

Samenvatting

Organismen op aarde ontwikkelen zich in de aanwezigheid van zwaartekracht. Een goede mogelijkheid om onderzoek te doen naar de invloed van zwaartekracht op organismen is het blootstellen van organismen of cellen aan een omgeving met een zwaartekracht van een andere grootte: bijvoorbeeld micrograviteit in de ruimte. Het is gebleken dat blootstelling aan condities van micrograviteit vele processen in organismen beïnvloedt. Ook op het niveau van de cel zijn veranderingen waargenomen na blootstelling aan micrograviteit, zoals veranderde signaaltransductie, expressie van genen, proliferatie van cellen en een veranderde vorm van cellen. Op basis van eerder onderzoek is gesuggereerd dat veel van deze waargenomen veranderingen in cellen wel eens het gevolg zouden kunnen zijn van een veranderend actine cytoskelet. In dit proefschrift zijn de veranderingen van het actine cytoskelet in cellen onder micrograviteit verder onderzocht.

In cellen organiseren een aantal eiwitten zich in een dynamisch netwerk van filamenten. Hierdoor wordt een soort skelet in cellen gevormd dat ook wel het cytoskelet genoemd wordt. Actine is een belangrijke component van het cytoskelet, naast tubuline en intermediaire filamenten. Actine is aanwezig in cellen in een gepolymeriseerde vorm (F-actine) en een niet gepolymeriseerde vorm (G-actine). Voortdurend worden actine filamenten gevormd en afgebroken onder invloed van met actine interacterende eiwitten. Deze processen worden door specifieke signaaltransductieroutes gereguleerd. Uiteindelijk organiseren actine microfilamenten zich lokaal in verschillende subcellulaire structuren die specifieke functies hebben in cellen. Zo bepaalt het actine cytoskelet de vorm van cellen en speelt een rol bij de beweging van cellen, draagt het er toe bij dat verschillende processen in cellen van elkaar gescheiden kunnen plaatsvinden, speelt het een rol bij de deling van cellen en bij de communicatie en het transport in cellen en heeft het nog vele andere functies (hoofdstuk 2).

In dit proefschrift zijn experimenten beschreven waarbij cellen zowel gedurende kortere als langere tijd aan condities van micrograviteit werden blootgesteld. Het ging hierbij zowel om micrograviteit tijdens raketmissies in de ruimte als om gesimuleerde micrograviteit op aarde. Doel van deze experimenten was in eerste instantie om het gedrag van actine in cellen te beschrijven na blootstelling aan micrograviteit. Hiervoor is eerst een aantal modellen geselecteerd waarbij actine in cellen (lokaal) sterk veranderd, namelijk cell cyclus progressie, het ontstaan van ruffles in de celmembraan en het bewegen van cellen. De aanwezigheid van een dynamisch actine cytoskelet impliceert dat er regulerende

signaaltransductie cascades geactiveerd worden. Dit biedt de mogelijkheid om zowel het gedrag van actine als de regulerende signaaltransductieroutes te bestuderen. Om een vergelijking met de situatie bij 1g te kunnen maken zijn deze modellen eerst bij 1g op aarde bestudeerd. Deze modellen zijn beschreven in het eerste deel van dit proefschrift (hoofdstuk 3, 4 en 5). Vervolgens zijn experimenten beschreven die zowel in gesimuleerde micrograviteit als in condities van echte micrograviteit zijn uitgevoerd (hoofdstuk 6).

Het is eerder beschreven dat zowel het gedrag van actine als de proliferatie van cellen veranderen onder condities van micrograviteit. Actine is verondersteld een veelzijdige rol te spelen tijdens de proliferatie van cellen. Te denken valt hierbij aan een rol bij signaaltransductie, transcriptie en als structuurbepalend eiwit, bijvoorbeeld bij de cytokinese en tijdens het opbollen en afplatten van cellen. De regulatie van de proliferatie van cellen is afhankelijk van signaaltransductieroutes die geactiveerd worden door externe signaal moleculen, zoals groeifactoren en componenten van de extracellulaire matrix. Op basis van het al dan niet geactiveerd worden van deze signaaltransductieroutes continueren cellen de cel cyclus, of stoppen de cel cyclus en ondergaan differentiatie, apoptose of quiescence. Deze beslissing wordt tijdens de G1 fase van de cel cyclus genomen. Voor het bestuderen van de relatie tussen het gedrag van actine en de proliferatie van cellen, zijn cellen gesynchroniseerd die zich in mitose bevinden. Vervolgens is het gedrag van actine in relatie tot de activatie van signaaltransductie cascades tijdens het begin van de G1 fase van de cel cyclus bestudeerd (hoofdstuk 3). Gebleken is dat actine en geactiveerde signaaltransductie nauw met elkaar verweven zijn aan het begin van de G1 fase. Actine is betrokken bij de vorming van blaasjes op de celmembraan die uitsluitend waarneembaar zijn aan het begin van de G1 fase, direct na de voltooiing van de mitose. Deze blaasjes bevatten diverse geactiveerde signaaltransductie eiwitten waarvan bekend is dat ze een sleutelrol spelen bij de progressie door de cel cyclus, zoals gefosforyleerd FAK en gefosforyleerd MAP kinase. Gebleken is dat de vorming van deze blaasjes gevuld met geactiveerde signaaltransductie eiwitten niet uniek is voor ronde cellen aan het begin van de G1 fase van de cel cyclus. Ook in getrypsiniseerde ronde cellen die zich opnieuw hechten en spreiden zijn deze membraan blaasjes waargenomen. De formatie van de membraanblaasjes lijkt onafhankelijk te zijn van de activatie van signaaltransductie aangezien de inhibitie van signaaltransductieroutes niet resulteerde in een inhibitie van de formatie van de membraan blaasjes.

De relatie tussen groeifactor geïnduceerde signaaltransductie en actine is verder bestudeerd in serum-gestarverde muizenfibroblasten (hoofdstuk 4 en 5). Deze cellen

induceren spectaculaire actine structuren na stimulering met de groeifactor PDGF (platelet-derived growth factor). Gepolymeriseerd actine duwt hier lokaal de celmembraan naar buiten en hierdoor worden dorsale circulaire ruffles gevormd. Dit gebeurt onder invloed van specifieke signaaltransductie routes die beginnen bij de geactiveerde PDGF receptor. Hoewel de subcellulaire lokalisatie van PDGF β -receptoren in serum-gestarverde cellen niet homogeen is, komt het waargenomen patroon van receptoren niet overeen met de lokale vorming van actine structuren. Daarom lijkt de distributie van PDGF β -receptoren geen verklaring te bieden voor de inductie van lokale veranderingen van het actine cytoskelet. Gebleken is dat de distributie van PDGF β -receptoren tijdens de stimulatie met PDGF verandert. PDGF β -receptoren blijven verbonden aan de geïnduceerde actinestructuren en accumuleren op deze wijze in de nieuw gevormde dorsale circulaire ruffles. De aanwezigheid van zowel macropinosomen als clathrine in de geïnduceerde circulaire ruffles suggereert dat de accumulatie van PDGF β -receptor in circulaire ruffles resulteert in de efficiënte internalisatie van PDGF β -receptoren.

Naast de translocatie van PDGF β -receptoren, resulteert de stimulatie met PDGF ook in een opmerkelijke relocatie van cPLA₂ α (hoofdstuk 5). cPLA₂ α maakt deel uit van een familie van enzymen die het vetzuur van de 2-plaats van membraan fosfolipiden vrijmaken waarbij onder andere arachidonzuur vrijkomt. Arachidonzuur is bij veel belangrijke processen betrokken, zo kan het bijvoorbeeld worden omgezet in componenten die een actieve rol spelen bij ontstekingen. In muizenfibroblasten die met PDGF gestimuleerd zijn, verplaatst cPLA₂ α zich vanuit het cytoplasma naar specifieke delen van de celmembraan waar protrusies van de cel worden geïnduceerd door lokale actine en membraan dynamiek. Het gaat hier bijvoorbeeld om ruffles en lamellae. In zowel muizenfibroblasten als humane navelstreng endotheel cellen (HUVEC) is cPLA₂ α ook gelokaliseerd in de leading edge van migrerende cellen, een zone met intense actine en membraan dynamiek die de beweging van cellen faciliteert. Ook de actieve gefosforyleerde vorm van cPLA₂ α is in ruffles, lamellae en leading edges gelokaliseerd. De inhibitie van de activiteit van cPLA₂ α door specifieke inhibitoren blokkeert groeifactor geïnduceerde membraan en actine dynamiek, zoals de vorming van ruffles. cPLA₂ α lijkt dus een belangrijke rol te hebben bij deze processen. Aangezien cPLA₂ α ook bij de waargenomen membraanblaasjes van ronde zich spreidende cellen is gelokaliseerd (hoofdstuk 3), lijkt cPLA₂ α een belangrijke rol te spelen bij veel vormen van lokale actine en membraan dynamiek.

Aangezien de mogelijkheden voor het doen van onderzoek tijdens ruimtemissies beperkt zijn, zou het zeer wenselijk zijn om condities van micrograviteit te kunnen simuleren. Het was eerder beschreven dat onder condities van micrograviteit in de ruimte er in humane epidermale carcinoma A431 cellen specifieke veranderingen van het actine cytoskelet optreden die uiteindelijk resulteren in het opbollen van cellen. Deze opbolling van A431 cellen is gedetailleerd bestudeerd met twee methoden waarvan beschreven was dat deze methoden condities van micrograviteit kunnen simuleren: rotatie met de Random Positioning Machine (RPM) en magnetische levitatie (hoofdstuk 6.1). In de RPM worden samples op een platform geplaatst dat in drie dimensies willekeurig van positie verandert doordat twee frames onafhankelijk van elkaar en met een willekeurige snelheid in willekeurige richting bewegen. De willekeurige rotatie in alle richtingen resulteert in een netto kracht van nul. Dus de RPM is gebaseerd op het principe dat de richting van graviteit willekeurig wordt gemaakt. In het geval van magnetische levitatie worden er magnetische krachten uitgeoefend op cellen door ze in een sterk magnetisch veld te plaatsen met een gradiënt. Doordat diamagnetische objecten, zoals bijvoorbeeld cellen, worden afgestoten door magnetische velden ontstaat hierdoor een magnetische kracht die kan worden gebruikt om de zwaartekracht te compenseren en dit resulteert in stabiele levitatie en de simulatie van micrograviteit. Zowel rotatie met de RPM als magnetische levitatie induceerde vergelijkbare veranderingen van de actine morfologie als beschreven voor cellen die aan condities van echte micrograviteit blootgesteld waren. Simulatie van condities van micrograviteit leidde tot een transiënte respons van opbolling van cellen en hernieuwde spreiding van cellen. De opbolling van cellen en spreiding van cellen ging gepaard met veranderingen van het actine cytoskelet en variatie in de aanwezigheid van focal adhesions. Actine en focal adhesions hebben een belangrijke rol bij de hechting van cellen. Ondanks het behalen van resultaten die goed overeenkomen met de resultaten zoals die waargenomen werden onder condities van echte micrograviteit is verdere karakterisering van beide methoden noodzakelijk. Het bleek namelijk dat bijeffecten van beide methoden gemakkelijk kunnen leiden tot het onterecht relateren van geïnduceerde cellulaire responsen aan het simuleren van condities van micrograviteit.

De reorganisatie van het actine cytoskelet die optreedt tijdens de stimulering met de groeifactor PDGF in muizenfibroblasten is als eerste bestudeerd onder echt condities van micrograviteit (hoofdstuk 6.2). Tijdens de Soyuz missie "DELTA" van 2004 zijn cellen gedurende langere tijd blootgesteld aan micrograviteit en tijdens de MASER-10 missie van 2005 zijn cellen slechts zes minuten blootgesteld aan micrograviteit. Alhoewel bij beide

experimenten het gedrag van actine tijdens stimulatie met PDGF bestudeerd werd, verschilden de experimenten in opzet. De simulatie-experimenten hebben laten zien dat cellen waarschijnlijk een transiënte respons laten zien na blootstelling aan micrograviteit. Bij kortdurende experimenten, zoals MASER missies, kunnen cellen bestudeerd worden die zich aan het aanpassen zijn aan de condities van micrograviteit en bij experimenten die langer duren kunnen cellen bestudeerd worden die zich aangepast hebben aan de veranderde omstandigheden. Beide experimenten hebben geen resultaten opgeleverd van cellen die aan micrograviteit zijn blootgesteld. In het geval van de MASER-10 is het experiment goed verlopen maar zijn de resultaten verloren gegaan door de ongecontroleerde landing van de raket. Bij de DELTA missie zijn geen resultaten verkregen door niet functionerende hardware en niet vervulde temperatuur vereisten.

Het onderzoek naar de effecten van micrograviteit wordt gehinderd door de beperkte toegang tot ruimtevluchten. Dit maakt het routinematig uitvoeren van laboratoriumonderzoek onmogelijk. Daarnaast kan worden geconcludeerd dat de weinige mogelijkheden die er zijn, niet gevrijwaard zijn van enig risico. Daarom is het essentieel om de methoden verder te ontwikkelen die het mogelijk maken om routinematig experimenten in gesimuleerde micrograviteit uit te voeren. Gecombineerd met nieuwe experimenten onder echte micrograviteit in de ruimte, bijvoorbeeld met de in deze thesis beschreven modellen, zal dit zeker inzicht verschaffen in de mechanismen die effecten induceren in cellen die blootgesteld worden aan condities van micrograviteit.