerase A (PPIA). Deze referentie genen werden door geNorm als stabielste genen aangewezen in de volgende geteste groep referentiegenen: β-actine (β-act), ribosomaal proteïne L13 (RPL13) cystatine (cys), glyceraldehyde-3-posphate dehydrogenase (GAPDH) en peptidylprolyl isomerase A (PPIA).

Tabel 1. Real-time PCR primers

De genexpressieprofielen van stamcel specifieke genen zoals proliferating cell nuclear antigen (pcna), mini-chromosome maintenance 2 (mcm2), smedinx-11 en smedwi-2, antioxidatief gen zoals koper/zink super dismutase (CuZnSOD), mismatch herstel gen zoals Msh2 en stress respons genen zoals heat shock proteïne 60 (hsp 60) en heat shock proteïne 70 (hsp 70) werden bepaald. De genexpressie werd genormaliseerd met behulp van de referentiegenen cystatine (cys), glyceraldehyde-3-posphate dehydrogenase (GAPDH) en peptidylprolyl isomerase A (PPIA). Deze referentie genen werden door geNorm als stabielste genen

aangewezen in de volgende geteste groep referentiegenen: β -actine (β -act), ribosomaal proteïne L13 (RPL13) cystatine (cys), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) en peptidylprolyl isomerase A (PPIA).

Gen	Functie	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
PCNA	stamcelgen	TCTTCTCAAGTATCTCTGTCGTTG	CTCGTCGTCTTCGATTTTAGG
MCM2	stamcelgen	GAAGAAGAAGTTGAAGGCGAAG	TGTTTCGTAAGTATCAAGTTCAGG
Smedinx-11	stamcelgen	TCGTCTCGATGGGATTTTTC	CTCCAAAGGTTCTCCACGAC
Smedwi-2	stamcelgen	GTCATCGTAAAGAAAAGAGTCGGC	CCACAACAGTTCAGGATTTGG
Msh2	herstelgen	AAACTGCCGCCACCCTCT	TAGGACCGGTAATGATTGG
CuZnSOD	antioxidant gen	TTCATGCTGTATGCGTTTTG	AACGTGTTTACCAGGAGTTAGA
Hsp 60	stressgen	GTTGCTGAAGATGTTGACGGA	CAAAACCTGGCGCTTTAACAG
Hsp 70	stressgen	GTAGCAATGAATCCCAACAA	CAGTAACAACATCAAAGGACCAA
PPIA	referentiegen	GCAAATGCAGGTCCAAATACA	ATGCCTTCAGCAACTTCTCC
GAPDH	referentiegen	GCAAAACATTATTCCGGCTTC	GCACTGGAAGTCTAAAGGCCA
Cys	referentiegen	AACTCCATGGCTAGAACCGAA	CCGTCGGGTAATCCAAGTACA
β -act	referentiegen	AGAACAGCTTCAGCCTCGTCA	TGGAATAGTGCTTCTGGGCAT
RPL13	referentiegen	AGGTGTCCCAGCTCCTTATGA	GGCCCAATTGACAGAATTTTC

6. Proteomics

Er werd een eiwitextractie protocol getest, gebaseerd op de procedure beschreven volgens Fernandez-Taboada ^[35]. Er werden enkele aanpassingen aangebracht in dit protocol. De eiwitprecipitatie stap werd uitgevoerd met trichloorazijnzuur (TCA)/aceton buffer in plaats van enkel aceton. Verder werd de eiwitkwantificatie bepaald met 2D Quant kit van GE healthcare. Uiteindelijk werd ook de invloed van een cysteïne chloride behandeling op de eiwitextractie bestudeerd. Cysteïne chloride werd gebruikt om de slijm laag van *S. mediterranea* te verwijderen.

6.1 Eiwitextractie

Elk staal bevatte 10 wormen. Er werd aan elk staal 1 ml lysisbuffer toegevoegd (40mM TrisHCl, 60 mM DTT en 2% SDS) waarna het staal werd geresuspendeerd voor 10 minuten op 70°C. Hierna werd TCA/aceton buffer (20% TCA en 0,1% DTT in aceton) toegevoegd en werden de stalen overnacht bewaard op -20°C. Het extract werd gecentrifugeerd op 30000 rcf (45 min op 4°C). Hierna werd het supernatans afgenomen en werd het pellet 3x gewassen met aceton. Vervolgens werden de stalen gevriesdroogd voor 30 minuten in de lyofilisator virtis sentry (VWR, Leuven; België). Het eiwitextract werd hierna oplost in 100 μ l labellingbuffer (7M ureum, 2M thiouream, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)

dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) en 30 mM Tris) waarna het gedurende 1 uur op de schudder werd geplaatst (23°C). De pH werd met behulp van NaOH (1 M en 100 mM) aangepast tot 8,5. Ten slotte werd de eiwitconcentratie gekwantificeerd met behulp van de 2D Quant kit van GE healthcare (Fisher scientific, Leuven; België).

Wanneer het effect van cysteine chloride werd bestudeerd, werden wormen voor aanvang van het protocol blootgesteld aan 2% van deze stof opgelost in MilliQ water gedurende 1 minuut waarna ze tweemaal voor 2 minuten werden gewassen in MilliQ.

6.2 1D SDS-PAGE

De 1D SDS-PAGE werd uitgevoerd met een 12% resolving gel (30% acrylamide/Bis; 1,5 M TrisHCl pH 8,8; 0,1 % APS; 0,1% SDS en TEMED) en een 4% stacking gel (30 % acrylamide/Bis; 0,5 M TrisHCl pH 6,6; 0,1% APS, 0,1% SDS en TEMED). Er werd 10 µg staal gescheiden op de gel. Vooraleer de stalen werden gescheiden op de gel, werden de stalen verdund in staalbuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 20% glycerol; 0,01% bromofenol blauw; 4% SDS en 200mM DTT) waarna ze voor 5 minuten werden geïncubeerd op 90°C. The SDS-PAGE gel werd gerund in een mini-PROTEAN tetra cell (Biorad, Nazareth; België) voor 45 minuten op 200V. Na elektroforese werden de eiwitbandjes in de gel gevisualiseerd met een coomassie blauw kleuring (0,1% coomassie R-250; 40% ethanol en 10% azijnzuur), waarna de gels werden ontkleurd met een oplossing van 10% azijnzuur en 40% ethanol in dubbel gedestilleerd water. De afbeeldingen van de gels werden verkregen door de Ettan Dige imager (GE healthcare, Diegem; België) via de Ettan Dige imager software.

7. Statistische analyse

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

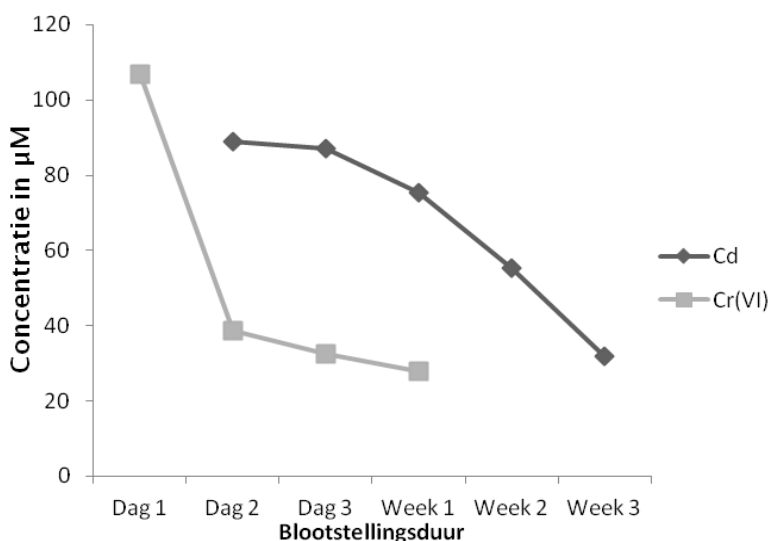
Om de LC50-waarde per tijdstip te berekenen, werd een probitanalyse in SAS uitgevoerd.

III Resultaten

Om de condities voor de proteomics studie bij *Schmidtea mediterranea* blootgesteld aan Cd en Cr(VI) te bepalen, werd de toxiciteit van beide metalen op organismaal niveau nagegaan voor regenererende wormen, opdat ze vergeleken kon worden met de reeds bekende toxiciteit ervan bij intacte organismen. De stamceldynamiek, alsook effecten van blootstelling op transcriptieniveau werden bestudeerd in zowel intacte als regenererende wormen. Op deze manier worden de verschillen tussen het niet-genotoxische metaal Cd en een wel genotoxische element Cr(VI) enerzijds en intacte en regenererende wormen anderzijds bestudeerd.

1. LC50-test

De Cd- en Cr(VI)-toxiciteit van de regenererende wormen werd nagegaan met behulp van een LC50-test waarbij wordt blootgesteld aan 0 – 10 – 15 – 25 – 35 – 45 – 55 – 65 – 75 – 95 μM Cd of 0 – 5 – 10 – 15 – 25 – 35 – 45 – 60 – 75 – 95 μM Cr(VI). Via de LC50 wordt de overleving van *S. mediterranea* blootgesteld aan Cd of Cr(VI) bestudeerd. De LC50-waardes bepalen welke concentraties lethaal zijn voor het organisme.



Figuur 5: De Cd- en Cr(VI)-toxiciteit van regenererende wormen. De overleving van *S.mediterranea* blootgesteld over een periode van 3 weken (controletijdstippen: dag 1, dag 2, dag 3, week 1, week 2 en week 3) aan 0 – 10 – 15 – 25 – 35 – 45 – 55 – 65 – 75 – 95 μM Cd of 0 – 5 – 10 – 15 – 25 – 35 – 45 – 60 – 75 – 95 μM Cr(VI). Iedere conditie bevat 15 regenererende wormen.

De concentraties Cd of Cr(VI) hebben een significant effect op de overleving van *S.mediterranea* (tabel 2). Regenererende wormen zijn gevoeliger voor Cr(VI) in vergelijking met Cd (figuur 5).

Tabel 2. LC50-waardes en betrouwbaarheidsintervallen voor Cd- en Cr(VI)-toxiciteit bij *S. mediterranea*

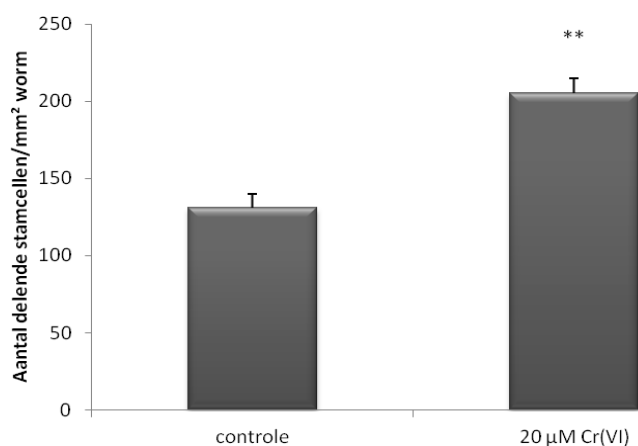
Tijdstip	LC50-waarde Cd	95% B.I.		P-waarde
Dag 1	-	-	-	-
Dag 2	89,1	95,8	112,3	< 0,001
Dag 3	87,1	98,6	127,2	<0,001
Week 1	75,4	82,8	94	< 0,001
Week 2	55,3	59,3	63,5	< 0,001
Week 3	32	36,5	40,7	< 0,001

Tijdstip	LC50-waarde Cr(VI)	95% B.I.		P-waarde
Dag 1	106,7	89,4	152,7	< 0,001
Dag 2	38,7	34,8	43,9	< 0,001
Dag 3	32,4	28,2	37,4	< 0,001
Week 1	27,9	24,5	31,5	< 0,001
Week 2	-	-	-	-
Week 3	-	-	-	-

2. Histon H3 kleuring

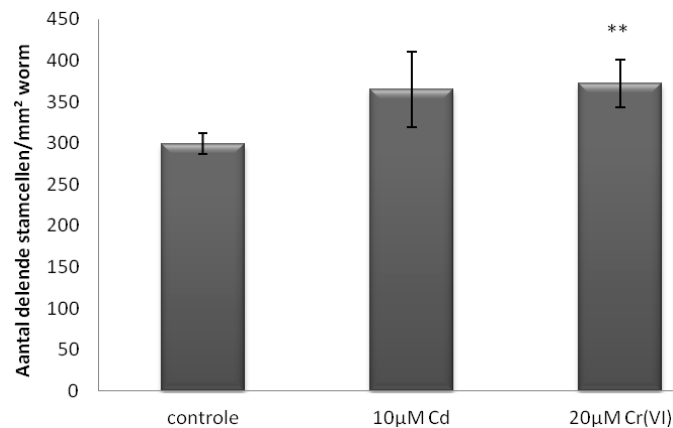
Het effect van Cd en Cr(VI) op de stamcelproliferatie in *S. mediterranea* wordt nagegaan aan de hand van een histon H3 kleuring. Histon H3 is één van de vijf histoneiwitten betrokken in de structuur van chromatine. Fosforylatie ter hoogte van serine 10 van histon H3 is gecorreleerd met de overgang van de G2-fase naar de M-fase. Aangezien de neoblasten de enige delende cellen zijn in *Schmidtea mediterranea*, kan een immunokleuring met anti-fosfo-histon H3 (Ser10) antilichaam gebruikt worden om de stamcelactiviteit te kwantificeren. Tijdens dit experiment werden intacte wormen gedurende 2 weken blootgesteld aan Cr(VI) en regenererende wormen voor 1 week aan Cd en Cr(VI).

Het aantal prolifererende stamcellen per mm² worm stijgt significant in intacte wormen na 2 weken blootstelling aan 20 µM Cr(VI) in vergelijking met de controle (0 µM) (figuur 6).



Figuur 6: Het effect van Cr(VI) op de stamcelproliferatie in intacte individuen van *S. mediterranea*. Het gemiddelde aantal delende stamcellen per mm² wordt weergegeven samen met de standaardfout voor intacte wormen die 2 weken werden blootgesteld aan Cr(VI) (0 – 20 µM). Iedere conditie bevat 4 biologische herhalingen. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip ** p-waarde < 0,05)

Het aantal prolifererende stamcellen per mm^2 worm stijgt significant in regenererende wormen na 1 week blootstelling aan $20 \mu\text{M}$ Cr(VI) in vergelijking met de controle ($0 \mu\text{M}$) (figuur 7).



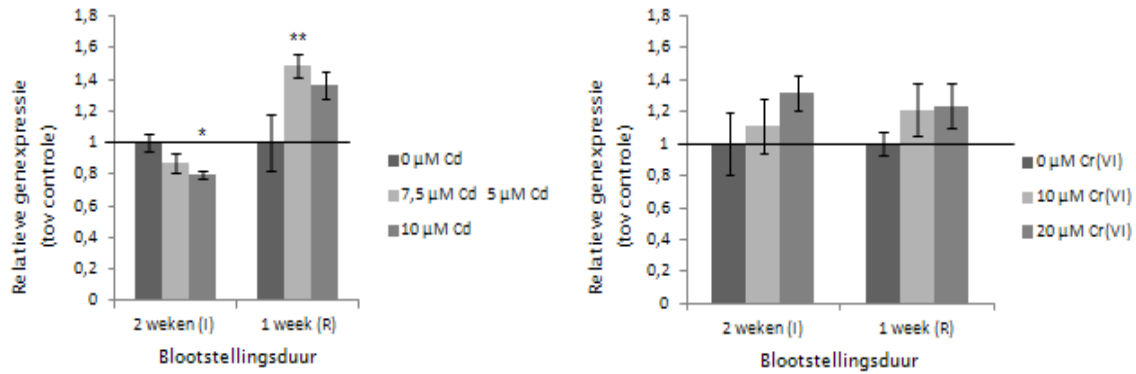
Figuur 7: Het effect van Cd en Cr(VI) op de stamcelproliferatie in regenererende individuen van *S. mediterranea*. Het gemiddelde aantal delende stamcellen per mm^2 wordt weergegeven samen met de standaardfout voor regenererende wormen die 1 week werden blootgesteld aan $20 \mu\text{M}$ Cr(VI) en $10 \mu\text{M}$ Cd. Iedere conditie bevat 6 biologische herhalingen. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip ** p-waarde < 0,05)

3. Genexpressie

Het effect van Cd en Cr(VI) op de expressie van stressgenen, antioxidatieve genen, DNA herstel genen en stamcel specifieke genen werd met behulp van real-time PCR nagegaan bij intacte (I) blootgesteld gedurende 2 weken en regenererende wormen (R) blootgesteld voor 1 week. Aangezien we het mechanismen achter deze stamcelproliferatie trachten uit te diepen, bestuderen we de genexpressieprofielen in condities, waarin een verhoogde celproliferatie werd waargenomen tijdens de histon H3 kleuring.

3.1 CuZnSOD

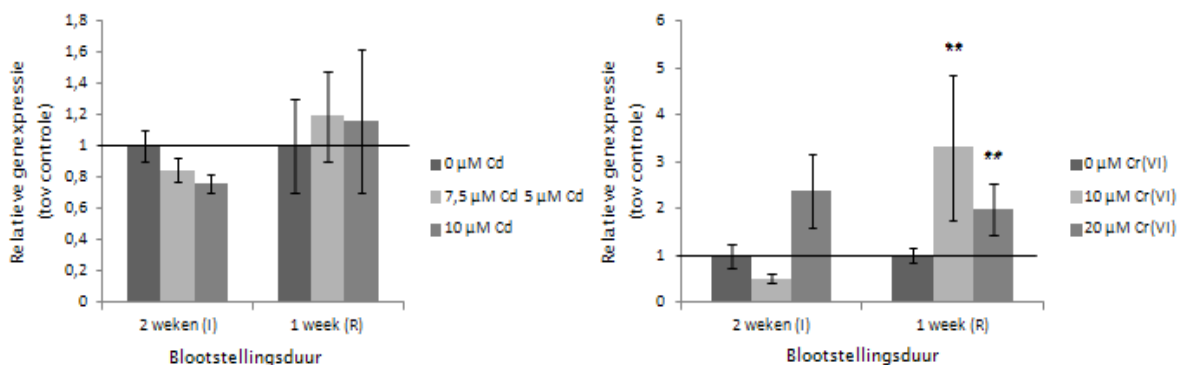
De expressie van CuZnSOD wordt na 2 weken blootstelling aan $10 \mu\text{M}$ Cd bij intacte wormen significant geïnhibeerd in vergelijking met de controle ($0 \mu\text{M}$ Cd) bij hetzelfde tijdstip. Wanneer regenererende wormen gedurende 1 week worden blootgesteld, is een significante stijging van de CuZnSOD expressie waar te nemen bij $5 \mu\text{M}$ Cd in vergelijking met de controle (figuur 8). Na Cr(VI)-blootstelling is er geen verschil op te merken in de expressie van CuZnSOD van intacte en regenererende wormen.



Figuur 8: Invloed van Cd en Cr(VI) op de expressie van CuZnSOD in *S. mediterranea*. De gemiddelde genexpressie van CuZnSOD met standaardfout bij regenererende en intacte wormen, die respectievelijk 1 week en 2 weken werden blootgesteld aan verschillende concentraties Cd (G : 0 – 7,5 – 10 µM ; R: 0 – 5 – 10 µM) of Cr(VI) (G en R : 0 – 10 – 20 µM), werd gemeten met real-time PCR. Elke conditie bevat 6 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven.(Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: $P < 0.1$; **: $P < 0,05$).

3.2 Msh2

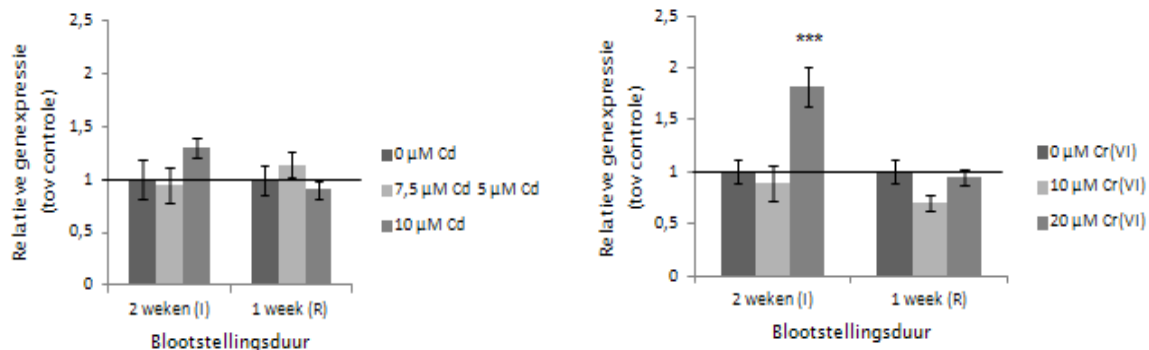
Er is een dalende trend waar te nemen in de expressie van Msh2 na Cd-blootstelling bij intacte wormen (figuur 4). Er werd echter geen significant verschil gevonden tussen de verschillende condities. De expressie van Msh2 wordt significant upgereguleerd na 1 week blootstelling aan 20 µM Cr(VI) bij regenererende wormen in vergelijking met de controle (0 µM Cr(VI)) bij hetzelfde tijdstip (figuur 9).



Figuur 9: Invloed van Cd en Cr(VI) op de expressie van Msh2 in *S. mediterranea*. De gemiddelde genexpressie van Msh2 met standaardfout bij regenererende en intacte wormen, die respectievelijk 1 week en 2 weken werden blootgesteld aan verschillende concentraties Cd (G : 0 – 7,5 – 10 µM ; R: 0 – 5 – 10 µM) of Cr(VI) (G en R : 0 – 10 – 20 µM), werd gemeten met real-time PCR. Elke conditie bevat 6 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven.(Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: $P < 0.1$; **: $P < 0,05$).

3.3 Hsp60

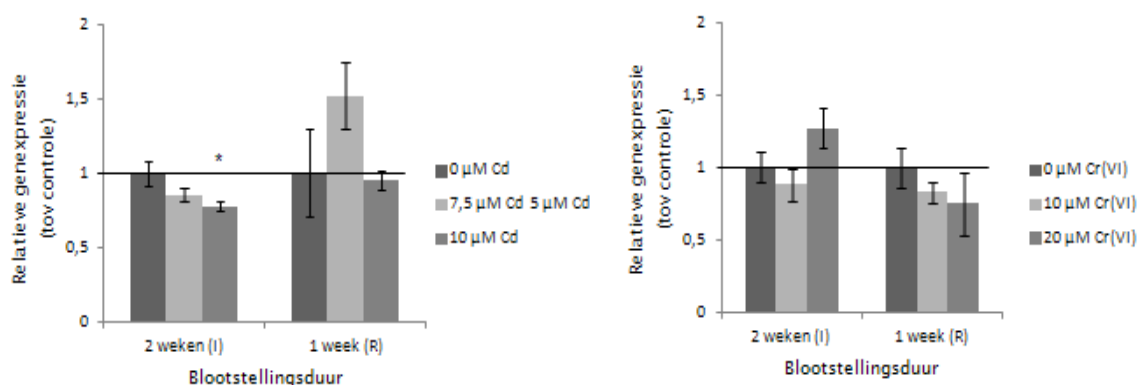
De expressie van Hsp60 stijgt significant na blootstelling aan 20 μM Cr(VI) bij intacte wormen in vergelijking met de controle (0 μM Cr(VI)) (figuur 10).



Figuur 10: Invloed van Cd en Cr(VI) op de expressie van Hsp60 in *S. mediterranea*. De gemiddelde genexpressie van Hsp60 met standaardfout bij regenererende en intacte wormen, die respectievelijk 1 week en 2 weken werden blootgesteld aan verschillende concentraties Cd (G : 0 – 7,5 – 10 μM ; R : 0 – 5 – 10 μM) of Cr(VI) (G en R : 0 – 10 – 20 μM), werd gemeten met real-time PCR. Elke conditie bevat 6 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *** : $P < 0,01$).

3.4 Hsp70

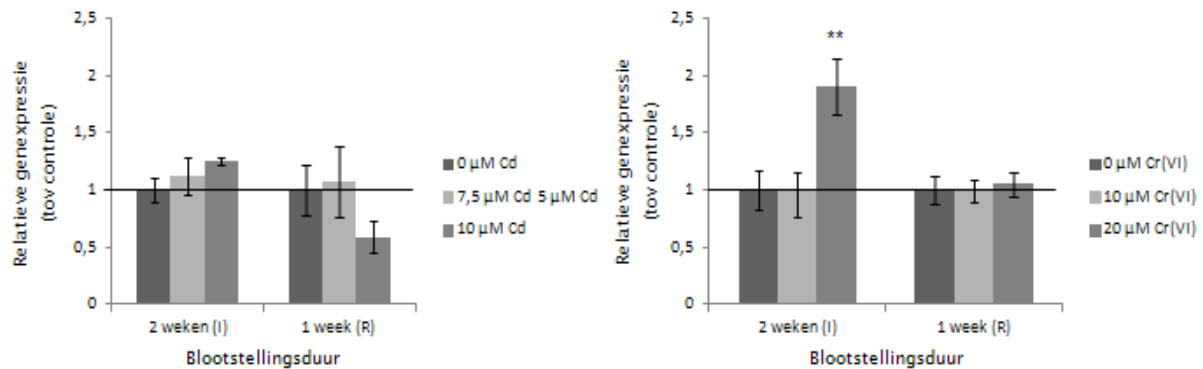
Er is een dalende trend waar te nemen in de expressie van Hsp70 na blootstelling aan Cd in intacte wormen. De expressie van Hsp70 daalt significant na blootstelling aan 10 μM Cd bij intacte wormen in vergelijking met de controle (0 μM Cd) (figuur 11).



Figuur 11: Invloed van Cd en Cr(VI) op de expressie van Hsp70 in *S. mediterranea*. De gemiddelde genexpressie van Hsp70 met standaardfout bij regenererende en intacte wormen, die respectievelijk 1 week en 2 weken werden blootgesteld aan verschillende concentraties Cd (G : 0 – 7,5 – 10 μM ; R : 0 – 5 – 10 μM) of Cr(VI) (G en R : 0 – 10 – 20 μM), werd gemeten met real-time PCR. Elke conditie bevat 6 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: * : $P < 0,1$; ** : $P < 0,05$).

3.5 PCNA

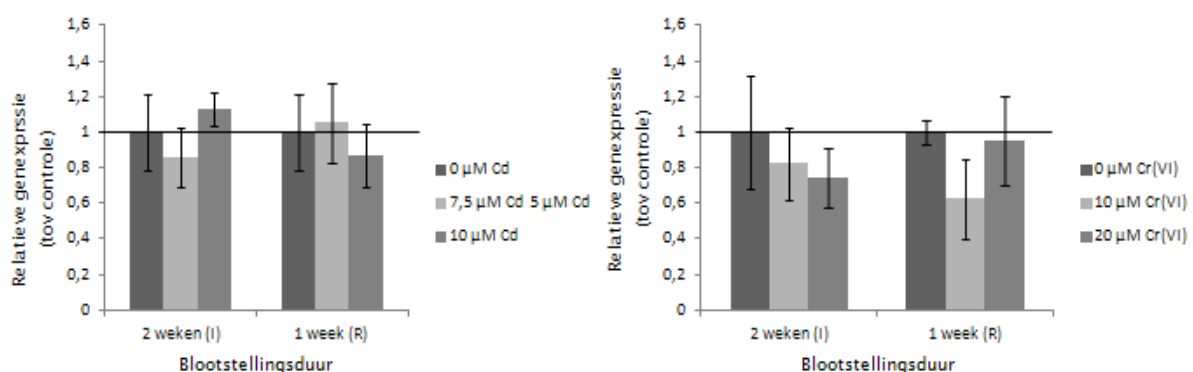
Er is een stijgende trend waar te nemen in de expressie van PCNA na blootstelling aan Cd in intacte wormen. Er werd echter geen significant verschil gevonden tussen de verschillende condities. De expressie van PCNA stijgt significant na blootstelling aan 20 μM Cr(VI) bij intacte wormen in vergelijking met de controle (0 μM Cr(VI)) (figuur 12).



Figuur 12: Invloed van Cd en Cr(VI) op de expressie van PCNA in *S. mediterranea*. De gemiddelde genexpressie van PCNA met standaardfout bij regenererende en intacte wormen, die respectievelijk 1 week en 2 weken werden blootgesteld aan verschillende concentraties Cd (G : 0 – 7,5 – 10 μM ; R : 0 – 5 – 10 μM) of Cr(VI) (G en R : 0 – 10 – 20 μM), werd gemeten met real-time PCR. Elke conditie bevat 6 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: $P < 0.1$; **: $P < 0,05$).

3.6 MCM2

Er werd geen significant verschil gevonden in de expressie van MCM2 tussen de verschillende condities voor intacte en regenererende wormen blootgesteld aan Cd en Cr(VI) (figuur 13).

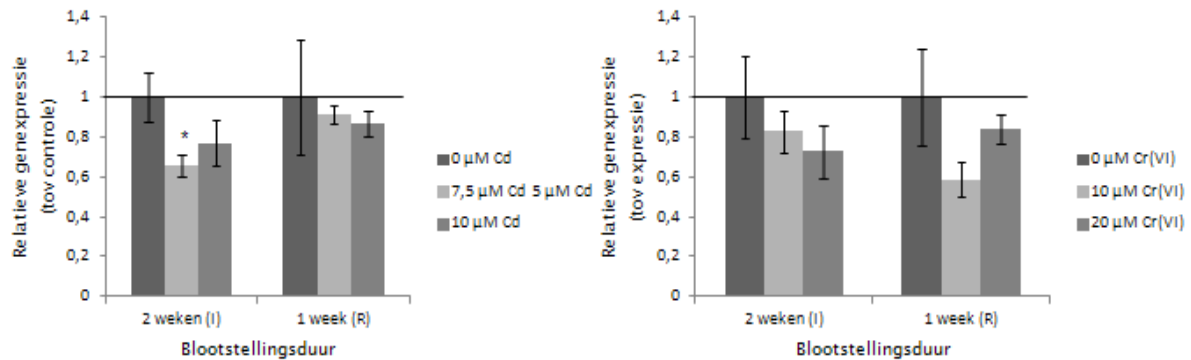


Figuur 13: Invloed van Cd en Cr(VI) op de expressie van MCM2 in *S. mediterranea*. De gemiddelde genexpressie van MCM2 met standaardfout bij regenererende en intacte wormen, die respectievelijk 1 week en 2 weken werden blootgesteld aan verschillende concentraties Cd (G : 0 – 7,5 – 10 μM ; R : 0 – 5 – 10 μM) of Cr(VI) (G en R : 0 – 10 – 20 μM), werd gemeten met real-time PCR. Elke conditie bevat 6 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten

opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: $P < 0.1$; **: $P < 0,05$).

3.7 Smedinx-11

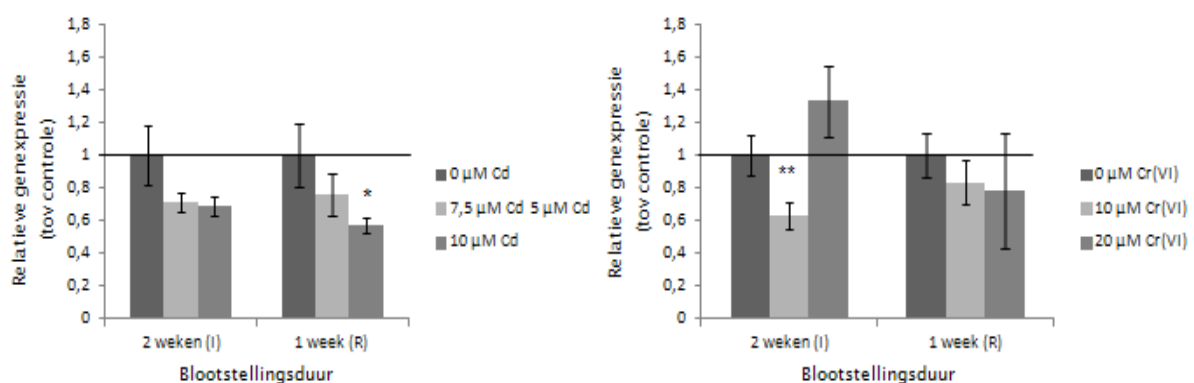
De expressie van smedinx-11 daalt significant na blootstelling aan 7,5 μM Cd bij intacte wormen in vergelijking met de controle (0 μM Cd) (figuur 14).



Figuur 14: Invloed van Cd en Cr(VI) op de expressie van smedinx-11 in *S. mediterranea*. De gemiddelde genexpressie van smedinx met standaardfout bij regenererende en intacte wormen, die respectievelijk 1 week en 2 weken werden blootgesteld aan verschillende concentraties Cd (G: 0 – 7,5 – 10 μM ; R: 0 – 5 – 10 μM) of Cr(VI) (G en R: 0 – 10 – 20 μM), werd gemeten met real-time PCR. Elke conditie bevat 6 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie = 1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: * $P < 0,1$; ** : $P < 0,05$).

3.8 Smedwi-2

De expressie van smedwi-2 daalt significant na blootstelling aan 10 μM Cd bij regenererende wormen in vergelijking met de controle (0 μM Cd) (figuur 9). Ook na blootstelling aan 10 μM Cr(VI) bij intacte wormen daalt de expressie van smedwi-2 significant (figuur 15).



Figuur 15: Invloed van Cd en Cr(VI) op de expressie van smedwi-2 in *S. mediterranea*. De gemiddelde genexpressie van smedwi-2 met standaardfout bij regenererende en intacte wormen, die respectievelijk 1 week en 2 weken werden

blootgesteld aan verschillende concentraties Cd (G : 0 – 7,5 – 10 μ M ; R: 0 – 5 – 10 μ M) of Cr(VI) (G en R : 0 – 10 – 20 μ M), werd gemeten met real-time PCR. Elke conditie bevat 6 biologische herhalingen. De genexpressie wordt relatief ten opzichte van de controle (genexpressie=1) weergegeven. (Significantieniveau tov de controle per tijdstip: *: $P < 0.1$; **: $P < 0,05$).

4. Proteomics

Schmidtea mediterranea wordt omringd door een mucuslaag waarin zich eiwitten bevinden. Voor de open proteoomscreening zijn we echter niet geïnteresseerd in de proteïnen van de slijm laag omdat deze eiwitten de resultaten kunnen verstoren. Deze mucuslaag kan worden verwijderd met cysteïne chloride ^[35, 36]. In deze thesis werd het effect van cysteïne chloride op het eiwitpatroon van *S. mediterranea* onderzocht met behulp van een 1D SDS-PAGE. Vooraleer we het effect van cysteïne chloride konden bestuderen, moest eerst een eiwitextractie protocol worden uitgetest. De uitgevoerde extractiemethode werd gebaseerd op het protocol beschreven volgens Fernandez-Taboada. In dit protocol werden enkele kleine wijzigingen aangebracht.

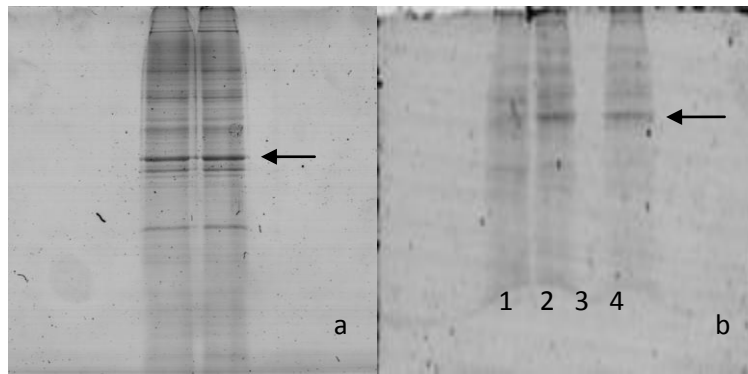
In eerste instantie werd er een test experiment uitgevoerd waarbij het protocol werd uitgevoerd op twee stalen uit de kweek. Vervolgens werd een experiment uitgevoerd waarbij er getracht werd de mucuslaag van *S. mediterranea* te verwijderen door behandeling met cysteïne chloride, en het resultaat te vergelijken met het resultaat van onbehandelde individuen. Voor elke conditie werden er 2 stalen vergeleken. Een van de met cysteïne chloride behandelde stalen is verloren gegaan.

4.1 Eiwitextractie

Het geteste protocol is terug te vinden in sectie II. Materiaal en methoden. Na extractie hebben de controle stalen van respectievelijk het test experiment en cysteïne chloride experiment een concentratie van 3,72 μ g/ μ l - 2,57 μ g/ μ l en 3,61 μ g/ μ l - 3,08 μ g/ μ l. Na behandeling met cysteïne chloride is de eiwitconcentratie gedaald tot 1,26 μ g/ μ l.

4.2 1D SDS-PAGE

Na het runnen van de gel van het test experiment zijn er twee exacte patronen van eiwitbanden waar te nemen (figuur 16a). De eiwitpatronen tussen het cysteïne chloride behandelde staal (laan 1) en de controle stalen (laan 2 en 4) zijn verschillend (figuur 16b).



Figuur 16: 1D SDS-PAGE gel. (a) Eiwitpatroon van twee teststalen uit de kweek. **(b)** Laan 1 bevat een cysteïne chloride behandeld staal en lanen 2 en 4 bevatten controle stalen. Laan 3 werd niet geladen. Er wordt een verschil waargenomen tussen de wel en niet behandelde stalen.

IV Discussie

Schmidtea mediterranea bezit een enorme en zeer toegankelijke populatie totipotente stamcellen waardoor het een zeer geschikt testorganisme is voor stamcelonderzoek en alsook onderzoek naar carcinogene processen. Voorafgaand onderzoek binnen de onderzoeksgroep 'Dierkunde: Biodiversiteit en toxicologie' heeft aangetoond dat blootstelling aan carcinogene elementen zoals Cd en Cr(VI) leidt tot een verhoogde stamcelproliferatie. Aangezien (ongecontroleerde) celproliferatie een kenmerk is van kanker, kan deze Cd- en Cr(VI)-geïnduceerde stamcelproliferatie mogelijk gelinkt zijn aan carcinogene processen. Deze proliferatie kan ook een verdediging om het verloren weefsel te herstellen. Om de onderliggende mechanismen hiervan te kunnen achterhalen, zal er in de toekomst een open proteoomscreening uitgevoerd worden. Als voorbereiding op deze screening werden de condities bepaald gebaseerd op verschillen tussen beide metalen en verschillen tussen intacte en regenererende wormen. Hiervoor werd de toxiciteit van beide metalen op regenererende individuen onderzocht. De stamceldynamiek, alsook effecten van blootstelling op transcriptieniveau werden bestudeerd in zowel intacte als regenererende wormen.

Om de toxiciteit van Cd en Cr(VI) na te gaan bij regenererende wormen werd er een LC50-test uitgevoerd.

Vervolgens werd de invloed van beide metalen op de stamcelproliferatie via een mitosekleuring nagegaan zowel bij intacte als regenererende wormen. Verder werden ook de genexpressieprofielen voor enkele stamcel specifieke genen en herstel gerelateerde genen bestudeerd bij deze twee verschillende groepen van wormen blootgesteld aan verschillende concentraties Cd of Cr(VI). Aan de hand van deze resultaten kunnen er eerste inzichten verkregen worden inzake herstel vs. schade (kanker) en Cd vs. Cr(VI).

Ten slotte werd ook de eiwitextractie van volledige wormen uitgetest en werd op het eiwitpatroon van *S. mediterranea* mét en zonder mucuslaag bestudeerd.

1. LC50-test

Uit de LC50-waardes blijkt dat de overleving bij regenererende wormen groter is bij blootstelling aan Cd dan aan Cr(VI) (figuur 5 en tabel 2). Dit resultaat komt overeen met de toxiciteit van Cr(VI) en Cd bij intacte wormen, onderzocht in voorafgaand onderzoek binnen de onderzoeksgroep, waar ook de intacte wormen gevoeliger zijn voor Cr(VI) dan voor Cd. Wanneer de LC50-waardes vergeleken worden tussen deze twee groepen (intacte vs. regenererende wormen) blijkt dat blootstelling aan Cr(VI) duidelijk een sterker toxisch effect heeft op regenererende wormen dan op intacte wormen

(tabel 3). Dit kan verklaard worden doordat organismen in ontwikkeling gevoeliger zijn omdat ze nog veel cellen en weefsels moeten aanmaken. Onder Cd-stress daarentegen lijkt het regeneratieproces niet versoord te zijn. Na één week blootstelling ligt de LC50-waarde voor regeneratiewormen zelfs iets hoger dan voor intacte wormen en blijken deze wormen beter bestand tegen Cd-stress. Regenererende wormen bevinden zich in een ontwikkelingsstadium waardoor verwacht wordt dat ze net gevoeliger zijn voor Cd in vergelijking met intacte wormen. In de literatuur staat ook beschreven dat prenatale blootstelling aan Cd een invloed kan hebben op de ontwikkeling van de hersenen in ratten ^[29]. Pérez-Coll toonde ook aan dat Cd een negatief effect op de ontwikkeling van amfibieën ^[37].

Tabel 3: LC 50-waardes voor Cd en Cr(VI) bij intacte individuen van *Schmidtea mediterranea*

Tijdstip	LC50-waarde Cd	95% B.I.		P-waarde		LC50-waarde Cr(VI)	95% B.I.		P-waarde
Dag 1	-	-	-	-		-	-	-	-
Dag 2	94.91	86.3	112.32	< 0,001		99.311	85.621	127.65	< 0,001
Dag 3	83.96	76.16	92.12	< 0,001		53.014	45.661	60.477	< 0,001
Week 1	60.01	53.68	67.14	< 0,001		23.522	15.625	43.792	< 0,001
Week 2	39.58	35.21	44.83	< 0,001		19.0975	16.6623	22.0913	< 0,001
Week 3	-	-	-	-		19.0975	16.6623	22.0913	< 0,001

Hieruit kan besloten worden dat regenererende individuen anders reageren dan intacte individuen na blootstelling aan deze carcinogene elementen. Bovendien kunnen we besluiten dat intacte individuen een duidelijk voordeel hebben ten opzichte van regenererende individuen tijdens blootstelling aan Cr(VI), waar dit bij blootstelling aan Cd na één week eerder omgekeerd lijkt te zijn. Cr(VI) kan sneller DNA-schade induceren en aangezien regenererende wormen nog in een ontwikkelingsstadium zitten, kan dit voor deze organismen nefast zijn.

2. Histon H3 kleuring

Het bestuderen van de stamceldynamiek toonde aan dat intacte en regenererende wormen een verhoogde celdeling vertonen na blootstelling aan Cd en Cr(VI) (figuur 6 en 7). Dit bevestigt de resultaten uit voorgaande studies binnen de onderzoeksgroep 'Dierkunde: Biodiversiteit en Toxicologie' (figuur 3).

Het is mogelijk dat Cd en Cr(VI) de balans tussen proliferatie en apoptose verstoren en op deze manier eventueel (ongecontroleerde) celdeling in de hand kunnen werken ^[20]. Of er hier sprake is van ongecontroleerde celgroei en of deze celgroei eventueel tot kanker zou kunnen leiden, moet

verder onderzoek op een ander niveau uitwijzen. In de literatuur staat beschreven dat blootstelling aan verscheidene carcinogene elementen zoals onder andere 3,4-benzpyreen tumoren kunnen induceren bij planaria ^[16, 38]. In Hall et al. 1986 werd een tumor beschreven in de planaria *Dugesia dorotocephala* na blootstelling aan Cd ^[7]. Doch, er konden tot op heden op fenotypisch niveau nog geen tumoren waargenomen worden bij *Schmidtea mediterranea*, en het is dus nog niet geweten of (enkelvoudige) blootstelling aan Cd en Cr(VI) effectief tot de ontwikkeling van een tumor kan leiden.

Een tweede mogelijke verklaring voor de geïnduceerde stamcelproliferatie kan gezocht worden in de mate van apoptose aanwezig onder Cd- en Cr(VI)-stress. Aangezien beide metalen een cel tot apoptose kunnen aanzetten, is het mogelijk dat blootstelling aan deze metalen een stijging in apoptose veroorzaakt bij *Schmidtea mediterranea* ^[20]. De toename in het aantal prolifererende cellen zou dan te verklaren zijn aan het feit dat het organisme op deze manier het celverlies probeert te compenseren. De stijging in de stamcelproliferatie zou dan gezien kunnen worden als een herstelmechanisme van *S. mediterranea*. Deze grote plasticiteit kan verantwoordelijk zijn voor het feit dat Cd-blootstelling op ultrastructureel niveau geen schade lijkt te veroorzaken ^[31]. Het is dus niet duidelijk of er hier sprake is van (ongecontroleerde) celdeling of van een herstelmechanisme als gevolg van verhoogde apoptose. Daarom kan het interessant zijn om in de toekomst specifiek apoptose te bestuderen en om uitgebreidere experimenten uit te voeren op gen- en proteoomniveau.

Wanneer de groepen van intacte en regenererende wormen met elkaar vergeleken worden, blijkt dat er bij regenererende wormen reeds na 1 week een stijging is te zien waar deze stijging pas na twee weken wordt waargenomen bij intacte organismen. Wormen zijn dus gevoeliger tijdens regeneratie. Het patroon van verhoogde stamcelactiviteit kan bij regeneratiewormen dus vervroegd geïnduceerd worden. Het herstel- of schademechanisme is dus sneller zichtbaar in regenererende wormen.

3. Genexpressie

Om een beter inzicht te krijgen welk mechanisme (herstel of schade) deze Cd- en Cr(VI)-geïnduceerde stamcelproliferatie opwekt, worden de verschillen tussen beide metalen en tussen regenererende en intacte wormen op transcriptieniveau bestudeerd. Op deze manier werd getracht de condities voor de open proteoomscreening te bepalen.

Genen werden geselecteerd in functie van stress en stamceldynamiek. De herstel genen werden gekozen op basis van de literatuur, met name CuZnSOD, Msh2, Hsp60 en Hsp 70.

CuZnSOD is een antioxidatief enzym dat zorgt voor het elimineren van superoxide. Msh2 is een proteïne van MMR systeem en vormt samen met Msh6 het MutS complex, dat verantwoordelijk is voor het herkennen van DNA-schade en voor het starten van DNA herstel. Inactivatie van MMR eiwitten heeft verschillende consequenties zoals het induceren van genoom instabiliteit ^[39]. De 'heat shock' proteïnen (Hsps) zijn stress respons eiwitten. Hsps kunnen functioneren als cellulaire chaperonen, vergemakkelijken eiwitvouwing, voorkomen van eiwitaggregatie en helpen bij de proteolytische afbraak van verkeerd gevouwen eiwitten. In respons op cellulaire stress zoals oxidatieve schade en chemische stressoren verhoogt de expressie van Hsps. De inductie Hsps wordt beschouwd als een respons, die cellen in staat stelt om te overleven in stress condities ^[24, 40].

De expressie van CuZnSOD daalt significant bij intacte wormen na Cd-blootstelling terwijl ze bij regenererende wormen significant stijgt. Intacte wormen vertonen hier een specifieke Cd respons. Regenererende organismen daarentegen vertonen een omgekeerde respons. Dit kan een verdedigingsmechanisme zijn waarmee regenererende organismen zich kunnen beschermen tegen de oxidatieve stress geïnduceerd door Cd-blootstelling. Wormen reageren dus anders wanneer ze gedurende hun regeneratie Cd-stress ondervinden, dan wanneer ze Cd-stress ervaren als volledig geregenereerd organisme.

Ook in de expressie van Msh2 na Cr(VI)-blootstelling is er een verschillende respons waar te nemen wanneer intacte en regenererende wormen worden vergeleken. Bij regenererende individuen lijkt de verhoogde genexpressie op een verdedigingsmechanisme te duiden. Cr(VI)-blootstelling leidt tot schade aan het DNA zoals DNA breuken en crosslinks waardoor herstel nodig is. Dit kan ook waargenomen worden in de LC50 resultaten, waar de regenererende groep minder goed bestand is tegen de blootstelling aan Cr(VI).

Na Cd-blootstelling is er een dalende trend waar te nemen bij intacte wormen.

Blootstelling gedurende 2 weken aan 20 μ M Cr(VI) verhoogt de expressie van Hsp60 significant bij intacte organismen terwijl bij regenererende wormen een dalende respons is waar te nemen. Dus ook voor Hsp60 is het omgekeerde op te merken tussen de verschillende groepen.

Na Cd-blootstelling is er voor de Hsp70 expressie een significant daling op te merken bij intacte individuen. Hsp70 staat gekend voor opwekken van vroege stressrespons ^[31]. Dergelijke significante daling bij intacte wormen werd ook gezien bij Plusquin et al. 2012.

Ook werden er 4 stamcelspecifieke genen gemeten namelijk PCNA, MCM2, Smedinx-11 en Smedwi-2. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is essentieel voor DNA replicatie en is betrokken in DNA

herstel ^[41]. Smedinx-11 is een innexine gap junction kanaal gen, dat tot expressie komt in de neoblasten van *Schmidtea mediterranea*. Het is een gen dat de somatische stamcellen reguleert tijdens weefselregeneratie, homeostase en neoblast handhaving ^[42]. Smedwi-2 komt tot expressie in de stamcellen van *Schmidtea mediterranea*. Smedwi-2 is in de eerste plaats niet nodig voor neoblast handhaving maar eerder voor de productie van neoblast voorloper cellen om gedifferentieerde cellen te vervangen tijdens homeostase of regeneratie ^[43, 44].

De genexpressie levels van deze stamcel specifieke genen vertonen over het algemeen geen verschillen tussen intacte en regenererende wormen in tegenstelling tot wat er verwacht wordt, aangezien bij de herstel genen wel omgekeerde responsen werden waargenomen.

Intacte wormen vertonen na 2 weken blootstelling aan 20 μ M Cr(VI) een significante stijging in de expressie van PCNA. Dit verwachten we ook aangezien PCNA een gen is dat betrokken is DNA replicatie.

Bij smedinx-11 en smedwi-2 daarentegen is zowel in intacte als in regenererende wormen een dalende genexpressie waar te nemen. Smedinx-11 is zoals eerder vermeld betrokken bij regeneratie en homeostase en verzorgt de communicatie tussen de neoblasten. Een dalende expressie van dit gen kan een teken zijn dat de regeneratie en homeostase verstoord is en er een verminderde communicatie is tussen de neoblasten. Een dalende expressie in Smedwi-2 kan te wijten zijn aan een daling in de productie van neoblast voorloper cellen.

Om dit mechanisme te ontrafelen en besluiten te kunnen trekken, is het noodzakelijk om op een breder vlak te gaan screenen en deze resultaten proberen te linken met celproliferatie en apoptose.

4. Proteomics

Dit deel is enkel technisch aangezien deze techniek nog uitgetest diende te worden. Ons protocol bleek een goede eiwitopbrengst op te leveren en ook de 1D SDS-PAGE gel gaf duidelijk te onderscheiden bandjes. In het eiwitpatroon is duidelijk te zien dat een eiwit dominant aanwezig in *S. mediterranea* (figuur 17a). Dit proteïne kan zich bevinden in de slijm laag van *S. mediterranea* maar voor de open proteoomscreening zijn we niet geïnteresseerd in deze eiwitten, aangezien deze eiwitten de resultaten kunnen verstoren. Daarom werd er een manier gezocht om deze slijm laag te verwijderen. Verschillende artikelen beschrijven het verwijderen van de mucus laag door middel van cysteïne chloride ^[35, 36] daarom behandelden wij de wormen gedurende 1 minuut met 2% cysteïne chloride waarna ze tweemaal twee minuten werden gewassen met MilliQ.

Er is een verschil waar te nemen tussen de wel en niet met cysteïne chloride behandelde stalen (figuur 17b). Het eiwit, wat dominant aanwezig is bij de niet behandelde stalen, is minder aanwezig bij de behandelde stalen waaruit zou kunnen besloten worden dat het hier gaat om een eiwit van de mucuslaag. Er moet echter in rekening gebracht worden dat tijdens de wasstappen de wormen begonnen te degraderen, waardoor we niet zeker kunnen zijn dat het effectief om een eiwit van de mucuslaag gaat.

Bijkomende experimenten zijn nodig om de behandeling met cysteïne chloride te optimaliseren zodat er geen degradatie van de wormen zal plaatsvinden. Een mogelijkheid is om de pH van de cysteïne chloride oplossing aan te passen tot 4 of de concentratie te verlagen ^[36]. Verder kan het zinvol zijn om het aantal en de duur van de wasstappen te veranderen. Tot slot werd in een verscheidene artikels gebruik gemaakt van 5% N-acetyl cysteine (NAC) opgelost in PBST om de mucuslaag van *S. mediterranea* te verwijderen ^[45]. We kunnen in de toekomst eventueel ook NAC testen in de proteomics experimenten.

V Conclusie

In deze thesis werd de toxiciteit en de stamceldynamiek, alsook de genexpressie van stamcelspecifieke en herstel genen in *S. mediterranea* bestudeerd na zowel Cd- als Cr(VI)-blootstelling, waarbij er een onderscheid werd gemaakt tussen intacte en regenererende wormen. Op deze manier werd getracht de functie van de stress-geïnduceerde stamcelproliferatie te achterhalen en hierbij na te gaan of er sprake is van schade dan wel herstel.

Op cellulair niveau vertonen beide groepen (intacte vs. regenererende wormen) een gelijkaardige respons. Doch, waar de stamcelproliferatie bij intacte individuen van *S. mediterranea* pas significant stijgt na 2 weken blootstelling, wordt deze stijging bij regenererende individuen reeds na 1 week waargenomen.

Op moleculair niveau zijn er anderzijds duidelijk verschillende responsen waar te nemen tussen de beide groepen (I vs G). Voor beide groepen werden de genexpressieprofielen bestudeerd in een situatie van celproliferatie. Voornamelijk wat betreft de herstel genen (CuZnSOD, Msh2, Hsp70 en Hsp60) vertonen intacte wormen een verschillende, tot zelfs een tegengestelde respons, vergeleken met regenererende organismen na blootstelling aan carcinogene metalen. Hoewel in beide gevallen een metaal geïnduceerde stamcelproliferatie wordt waargenomen, lijken de onderliggende mechanismen voor intacte en regenererende organismen verschillend te zijn.

Deze responsen op transcriptieniveau blijken enigszins overeen te komen met de responsen op organismaal niveau, waar de overleving bij regenererende en intacte wormen ook verschillend is.

Een bredere screening, zoals een proteoomscreening, is noodzakelijk om beter in kaart te brengen welk mechanisme (schade vs. herstel) betrokken is in deze celproliferatie, alsook om het effect van deze een al dan niet genotoxische metalen op grotere schaal te onderzoeken. Wanneer men de verschillen tussen Cd en Cr(VI) verder wil uitdiepen in deze set-up, lijkt het het meest interessant om met intacte wormen verder te gaan voor de proteoomscreening. Intacte organismen vertonen in de expressie van CuZnSOD, in tegenstelling tot de regenererende organismen, na Cd-blootstelling een typische Cd-respons. Bovendien worden er zowel bij de heat shock proteïnes, alsook bij de stamcel specifieke genen Smedwi-2 en Smedinx-11 voornamelijk bij de intacte wormen significante effecten waargenomen na blootstelling aan Cd of Cr(VI).

Referenties

1. Reddien, P.W. and A. Sanchez Alvarado, *Fundamentals of planarian regeneration*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 725-57.
2. Newmark, P.A. and A. Sanchez Alvarado, *Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(3): p. 210-9.
3. Kiefer, J.C., *Emerging developmental model systems*. Dev Dyn, 2006. **235**(10): p. 2895-9.
4. Salo, E., *The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes)*. Bioessays, 2006. **28**(5): p. 546-59.
5. Sánchez Alvarado A., R.P., Newmark PA. and Nusbaum C, *Proposal for the Sequencing of a New Target Genome: White Paper for a Planarian Genome Project*. The Schmidtean Mediterranean sequencing consortium., 2008: p. 1-13.
6. Sanchez-Alvarado, A., *Planarian regeneration: Its end is its beginning*. Cell, 2006. **124**(2): p. 241-245.
7. Hall, F., M. Morita, and J.B. Best, *Neoplastic transformation in the planarian: II. Ultrastructure of malignant reticuloma*. J Exp Zool, 1986. **240**(2): p. 229-44.
8. Hall, F., M. Morita, and J.B. Best, *Neoplastic transformation in the planarian: I. Cocarcinogenesis and histopathology*. J Exp Zool, 1986. **240**(2): p. 211-27.
9. Oviedo, N.J. and W.S. Beane, *Regeneration: The origin of cancer or a possible cure?* Semin Cell Dev Biol, 2009. **20**(5): p. 557-64.
10. Wenemoser, D. and P.W. Reddien, *Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence*. Dev Biol, 2010. **344**(2): p. 979-91.
11. Baguna, J., *The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes*. Int J Dev Biol, 2012. **56**(1-2-3): p. 19-37.
12. Ladurner, P., R. Rieger, and J. Baguna, *Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth macrostomum sp.: a bromodeoxyuridine analysis*. Dev Biol, 2000. **226**(2): p. 231-41.
13. Ermakov, A.M., et al., *Study of planarian stem cell proliferation by means of flow cytometry*. Mol Biol Rep, 2012. **39**(3): p. 3073-80.
14. Hayashi, T., et al., *Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting*. Dev Growth Differ, 2006. **48**(6): p. 371-80.
15. Egger, B., et al., *The regeneration capacity of the flatworm Macrostomum lignano--on repeated regeneration, rejuvenation, and the minimal size needed for regeneration*. Dev Genes Evol, 2006. **216**(10): p. 565-77.
16. Foster, J.A., *Induction of neoplasms in planarians with carcinogens*. Cancer Res, 1963. **23**: p. 300-3.
17. M., V.S., *Indicator rapport*. MIRA: Milieuraapport Vlaanderen, 2011.
18. Maes J., B.J., Provoost J., Den Hond E., Van Volsem S., Theuns I., De Cooman W., Claeys N., Dumolin J., Eppinger R., Frohnhoffs A., D'hont D., Goemans G., Belpaire C., Lettens S., De Vos B., Van Den Bulck S., Ceenaeme J., Dedeker D., De Naeyer F., Dries V.,

- Gommeren E., Van Dijck W., Van Dyck E., D'Havé H., De Coen W., Peeters B., *Verspreiding van zware metalen*. Milieurapport Vlaanderen MIRA, 2007: p. 1-117.
19. Hill, M.K., *Understanding environmental pollution*. Cambridge University Press, 2004: p. 1-34.
 20. Beyersmann, D., *Effects of carcinogenic metals on gene expression*. Toxicol Lett, 2002. **127**(1-3): p. 63-8.
 21. Joseph, P., *Mechanisms of cadmium carcinogenesis*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **238**(3): p. 272-9.
 22. Waalkes, M.P., *Cadmium carcinogenesis in review*. J Inorg Biochem, 2000. **79**(1-4): p. 241-4.
 23. Bertin, G. and D. Averbeck, *Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review)*. Biochimie, 2006. **88**(11): p. 1549-59.
 24. Waisberg, M., et al., *Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis*. Toxicology, 2003. **192**(2-3): p. 95-117.
 25. Barceloux, D.G., *Chromium*. J Toxicol Clin Toxicol, 1999. **37**(2): p. 173-94.
 26. Guertin J., J.J.A., Avakian C.P., *Chromium (VI) handbook*. CRC Press, 2004.
 27. Vincent, J.B., *The biochemistry of chromium*. J Nutr, 2000. **130**(4): p. 715-8.
 28. *Toxicological profile chromium*.
 29. B., S., *Heavy metals in the environment*. Marcel Dekker, Inc., 2002: p. 1-743.
 30. Macfie, A., E. Hagan, and A. Zhitkovich, *Mechanism of DNA-protein cross-linking by chromium*. Chem Res Toxicol, 2010. **23**(2): p. 341-7.
 31. Plusquin, M., et al., *Physiological and molecular characterisation of cadmium stress in *Schmidtea mediterranea**. Int J Dev Biol, 2012. **56**(1-3): p. 183-91.
 32. A., G., *2-D Electrophoresis Principles and Methods*. GE Healthcare, 2004.
 33. Minden, J.S., et al., *Difference gel electrophoresis*. Electrophoresis, 2009. **30 Suppl 1**: p. S156-61.
 34. Nair, K.S., et al., *Proteomic research: potential opportunities for clinical and physiological investigators*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(6): p. E863-74.
 35. Fernandez-Taboada, E., et al., *A proteomics approach to decipher the molecular nature of planarian stem cells*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 133.
 36. Bayascas, J.R., et al., *Planarian Hox genes: novel patterns of expression during regeneration*. Development, 1997. **124**(1): p. 141-8.
 37. Perez-Coll, C.S., J. Herkovits, and A. Salibian, *[Effects of cadmium on the development of an amphibian]*. Arch Biol Med Exp (Santiago), 1985. **18**(1): p. 33-9.
 38. DJ., S., *Planarians as a model system for in vivo teratogenesis studies*. Qual Assur, 1993. **2**: p. 265-318.
 39. GM., L., *Mechanisms and functions of DNA mismatch repair*. cell research, 2008. **18**: p. 85-98.
 40. Kalmar, B. and L. Greensmith, *Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(4): p. 310-8.

41. Kelman, Z., *PCNA: structure, functions and interactions*. Oncogene, 1997. **14**(6): p. 629-40.
42. Oviedo, N.J. and M. Levin, *smedinx-11 is a planarian stem cell gap junction gene required for regeneration and homeostasis*. Development, 2007. **134**(17): p. 3121-31.
43. Reddien, P.W., et al., *SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells*. Science, 2005. **310**(5752): p. 1327-30.
44. Rossi, L., et al., *Planarians, a tale of stem cells*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(1): p. 16-23.
45. Pearson, B.J., et al., *Formaldehyde-based whole-mount in situ hybridization method for planarians*. Dev Dyn, 2009. **238**(2): p. 443-50.

Auteursrechtelijke overeenkomst

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

Stamceldynamiek na blootstelling aan cadmium en hexavalent chroom in Schmidtea mediterranea: regenererende vs. intacte wormen

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

Jaar: **2012**

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,

Deluyker, Dorien

Datum: **11/06/2012**