

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/39295> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Polman, J.A.E.

Title: Glucocorticoid signature in a neuronal genomic context

Issue Date: 2016-05-10

Chapter Eight

Samenvatting

Tijdens het dagelijkse leven wordt het lichaam geconfronteerd met interne en externe stimuli (ook wel stressoren genoemd) die de homeostase dreigen te verstoren. Het lichaam reageert op deze stimuli door een stressrespons te initiëren, die tot stand komt door activatie van het sympatisch zenuwstelsel en de hypothalamus-hypofyse-bijnier (HHB) als resulterend in de afgifte van respectievelijk adrenaline en corticosteroïde hormoon (CORT) uit de bijnier. CORT dringt gemakkelijk door in de hersenen en koppelt terug op die hersenstructuren die betrokken zijn bij de ontwikkeling van de stressrespons. Dit betreft o.a. de hippocampus, een limbische hersenstructuur die van belang is voor de context waarin de stress respons ervaren is. In de hippocampus bevordert CORT leer- en geheugenprocessen. Voor dit doel bindt CORT aan twee nauw verwante receptortypen, de glucocorticoïd receptor (GR) en de mineralocorticoïd receptor (MR), waarna de receptoren migreren naar de celkern waar ze de transcriptie van CORT-responsieve genen kunnen regelen. Terwijl MR betrokken is bij het onderhouden van de basale activiteit van het stress-systeem, de inschatting van de betekenis van de stressor en het starten van de stressreactie, zorgt GR voor het herstel na de stress respons en de gedragsadaptatie. Uiteindelijk is de gebalanceerde activatie van de receptoren een belangrijke factor in neuronale exciteerbaarheid en stressresponsiviteit.

De laatste jaren is veel kennis verzameld betreffende de CORT-responsieve genen. Echter, deze inventarisaties zijn een mix van primaire CORT-responsieve genen en van genen die indirect door MR en GR gereguleerd worden, waarbij het niet mogelijk was deze twee groepen te onderscheiden. Dankzij innovatieve technologieën, die resulteerden in de eerste ChIP-seq studies, werd het mogelijk om bindingsplaatsen van transcriptiefactoren te identificeren in het gehele genoom. Het doel van deze thesis was om de bindingsplaatsen van GR en ook MR in het genoom in een neuronale context te onderzoeken. Tevens zijn de functionele implicaties van met name de GR binding aan deze genomische locaties onderzocht. Hiervoor zijn 4 specifieke doelen geformuleerd die behandeld worden in Hoofdstukken 2 t/m 5.

Doel I: “Een *in silico* benadering gebruiken om neuronaal-specifieke GREs in het genoom te voorspellen en experimenteel te valideren”.

GR kan dimerizeren en als zodanig kan het glucocorticoïd-responsieve elementen (GREs) in het DNA herkennen en binden waardoor de expressie van genen kan worden gereguleerd. GRE-afhankelijke processen zijn belangrijk in de hersenen, omdat bij muizen waar GR niet kan dimerizeren en als zodanig niet kan binden aan GREs, hippocampale exciteerbaarheid en ruimtelijk geheugen aangetast zijn. De GREs die verantwoordelijk zijn voor de GR-werking *in vivo* in de hersenen zijn grotendeels onbekend. Daarbij hoeft GR-binding aan een GRE niet altijd te leiden tot een functioneel effect. In **hoofdstuk 2** is de ontwikkeling van een Positie Specifiek Score Matrix (PSSM) beschreven van 44 GREs die toegepast is om de aanwezigheid van

evolutionair-geconserveerde GREs te voorspellen. Met deze matrix zijn grote genomische regio's gescand die zich rond neuronale CORT-responsieve genen bevinden. In de rat hippocampus zijn 15 van de 32 voorspelde GREs geïdentificeerd waarvan tenminste 10 GREs nieuw zijn. Verder zijn in sequenties rondom de GREs, GR-box geassocieerde motieven geïdentificeerd. Dit karakteristieke bindingsprofiel was afwezig in een andere dataset afkomstig van een ander weefsel. Deze vondst is een aanwijzing dat GREs gebruikt kunnen worden voor het vaststellen van een weefsel-specifieke CORT werking. Concluderend, zien we onze huidige bevindingen als een eerste stap naar een beter begrip van CORT werking in de hippocampus.

Doel II: “Het identificeren van genomwijde GR-bindingsplaatsen (GBS) *in vitro* in neuronale PC12 cellen en *in vivo* in rat hippocampus door het toepassen van CHIP-seq en het identificeren van responsieve genen die zich in de buurt van deze GBS bevinden”.

GR kan direct binden aan GREs of indirect aan het genoom via interacties met transcriptiefactoren. Deze twee mogelijkheden, die respectievelijk transactivatie en transrepressie worden genoemd, resulteren in de regulatie van een grote hoeveelheid genen die belangrijk zijn voor neuronaal functioneren. Ondanks het feit dat veel kennis al beschikbaar was aangaande genen die differentieel tot expressie komen na activatie van GR, waren de primaire genomische bindingsplaatsen van GR nog niet onderzocht in een neuronale context. In **hoofdstuk 3**, is een genoombrede analyse van GBS in neuronale PC12 cellen beschreven. Op het moment van publicatie was dit de eerste inventarisatie van GBS in een neuronale context. De meerderheid van de PC12 GBS die uniek waren voor dit celmodel bleken gelokaliseerd te zijn bij genen met een bekende neuronale functie. **Hoofdstuk 4** betreft een analyse van genomische GBS in de rat hippocampus na een acute CORT puls. In beide hoofdstukken is een hoge prevalentie van intragene GBS aangetoond waarvan de meerderheid gelokaliseerd is in intronen. In **hoofdstuk 3** en **4** laat een motiefanalyse zien dat de GRE het meest voorkomende motief is. Dit is een aanwijzing dat GR-binding aan specifieke locaties in het DNA via transactivatie een belangrijk mechanisme is van GR om genexpressie te regelen.

In **hoofdstuk 3** en **4** is de ontdekking gerapporteerd van een motief voor Zbtb3 in de GBS, die in PC12 cellen alleen voorkwam in de niet-GRE bevattende GBS, wat aangeeft dat het een nieuwe transrepressie partner van GR in een neuronale context zou kunnen zijn (**hoofdstuk 3**). Echter bij de rat hippocampus werd Zbtb3 alleen geïdentificeerd in de GRE-bevattende GBS, wat een nieuwe transactivatie partner van GR impliceert (**hoofdstuk 4**). In de rat hippocampus waren de GBS die een combinatie van GRE and Zbtb3 bevatten geassocieerd met genen die betrokken zijn bij regulatie van apoptose, regulatie van transcriptie, regulatie van macromoleculaire metabole processen en het insuline receptor werkingsmechanisme. Interessant genoeg zijn deze processen allemaal gekoppeld aan de mTOR signaalcascade. Con-

cluderend kan gesteld worden dat het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 3** en **4** inzicht heeft verschaft in nieuwe aspecten van glucocorticoïdwerking via GR in een neuronale context. Ook al is het niet mogelijk gebleken alle geïdentificeerde GBS en de nieuw veronderstelde transactivatie en transrepressie partners te valideren, deze inventarisatie is van belang voor verder onderzoek naar glucocorticoïdwerking in een neuronale context. Het begrijpen hoe GR de werking van glucocorticoïden in een neuronale context tot stand brengt is belangrijk gezien de grote effecten van glucocorticoïden op neuronale plasticiteit en uiteindelijk op hersenfunctie.

Doel III: “Onderzoek naar het bindingsprofiel van MR en GR aan GBS van het hippocampus genoom als functie van de CORT concentratie”.

In de hersenen bindt CORT aan MR en GR. Terwijl GR tot expressie komt in iedere hersencel, is de expressie van MR beperkt tot met name de limbische hersenstructuren. Beide receptoren verschillen in hun affiniteit voor CORT; MR heeft een tien maal hogere affiniteit voor CORT dan GR. Hierdoor zal GR geactiveerd worden bij een hogere concentratie circulerend CORT, zoals tijdens stress, en zal MR al reeds geactiveerd zijn onder basale niet-stressvolle condities. De activatie van beide receptoren is een belangrijke determinant voor neuronal exciteerbaarheid en stress responsiviteit. De GR kan als dimeer binden aan GREs die aanwezig zijn in het DNA en transactivatie induceren. Verder is bekend dat GR via binding aan andere transcriptiefactoren transrepressie van door stress-geïnduceerde signaal cascades kan bewerkstelligen.

Kennis over de MR-interactie met het genoom is schaars, met name in de hersenen. In **hoofdstuk 4** hebben we gekeken naar hippocampale GR-gebonden GBS die geïdentificeerd zijn in mannelijke bijnierloze ratten die verschillende doseringen van de GR-agonist CORT, variërend van 3 tot 3,000 µg/kg intraperitoneaal toegediend hebben gekregen. Verder hebben we het vermogen van MR om te binden aan deze GBS geanalyseerd. Het blijkt dat afhankelijk van de CORT concentratie, 2 verschillende groepen GBS worden gerecruteerd. De lage-CORT groep laat GR-binding zien aan GBS bij 30 µg/kg, die verder toeneemt bij hogere CORT concentraties. In de hoge-CORT groep is GR-binding aanwezig na het injecteren van 3,000 µg/kg maar niet bij lagere concentraties CORT. MR-binding is in beide groepen al verzadigd bij 30 µg/kg.

Concluderend wijzen de resultaten op het bestaan van 2 verschillende populaties van GBS in het rat hippocampale genoom die onderscheiden kunnen worden op basis van de mate van CORT binding. Verder bindt de MR aan een selectie van GBS. De gelijktijdige binding van GR en MR aan dezelfde GRE-bevattende GBS kan heterodimerisatie van GR en MR impliceren.

Doel IV: “Onderzoek naar het effect van acute CORT toediening op de mTOR signaalcascade in ratten die blootgesteld zijn aan chronische stress.”

De mTOR signaalcascade speelt een centrale rol in de controle van translatie en heeft langdurige effecten op de plasticiteit van specifieke hersengebieden. Of een lage of hoge mTOR activiteit beter is voor het neuronaal functioneren is onduidelijk en hangt af van de context en de timing van de stressvolle stimulatie die de signaalcascade beïnvloedt. mTOR is van belang voor langetermijnpotentiëring (LTP) en geheugenvorming, terwijl het ook met de handhaving van cellulaire homeostase in verband is gebracht. Het is bekend dat de mTOR signaalcascade door een groot aantal extracellulaire stimuli geactiveerd wordt. Echter, deze kennis is met name gebaseerd op het perifere systeem en is minder goed bestudeerd in de hersenen.

In **hoofdstuk 5** is beschreven dat de mTOR signaalcascade direct door CORT gereguleerd wordt in de gyrus dentatus van de rat hippocampus. Verder wordt aangetoond dat ratten die blootgesteld zijn aan chronische stress, een hoger basaal mTOR eiwitniveau hebben in de hippocampus in vergelijking met controle dieren. Echter, mTOR eiwit was drie uur na een acute CORT injectie verlaagd in de chronisch gestresste dieren. Onder deze condities komen de regulatoren van de mTOR cascade differentieel tot expressie. Voorts is de GR-binding gevalideerd bij de mTOR regulatoren DDIT4 en FKBP51. Concluderend, het blijkt dat de mTOR cascade in de rat hippocampale gyrus na chronischestress in aanzienlijke mate onderdrukt wordt door een acute toediening van CORT.

Conclusie

In deze thesis zijn de primaire genomische bindingsplaatsen van MR en GR geanalyseerd binnen een neuronale context. Door ChIP-sequencing te gebruiken zijn er duizenden GBS geïdentificeerd in neuronale PC12 cellen en in de rat hippocampus. Nieuwe transactivatie en transrepressie partners zijn geïdentificeerd waarmee GR potentieel in staat is om neuronaal-specifiek gentranscriptie te regelen. Twee GBS-populaties zijn aangetoond, die afhankelijk van de CORT concentratie door GR gebonden worden. Verder is vastgesteld dat MR bindt aan een selectie van GBS. Tenslotte is aangetoond dat in de rat hippocampus met name na chronische stress de mTOR cascade sterk onderdrukt wordt na een CORT toediening.

Tesamen dragen deze bevindingen bij aan een beter inzicht in de interactie van de GR en MR met het genoom in een neuronale context.

