

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft enerzijds de effecten van hyperthermie op de proliferatie capaciteit van gesynchroniseerde zoogdiercellen en anderzijds de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de bescherming van een cel tegen hyperthermie. Om de effecten van hyperthermie op de celproliferatie te kunnen relateren aan algemene of specifieke biochemische en moleculaire processen die nodig zijn voor celdeling werden deze studies verricht aan gesynchroniseerde cellen. Er wordt aandacht besteed aan drie belangrijke vragen in de heat stress fysiologie: (a) wat zijn de fysiologische parameters die de warmtegevoeligheid van een cel bepalen, (b) wat zijn de kritische processen c.q. structuren die verstoord worden door hyperthermie, en (c) wat zijn de moleculaire mechanismen die de cel beschermen tegen een heat shock.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de meest recente literatuur met betrekking tot dit onderzoeksgebied. Een interessant aspect van de heat stress fysiologie is de waarneming dat een cel na een eerste warmtebehandeling resistent kan worden voor een tweede warmtebehandeling. Deze toename in warmteresistentie wordt thermotolerantie genoemd. Een aantal waarnemingen duiden op de betrokkenheid van bepaalde eiwitten, de heat shock proteins (HSP's), bij het optreden van thermotolerantie en bij de regulatie van de warmtegevoeligheid van een cel in het algemeen. De synthese van HSP's is verhoogd na een heat shock. Ondanks dat er uitgebreid onderzoek is gedaan naar de synthese en cellulaire distributie van HSP's zijn er tot nu toe geen specifieke functies voor deze eiwitten bekend.

In de hoofdstukken 3, 4 en 5 wordt getoond dat het effect van een heat shock op de proliferatie capaciteit van cellen afhangt van (a) de voorbehandelingstemperatuur, (b) de positie van een cel in de celcyclus en (c) omgevingsfactoren zoals serum. Het effect van een heat shock wordt gemodificeerd door hypo- of hypertherme voorbehandeling. In overlevingsproeven werd aangetoond dat de warmtegevoeligheid van Neuro-2A cellen toeneemt, direct nadat deze bij hypotherme temperaturen worden geplaatst (Hoofdstuk 3). De snelheid van thermosensitivering hangt af van (a) de hypotherme temperatuur, (b) de tijdsduur van hypotherme preincubatie en (c) de celcyclus fase op het moment dat de cellen met hypothermie behandeld worden. Bovendien blijkt het effect van een heat shock op de celoverleving gerelateerd te zijn aan de celcyclus. Cellen in de late S fase of vroege G2 fase zijn gevoeliger voor een warmtebehandeling dan G1- of

vroege S fase cellen.

Verandering van warmtegevoeligheid tijdens de celcyclus wordt nader beschreven in hoofdstuk 4. Het mitose-uitstel ten gevolge van een niet-lethale heat shock is groter in late S/G2 fase cellen dan in G1 fase cellen. Na een eerste heat shock wordt de celcyclus progressie van Neuro-2A cellen tolerant voor een tweede shock. Deze tolerantie ontwikkelt zich sneller in G1 dan in late S/G2 fase cellen.

Een andere parameter die invloed heeft op de warmtegevoeligheid van een cel is de aanwezigheid van serum-bevattend medium tijdens de warmtebehandeling. Serum beschermt Neuro-2A cellen tegen hitte-geïnduceerde veranderingen in celcyclus progressie alsook tegen hitte-geïnduceerde celdood. Dit beschermend effect werd wel in G1 fase cellen waargenomen, maar niet in late S/G2 fase cellen. Serum beïnvloedt de hitte-geïnduceerde veranderingen in celproliferatie direct: verwijdering van serum veroorzaakt een directe sensitivering.

In de hoofdstukken 6, 7 en 8 wordt de vraag gesteld wat de moleculaire basis is voor de regulatie van warmtegevoeligheid zoals waargenomen in de voorafgaande drie hoofdstukken. De resultaten zoals gepresenteerd in hoofdstuk 6 duiden op een functie van HSP's bij de proliferatie van Neuro-2A cellen na een heat shock. Er werden aanwijzingen gevonden dat HSP's de G1 fase cellen beter tegen heat shock beschermen dan de late S/G2 fase cellen. De basale HSP synthese en de door heat shock geïnduceerde HSP synthese veranderen niet tijdens de celcyclus.

Er zijn aanwijzingen dat schade in het chromatine verantwoordelijk is voor hitte geïnduceerde celdood. In de hoofdstukken 7 en 8 wordt de regulatie van de warmtegevoeligheid op chromatine nivo bestudeerd. Hoofdstuk 7 handelt over groeistimulatie van rustende Reuber H35 hepatoma cellen door serum-bevattend medium. Na groeistimulatie neemt de thermoresistentie van cellen toe en parallel hieraan worden ook structurele en moleculaire eigenschappen van het chromatine thermotolerant. We speculeren over de moleculaire basis voor de toename van thermoresistentie na groeistimulatie. De verandering in thermoresistentie van chromatine valt samen met specifieke veranderingen in de chromatine fractie zoals aangetoond wordt d.m.v. 'in vitro' fosforilering van geïsoleerde Non-Histone Chromosomal Proteins (NHCP's). Deze veranderingen gaan aan de verhoging van HSP synthese vooraf. Een heat shock veroorzaakt vergelijkbare veranderingen in de NHCP fractie (Hoofdstuk 8). Deze hitte geïnduceerde veranderingen in het chromatine worden gevolgd door (a) een verhoging van de HSP syn-

these, (b) binding van nieuw gesynthetiseerd HSP 68-70 aan het chromatine en (c) de ontwikkeling van thermotolerantie. Recente resultaten laten zien dat ook constitutief gesynthetiseerd HSP 68-70 geassocieerd raakt met het chromatine. Binding van constitutief gesynthetiseerd HSP 68-70 vindt tijdens de heat shock plaats terwijl nieuw gesynthetiseerd HSP 68-70 erna bindt. Mogelijk dat thermotolerantie afhangt van (a) de toestand van het chromatine, zoals gereflecteerd in de endogene fosforilering van geïsoleerde NHCP's, welke belangrijk kan zijn voor binding van HSP's en (b) de hoeveelheid HSP's die in de cel aanwezig is. In de slotdiscussie wordt aan de hand van dit idee een moleculaire verklaring gegeven voor:

- a) Verandering van warmtegevoeligheid zonder verandering in HSP synthese zoals waargenomen in hoofdstuk 3 voor hypothermie behandeling, in de hoofdstukken 5 en 7 na verandering van serum concentratie en in een aantal recente artikelen.
- b) Verandering van warmtegevoeligheid welke gekoppeld is aan verandering van HSP synthese (en NHCP's) zoals beschreven in hoofdstuk 8 en in een aantal artikelen.
- c) Verandering van warmtegevoeligheid tijdens de celcyclus.