

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28734> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Zalachoras, Ioannis

Title: Targeting the brain under stress : selective glucocorticoid receptor modulation

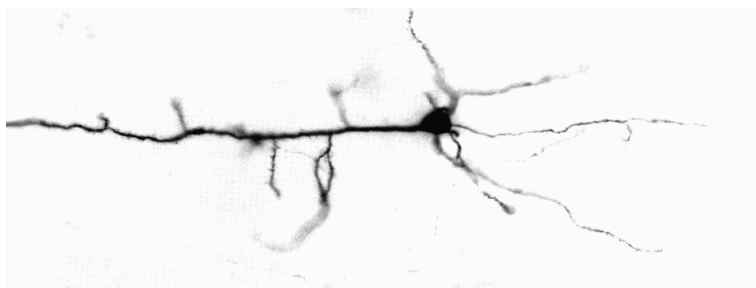
Issue Date: 2014-09-17

Chapter

Summary

Samenvatting

7



Summary

The hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and its glucocorticoid end product orchestrate the stress response, which is crucial for adaptation and survival. The main effectors are glucocorticoid hormones, which act via by the mineralocorticoid receptors (MRs) and glucocorticoid receptors (GRs) and involves modulation of gene expression. Here we focus on the GR. One target gene of the GR is the *Crh* gene, which is expressed in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and the central nucleus of the amygdala (CeA). In the PVN, GR mediates the feedback action of the glucocorticoids on stress-induced CRH synthesis and release, while in the central amygdala the glucocorticoids are involved in the regulation of expression of emotional states.

Given the pleiotropic effects of glucocorticoids, treatment with GR agonists or antagonists may be accompanied by side effects. Therefore, the ability to modulate specific GR-dependent pathways may provide an opportunity to develop more selective drugs. One possibility of increased selectivity might be to target proteins that interact with the GR.

In order to mediate the genomic effects of glucocorticoids the GR often needs to operate in synergy with other proteins (coregulators) that are involved in transcriptional modulation. Steroid receptor coactivator 1 (SRC-1) is a coregulator of the GR that is necessary for the regulation of *Crh* expression. Its two isoforms SRC1a and SRC1e are encoded by the *Ncoal* gene. SRC-1a lacks a SRC-1e specific exon. The two isoforms differ in their activities and distribution in the brain: SRC-1a is more abundant in the PVN and can potentiate repression at the *Crh* promoter, whereas SRC-1e is more abundant in the CeA and lacks repressive capacity.

In this thesis studies are reported aimed to modulate the function of the GR by targeting GR-coregulator interactions. To achieve this goal, we used two different approaches. Firstly, we manipulated the splicing of SRC-1 with antisense oligonucleotides (AONs) administered in the CeA to change the relative expression of the two SRC-1 splice variants. Secondly, we used two novel GR ligands that allowed certain GR-coregulator interactions while preventing others, thus resulting in a mixed GR-coregulator interaction profile, which exhibited a spectrum of both agonist and antagonist activities.

In **chapter 1** the role of the HPA axis was introduced with focus on the effects of glucocorticoids on the regulation of *Crh* expression and the function of the amygdala. Moreover, we introduced the possibility to manipulate gene expression and splicing by antisense oligonucleotides for the study of the importance of GR-coregulator interactions.

In **chapter 2** we described the validation of the antisense-mediated exon skipping of SRC-1 *in vivo* in the CeA, in terms of cellular uptake, efficacy and potential immunostimulatory effects. After a single injection with either a control AON or saline in the mouse CeA, we investigated the uptake by neurons and possible immune responses induced by this treatment in the brain. The results showed that AONs were readily taken up by neurons in the brain and there were no differences between AONs and saline with regard to the elicited immune responses

following a single injection in the CeA.

Subsequently, we investigated the effects of an AON targeting the SRC-1e specific exon on the expression ratio of the two SRC-1 splice variants. Using laser microdissection, the cells that had taken up AONs were collected and the expression of SRC-1a, SRC-1e, total SRC-1 and GR was quantified with qPCR. Our results showed that the SRC-1e specific AON treatment resulted in an increased SRC-1a:SRC-1e expression ratio, three and seven days post-injection. This shift in favour of SRC-1a was not accompanied by differences in expression of total SRC-1, SRC-2 or GR in the CeA.

These results indicate that AON-mediated exon skipping is an efficient method to manipulate the splicing of the *NcoA1* gene with limited adverse effects.

In **chapter 3**, we described the effects of shifting the expression ratio of SRC-1a:SRC-1e in favour of SRC-1a, in the CeA, on behavior and regulation of *Crh* expression by glucocorticoids. We found that animals injected with the AON targeting the SRC-1 specific exon showed higher locomotion in an open field test, which was positively correlated with the SRC-1a:SRC-1e expression ratio. We also observed impaired contextual fear memory consolidation in a fear conditioning paradigm. The differences in behavior were observed despite the lack of effects on HPA axis activity either at basal conditions or after exposure to a stressor. Moreover, SRC-1 exon skipping completely blocked the dexamethasone-induced *crh* expression in the CeA. The expected downregulation of *crh* expression in the PVN in response to dexamethasone was still present suggesting that an altered SRC-1a:SRC-1e expression ratio in the CeA does not affect *Crh* expression in the PVN.

The effects on behavior, particularly on fear memory consolidation, and (foremost) the abrogation of dexamethasone-induced upregulation of *Crh* expression in the CeA suggest a differential sensitivity of the CeA to glucocorticoids as a result of the manipulation of SRC-1 splicing. In conclusion, targeted changes of the available pool of coregulators may result in preferential activation or repression of specific pathways in the brain.

In parallel, we tried to selectively modulate glucocorticoid responsive pathways with pharmacological manipulations of the GR. In **Chapter 4** the experiments were reported with a novel selective GR ligand (C108297). We tested the effects of C108297 on GR-coregulator interactions, gene expression in the hippocampus, HPA axis activity, *Crh* expression in the CeA and PVN, as well as adult neurogenesis and fear memory consolidation. We found that C108297 showed agonism and antagonism, but in different pathways. It induced a mixed GR-coregulator interaction profile, allowing some of the interactions while inhibiting others. C108297 had agonistic effects on fear memory consolidation, as well as weak agonistic effects on the regulation of the HPA axis in response to stress. On the other hand, C108297 showed antagonism on the expression of *Drd1a* in the hippocampus and it blocked the effects of corticosterone treatment on adult neurogenesis. Taking into account the mixed properties of C108297, we can conclude that the compound acts as selective modulator rather than an agonist or antagonist.

The pharmacological profile of C108297 suggests a potential improvement over the current

treatment regimens with GR antagonists. Its lack of affinity for other nuclear receptors may exclude some of the adverse effects associated with the current GR antagonists such as RU486. Moreover, the mixed agonist and antagonist effects indicate the differential impact of C108297 on different GR-dependent pathways, which may also result in a more specific regulation. Taken together, the current results provide a proof-of-principle for the use of selective GR ligands to limit the effects of hypercortisolemia.

In **chapter 5**, the findings with another novel GR ligand (C118335) were described. C118335 lacks affinity for the progesterone receptor, but has retained low affinity for the MR. C118335 induced a distinct GR-coregulator interaction profile. Most of the interactions were blocked. However, in contrast to the classical antagonist RU486, it did not recruit corepressors, but induced, to some extent interactions with SRC-1 NR-boxes. Interestingly, C118335 induced considerable interactions with the SRC-1a specific NR-box. At the functional level, C118335 had antagonistic effects on the regulation of gene expression by glucocorticoids in the hippocampus and the striatum, while it impaired fear memory consolidation. Despite its antagonist properties, C118335 did not lead to disinhibition of the HPA axis under mild stress.

Similarly to C108297, C118335 may also represent an improvement to current therapeutic agents in relation to hypercortisolemia, although the effects of the two compounds differ significantly, particularly regarding their effects on memory consolidation and gene expression. Nevertheless, the weak MR affinity of C118335 may also be relevant in such conditions.

Finally, in **chapter 6**, we attempt a synthesis of the concepts presented in this thesis. A model emerges where GR-coregulator interactions have a prominent role in the modulation of GR-dependent pathways. These interactions can be, in turn, modulated in two different ways: either via manipulation of the availability of coregulators or their splicing (chapters 2 and 3), or by treatment with ligands that can alter the recruitment of coregulators by the GR (chapters 4 and 5). In this process, antisense-mediated manipulation of splicing was shown to be an effective experimental tool to study gene function in the brain (chapter 2). Moreover, a step was made towards the clarification of the *in vivo* role of the two SRC-1 splice variants in relation to regulation of *crh* expression and fear memory consolidation (chapter 3).

In addition, two novel compounds were tested, both of which had distinct properties compared to GR agonists or the GR antagonist RU486. C108297 (chapter 4) acted as a selective modulator with agonist as well as antagonist properties. C118335 (chapter 5) showed antagonism in most functions tested. In conclusion, the approaches described here may offer new possibilities for the targeted modulation of GR-dependent pathways in the brain.

Samenvatting

Glucocorticoïd hormonen reguleren als eindproduct van de hypothalamus-hypofyse-bijnier (HPA) as de reactie op stress die cruciaal is voor aanpassing en overleven van het organisme. Deze hormonen oefenen doorgaans hun werking uit door binding aan mineralocorticoïd receptoren (MR) en glucocorticoïd receptoren (GR) via modulatie van genexpressie. Ons werk heeft vooral betrekking op de effecten die via de GR tot stand komen.

Omdat glucocorticoïd hormonen vele processen in het hele lichaam beïnvloeden, kan toediening van GR agonisten (activatoren) en antagonist (blokkers) met veel bijwerkingen gepaard gaan. Modulatie van specifieke GR-afhankelijke signaaltransductie biedt een mogelijkheid om selectief werkende glucocorticoïden te ontwikkelen. Daartoe zouden eiwitten, die specifieke glucocorticoïd effecten bij GR-activatie tot stand brengen, beïnvloed moeten worden. Voor de GR effecten die via gentranscriptie verlopen is daarvoor de klasse van *coregulator* eiwitten van groot belang.

Het eiwit Steroïd Receptor Coactivator-1 (SRC-1) is zo'n coregulator. SRC-1 is van belang gebleken voor specifieke effecten die via GR verlopen in de hersenen. Het betreft regulatie van het *Crh* gen, dat codeert voor *corticotropin releasing hormone* (CRH) dat de reactie op stress orkestreert. In de nucleus paraventricularis van de hypothalamus leidt GR-activering tot onderdrukking van CRH, in het kader van negatieve terugkoppeling binnen de HPA as. In de centrale nucleus van de amygdala leidt GR-activering juist tot stimulering van CRH productie, en dit is van belang voor expressie van emoties. Zonder SRC-1 vindt noch de stimulatie noch de remming van CRH door glucocorticoïden plaats.

Het SRC-1 eiwit komt in twee varianten voor, SRC-1a en SRC-1e. Dit zijn zogenaamde *splice* varianten van hetzelfde gen, het *Ncoal* gen (voor 'nuclear receptor coactivator 1'). Het vóórkomen van deze twee varianten verschilt tussen hersengebieden. SRC-1a is veel aanwezig in de hypothalamus, waar het de expressie van het *Crh* gen onderdrukt. SRC-1e komt relatief meer voor in de amygdala en blijkt niet in staat tot onderdrukking van het *Crh* gen.

De doelstelling van het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven is, was om de functie van GR te moduleren door de interactie met specifieke coregulatoren te manipuleren in de hypothalamus en amygdala van proefdieren. Hiertoe zijn twee benaderingen gebruikt. Ten eerste hebben we de verhouding tussen de hoeveelheid SRC-1a en SRC-1e gemanipuleerd met '*exon skipping*'. Kleine stukjes DNA (*antisense oligonucleotiden* of AONs) zijn hiertoe toegediend in de amygdala van muizen om het 'splicing' proces te beïnvloeden en daarmee de GR-transductie sterker via de SRC-1a variant te laten verlopen. Ten tweede hebben we twee nieuwe synthetische steroïden gebruikt die selectief binden aan de GR. Waar GR bezetting door lichaamseigen hormonen ('volle agonisten') leidt tot een groot aantal GR-coregulator interacties, staan de twee nieuw gebruikte verbindingen maar een klein aantal van dergelijke interacties toe. Dat leidt tot een GR-coregulator profiel dat het midden houdt tussen dat van een agonist en een antagonist van de receptor. Daarmee bootsen deze stoffen sommige aspecten van glucocorticoïdwerking na, maar kunnen ze andere effecten blokkeren.

In **hoofdstuk 1** is de rol van de HPA-as bij aanpassing aan stress beschreven, met nadruk op de effecten die glucocorticoïd hormonen hebben op de regulatie van het *Crh* gen, en de functie van de amygdala. Bovendien wordt het principe van manipulatie van genexpressie via ‘exon skipping’ besproken in het kader van het onderzoek naar stress en GR functie.

In **hoofdstuk 2** is de werkzaamheid en eventuele ongewenste bijwerkingen beschreven van *exon-skipping* na AON-behandeling in het muizenbrein. Na één injectie van AONs in de centrale nucleus van de amygdala, zijn de effecten 3, 7 en 14 dagen na de injectie vastgesteld. De AONs bleken opgenomen te worden in de zenuwcellen en er werd niet meer schade of aspecifieke weefselreacties waargenomen dan wanneer er een fysiologisch zout oplossing toegediend werd. De bepaling van de werkzaamheid werd gedaan door met de *laser microdissectie* techniek kleine hoeveelheden weefsel te verzamelen, waarin door fluorescente de opname van AONs gemarkeerd was. In dat weefsel werd de expressie (het vóórkomen) van mRNA coderend voor de relevante SRC-1 varianten en voor totaal SRC-1 mRNA bepaald met de kwantitatieve PCR techniek. De resultaten lieten zien dat het zinnig is om de *exon-skip* methode te gebruiken teneinde de rol van SRC-1 varianten in het muizenbrein te onderzoeken.

In **hoofdstuk 3** zijn vervolgens de effecten beschreven van een veranderde verhouding tussen de SRC-1a en SRC-1e varianten in de amygdala (ten gunste van SRC-1a) op stress-gerelateerd gedrag *per se*, en op de gevoeligheid van de centrale amygdala voor glucocorticoïd hormonen wat betreft expressie van het *Crh* gen, en gedragseffecten van deze hormonen.

De dieren hadden na behandeling met AONs veranderde gedragsreactiviteit in een ‘open veld’ test, en ook minder herinnering aan een aversieve situatie in een klassiek conditioneringsexperiment. Deze gedragsveranderingen gingen evenwel niet gepaard met verschillen in hormonale stressreactie. Opmerkelijk was dat na AON behandeling de dieren in het geheel niet meer reageerden op behandeling met glucocorticoïden, wat betreft regulatie van het *Crh* gen in de amygdala. Ook gedragsveranderingen die in controle-dieren gezien werden na hormoonbehandeling traden niet op na *exon-skipping*.

Deze resultaten laten zien dat de beschikbaarheid van coregulatoren bepalend is voor de effecten van glucocorticoïden op stress-circuits in het brein. Omdat coregulatoren specifiek betrokken zijn bij een deel van de effecten die uitgeoefend worden via de GR, betekent dit dat de effecten van het glucocorticoïd hormoon cortisol *gestuurd* kunnen worden door manipulatie van de beschikbaarheid van coregulatoren.

In **hoofdstuk 4** is als alternatief voor de *exon-skipping* de farmacologische aanpak beschreven. Hiertoe is een nieuwe selectieve ligand van de GR gebruikt, de synthetische verbinding C108297. Aan de hand van de moleculaire interacties die optraden tussen de GR en verschillende coregulator eiwitten, kon voorspeld worden dat deze stof een zogenaamde *selective modulator* is, die zowel agonisme als antagonisme kan vertonen, afhankelijk van het specifieke proces. Hier is dus niet de beschikbaarheid van coregulatoren in de cel bepalend, maar de affiniteit van de door ligand gebonden receptor voor specifieke coregulatoren.

C108297 bleek inderdaad zowel als agonist als antagonist te werken op GR-afhankelijke genexpressie in de hippocampus van de rat. Er was sterk agonisme bij consolidatie van

angstherinneringen, zwak agonisme op de activiteit van de HPA-as, maar functioneel antagonisme op *Crh* expressie in de amygdala en neurogenese in de hippocampus.

Dit zijn de eerste resultaten die laten zien dat ‘selectieve modulators’ van de GR werkzaam kunnen zijn in hersengebieden die betrokken zijn bij de aanpassing aan stress. Zulke stoffen kunnen nuttig zijn om de effecten van glucocorticoïden beter te begrijpen, maar ook om – waarschijnlijk eerder dan de AONs die gebruikt werden in de eerder beschreven proeven – in klinische omstandigheden met een mate van selectiviteit GR-afhankelijke processen te beïnvloeden bij stress-gerelateerde ziekte.

In **hoofdstuk 5** is een andere nieuwe GR ligand, C118335 beschreven. Ook deze stof induceert een uniek interactie-profiel tussen de GR en haar coregulatoren. De interacties lijken op die van de meest gebruikte antagonist (mifepristone of RU486), maar suggereren een hogere mate van agonisme via interacties met enkele coregulatoren. Bovendien heeft C118335 ook affiniteit voor de MR.

Functioneel werkte C118335 met name als antagonist wat betreft regulatie van klassieke GR-afhankelijke genen in de hippocampus en het striatum. De stof had een verrassend sterk remmend effect op consolidatie van angstherinneringen. Ondanks dit antagonisme, werd geen ontremming van de HPA-as waargenomen.

C118335 is daarmee een ‘selectieve modulator’ met een meer antagonist-achtig werkingsprofiel, die evenwel geen duidelijk antagonisme laat zien op de HPA-as. Ook kunnen stoffen als deze experimenteel en – mogelijk – klinisch gebruikt worden om ongewenste effecten van hoge cortisolspiegels tegen te gaan, waarbij een groot aantal zowel MR- als GR afhankelijke effecten geblokkeerd zullen worden.

Ten slotte heb ik getracht in **hoofdstuk 6** tot een synthese te komen van de concepten die in eerdere hoofdstukken gepresenteerd zijn. Centraal hierbij is het idee dat GR- (en MR-) coregulator interacties selectief te activeren zijn, en dat daarmee gewenste en ongewenste effecten van glucocorticoïden te scheiden zijn, ook die effecten die via één receptortype gemedieerd worden. Dit principe is op twee manieren aangetoond.

Eén specifieke manier is om coregulator-beschikbaarheid te beïnvloeden via *exon-skipping*, lokaal in de hersenen. De specificiteit betreft hier echter met name het GR-signaal dat beïnvloed wordt, omdat de coregulatoren vaak ook voor andere signaaltransductie processen van belang zijn. Een andere meer grofmazige manier is het gebruik van selectieve receptormodulators. Hierbij wordt van alle mogelijke mechanismen die via de receptor verlopen een deel geactiveerd, en een ander deel niet. Deze laatste benadering is misschien minder specifiek dan het manipuleren van één bepaalde coregulator, maar waarschijnlijk gemakkelijker toe te passen in het onderzoek en – wellicht – de kliniek. Beide benaderingen zijn evenwel uitermate geschikt om de rol van MR en GR bij aanpassing aan stress te onderzoeken, en bieden derhalve duidelijke aanknopingspunten om nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen die van betekenis kunnen zijn bij de behandeling van stress- en glucocorticoïd-gerelateerde ziekten.

