

Samenvatting

Chronische beroepsblootstelling aan vele zware metalen is geassocieerd met een toenemend kankerrisico. Echter, de mechanismen van het tumorproces veroorzaakt door metalen zijn nog grotendeels ongekend en blijven een complex en onvoldoende begrepen proces. Er werd een associatie aangetoond tussen beroepsblootstelling aan kobalt-bevattend stof en longtoxiciteit, waaronder bronchiale astma, fibroserende alveolitis en longkanker. Terwijl bronchiale astma blijkbaar gelinkt is met vele industriële toepassingen, ongeacht de chemische of fysische toestand van kobalt, zijn fibroserende alveolitis (hardmetaalziekte) en longkanker in het bijzonder geassocieerd met de hardmetaal industrie waar men blootgesteld wordt aan een mengsel van kobalt metaal en wolframcarbide partikels (Lison, 1996; Moulin *et al.*, 1998). Wat genotoxiciteit betreft, heeft hardmetaal of WC-Co een hoger *in vitro* mutageen effect in vergelijking met zijn individuele componenten (Anard *et al.*, 1997; Van Goethem *et al.*, 1997; De Boeck *et al.*, 1998; De Boeck *et al.*, 2003c). Dit hoge mutagene effect werd *in vivo* in rat type II pneumocyten bevestigd (De Boeck *et al.*, 2003a). De verhoogde mutagene en carcinogene (ter hoogte van de long) effecten van hardmetaal in vergelijking met kobalt kunnen gedeeltelijk verklaard worden door het fysisch-chemisch mechanisme van oppervlakte interactie tussen kobalt (Co) en wolframcarbide (WC) partikels, resulterend in een hoge vrijgave van reactieve zuurstofradicalen (Lison *et al.*, 1995).

Het hoofddoel van deze thesis was de hogere geïnduceerde genotoxiciteit en carcinogeniciteit van WC-Co te verklaren door de cellulaire respons van de cellen blootgesteld aan WC-Co te vergelijken met deze blootgesteld aan WC, Co en CoCl₂. Daarom meer specifiek had deze thesis tot doel het bestuderen van de moleculaire en genetische mechanismen betrokken in de (geno)toxiciteit geïnduceerd door kobalt-bevattend stof en meer in het bijzonder hardmetaal.

In een eerste deel van dit werk, focuseerden we ons op één van de mogelijke cellulaire antwoorden na metaalblootstelling, namelijk inductie van apoptose. Blootstelling van PBMC met CoCl₂, Co, WC of WC-Co induceerde apoptose zoals waargenomen met verschillende complementaire technieken die specifieke opeenvolgende stadia van het apoptose proces benaderen. Het gebruik van specifieke caspase inhibitoren maakte het mogelijk te onderzoeken of caspase-8 of -9 betrokken waren in Co-, WC- of WC-Co geïnduceerde apoptose. Co-geïnduceerde apoptose werd geïnhibeerd door inhibitoren van caspase-8 and -9, terwijl WC- en WC-Co-geïnduceerde apoptose meer geïnhibeerd werden door de caspase-9 inhibitor, wat wijst op hun rol als initiator caspases in het apoptotisch proces geïnduceerd

door de verschillende metaalverbindingen. Het apoptogeen vermogen van kobalt-bevattende verbindingen werd ook bevestigd in de epitheliale long- (meer relevante doelwitcellen) en borstkankercellijnen.

In een volgende deel van deze studie, werd het totaal cellulair antwoord van PBMC behandeld met kobalt-bevattende verbindingen onderzocht door middel van analysemethoden op transcriptieel niveau zoals microarray en kwantitatieve reverse transcriptie PCR. Een eerste microarray analyse toonde aan dat 24h behandeling met WC-Co een groot aantal genen moduleert, die kunnen onderverdeeld worden in brede functionele groepen. De meest significant opgereguleerde pathways in WC-Co behandelde PBMC waren apoptose, wat het apoptogeen vermogen van WC-Co bevestigt, en stress/defensie respons; de meest significante downgereguleerde waren immuunrespons, stress/defensie respons en cel-cel signalisatie. De sterke ROS vorming na WC-Co behandeling en de opregulatie van genen betrokken in glucose metabolisatie suggereren een hypoxia-achtige toestand met mogelijks de activatie van HIF-1. Bovendien werden verscheidene HIF-1-responsieve genen opgereguleerd zoals de pro-apoptose genen *BNIP3* en *BNIP3L*, de stress respons genen *HMOX1* en *ADM* en sommige glucose metabolisatie genen zoals *TPI*, *PDK* and *GBE1*. De kwantitatieve reverse transcriptie PCR uitgevoerd voor een selectie van de meest gemoduleerde genen (*HMOX1*, *HSPA1A*, *HSPA1L*, *BNIP3*, *BNIP3L*, *ADORA2B*, *MT3*, *PLA2G7*, *TNFAIP6*) en enkele bijkomende gekozen apoptose genen (*BCL2*, *BAX*, *FAS*, *FASL*, *TNF α*), bevestigden de microarray data na WC-Co blootstelling maar konden geen belangrijke verschillen in geninductie tussen kobalt-bevattende verbindingen aantonen wat niet helpt om het carcinogene effect van WC-Co te verklaren.

Daarom werd de genexpressie analyse uitgebreid naar een experimentele conditie van 15 minuten blootstelling van PBMC om het dominerende effect van de Co-ionen over de vroege ROS vorming uit te schakelen. Deze tweede microarray analyse waarbij het korte blootstellingseffect van WC-Co direct met CoCl_2 vergeleken werd, toonde *HMOX1* aan als het meest opgereguleerd gen. Bij de langere blootstellingsexperimenten kon met kwantitatieve reverse transcriptie PCR geen verschil in *HMOX1* inductie tussen WC-Co en CoCl_2 blootstelling worden aangetoond. In de korte blootstellingskinetiek konden we via microarray en kwantitatieve reverse transcriptie PCR een hogere inductie van *HMOX1* aantonen na WC-Co blootstelling in vergelijking met CoCl_2 blootstelling.

Als vervolg op deze tweede microarray analyse, welke DNA repair als een van de meest significante meer WC-Co opgereguleerde dan CoCl₂ pathways aantoonde, werd door middel van kwantitatieve reverse transcriptie PCR de fold expressie na blootstelling aan WC-Co, Co, WC of CoCl₂ van enkele geselecteerde DNA repair genen (*GADD45A*, *EXO1*, *RAD51*, *RAD23B* and *BRCA1*) nagegaan. Echter, onthulde deze kwantitatieve reverse transcriptie PCR data meestal geen statistisch significante verschillen tussen behandelde en controle cellen, zodat er geen eenduidig beeld verkregen werd. Wat de weinige statistisch significante verschillen tussen behandelde en controle cellen in donor 1 betreft, konden we niet met zekerheid besluiten of de verschillen in genexpressie van deze geselecteerde DNA repair genen enige biologische significantie hadden daar ze niet reproduceerbaar waren in de andere donor. Daarom is bijkomende analyse met meer donoren noodzakelijk om een meer significant beeld te krijgen.

Studie van post-translationeel gereguleerde pathways, welke ook een belangrijke rol spelen in het cellulair antwoord, toonden een duidelijke inductie van p53 aan na korte blootstelling met WC-Co en Co maar niet na blootstelling aan WC of CoCl₂. Alsook bevestigden de data een correlatie tussen *HMOX1* mRNA inductie en de accumulatie van p53. Na blootstelling aan de kobalt-bevattende verbindingen werd geen ATM afhankelijke fosfoylatie van p53 op Ser15 waargenomen. Fosforylatie van p38 MAPK werd waargenomen na korte blootstelling aan WC-Co en Co. Geactiveerd p38 kan verschillende pathways signaliseren leidend tot p53 stabilisatie en accumulatie. In de toekomst zijn bijkomende experimenten nodig om de stabilisatie van HIF-1 α en de eventuele directe fosforylatie van p53 op Ser33 en Ser46 door p38 leidend tot p53 stabilisatie te onderzoeken.

Ter conclusie, kunnen we stellen dat we in deze thesis een groot deel van de moleculaire signalisatiemechanismen na blootstelling van PBMC aan WC-Co konden beschrijven. Echter, konden we niet direct sleutelfactoren aantonen die verklaren dat WC-Co meer carcinogeen is dan kobalt. Verder onderzoek is nodig om een duidelijker beeld te krijgen aangaande het carcinogene vermogen van WC-Co.