

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29602> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Groeneweg, Femke Lokke

**Title:** Corticosteroid receptor dynamics : analysis by advanced fluorescence microscopy

**Issue Date:** 2014-11-06

---

# Addendum

---

- I English summary
- II Nederlandse samenvatting
- III Curriculum Vitae
- IV Publication list

---

## English summary

---

**S**TRESS has many faces. A balanced activation and suppression of our stress system enables a highly adaptive response to disturbances in homeostasis. But when this balance is disrupted, for example when stress responses are not terminated properly, stress acts as an important risk factor for a large number of diseases. These diseases range from obesity, heart and cardiovascular problems to psychiatric disorders including major depression and posttraumatic stress disorder. Key to understanding the cause of the shift from adaptive towards detrimental effects is a comprehensive understanding of the different players and phases involved in the stress response and their interactions.

In this thesis, I focus on the actions of the corticosteroid hormones: corticosterone and cortisol. Of note, I use the term corticosteroids throughout this thesis only in referral to corticosterone, cortisol and their synthetic analogues (the term officially also includes mineralocorticoids). Corticosteroids are one of the main hormones released from the adrenals during stress. They exert their cellular actions through binding to two receptor types: the glucocorticoid receptor (GR) and the mineralocorticoid receptor (MR). The receptors have two distinct modes of action. They translocate to the nucleus upon activation, where they act as transcription factors and bind directly and indirectly to the DNA, regulating overlapping sets of stress-responsive genes (i.e. genomic actions). Recently, a small subpopulation of each receptor has been postulated to be present at the plasma membrane. This subpopulation is essential for rapid corticosteroid actions (i.e. non-genomic actions). In this thesis I aimed to explore further finesses in the cellular dynamics of the MR and GR in both their membrane-associated and their nuclear subpopulations. I specified three specific aims which are addressed in *Chapters 2 till 6*.

### **Aim I “To investigate the multitude of non-genomic effects of corticosteroids in different brain areas and to explore how these fit within the onset of the stress response”**

In *Chapter 2* we evaluated the current state of knowledge on the non-genomic actions of corticosteroids through membrane-associated receptors and their relevance for brain functioning. Many non-genomic actions have been described in the hypothalamus and limbic brain areas. Interestingly, like the genomic steroid actions, the vast majority of these effects are conditional; i.e. they increase or decrease the threshold for neuronal activation. This implies that only in those brain areas that are also activated by the context of the stressor, the non-genomic actions will affect neuronal activity. The non-genomic actions of corticosteroids are followed up by genomic actions at a later time point: this results in diverse temporal patterns of enhanced or decreased excitability between brain areas. These temporal patterns correlate well with rapid corticosteroid modulation of neuro-endocrine output and behavior. Finally, we addressed the current state of knowledge regarding underlying signaling cascades of these corticosteroid effects and listed the main caveats in the current knowledge. For example, the regulation of MR and GR translocation to the membrane is still elusive, as is the proportion of the membrane population involved.

### **Aim II “To set up *in vitro* models to show the presence and function of a distinct membrane-associated population of the MR”**

Corticosteroids rapidly affect the excitability status of neurons in multiple brain areas. These actions arise from a membrane-localized receptor, but only bits and pieces of the signaling cascades are known. In this regard, it would be very valuable to establish a functional *in vitro* model that enables manipulations of the system and thereby investigations of the downstream and upstream molecular pathways. In *Chapter 3* we mimicked a functional non-genomic corticosteroid effect in a neuronal-like cell line. Potassium A-type currents have previously been shown to be inhibited by corticosterone in a non-genomic, membrane-initiated and MR-dependent manner within the hippocampus. We studied this same effect in the neuronal-like cell line: NS-1 cells. NS-1 cells show large potassium currents, including A-type currents. Only after MR-transfection, corticosterone induced a > 25 % reduction in A-type current amplitudes, while no effect was seen in control-transfected cells. We could replicate this effect with a membrane-impermeable corticosterone-BSA conjugate. In contrast, the slowly-inactivated potassium currents in NiE-115 cells were not affected by corticosterone in the presence of the MR. The MR is thus sufficient for a rapid inhibition of A-type potassium channels by corticosterone and this effect is specific for certain subtypes of potassium channels.

With EM microscopy a subfraction of the MR has been shown at the plasma membrane where it functions as non-genomic corticosteroid receptor. However,

this fraction of membrane-associated MR is very small compared to the bulk of cytoplasmically localized MR and conventional imaging methods fail to show the existence of this fraction. In *Chapter 4* we imaged the putative membrane-associated fraction of the MR using TIRF microscopy. In TIRF microscopy a thin wavefield is created that excites fluorophores in a 60–100 nm sheet from the coverglass. This includes all membrane-associated molecules, but excludes the majority of cytoplasmic proteins. We imaged YFP-tagged MR using conventional wide-field (only cytoplasm) and TIRF microscopy (highly enriched for membrane-associated molecules) and assessed protein dynamics in both imaging modes using single-molecule microscopy (SMM). We observed a > 1.5 fold larger fraction of slowly diffusing YFP-MR molecules in TIRF. This fits with the notion of an enrichment of membrane-associated molecules as these are known to diffuse very slowly. This effect was also replicated in a second cell line. We next applied hormones. Ligand activation has been shown to change the dynamics of most (membrane-associated) receptors. However, we did not observe any effect of short-term corticosterone treatment on YFP-MR's dynamics at the membrane. In conclusion, the combination of TIRF and SMM provides a strong suggestion for the existence of a membrane-associated MR fraction. Future studies and further manipulations will show whether this imaging approach is a valid method to distinguish between membrane-associated and cytoplasmic subpopulations of proteins.

### **Aim III “To characterize the chromatin binding dynamics of the MR and GR and to explore the effect of mutations within the receptors and different ligands on their nuclear dynamics”**

The GR and MR bind to the DNA and regulate gene transcription. This process is highly dynamic: the receptors do not stay bound to the DNA, but show only transient interactions. Quantification of these rapid processes has remained difficult and small errors in modelling presumptions have resulted in a large variability in outcomes between studies. New approaches such as SMM enable more precise quantifications of protein dynamics with a high temporal and spatial resolution. In *Chapter 5*, we assessed the intranuclear dynamics of the GR using both SMM and FRAP. Importantly, we found that this combination of approaches gave a very consistent quantification of the DNA-binding dynamics of the GR. We found that agonist-bound GR is diffusing throughout the nucleus for ~50% of the time, interspersed with transient DNA-binding events of ~0.5 seconds (~30%) and 2–3 seconds (~20%). GR deletion mutants devoid of DNA-binding showed predictably a stark reduction of these DNA-binding events. Similarly, when bound to an antagonist, the GR also showed a reduced frequency of DNA-binding events. In both cases, the receptor also showed faster diffusion, therefore, we presume that a third type of very short DNA-interactions were included in the diffusion coefficient. The GR thus shows (i) ultrashort (< 6 ms), short (~0.5 seconds) and long (2–3 seconds)

binding to the DNA. We presume that most of these DNA-interactions are nonspecific binding to the chromatin and only part of the longer binding events represent specific binding to GR-regulated genes. A final observation from these experiments was that subtle differences in agonist structure have a profound effect on the frequency and duration of DNA-binding events of the GR. The most potent agonists make more connections to the amino acids lining the ligand-binding pocket. This affects the conformational shift of the receptor and ultimately affects its affinity for DNA.

The MR and GR share very high sequence homology. They share part of their DNA binding sequences and part of their ligands, but there are also differences. For example, the MR binds both mineralocorticoids and corticosteroids and has  $\sim 10$ -fold higher affinity for the endogenous corticosteroids as the GR. In *Chapter 6*, we utilized the same combination of SMM and quantitative FRAP to assess the intranuclear dynamics of the MR. First, as for the GR we found that the combinational approach gave a highly consistent analysis of MR's DNA-binding dynamics. Also the MR, when bound to a potent agonist, spends approximately 50% of its time diffusing, and the remainder being transiently bound to the DNA. In correspondence to the GR, MR binds the DNA with ultrashort, short and long binding events. Also for the MR, small differences in agonist structure affected the MR's DNA-binding affinity. But, this effect was seen for different steroid side-groups, suggesting that different ligand-receptor interactions affect the conformational shift of the MR. Finally, when bound to the natural corticosteroids (cortisol or corticosterone) the MR shows more frequent and longer DNA-binding than the GR.

## Conclusion

In conclusion, in this thesis I explored further finesses in the cellular action of corticosteroids. Membrane-initiated and non-genomic actions of corticosteroids are shown throughout the brain and play an important role in the early phases of the stress response. With use of TIRF and SMM microscopy we found a strong indication that the MR is present in a detectable amount at the plasma membrane. Within the nucleus, we focused on the highly dynamic behavior of the GR and MR and we could quantify multiple nonspecific and specific DNA-binding events for both receptors. The finding that these DNA binding patterns are highly affected by specific ligand attributes is intriguing and calls out for further research.

## Nederlandse samenvatting

---

“ziekteverzuim neemt fors toe door stress”  
“stress verdubbelt kans op onvruchtbaarheid”  
“link tussen stress en verslaving”  
“6 jaar ouder door stress”

**Z**OMAAR wat koppen uit de krant. Stress wordt vaak gezien als iets negatiefs, iets ongezonds en als risicofactor voor allerlei ziektes en aandoeningen. En dat is waar: mensen die veelvuldig blootgesteld zijn aan stress of zelfs eenmalig aan zeer ernstige stress hebben een hoger risico op verschillende ziektes zoals hart- en vaat-aandoeningen en vele psychiatrische aandoeningen (bijvoorbeeld depressie of post-traumatisch stress syndroom). Maar dit is slechts één kant van de medaille. Ons stress-systeem is in de basis een systeem dat er voor zorgt dat wij heel snel en correct kunnen reageren als er een plotse dreiging wordt waargenomen. Pas wanneer de stress niet meer gehanteerd kan worden wordt de gezondheid bedreigd.

## De HPA-as

De allereerste reacties na stress komen van het sympatisch zenuwstelsel en de afgifte van adrenaline. De hartslag wordt verhoogd en energie wordt gemobiliseerd voor onmiddellijke actie: vechten of vluchten. Adrenaline verhoogt ook de algehele alertheid: de oren zijn gespitst.

Een tweede belangrijk systeem dat wordt geactiveerd tijdens stress is de HPA-as (*hypothalamic-pituitary-adrenal axis*). Deze as wordt zo genoemd omdat de activatie ervan loopt vanaf de hypothalamus in de hersenen, via de hypofyseklieer naar de bijnierschors. Activatie van de bijnier leidt tot productie van het stresshormoon cortisol bij de mens en het nauw verwante corticosteron bij de muis en de rat. Deze hormonen worden afgegeven aan het bloed waardoor ze alle organen en weefsels van ons lichaam bereiken.

De effecten van cortisol en corticosteron zijn veelzijdig. Al binnen enkele minuten zorgt cortisol voor een snelle reactie op de stressvolle gebeurtenis. Via activatie van verschillende hersengebieden zorgt cortisol bijvoorbeeld voor een verhoogde alertheid en een juiste inschatting van de situatie: moet ik vluchten, vechten of is er niets aan de hand? Deze onmiddellijke reactie is essentieel, maar wordt zelf schadelijk indien deze niet beteugeld wordt. Cortisol zorgt zelf voor deze beteugeling, dit gebeurt via activatie van nieuwe genen en deze effecten komen met een vertraging van een half uur tot zelfs enkele uren tot stand. Cortisol stimuleert ook het geheugen. Zo komt het dat we stressvolle gebeurtenissen veel beter onthouden dan de alledaagse routine. Cortisol is onderdeel van de familie der corticosteroiden. In de experimenten beschreven in dit proefschrift heb ik verschillende corticosteroiden gebruikt en ik zal vanaf hier steeds spreken over corticosteroiden als algemene term voor deze hormonen.

## Een balans in het stress systeem; vanaf de cel tot het organisme

Bij milde en niet te langdurige stress werkt het stress-systeem heel adaptief: het zorgt ervoor dat alle systemen die nodig zijn voor een snelle reactie 'aan' worden gezet terwijl alle systemen die niet direct nodig zijn even op een laag pitje staan. Maar in geval van langdurige of heel heftige stress kan de balans zoek raken. Dan wordt de stressreactie niet meer goed aangezet of (wat vaker voor komt) gaat hij niet meer goed uit als dit nodig is. Al decennia lang proberen onderzoekers erachter te komen hoe deze balans bijgestuurd kan worden.

In dit proefschrift draag ik een (klein) steentje bij aan dit onderzoek. Ik heb onderzoek gedaan naar de werking van corticosteroiden en enkele synthetische analogen. Hierbij heb ik mij met name gericht op de processen die zich afspelen in de cel. De effecten van corticosteroiden op celniveau bepalen uiteindelijk ook wat het effect zal zijn op het weefsel, orgaan en het hele organisme.



## Corticosteroiden in de cel

Corticosteroiden kunnen binden aan twee verschillende receptoreiwitten: de Mineralocorticoid Receptor (MR) en de Glucocorticoid Receptor (GR). Bijna alle cellen in ons lichaam bezitten de GR, terwijl de MR alleen in specifieke weefsels voorkomt.

De twee receptoren hebben ook twee verschillende werkingsmechanismes in de cel (geïllustreerd in Figuur 1). De meeste receptoren bevinden zich in het cytoplasma van de cel en zodra het hormoon bindt, verplaatst de geactiveerde receptor zich naar de kern. In de kern kunnen de receptoren direct binden aan het DNA. Binding van de receptoren zorgt ervoor dat nieuwe genen worden afgeschreven. Hierdoor worden nieuwe eiwitten geproduceerd, die uiteindelijk zorgen voor verdere effecten. Deze route geeft de **genomische effecten**. Deze effecten zijn pas met een vertraging zichtbaar, maar houden wel erg lang aan.

Een kleiner gedeelte van de receptoren bevindt zich op het membraan. Ook deze membraangebonden MR en GR worden geactiveerd door binding van corticosteroiden, wanneer ze geactiveerd zijn kunnen ze al bestaande eiwitten activeren. Dit geeft de **niet-genomische effecten**. Niet-genomische effecten zijn al binnen enkele minuten zichtbaar, maar houden korter aan.

## Doel van dit proefschrift

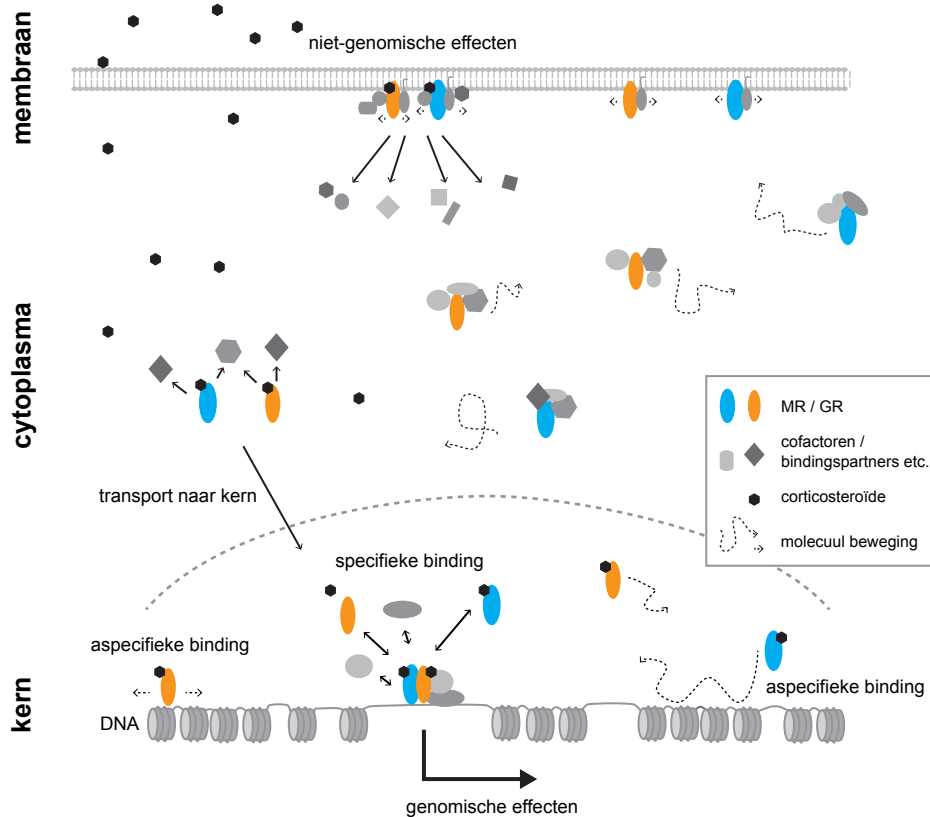
In dit proefschrift heb ik zowel de genomische als de niet-genomische effecten van corticosteroiden onderzocht, ik had hierbij 3 specifieke doelen.

- I Het evalueren van de verschillende niet-genomische effecten van corticosteroiden in de hersenen. Tevens om te beschrijven hoe deze passen binnen de stress reactie.
- II Het opzetten van *in vitro* modellen die gebruikt kunnen worden om de membraangebonden fractie van de MR te laten zien en te karakteriseren.
- III Het onderzoeken van de dynamiek van DNA-binding door zowel de GR als de MR. Tevens om te bepalen hoe deze dynamiek wordt beïnvloed door mutaties in de receptoren en door binding van verschillende liganden.

Deze specifieke doelen heb ik verder uitgewerkt in hoofdstukken 2 tot en met 6. In hoofdstuk 7 heb ik de belangrijkste bevindingen verder bediscussieerd.

## Fluorescentie-microscopie en single-molecule microscopie

Voordat ik de belangrijkste bevindingen uit dit proefschrift beschrijf eerst een korte uitweiding over de gebruikte technieken. In mijn onderzoek heb ik gebruik gemaakt van verschillende moleculaire technieken, maar voor het belangrijkste deel heb ik gebruik gemaakt van geavanceerde fluorescentie-microscopie. Hieronder leg ik een aantal basisprincipes van fluorescentie-microscopie en de gebruikte variaties hierop uit.



**Figuur 1: De dynamiek van corticosteroïd receptoren in de cel**

In dit proefschrift heb ik de functie en de dynamiek van de twee corticosteroïd receptortypen, de MR en de GR, onderzocht. De beweging, of dynamiek, van de MR en GR hangt samen met hun verschillende functies binnen de cel. Een aantal belangrijke bevindingen van mijn proefschrift zijn hier geïllustreerd. In afwezigheid van hormoon bevinden de meeste MR en GR moleculen zich in het cytoplasma van de cel. Ze zijn hier gebonden door hulpewitten (cofactoren) en ze bewegen grotendeels vrijelijk. Binding van het hormoon, bijvoorbeeld cortisol, leidt ertoe dat de receptoren zich naar de kern verplaatsen. In de kern bewegen de receptoren ook vrijelijk, maar gaan ze tevens korte bindingen aan met het DNA. DNA binding leidt tot immobilisatie van de eiwitten. In hoofdstukken 5 en 6 laten wij zien dat deze binding altijd kortdurend is, maar wel in verschillende vormen kan voorkomen. Aspecifieke bindingen met het DNA zijn zeer kort (millisecondes tot een halve seconde) terwijl langere bindingen (meerdere secondes) waarschijnlijk wijzen op specifieke binding van de receptor. Specifieke binding leidt tot gentranscriptie en tot de genomische effecten van corticosteroïden. Een kleiner gedeelte van de receptorpopulatie bevindt zich aan het celmembraan. Cofactoren helpen met de membraanbinding. In hoofdstuk 4 laten wij zien dat de membraangebonden MR langzamer beweegt dan in het cytoplasma of de kern. Cortisol binding aan de membraangebonden receptoren leidt tot snelle modificaties van eiwitten en tot de niet-genomische effecten van corticosteroïden. Welke verder staan beschreven in hoofdstukken 2 en 3.

Fluorescentie-microscopie gaat uit van fluorescerende moleculen. Dit zijn moleculen die de energie van een lichtbron (bijvoorbeeld een laser of een lamp van een specifieke golflengte) kunnen absorberen en als reactie zelf ook licht gaan uitstralen. Het bekendste fluorescerende eiwit is GFP (*green fluorescent protein*), dit eiwit

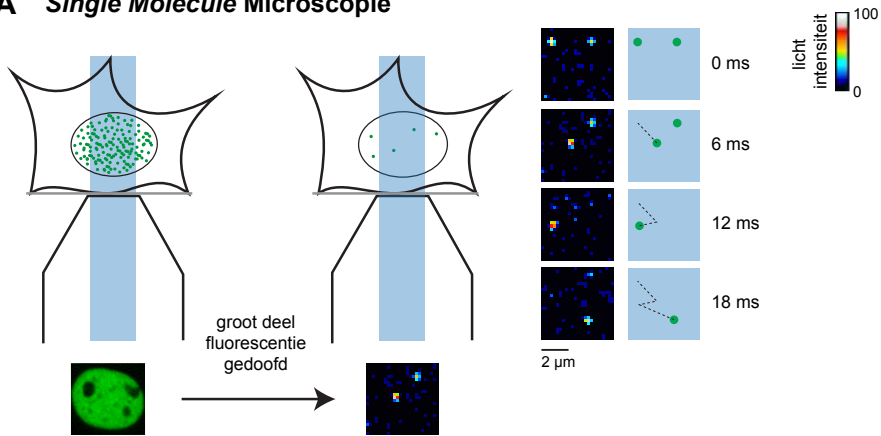
absorbeert blauw licht en straalt hierop zelf groen licht uit. Er zijn vele varianten op GFP ontwikkeld met andere kleuren. In dit proefschrift maak ik voornamelijk gebruik van YFP (*yellow fluorescent protein*) een eiwit dat geel licht uitzendt. Om de functie van de twee corticosteroid receptoren —de MR en GR— te onderzoeken heb ik deze receptoren gefuseerd aan YFP. Het resulterende eiwit —YFP-MR of YFP-GR— gedraagt zich als de MR of GR, maar dan zit er een fluorescerend deel aan vast.

Voor de experimenten in dit proefschrift heb ik veelvuldig gebruik gemaakt van een variatie op fluorescentie-microscopie: *single-molecule* microscopie. Hierbij worden individuele fluorescerende moleculen gevolgd over de tijd waardoor de beweging (dynamiek) van moleculen bestudeerd kan worden (geïllustreerd in Figuur 2A). Wij gebruikten hiervoor cellen die YFP-MR of YFP-GR bezitten. In elke cel zitten dan vele duizenden YFP-MR of YFP-GR moleculen. Om individuele moleculen van elkaar te onderscheiden moet eerst het overgrote gedeelte van de moleculen worden uitgedoofd. Dit wordt gedaan door de cel langdurig met de lichtbron te beschijnen. De meeste YFP moleculen doven dan uit. Zodra de dichtheid van de nog fluorescerende moleculen laag genoeg is kan met een zeer gevoelige camera de fluorescentie van deze individuele moleculen zichtbaar worden gemaakt. Wij maakten hiervan filmpjes met om elke 6 millisecondes een nieuwe foto. Een individueel molecuul kan dan op opeenvolgende foto's worden gevolgd en als het tijdens deze periode beweegt zien we het steeds op een andere plek terug. Met een pakket aan analysesoftware kunnen we de bewegingen van vele individuele moleculen samen analyseren en dit geeft ons een beeld van hoe deze moleculen bewegen.

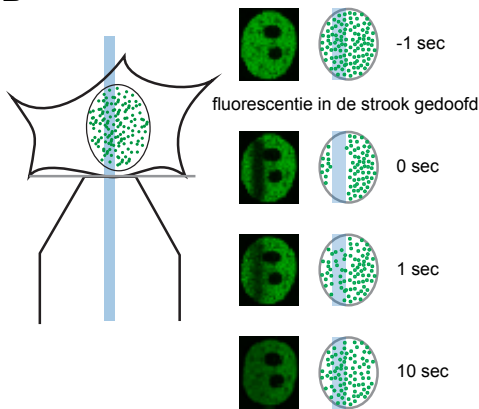
Een tweede methode om de dynamiek van fluorescerende moleculen te onderzoeken is FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*). Hierbij wordt een sterke laser gebruikt die fluorescerende moleculen uitdooft (*photobleaching*). Deze laser wordt maar op een deel van de cel gezet, dus alleen in dit stukje cel wordt de fluorescentie gedoofd en dit stukje wordt dan een tijdlang gevolgd. Omdat eiwitten bewegen zullen fluorescerende eiwitten uit andere delen van de cel zich verplaatsen naar het uitgedoofde gebied en zal er dus langzaam herstel van de fluorescentie gezien worden. Hoe sneller een eiwit beweegt, des te sneller zal het gebied weer opnieuw opgevuld worden met fluorescentie (zie Figuur 2B).

Een laatste variatie op fluorescentie-microscopie die wij hebben gebruikt is TIRF (*total internal reflection fluorescence*) microscopie. Bij TIRF-microscopie wordt de activatie laser in een scherpe hoek geplaatst waardoor het licht op het glas wordt gereflecteerd. Als reactie hierop wordt een dun energieveld gevormd. Dit energieveld reikt maar tot maximaal 100 nanometer diep en activeert dus alleen fluorescerende moleculen die zich in dit dunne veld bevinden. Wij hebben TIRF-microscopie gebruikt op cellen die bovenop het glas waren geplaatst. Cellen zijn meerdere micrometers dik en met TIRF-microscopie wordt dus alleen het onderste laagje van de cel belicht. Aangezien het membraan het laagste deel van de cel is worden met TIRF-microscopie alle fluorescerende moleculen in het (onderste) membraan be-

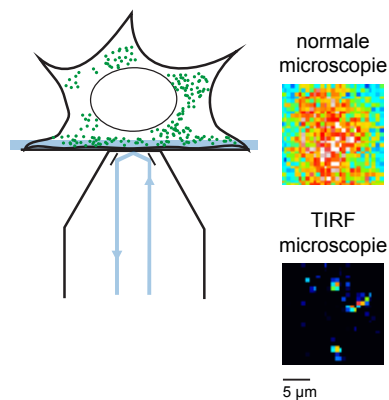
**A Single Molecule Microscopie**



**B FRAP**



**C TIRF microscopie**



**Figuur 2: Geavanceerde fluorescentie microscopie**

(A) *Single molecule* microscopie. Een fluorescerend eiwit (bijvoorbeeld YFP-GR) bevindt zich in de kern van een cel. Het fluorescentiesignaal van vele moleculen samen geeft een beeld van een volledige celkern (meest links). Voor *single molecule* microscopie wordt de cel eerst langdurig met een laser bestraald zodat de meeste fluorescentie uitdooft: slechts enkele nog fluorescerende moleculen blijven over. Met een zeer gevoelige camera wordt de fluorescentie van deze individuele moleculen zichtbaar gemaakt en gevolgd (figuur midden). Meest rechts zijn twee individuele YFP-GR moleculen afgebeeld: één zit gedurende 6 millisecondes op 1 plaats (en is daarna niet meer zichtbaar), de andere beweegt gedurende 18 millisecondes door de kern heen. (B) FRAP. Bij FRAP wordt een klein gedeelte van de celkern met een sterke laser beschoten zodat alle fluorescerende moleculen hier uitdoven. Daarna vindt vermenging plaats van nog fluorescerende moleculen uit andere gedeeltes van de kern en de uitgedoofde moleculen waardoor er nieuwe fluorescentie in het bestraalde gebied terugkeert. Hoe sneller een eiwit beweegt, hoe sneller dit herstel zal zijn. Rechts staat een voorbeeld van FRAP op YFP-GR. (C) TIRF-microscopie. TIRF-microscopie is een techniek om fluorescerende eiwitten bij het membraan te bekijken. Bij TIRF-microscopie komt de laser met een sterke hoek binnen, waardoor vrijwel alle energie van de laser terugkaatst het objectief in. Een klein deel van de energie komt aan het oppervlak vrij, slechts een tiende van een micrometer diep. Rechts ziet u voorbeelden van de fluorescentie van een membraangebonden eiwit eerst bekeken met 'normale' fluorescentie microscopie waarbij veel en diffuse fluorescentie te zien is en daarna is hetzelfde gebied met TIRF microscopie waarbij individuele moleculen te zien zijn en de hoge achtergrondfluorescentie is verdwenen.

licht samen met een klein stukje van het bovenliggende cytoplasma. Hierdoor krijgen we met TIRF-microscopie een grote verrijking van fluorescerende moleculen in het membraan ten opzichte van het cytoplasma (zie Figuur 2C).

### **Belangrijkste bevindingen van dit proefschrift**

Gedurende de laatste 20 jaar is er veel nieuw onderzoek gedaan naar de niet-genomische effecten van corticosteroiden. Voor het eerst werd gevonden dat deze snelle effecten ook via de MR en GR lopen en dat deze receptoren aan het membraan voor komen. In **hoofdstuk 2** evalueer ik de huidige kennis over de niet-genomische corticosteroid effecten in de hersenen. Voorts beschrijf ik de relevantie van deze effecten voor de stressreactie. Een belangrijke bevinding hierbij is dat deze niet-genomische effecten conditioneel zijn en werken als een neuromodulator. Dat wil zeggen dat ze zelf geen neurale activiteit veroorzaken maar wel de afgifte van een transmitter kunnen beïnvloeden of de gevoeligheid van neuronen voor activatie veranderen.

Het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de niet-genomische werking van corticosteroiden is slechts in beperkte mate onderzocht. In **hoofdstuk 3** hebben wij een niet-genomisch effect nagebootst in een *in vitro* cellijn. In hippocampale neuronen geeft een korte behandeling met corticosteron een inhibitie van één specifiek type kaliumkanaal: het A-type. Wij hebben laten zien dat ook de NS-1 cellijn een A-type kaliumstroom bevat. Na transfectie met de MR, leidt kortstondige behandeling met corticosteron tot een inhibitie van deze A-type kanalen in NS-1 cellen. In NS-1 cellen zonder MR heeft corticosteron geen effect. Bovendien vonden we dat corticosteron ook geen effect gaf op een ander type kaliumkanaal (langzaam inactiverend). Samengevat vonden we dat aanwezigheid van de MR voldoende is voor een niet-genomisch effect van corticosteron en dat dit effect specifiek is voor A-type kanalen.

In **hoofdstuk 4** beschrijf ik verder onderzoek naar de membraangebonden MR. Het is bekend dat een kleine fractie van alle MR moleculen aan het membraan geankerd zit, maar het is heel moeilijk om deze kleine fractie te onderscheiden van de veel grotere populatie MR moleculen die zich in het cytoplasma bevindt. In dit hoofdstuk vergeleken wij de dynamiek van YFP-MR moleculen tussen conventionele-microscopie (voornamelijk cytoplasma) en TIRF-microscopie (grote verrijking van membraan fractie). De dynamiek van YFP-MR werd gemeten met *single-molecule* microscopie. Met TIRF-microscopie werd een anderhalf maal grotere fractie aan zeer langzaam bewegende YFP-MR moleculen gevonden dan met conventionele-microscopie. Membraangebonden moleculen bewegen zeer langzaam, dus deze bevinding wijst erop dat er inderdaad een kleine membraangebonden fractie van YFP-MR bestaat (geïllustreerd in Figuur 1).

Zowel de GR en de MR kunnen direct aan het DNA binden. Deze bindingen zijn niet statisch: de receptoren binden het DNA steeds kort en laten dan weer los om kort erop weer opnieuw te binden. Het kwantificeren van deze bindingsdynamiek

is zeer lastig. In **hoofdstuk 5** gebruikten wij een combinatie van *single-molecule* microscopie en FRAP om de bindingsdynamiek van de GR aan het DNA te kwantificeren. Ten eerste vonden wij dat beide onafhankelijke technieken een zeer vergelijkbare kwantificatie van de DNA-bindingen van de GR gaven. In zijn geactiveerde vorm was op elk moment 50 % van de GR moleculen aan het DNA gebonden terwijl de resterende 50 % vrij bewoog. Met FRAP konden wij tevens de duur van de DNA bindingen kwantificeren en vonden bindingstijden rond de halve seconde (30 %) en tussen de 2 en 3 secondes (20 %). Niet-geactiveerde GR liet minder frequente en kortere DNA-binding zien en tevens een snellere diffusie. Deze laatste bevinding suggereert dat er in de bewegende fractie nog een derde zeer korte DNA-binding verstopt zit: bindingen van minder dan 6 millisecondes. Alles samen genomen kunnen we concluderen dat de GR binnen de kern veel korte —aspecifieke— bindingen met het DNA laat zien en slechts sporadisch voor langere tijd aan zijn specifieke bindingsplaatsen zit gebonden (geïllustreerd in Figuur 1).

In **hoofdstuk 6** hebben wij dezelfde combinatie van *single-molecule* microscopie en FRAP gebruikt om de bindingsdynamiek van de MR aan het DNA te bestuderen. Ook voor de MR vonden wij dat de geactiveerde receptor voor 50 % van de tijd aan het DNA gebonden zat. De frequentie en duur van deze DNA-bindingen was veel lager als de receptor met een antagonist was gebonden. De natuurlijke corticosteroiden —cortisol en corticosteron— hebben een hogere affiniteit voor de MR dan voor de GR. Dit leidt tot een verschil in bindingsdynamiek tussen de MR en de GR. Wanneer beide gebonden zijn door hun natuurlijke ligand laat de MR meer en langere DNA-binding zien dan de GR.

## Conclusie

In dit proefschrift heb ik onderzoek naar de cellulaire effecten van corticosteroiden beschreven. Ik heb hiervoor verschillende geavanceerde fluorescentie microscopie methodes gebruikt. Met TIRF en *single-molecule* microscopie heb ik sterke indicaties gevonden voor het bestaan van een membraangebonden fractie van de MR. De combinatie van FRAP en *single-molecule* microscopie gaf een zeer precieze kwantificatie van de bindingsdynamiek van zowel de GR als de MR aan het DNA. Hierbij kon ik onderscheid maken tussen frequente aspecifieke bindingen en minder frequente specifieke bindingen. Ook de bevinding dat verschillende hormonen een heel ander DNA-bindingsdynamiek van de MR en de GR aan het DNA laten zien is zeer interessant en kan de basis vormen voor verder onderzoek.

---

## Curriculum Vitae

---

Femke Lokke Groeneweg was born on the 21st of August, 1982 in Leiden, The Netherlands. She attended secondary school at the Leonardo Da Vinci College in Leiden and graduated in 2000. In the same year she started her Bachelor of Biology at the University of Utrecht. After graduating from her Bachelor in 2004 she enrolled in the Master's programme Neuroscience and Cognition, track of Experimental and Clinical Neuroscience at the Graduate School of Life Sciences at Utrecht University. This programme included two internships. In 2005 she performed a 9-month internship at the Rudolf Magnus Institute under supervision of Dr. Susanne la Fleur on the effects of a high fat, high-sugar diet on physiology and hypothalamic neuropeptide expression in rats. In 2006 she performed a 6-month internship at Columbia University Medical School in New York City, USA under supervision of Dr. Lu Cao and Prof. Joseph Gogos. The topic was the effect of between-cell competition on axonal arborization in olfactory neurons. During the same period Femke also enrolled in the excellence track "Xtrack" which she concluded with winning the first price for her research proposition. She obtained her Master's diploma with honors (*cum laude*) in 2007.

After graduation, Femke moved her studies back to Leiden and started working as a PhD student at the Department of Medical Pharmacology of the Leiden/Amsterdam Center for Drug Research at Leiden University and the LUMC. She studied the genomic and non-genomic cellular actions of corticosteroids through the glucocorticoid and mineralocorticoid receptors under supervision of Prof. Ron de Kloet and Dr. Marcel Schaaf (of the Department of Molecular Cell Biology at Leiden University). The results of her PhD research are reported in this thesis.

Since 2012 Femke works as postdoctoral researcher in the workgroup of Synapse and Network Development at the Institute of Neuroscience in Amsterdam, under supervision of Dr. Christian Lohmann. Femke is married and lives in Duivendrecht with her husband and daughter.

---

# Publication list

---

**Groeneweg F.L.**, Sierksma M., de Kloet E.R., van Noort J., Schmidt T.S., Schaaf M.J.M.

*A combination of wide-field and TIRF single-molecule microscopy as method to visualize the membrane-associated population of the mineralocorticoid receptor.* Manuscript in preparation

**Groeneweg F.L.**, van Royen M.E., Fenz S., Keizer V.I., Geverts B., Prins J., de Kloet E.R., Houtsmuller A.B., Schmidt T.S., Schaaf M.J.M.

*Quantitation of glucocorticoid receptor DNA-binding dynamics by single-molecule microscopy and FRAP.* PLoS One (2014) 9 (3): e90532

**Groeneweg F.L.**, Karst H., de Kloet E.R., Joëls M.

*Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signaling.* Molecular and Cellular Endocrinology (2012) 350 (2): 299-309

**Groeneweg F.L.**, Karst H., de Kloet E.R., Joëls M.

*Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response.* Journal of Endocrinology (2011) 209 (2): 153-167

Joëls M., **Groeneweg F.L.**, Karst H.

*Nongenomic cellular actions of corticosteroids in the brain.* Chapter in "The handbook of stress: neuropsychological effects on the brain". Blackwell publishing (2011) doi: 10.1111/b.9781444330236.2011.00008.x

La Fleur S.E., van Rozen A.J., Luijendijk M.C., **Groeneweg F.L.**, Adan R.A.

*A free-choice high-fat high-sugar diet induces changes in arcuate neuropeptide expression that support hyperphagia.* International Journal of Obesity (2010) 34 (3): 537-546



