

SAMENVATTING

Van microtubuli-inhibitoren is geweten dat ze de celcyclus kunnen blokkeren in de M-fase door schade aan de mitotische spoelfiguur. Toch kunnen cellen ontsnappen aan deze effecten en aneuploid, polyploid worden en/of micronuclei bevatten. Aneuploidie vormt een gekend risico voor de gezondheid van de mens, het speelt onder meer een rol bij miskramen en de ontwikkeling van tumoren (Duesberg and Rasnick, 2000). Microtubuli-inhibitoren worden in hoge concentraties gebruikt als chemotherapeutische middelen, fungiciden en antiparasitaire middelen om de celdeling te blokkeren en tumorcellen, schimmelpathogenen of andere schadelijke organismen te doden. Er kan ook omgevingsblootstelling, aan lage concentraties van deze stoffen, optreden, wat het risico voor de inductie van aneuploidie met zich meebrengt.

Het doel van dit werk was de relatie tussen aneuploidie/polyploidie/de aanwezigheid van micronuclei en de inductie van apoptose in menselijke cellen na in vitro blootstelling aan lage en hoge concentraties van de microtubuli-inhibitor nocodazole te onderzoeken.

In een eerste deel van deze studie werd het overleven van polyploide cellen, ontstaan na blootstelling aan een hoge concentratie nocodazole, onderzocht in de erythroleukemie-cellijnen K562 (drukt p53 niet uit) en KS (drukt p53 uit). De resultaten bevestigden dat spoelfiguur-inhibitoren zoals nocodazole apoptose induceren (Verdoodt et al., 1999) en dat apoptose onafhankelijk van p53 wordt geïnduceerd, aangezien apoptose in beide cellijnen werd vastgesteld (Casenghi et al., 1999). Om het overleven van polyploide cellen te onderzoeken werd een FISH analyse uitgevoerd op de apoptotische en levende cellen, bekomen met annexine-V-labeling gecombineerd met flow cytometrie. In de p53-positieve KS-cellen, induceerde de blootstelling aan nocodazole een vergelijkbare fractie van hexaploide cellen in zowel de levende als de apoptotische celfracties, maar geen dodecaploide cellen werden ooit geobserveerd. In de p53-negatieve K562-cellen daarentegen, werd duidelijk een populatie van dodecaploide cellen waargenomen, die hoofdzakelijk levend waren. Deze resultaten bevestigden dat wild-type p53 het verder circuleren van polyploide cellen voorkomt door rereplicatie te blokkeren. Bovendien bood deze studie het eerste bewijs dat polyploidie geen sterk signaal voor apoptose vormt. Dit suggereert dat apoptose geïnduceerd wordt vóór de mitotische segregatie heeft plaatsgevonden en dat niet enkel de spoelfiguurmicrotubuli, maar ook de interfasemicrotubuli gevoelig zijn voor nocodazole.

In een volgende deel van deze studie werd onderzocht of aneuploide cellen, geïnduceerd door lage concentraties nocodazole, geëlimineerd kunnen worden door apoptose en of dit optreedt onder de drempelwaardeconcentraties voor de inductie van chromosoom non-disjunctie en chromosoomverlies (Elhajouji et al., 1995; 1997). Apoptotische en levende cellen werden gescheiden met behulp van een nieuwe methode: magnetische microbead celsortering gecombineerd met annexine-V-labeling, en micronuclei, chromosoomverlies en non-disjunctie werden bepaald met FISH in de twee bekomen celfracties. De resultaten suggereerden dat de eliminatie van cellen met micronuclei of cellen met chromosoom non-disjunctie optreedt, zelfs onder de drempelwaardeconcentraties voor chromosoom non-disjunctie en chromosoomverlies. Toch was het signaal voor apoptose dat teweeggebracht werd door cellen met micronuclei sterker dan cellen met chromosoom non-disjunctie. Daarom vormen cellen met micronuclei een sterker apoptotisch signaal. Aangezien de resultaten aantoonde dat apoptose de frequenties van micronuclei wijzigt, zou rekening moeten gehouden worden met de invloed van apoptose bij het inschatten van risicobepaling op basis van drempelwaarden voor individuele aneugene chemicaliën. Het gebruik van specifieke caspase-inhibitoren liet ons toe om na te gaan welke belangrijke caspases betrokken zijn in het apoptotisch proces geïnduceerd door hoge concentraties nocodazole. In PBMC werd apoptose geïnduceerd door nocodazole geïnhibeerd door inhibitoren van caspase-3, -8 en -9, wat wijst op hun rol in het apoptotisch proces geïnduceerd door microtubuli-inhibitoren. Bovendien werd een toename aan cellen met micronuclei waargenomen met inhibitoren van de twee apicale caspases-8 en -9, wat onze vroegere bevindingen dat cellen met micronuclei kunnen geëlimineerd worden door apoptose, bevestigt. Met de gepaarde humane borstcarcinoma cellijnen cellijnen MCF-7, die caspase-3-deficient is en de MCF-7 getransfecteerd met een functioneel caspase-3 gen (MCF-7 casp3+) konden we bevestigen dat inhibitie van caspase-8 and -9 tot een toename

aan nocodazole-geïnduceerde MNCB leidt, wat in overeenstemming is met onze observaties in PBMC. Wanneer eenkernige cellen met micronuclei (MNMONO), ontstaan door "mitotic slippage", daarentegen werden bepaald na blootstelling aan hoge concentraties nocodazole in aanwezigheid van inhibitoren van caspase-8 en -9, werd geen toename in de frequenties van MNMONO waargenomen. Daarom wijzen onze data erop dat MNMONO, ontstaan door "mitotic slippage", niet preferentieel geëlimineerd worden door apoptose en bevestigen dus dat polyploidie geen sterk signaal voor de inductie van apoptose vormt.

In aanwezigheid van een caspase-3-inhibitor werd, onverwacht, een daling in de frequenties van nocodazole-geïnduceerde micronuclei in PBMC vastgesteld. Daarom werd de mogelijke rol van caspase-3 in de vorming van micronuclei verder onderzocht in de MCF-7 en MCF-7 casp3+ cellijnen. De bekomen resultaten toonden aan dat in elke toestand waarbij caspase-3 niet functioneel was, een lagere frequentie aan micronuclei werd geobserveerd. Deze resultaten suggereren dat caspase-3, naast zijn functie in apoptose, ook betrokken is in de vorming van micronuclei. De rol van caspase-3 in de vorming van micronuclei is niet beperkt tot tweekernige cellen en dus ongeacht of de cellen met micronuclei cytokinese/nucleaire deling hebben ondergaan.

Analyse van de genexpressieprofielen in HepG2-cellen bevestigde het apoptogeen vermogen van nocodazole en toonde een gemoduleerde genexpressie voor sommige apoptose-gerelateerde genen in aanwezigheid van nocodazole, zoals BAK, GADD45, b-JUN and c-JUN, toch waren deze veranderingen in genexpressie niet altijd statistisch significant. Bovendien werd geen duidelijke opregulatie waargenomen voor de genen die coderen voor caspases. Aangezien caspases constitutief uitgedrukt worden als pro-enzymen, en hun activatie dus klieving vraagt die gebeurt op proteïneniveau en niet op genniveau, kon dit verwacht worden. Uit deze bedenkingen kan men besluiten dat analyse van genexpressie gebruik makend van microarrays niet de meest geschikte methode is om het apoptotisch proces te bestuderen. Verder toonden de resultaten ook aan dat microtubule-inhibitoren zoals nocodazole, naast celdeling, ook andere cellulaire processen kan beïnvloeden, in het bijzonder processen die gebruik maken van microtubuli voor cellulair transport, zoals enzymen betrokken in DNA- repair.

In de toekomst zijn bijkomende experimenten nodig om te ontrafelen hoe micronuclei een signaal kunnen zijn voor apoptose. Verder zou de labeling van micronuclei met het 3F3/2-antilichaam, om na te gaan of een volledig chromosoom/chromatide in micronuclei beslissend is voor de inductie van apoptose, ook een duidelijker antwoord kunnen geven over het mechanisme dat leidt tot de eliminatie van cellen met micronuclei. Een ander thema dat verder onderzoek vraagt is de rol van caspase-3 in de vorming van micronuclei. Daarom is de studie van de moleculaire mechanismen verantwoordelijk voor deze niet-apoptotische functie caspase-3 nodig.