



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Expression and function of nuclear receptor coregulators in brain: understanding the cell-specific effects of glucocorticoids**

Laan, S. van der

### **Citation**

Laan, S. van der. (2008, November 6). *Expression and function of nuclear receptor coregulators in brain: understanding the cell-specific effects of glucocorticoids*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13221>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13221>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

# CHAPTER VIII

SAMENVATTING

Het was de Franse fysioloog Claude Bernard (1813-1878) die het concept van het ‘interne milieu’ bedacht. Aan de hand daarvan formuleerde de baanbrekende Amerikaanse fysioloog Walter Cannon (1871-1945) aan het begin van de 20<sup>ste</sup> eeuw het principe van ‘homeostase’ voor levende organismen. Hij leidde de vakterm als volgt in: ‘de gecoördineerde fysiologische reacties die de evenwichtstoestanden in het lichaam behouden zijn zo complex, en zo eigenaardig voor levende organismen, dat er een bepaalde aanduiding voor deze toestanden gebruikt dient te worden- homeostase’ (1929). Als homeostase wordt bedreigd, zoals het geval is bij acuut gevaar, wordt er bij de meeste zoogdieren een hormonale kettingreactie vanuit de hersenen geïnitieerd, de zogenaamde hypothalamus hypofyse bijnier as (HPA-as van hypothalamus pituitary adrenal axis in het Engels). Activering van deze as leidt tot een verhoging van de bloedspiegel glucocorticoïd hormonen die onder andere het terugkeren naar de evenwichtstoestand bevorderen door bijvoorbeeld neuroplasticiteit die ten grondslag ligt aan gedragsmatige aanpassingen in de hersenen te stimuleren.

Het toenemend besef dat glucocorticoïden betrokken zijn bij het ontstaan van talrijke neurologische en andere aandoeningen vormt een sterk argument om verder inzicht te vergaren in de werkingsmechanismen van deze hormonen op lichaamseigen processen (homeostase) en het functioneren van de hersenen. Glucocorticoïden oefenen de meeste van hun effecten uit door binding aan intracellulaire receptoren die op hun beurt genexpressie beïnvloeden (transcriptie factoren). Een opmerkelijk en toch onverklaard fenomeen dat ruim twee decennia geleden beschreven werd, is de celspecifieke effecten van glucocorticoïd hormonen op genexpressie in specifieke gebieden in de hersenen. Terwijl verhoogde hormoonniveaus de synthese van het ‘corticotropin-releasing hormone’ (CRH) in de hypothalamus onderdrukken, wordt tegelijkertijd de productie van hetzelfde gen CRH in de amygdala juist bevorderd. Aangezien de expressie van de intracellulaire corticosteroid receptoren in de hersenen al bestudeerd zijn en dat deze de gevonden effecten niet in zijn geheel kunnen verklaren, is het van belang om de rol van onlangs ontdekte ‘coregulators eiwitten’ in dit kader te bestuderen. Deze coregulators oefenen invloed uit op de aard en de mate van gen transcriptie. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift bestudeert de expressie en de functie van coregulators in de hersenen van knaagdieren en in cellijn. Bovendien is er een techniek ontwikkeld die rekrutering (interacties van verschillende eiwitten op het DNA) van coregulators eiwitten door de corticosteroid receptoren in hersenweefsel mogelijk kan maken.

Ten eerste wordt er in hoofdstuk 2 de mate van expressie van de twee eerst ontdekte en functioneel verschillende corepressoren (d.w.z. N-CoR en SMRT) in de hersenen en hypofyse van knaagdieren beschreven. Duidelijke verschillen in relatieve mRNA en eiwit expressie werden aangetoond in hersengebieden die nauw betrokken zijn bij de regulatie van de HPA-as, bijvoorbeeld in de paraventriculaire nucleus van de hypothalamus (PVN: een van de gebieden waar het CRH gemaakt wordt). In de kernen van hippocampale zenuwcellen is er gevonden dat N-CoR en SMRT colocaliseren in dezelfde eiwitcomplexen hoewel ook complexen die uitsluitend N-CoR of SMRT bevatten werden ontdekt. Tegen de verwachtingen in, is bovendien N-CoR immunoreactiviteit in het cytoplasma van piramidale neuronen in de frontale cortex en in enkele hippocampale zenuwcellen waargenomen, hetgeen hoogst waarschijnlijk aanduidt dat N-CoR ook een andere rol uitoefent dan het moduleren van gentranscriptie. De bevindingen beschreven in dit hoofdstuk ondersteunen de gedachte dat deze coregulators eiwitten ten grondslag liggen aan de cel specifieke effecten

van glucocorticoïd hormonen in de hersenen. Met name omdat er verschillen in de mate van expressie tussen deze twee functioneel verschillende coregulatoren is gevonden.

Gebaseerd op de bovengenoemde verschillen in expressieniveaus van beide corepressoren in de hersenen en eerder beschreven expressieniveaus van SRC1, worden er in hoofdstuk 3 de effecten van deze coregulatoren beschreven met betrekking op de transcriptionele activiteit van de GR op een endogeen responsief gen: CRH. Aan de hand van het model dat in 1999 door Szapary en collega's werd beschreven is verondersteld dat coactivatoren en corepressoren tegenovergestelde effecten zouden veroorzaken op de mate van GR gedreven transcriptie. Dit zou betekenen dat overexpressie van corepressoren een verschuiving van de dosis-response curve naar rechts zou moeten veroorzaken terwijl coactivatoren een verschuiving naar links teweegbrengen. In AtT20 cellen, een bewezen modelstelsel voor het bestuderen van GR-afhankelijke onderdrukking van het menselijke CRH gen, veroorzaakte corepressoren overexpressie geen verschil in de mate van GR-afhankelijke repressie van het gen, maar, resulteerde wel in een vermindering van de cAMP geïnduceerde stimulatie van het gen. SRC1a overexpressie verhoogde zowel de effectiviteit als de potentie van de glucocorticoïd geïnduceerde repressie, terwijl SRC1e een tendens vertoonde om de repressie juist te verminderen. De resultaten benadrukken het belang van de aanwezigheid van SRC1a voor CRH gen regulatie in de PVN.

Omdat *in vivo* de timing van activering van de twee voornaamste signalen betrokken bij het reguleren van het CRH gen sterk kunnen verschillen, is er in hoofdstuk 4 gekeken naar de invloed van de volgorde van activering van de signalen op de activiteit van de CRH promotor. Inductie van de promotor van het CRH gen via de stof forskoline (FSK) wordt op efficiënte wijze door de GR onderdrukt in het geval dat het synthetische glucocorticoïd dexamethason tegelijkertijd of snel na FSK behandeling wordt aangebracht. Echter, een kleine vertraging in het tijdstip van het aanbrengen van dexamethason had als gevolg een sterk verminderde onderdrukking door de GR van de cAMP gestimuleerde promotor. Omdat de cAMP en GR response elementen (CRE en GRE) in de promotor dicht bij elkaar zijn is er gesuggereerd dat dit effect veroorzaakt wordt door sterische hinder, i.e. dat delen van moleculen in de weg zitten voor andere delen of voor elkaar. Ter zijde van de hoeveelheid en het type coregulatoren dat aanwezig is in de nabijheid van de CRH promotor (zie hoofdstuk 3), is de timing van de activering van de twee signalen ook een belangrijke factor voor zowel stimulatie als repressie van het CRH gen in de PVN.

Om interacties en rekrutering van coregulatoren op het DNA *in vivo* te kunnen bestuderen, wordt er in hoofdstuk 5 onderzocht of het glucocorticoïd-induced leucine zipper (GILZ) gen een mogelijke kandidaat-gen is voor chromatine immunoprecipitatie experimenten (ChIP) op hersenweefsel. In vrijwel alle cellen in de hersenen werd GILZ mRNA gemeten en toediening van corticosteron aan ratten veroorzaakte een significante verhoging van de mRNA expressie niveaus. Tot dusver zijn de GILZ promotor en de locatie van de GREs exclusief bestudeerd in de context van humane cellijnen. Vergelijking van de nucleotide sequentie (opbouw van het DNA) van de humane en rat promotor toonde aan dat er relatief weinig overeenkomst is tussen beide sequenties (57%). Belangrijker nog, de tot dusver ontdekte GREs in de humane proximale promotor bleken niet of alleen deels aanwezig te zijn in de rat sequentie. Door middel van ChIP-scanning experimenten is er gezocht naar GR bindende gebieden binnen de 5kb opwaarts van de transcriptie start site. De gevonden gebieden zijn vervolgens

onderzocht door de 5kb sequentie te doorzoeken met met behulp van een ‘position-weight’ rooster (bioinformatica). Op deze wijze zijn twee waarschijnlijke GREs ontdekt in exact de promotor gebieden waaraan GR bindt. Door deze techniek te gebruiken kunnen belangrijke aspecten zoals interacties tussen coregulatoren en de corticosteroïd receptoren (GR en MR) eiwitten op het DNA in specifieke hersengebieden worden bestudeerd.

De resultaten beschreven in dit proefschrift dragen bij aan de huidige kennis over de neurobiologie van de ‘stress respons’ en kunnen mogelijk een bijdrage leveren aan het ontwerpen van veiliger en selectieve glucocorticoïden met minder bijwerkingen. Zowel de biologische als de farmaceutische aspecten van de resultaten worden in hoofdstuk 6 uitgebreid besproken.