

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19143> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Chatzopoulou Chatzi, Antonia

Title: Unraveling the glucocorticoid receptor pathway in zebrafish

Issue Date: 2012-06-26

Samenvatting

Signaling gemedieerd door de glucocorticoid receptor is essentieel voor het overleven en welzijn van de meeste gewervelde dieren, en het draagt bij aan het bestrijden van ontstekingen (voor een review **zie hoofdstuk 1**). De focus van dit proefschrift is dan ook om de biologische significantie en de werking van de GR op te helderen door middel van genetische manipulatie en stimulatie met synthetische glucocorticoïden (GCs). Als modelsysteem hebben we de zebravis gebruikt, die het mogelijk maakt om nauwgezette genetische, moleculair- en celbiologische experimenten uit te voeren. Als belangrijkste uitleessysteem hebben we transcriptoomanalyse gebruikt, omdat de GR een transcriptiefactor is. Het doel van het onderzoek was verder om de functie van deze veelzijdige signaalcascade te karakteriseren in zebravis, om dit diemodel op te zetten als systeem om zowel zeer gedetailleerd als high-throughput GR onderzoek te doen.

In **hoofdstuk 2** hebben we de rol van de zebravis GR α -isoform (zGR α) onderzocht in de modulatie van de immuunrespons na een verwonding. Hiervoor hebben we het staartvinamputatie-model gebruikt in drie dagen oude zebravis larven die na de amputatie met het synthetische GC beclomethason werden behandeld. Amputatie veroorzaakte migratiegedrag naar de plaats van verwonding voor neutrofielen en macrofagen, en veroorzaakte daarnaast de activatie van een groot aantal immuun-gerelateerde signaalroutes. Met behulp van microscopische en transcriptoomanalyse hebben we het GC effect op leukocytmigratie onderzocht en de transcriptionele activiteit van genen bestudeerd die een rol spelen in de door amputatie veranderde moleculaire netwerken. Onze resultaten laten zien dat behandeling van geamputeerde larven met beclomethason de migratie van neutrofielen remt, maar niet die van macrofagen. Daarnaast heeft GC behandeling een zeer algemeen dempend effect op de inductie van genexpressie na amputatie, zonder enige zichtbare specificiteit voor bepaalde signaalroutes. Deze resultaten laten zien dat het model van staartvin amputatie in zebravis larven gecombineerd met beclomethasonbehandeling goed de ontstekingsremmende werking van GCs nabootst, en dus een betrouwbaar modelsysteem is voor verder onderzoek naar de moleculaire mechanismen van GC signaling.

In **hoofdstuk 3** hebben we de specificiteit en functie van de zebravis GR α - en β -isoform (zGR α en zGR β) onderzocht. Zebravisembryo's werden geïnjecteerd met twee morfolino's die splice-sites blokkeerden (één die zowel zGR α als zGR β expressie omlaag reguleerde en één die de splice-site die tot zGR β expressie leidt blokkeerde) en met zGR β mRNA (wat tot zGR β overexpressie leidt). Embryo's werden behandeld met het synthetische GC dexamethason en vervolgens werd transcriptoomanalyse uitgevoerd met behulp van microarray technologie. Dit experiment maakte het mogelijk om drie vragen te beantwoorden. Ten eerste, welke specifieke genen worden door zGR α gereguleerd onder specifieke fysiologische condities? Ten tweede, heeft zGR β een dominant-negatieve werking heeft op de transcriptionele activiteit van zGR α ? Ten derde, welke genen worden specifiek gereguleerd door een mogelijk intrinsieke transcriptionele activiteit van zGR β ? Onze transcriptoomanalyse liet twee verschillende clusters van genen zien die werden gereguleerd door zGR α . Eén cluster, dat werd gereguleerd onder basale condities, en een dat werd gereguleerd na zGR α activatie door beclomethasonbehandeling. In het algemeen bevat het eerste cluster vooral genen die betrokken zijn bij de celcyclus terwijl het tweede cluster vooral genen bevat die een spelen in het metabolisme. Verder vonden we geen bewijs voor een dominant-negatieve werking van zGR β op de transcriptionele activiteit

van zGR α . Een intrinsieke transcriptionele activiteit van zGR β kunnen we op basis van deze resultaten niet uitsluiten, al zou hiervoor wel een hoog expressieniveau van deze splice variant nodig zijn.

In **hoofdstuk 4** hebben we een serie van experimentele benaderingen gekozen die het ons mogelijk maakte om de biologische significantie van de zGR β -isoform te bestuderen. In het bijzonder waren we geïnteresseerd in twee vragen. Ten eerste, veroorzaakt zGR β dominant-negatieve inhibitie op de transcriptionele activiteit van zGR α ? Ten tweede, laat zGR β intrinsieke transcriptionele activiteit zien, dus onafhankelijk van zGR α ? We hebben zGR β transiënt tot overexpressie gebracht door cellen te transfecteren met een zGR β expressievector. Luciferase reporter assays op getransfecteerde COS-1 cellen lieten een dominant-negatief effect zien van zGR β op de transcriptionele activiteit van zGR α . Echter, dit effect was niet te zien in zebrafish PAC2 cellen, wanneer we gebruik maakten van de inductie van het *fkbp5* gen als uitleessysteem. Daarnaast zagen we geen dominant-negatief effect van zGR β op de zGR α -geïnduceerde transactivatie van het *fkbp5*, *pepck* en *nfkbiaa* gen. Vervolgens hebben we een transgene zebrafishlijn vervaardigd met induceerbare overexpressie van zGR β . Gebruik makend van deze lijn werd transcriptoomanalyse met behulp van microarrays en qPCR validatie gedaan, en geen effect van zGR β overexpressie kon worden gedetecteerd (noch de dominant-negatieve activiteit, noch de intrinsieke transcriptionele activiteit). Door deze resultaten kunnen we stellen dat de zebrafish GR β -isoform geen regulerende rol heeft op transcriptie en dat splicing van het GR pre-mRNA tot een mRNA dat codeert voor zGR β een fysiologisch mechanisme zou kunnen zijn dat er enkel op gericht is de expressie van de klassieke GR α -isoform omlaag te reguleren.

In **hoofdstuk 5** worden de resultaten van de drie voorgaande hoofdstukken bediscussieerd om vervolgens conclusies te trekken over de validiteit van het zebrafish modelsysteem voor GC onderzoek en, nog belangrijker, de rol en activiteit van beide zGR splice varianten. Ons werk laat zien dat de zebrafish een betrouwbaar systeem is om de GR signaalroute te bestuderen, omdat in dit modelorganisme klassieke effecten van GR α activatie nagebootst kunnen worden als transactivatie van specifieke genen en de immuunsuppressieve werking. Verder heeft de transcriptoomanalyse, uitgevoerd op een compleet, intact organisme, een schat aan informatie opgeleverd over GR α -afhankelijke genexpressie onder verschillende fysiologische condities. Deze gegevens kunnen verder en in meer detail worden bestudeerd, om de biologische significantie, moleculaire eigenschappen en interacties van deze receptor te bestuderen in relatie tot specifieke fysiologische omstandigheden. Zo kunnen bijvoorbeeld verschillende vormen van ontstekingsreacties makkelijk worden gemodelleerd in zebrafish, om vervolgens de zGR α -gemedieerde regulatie van deze reactie geanalyseerd. Wat betreft de biologische functie van zGR β vinden we in onze data geen bewijs voor een dominant-negatieve rol van zGR β op de transcriptionele activiteit van zGR α , terwijl een intrinsieke transcriptionele activiteit niet kan worden uitgesloten.

