**Uitleg Siliconenartikel m.b.t. celdood door Carla Onnekink en**

**Rita Kappel**

**Belangrijke informatie:**

**2 soorten celdood:**

* **Apoptose**
* **Necrose**

**Apoptose:** **Geprogrammeerde celdood**

Cellen gaan op geordende manier dood. Eiwitten worden in stukken gehakt, verpakt en “verslonden”door immuuncellen om gerecycled te worden.

Bij het afbreken van de eiwitten spelen het eiwit Bcl-2 en de diverse Caspases een rol.

In het lab gebruikten wij Jurkat cellen voor dit onderzoek. Dat zijn T-cel lymphocyten. Die groeien als losse cellen in een kweekmedium. We kunnen die apoptotisch laten worden door het toevoegen van het stofje Anisomycine.

Onder de microscoop is dan met het blote oog te zien dat er apoptose optreedt. De cellen krijgen nl. allerlei uitstulpingen, de zg. blebs. ( zie fig.1)

Op eiwitniveau is de apoptose aan te tonen door bv. te laten zien dat het eiwit U1-70K , dat 70 kiloDalton groot is, in een kleiner stuk van 40 kiloDalton is geknipt.( zie fig 2) ( praktische uitleg volgt)

**Necrose: Niet geplande celdood**

Cellen gaan dood door externe factoren, die stress veroorzaken. Eiwitten worden wel in stukken gehakt, maar niet netjes verpakt voor recycling.

In het lab kunnen wij Jurkat cellen necrotisch maken door het toevoegen van H2O2, waterstofperoxide.

Onder de microscoop is te zien dat de cellen opzwellen en kapot gaan, waarbij de inhoud van het cytoplasma vrij komt. ( fig.1)

Op eiwitniveau aantoonbaar doordat bv het eiwit Topoisomerase I ( Topo I) , dat 100 kiloDalton groot is, in een kleiner stuk van 45 kiloDalton is geknipt.

( bij apoptose wordt trouwens Topo I geknipt in een stuk van 70 kiloDalton.)

Op Youtube zijn diverse (animatie)-filmpjes te vinden over Apoptose en Necrose.

**Eiwitten:**

Eiwitten zijn de bouwstenen van het lichaam. Een eiwit is een soort kralensnoer, in elkaar gevouwen tot een 3D structuur.

**Siliconen onderzoek:**

Vrouwen met siliconen implantaten kunnen klachten ontwikkelen, die lijken op een auto-immuun ziekte. Dat zou kunnen betekenen dat hun immuunsysteem aanslaat op een “eigen” stuk eiwit. In dat geval hebben ze antilichamen in hun bloed tegen een “eigen” eiwit. Alleen weten we niet tegen welk eiwit dat is. En ook niet of iedereen met dezelfde klachten ook antilichamen heeft tegen hetzelfde eiwit. En hoe het ontstaat.

Siliconen implantaten worden gemaakt door een mengsel van oliën samen te voegen, en na een bepaalde procedure wordt dat een flubberige gel. De gebruikte siliconen oliën zijn verschillend van molecuul grootte. D4 is de kleinste daarna komt D5, daarna D6. Het implantaat kan scheuren in de borst, maar het is ook bekend dat de implantaten kunnen “zweten”. Dan komt er olie uit. Omdat D4 de kleinste olie is, lijkt het voor de hand te liggen dat deze er het eerst “uitzweet”.

In het lab hebben we emulsies van D4, D5 en D6 bij de Jurkat cellen gedaan.

Met name met D4 olie zag je al na 4 uur dat de cellen veranderden. (fig.1)

Deze cellen hebben we gebruikt om onderzoek te doen door middel van een **immuno-blot.**

We hebben de behandelde cellen verzameld en kapot gemaakt zodat we een eiwitmengsel hadden ( Lysaat). Dat eiwitmengsel hebben we “gescheiden”op een acrylamide-gel. In zo’n gel worden de eiwitten als het ware van boven naar beneden getrokken door een soort netwerk / doolhof. Hoe kleiner het eiwit hoe makkelijker het door dat netwerk gaat.. Als je stopt met “trekken”op het moment dat de kleinste eiwitten beneden zijn, zijn de grootste nog bovenaan en daartussenin zijn de eiwitten mooi van klein naar groot verdeeld. Als je tegelijkertijd ook eiwitten mee laat lopen waarvan bekend is hoe groot ze zijn, kun je later bepalen hoe groot een aangetoond eiwit ongeveer is. ( in kiloDalton)

Eerst maken we een afdruk van de gel. Dan komen de eiwitten op een soort papier vastgeplakt te zitten, een zg. blot. Als je vervolgens die blot ( of een stukje daarvan) in serum legt, en er zitten antilichamen in dat serum die een eiwit op die blot herkennen, dan plakken de antilichamen daar ook aan vast en kun je die met een trucje zichtbaar maken als zwarte streepjes. ( fig 2)

Als je kijkt naar fig.2 : daar zie je 2 blots, A en B. Aan de linkerkant staan getallen: dat zijn de groottes van de bekende eiwitten ( markers). Aan de bovenkant staat welk lysaat er op die plek op de blot zit. Er zijn 9 “laantjes”, nl. cellen met An(isomycine, dus apoptotisch), met H2O2 ( dus necrotisch), met niks ( Mock) en met D4 olie. Blot A is vervolgens behandeld met serum van een auto-immuun patient, waarvan wij weten dat die persoon antilichamen heeft tegen U1-70K. Je ziet dat er duidelijke zwarte streepjes zitten bij o.a. ongeveer 70 kilo en bij 40 kiloDalton. Bij blot B is hetzelfde gedaan , nu met serum van een patient waarvan we weten dat er antilichamen tegen Topo I in zitten.

Zoals je ziet , met name bij B, zitten er nog veel meer streepjes op die blot. Dat betekent dat er in het serum veel meer antilichamen zitten tegen eiwitten waarvan wij geen idee hebben welke het zijn, en of het kwaad kan. Ook “gezonde” mensen hebben heel veel antilichamen in hun bloed, die waarschijnlijk geen kwaad kunnen.

**Onderzoek:**

We zijn eerst op zoek gegaan naar evt. overeenkomende antilichamen in het serum van siliconen patienten. We hebben tientallen sera getest, op blots met eiwitten van cellen , behandeld met D4 olie, maar ook van cellen die apoptotisch waren gemaakt, of necrotisch. Plus dat we naarnaast tientallen sera van “gezonde”mensen op dezelfde manier hebben getest.

Helaas vonden we geen duidelijke positieve signalen. Meestal zagen we alleen maar zwakke signalen, en als we een sterker signaal zagen, dan hadden de gezonde mensen dat ook.

Maar omdat we wel zagen dat cellen , behandeld met D4 olie duidelijk niet “happy” waren, zijn we daarmee verder gegaan.

Want als de siliconen olie de cellen kan aantasten, dan kan er , volgens de theorie, ook een auto-immuun reactie ontstaan.

**We wilden met name weten of de cellen dood gingen via apoptose of via necrose**.

**1**. Onder de microscoop zagen cellen, behandeld met D4 olie , er necrotisch uit. ( fig.1). Er waren geen blebs, de cellen zwollen op.

Maar: als we op eiwitniveau keken, dan kwam het patroon overeen met apoptose. ( fig 2).

In fig 2A zie je bij de laantjes waarboven An staat, ( dit waren de cellen die apoptotisch gemaakt waren met Anisomycine) zwarte streepjes bij 40 K. Diezelfde zwarte streepjes zie je bij de laantjes waar D4 boven staat. Al na 2 uur behandelen met D4 olie ontstaat dit afbraakproduct van U1-70K.

**2**. Een andere methode om apoptose zichtbaar te maken, is via het aantonen van het eiwit phosphatidylserine. Tijdens apoptose gaat dit eiwit aan de buitenkant van de cel zitten, terwijl het membraan van de cel intact blijft. M.b.v. van het eiwit Annexin V, wat plakt aan phosphatidylserine, kun je dat aantonen, als je daar een lichtgevend stofje aan heb gezet.

Met een ander stofje, propidium iodide, wat plakt aan DNA, kun je aantonen of de celwand doorlaatbaar is ( wat gebeurt bij necrose), of niet.

In fig.3 zie je dat bij cellen die apoptotisch worden gemaakt met Anisomycin ,al na 2 uur Annexin V vastgeplakt zit aan phosphatidylserine, terwijl er nog geen Propidium iodide aan het DNA zit. Dit betekent dat het membraan nog intact is, en het phosphatidyl eiwit aan de buitenkant zit.

Bij cellen die necrotisch gemaakt zijn met H2O2 zie je na 2 uur dat er veel Annexin V aan phosphatidylserine zit geplakt, maar dat er ook veel propidium iodide aan DNA zit geplakt. Dit betekent dat de celwand doorlaatbaar is geworden, en de Annexin V in de cel aan phosphatidylserine zit vastgeplakt.

Bij cellen die behandeld zijn met D4 olie kwam een heel ander patroon naar boven. Na 2 uur, en helemaal na 4 uur, was er bij bijna alle cellen propidium iodide aan het DNA geplakt, maar er zat geen Annexin V aan phosphatidylserine geplakt. Pas na 6 uur was dat te zien. Dit betekent dat het phosphatidylserine niet, zoals bij apoptose, aan de buitenkant van de cel zit. En het betekent ook dat de celwand weliswaar doorlaatbaar is geworden, het propidium iodide kan er doorheen, maar niet zo doorlaatbaar als bij necrose, want Annexin V kan moeilijker doorheen.

**3.** Weer een andere manier om onderscheid te kunnen maken tussen apoptose en necrose is kijken naar DNA afbraak. Bij apoptose wordt DNA in stukken geknipt van diverse groottes, die je net zo als eiwitten weer kunt scheiden van groot naar klein op een ( agarose ) gel. Ook op deze gel gaan de kleinste fragmenten het snelst naar beneden. Je ziet dan een zogeheten “ladder-patroon”. Bij necrose verpulvert het DNA als het ware en zijn de fragmenten zo klein dat ze niet meer te zien zijn.

Bij fig. 4 zie je het DNA als de witte streepjes. Bij An zie je een ladder, bij H2O2 zie je niks, en bij D4 olie zie je weer een ladder. D4 olie is hier in 2 concentraties gebruikt. Bij een lagere concentratie ( 0,3) duurt het wat langer voor het DNA in stukken is geknipt.

Dit lijkt dus weer op apoptose.

Als een cel in apoptose gaat, ontstaat er een kettingreactie. Caspases ( met name caspase 3) breken de structuur van de cel af, maar moeten eerst geactiveerd worden. Dat kan vanaf buiten de cel ( extrinsic pathway) , of vanaf binnen de cel ( intrinsic pathway). Bij de intrinsic pathway speelt het eiwit Bcl-2 ( en Bcl-x) een grote rol. Dit eiwit bindt normaliter aan de eiwitten Bax/Bak en remt zo apoptose. Als Bcl-2/ Bcl-x losgekoppeld wordt, zetten de eiwitten Bax/ Bak de kettingreactie in gang waar uiteindelijk de caspases geactiveerd worden.

( zie bv. Youtube: What is Apoptosis? The apoptotic pathways and the Caspase cascade, van Elvire Thouvenot-Nitzan).

Wij deden tot nu al het onderzoek met Jurkat cellen. ( T4- lymphocyten).

Op het lab hadden we ook de beschikking over Jurkat cellen die zo gemaakt zijn, dat ze heel veel Bcl-2 eiwit hebben. ( en dus apoptose remmen).

In fig. 5 zie je weer een blot met materiaal van “gewone” Jurkat cellen die behandeld zijn met Anisomycin (apoptotisch ) , H2O2 ( necrotisch) of behandeld met D4 olie, en de blot is behandeld met serum met antilichaam tegen U1-70K. Je ziet hier weer dezelfde zwarte strepen als bij fig.1, die er op wijzen dat D4 olie de cellen apoptotisch maakt.

Op blot 5 B hebben we materiaal van cellen met extra Bcl-2 gebruikt, die ook

Behandeld zijn met An , H2O2 of D4 olie, en de blot is weer behandeld met serum met anti- U1-70K. Je ziet nu dat de extra Bcl-2 van de cellen de apoptose heeft geremd, zowel bij de controle ( An) als bij D4 olie. Er ontstaat nl. geen afbraakbandje op 40K.

Hierna hebben we gekeken of de grootte van de olie, of de hoeveelheid of de tijdsduur van behandeling wat uitmaakte.

Zoals gezegd is D4 de kleinste olie, daarna D5 en daarna D6.

De tot nu gebruikte hoeveelheid was een emulsie van 1 % olie in kweekmedium.

En de tijdsduur van behandelen was meestal 2, 4 en 6 uur.

In fig. 6 zie je weer de gebruikelijke blots, om apoptose aan te tonen met anti-U1-70K of necrose met anti Topo I.

Op blot 6A en B zit materiaal van cellen behandeld met D4 olie, voor 2,4 of 6 uur, in concentraties van 1%, 0,3 % of 0,1 %.

Bij 1% zie je al na 2 uur effect ( bandje bij 40K op blot 6A ), bij 0,3 % pas bij 4 uur en bij 0,1% nog geen effect bij 6 uur.

Op blot 6 C en D zit materiaal van cellen behandeld met D5 olie, voor 6, 9 of 16 uur, in dezelfde concentraties.

Hier zie je pas na 6 uur , bij concentratie 1%, effect. ( 40K op blot 6C)

Op blot 6 E en F zit materiaal van cellen behandeld met D6 olie.

Hier zie je na zelfs 30 uur behandeling nog geen effect.

Zoals gezegd is al dit onderzoek gedaan in Jurkat cellen. Dit zijn T-lymphocyten , die los in het kweekmedium drijven en dus makkelijk hanteerbaar zijn.

We wilden ook weten of we hetzelfde effect zouden zien in andere celsoorten. In het lab wordt veel gebruik gemaakt van HeLa cellen. Deze groeien niet los, maar als een laagje op de bodem.

Als je bij deze cellen Anisomycine , H2O2 of D4 olie doet, zie je onder de microscoop ook veranderingen. ( fig.7) Bij “Mock”zie je hoe de cellen er normaal uitzien.

We hebben dit ook op eiwitniveau bekeken, weer met de gebruikelijke blots, evenals een andere cellijn: Hep-2 cellen. ( fig. 8).

Op deze blots zie je dat ook de HeLa cellen een (zwak) zwart bandje heeft bij 40K, na 7 uur.

Bij de Hep-2 cellen gebeurt dit niet, zelfs niet na 17 uur.

Verschillende celsoorten reageren dus verschillend op aanwezigheid van D4 olie.

Uiteraard moet er nog meer onderzocht worden naar het effect van siliconen olie op weefsels en cellen in het lichaam en wat voor gevolgen dit heeft voor het immuun systeem.

**Maar het is nu wel duidelijk dat met name D4 siliconen olie wel degelijk een effect kan hebben, dat het een soort tussenvorm tussen apoptose en necrose (beide betekenen hoe dan ook verlies van gezonde cellen) kan veroorzaken, en daardoor gezondheidsstoornissen, inclusief immuniteitsstoornissen zou kunnen doen ontstaan.**