



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

**Genomic glucocorticoid signaling in the hippocampus:
understanding receptor specificity and context dependency**

Weert, L.T.C.M. van

Citation

Weert, L. T. C. M. van. (2021, November 16). *Genomic glucocorticoid signaling in the hippocampus: understanding receptor specificity and context dependency*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3240129>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3240129>

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

CHAPTER 7

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum vitae

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Als gevolg van stress worden stresshormonen aangemaakt in de bijnieren. Allereerst komt het snelwerkende adrenaline vrij, waarvan noradrenaline het equivalent is in de hersenen. Daarnaast worden met enige vertraging glucocorticoïden (corticosteron in knaagdieren en cortisol in de mens) afgegeven. De glucocorticoïd hormonen activeren twee vergelijkbare receptoren: de mineralocorticoïd receptor (MR) en de glucocorticoïd receptor (GR). Ondanks dat de MR en GR qua structuur op elkaar lijken, hebben ze interessant genoeg een verschillende en soms zelfs tegengestelde functie. Zo is de MR meer betrokken bij het begin van de stressrespons, namelijk de inschatting van een situatie en hoe daarmee wordt omgegaan. De GR speelt daarentegen een rol in de herstelfase, waaronder het verwerken en vastleggen van een stressvolle gebeurtenis in het geheugen. Veel van de effecten die MR en GR teweegbrengen, worden in gang gezet via het reguleren van genexpressie: de receptoren binden op het DNA en oefenen zo invloed uit op de mate van transcriptie van genen. Het is voor deze genomische effecten lange tijd niet bekend geweest in hoeverre bindingsplekken op het DNA overlappen voor MR en GR. Gezien beide receptoren in de hippocampus voorkomen en daar van cognitief belang zijn, leent dit hersengebied zich uitstekend voor het onderzoeken van zowel de MR en GR samen, als de GR in de context van een geheugentaak. In dit proefschrift zijn twee aspecten van de glucocorticoïd transcriptiebiologie bestudeerd: de manier waarop MR/GR-specificiteit wordt bereikt, en de rol van interactie met andere transcriptiefactoren (TFs).

De eerste onderzoekshoofdstukken (**Hoofdstuk 2, 3 en 4**) bestuderen de genomische interacties van MR ten opzichte van GR, en de gemeenschappelijke en specifieke transcriptionele effecten die door de twee receptor typen worden bewerkstelligd. In **Hoofdstuk 2** hebben we chromatine-immunoprecipitatie (ChIP) gevolgd door sequenzen (ChIP-seq) uitgevoerd, om genoom-wijde DNA-binding profielen voor MR en GR te bepalen. Dit werd gedaan in hippocampusweefsel van bijnierloze ratten die 60 minuten voor opoffering een corticosteron injectie toegediend hadden gekregen. Vergelijking van de MR- en GR-bindingsplekken resulteerde in 918 MR-exclusieve, 1450 GR-exclusieve en 475 MR-GR overlappende locaties op het DNA. Bepaling van de MR-bindingsplekken is gebaseerd op twee verschillende doses (0.3 mg/kg en 3.0 mg/kg) en er werd, in tegenstelling tot onze verwachtingen, beperkte overlap gevonden tussen de MR-bindingsplekken na toediening van de lagere versus hogere hoeveelheid hormoon. Met een ChIP-qPCR meting konden een aantal MR-exclusieve bindingsplekken worden bevestigd in een onafhankelijke groep van bijnier intacte dieren, ten tijde van hun

lichaamseigen corticosteron piek. Aangezien DNA-binding door MR/GR vervolgens ook tot modulatie van genexpressie moet leiden om consequenties te kunnen hebben op het functioneren van een (hersenen)cel, hebben we in **Hoofdstuk 3** gekeken naar geassocieerde transcriptionele effecten. Hierbij hebben we gefocust op bindingsplekken die zich in of dichtbij een gen (promotor regio) bevonden. Een selectie van MR-specifieke, GR-specifieke en MR-GR overlappende potentiële targets werden bestudeerd in een voorhersenen MR knockout (fbMRKO) model. In deze muizen werd een lagere expressie gevonden voor een aantal voorspelde MR-specifieke targets, voor het klassieke glucocorticoïd target gen *Fkbp5* en een aantal andere overlappende targets, en – verassend genoeg – ook voor twee voorspelde GR-specifieke target genen. Het meest robuuste effect werd gezien op mRNA niveaus van het MR-specifieke target *Jdp2*. Dit was (naast het panel van klassieke targets) het enige MR/GR-target dat reageerde (namelijk: hoger tot expressie kwam) bij verdere metingen in een model van restraint stress. We hebben daarmee *Jdp2* geïdentificeerd als bonafide hippocampale MR-specifiek target gen.

In de studies beschreven in **Hoofdstuk 2** hebben we ook de DNA-sequenties onderliggend aan de MR- en GR-bindingsplekken geanalyseerd. Nagenoeg alle locaties gebonden door MR en/of GR droegen bij aan *de novo* detectie van het glucocorticoïd respons element (GRE). Daarnaast waren we verrast door het feit dat alle MR-exclusieve locaties werden geassocieerd met een Atoh1 consensus site (behorend bij de groep van 'E-box sequenties'), welke niet werd gedetecteerd in de GR-exclusieve of MR-GR overlappende dataset. Op basis van hun aanwezigheid in de hippocampus stelden we de hypothese dat eiwitten van de NeuroD familie aan deze extra sequentie zouden binden. Door middel van CHIP-qPCR konden we inderdaad bevestigen dat *in vivo* Neurod2 gebonden was aan het DNA in de buurt van MR-exclusieve bindingsplekken. In daaropvolgende experimenten hebben we de in volwassenheid aanwezige NeuroD eiwitten (Neurod1, Neurod2 en Neurod6) bestudeerd in reporter assays gedreven door een promotor met een GRE en naastliggende Atoh1 bindingsplek (GRE-At). Deze experimenten werden uitgevoerd in HEK293 cellen, waaraan ook expressie plasmiden voor de receptoren toegevoegd moesten worden. Alle drie de NeuroD familieleden konden corticosteron-geïnduceerde transactivatie op dit construct potentiëren, voor zowel MR- als onverwachts ook GR-getransfecteerde cellen. Dit effect was niet afhankelijk van de N-terminus of de C-terminus van de MR/GR, zoals duidelijk werd bij het gebruik van ingekorte versies van de receptoren. De *in vitro* afwezigheid van specificiteit voor potentiëren van MR- ten opzichte van GR-signalering verklaarden we door het ontbreken van een neuronale chromatine/cellulaire omgeving. Zodoende vormden we de nieuwe hypothese dat

additionele factoren betrokken zijn bij een indirect effect van NeuroD op de glucocorticoid signalering. In **Hoofdstuk 4** hebben we het mechanisme onderliggend aan NeuroD-gemedieerde versterking van MR-signalering verder onderzocht. Allereerst lieten we door middel van ChIP-qPCR in fbMRKO dieren zien dat Neurod2-binding onafhankelijk was van MR-binding. Ook GR-binding werd niet beïnvloed door afwezigheid van MR voor de bestudeerde bindingsplekken, behalve een licht verhoogde GR-bezetting op de *Per1* promotor. Het doel van vervolggexperimenten was om te achterhalen welk deel van het NeuroD eiwit verantwoordelijk is voor het potentiëren van glucocorticoid signalering. Verschillende NeuroD-gerelateerde E-box binders (MyoD, Myf5 en een ingekorte MyoD variant) werden bestudeerd in onze (aangepaste) GRE-At reporter assay. MyoD was in staat om MR/GR-transactivatie te potentiëren wanneer het DNA-bindings domein was vervangen door dat van Neurod2, of wanneer de E-box sequentie in de luciferase promotor was aangepast om effectief MyoD te binden. Dit laatste construct werd verder bestudeerd in combinatie met de verschillende E-box binders. We lieten zien dat MyoD varianten inclusief een domein dat verantwoordelijk is voor chromatine hermodellering, maar ontbrekend aan een activatie functie voor directe aantrekking van transcriptionele machinerie, de capaciteit behielden om MR/GR-gemedieerde transcriptie te versterken. Onze algehele conclusie was dat NeuroD de MR-binding vergemakkelijkt in plaats van dat het GR-binding voorkomt, en dat chromatine hermodellering het drijvende mechanisme lijkt te zijn voor deze NeuroD potentiëring van MR-signalering.

De interactie tussen GR en andere TFs is voornamelijk bestudeerd in cellijn modellen. In **Hoofdstuk 5** hebben we *in vivo* op genoom-wijde schaal GR context-afhankelijkheid onderzocht, in een geheugen-relevant gedragsmodel. Hiertoe hebben we gebruik gemaakt van een object locatie geheugen (OLM) taak, waarin glucocorticoiden kunnen dienen als schakelaar om lange termijn geheugenvorming te induceren. Dit effect is echter afhankelijk van training-geïnduceerde noradrenerge signalering. Een van de TFs die geactiveerd (namelijk gefosforyleerd) wordt door noradrenaline is cAMP-responselement-bindend eiwit (CREB). Daarom hebben we de potentiële interactie van GR met pCREB geëvalueerd. In onze proefopstelling maakten vehicle-geïnjecteerde dieren geen onderscheid tussen de objecten. Corticosteron-geïnjecteerde dieren (3.0 mg/kg, subcutaan) daarentegen lieten een duidelijke voorkeur zien voor het object op de nieuwe locatie ten opzichte van het object op de vertrouwde locatie, dienend als maat voor geheugen. Vier behandelgroepen werden onderzocht op DNA-binding van de twee factoren: [1] niet getrainde vehicle-geïnjecteerde controledieren, [2] niet getrainde corticosteron-geïnjecteerde dieren om het effect van GR-activatie te observeren, [3]

OLM-getrainde vehicle-geïnjecteerde dieren om veranderingen in pCREB als gevolg van alertheid te observeren, en [4] OLM-getrainde corticosteron-geïnjecteerde dieren om het effect van gecombineerde CREB- en GR-activatie te observeren. In elk van deze groepen werd genoom-wijde binding van pCREB en GR in de hippocampus, op een tijds punt van 45 minuten na de injectie, gemeten door middel van ChIP-seq. We includeerden de meest robuuste pieken (d.w.z. welke aanwezig waren in 3/4 of 4/4 van de biologische replica's) in onze analyse. Interessant genoeg was de fractie van de gedetecteerde GR-pieken die een GRE bevatte in OLM-getrainde dieren lager ten opzichte van niet getrainde groepen, wat suggereert dat de wijze van GR-signalering wordt beïnvloed door training status. Pieken werden geanalyseerd voor verschillen tussen de behandelgroepen. Er werden slechts 6 bindingsplekken gevonden die differentieel bezet waren door pCREB. Dit heeft ons doen besluiten te focussen op de GR-binding data in de verdere analyse. Onder de GR-pieken bevonden zich 67 differentieel bezette bindingsplekken, voornamelijk als gevolg van corticosteron behandeling. Hiervan werden 20 bindingsplekken onafhankelijk van training status door het hormoon beïnvloed, terwijl 27 bindingsplekken specifiek waren voor niet getrainde dieren en 19 bindingsplekken specifiek waren voor OLM-getrainde dieren. Vervolgens bevestigden we corticosteron-gemedieerde genexpressieveranderingen op pre-mRNA niveau voor het klassieke target gen *Fkbp5*, evenals de nieuw geïdentificeerde GR-targets *Gjb6* en *Nsmf*. We hebben bewijs geleverd dat GR bindingsplekken, al dan niet als gevolg van interacties met pCREB, kunnen worden beïnvloed door blootstelling aan een trainingstaak.