**Corticosteron is half zo effectief in de translocatie van hGR als cortisol, mifepriston heeft geen antagonistische werking op cortisol, 17-AAG wel**

**1. Introductie**

Iedereen ervaart wel eens stress. Stress is een biologische reactie op gevaarlijke situaties. Stress moet er voor zorgen dat er juist gehandeld wordt tijdens een stressvolle situatie. Het stressgevoel komt deels tot stand door hormonen en diens effect op de genexpressie. In dit onderzoek verslag ligt de focus op hoe hGR(menselijke glucocorticoïden receptoren) reageert op “het stresshormoon” cortisol.

Ongeveer een vierde van de wereld heeft last van stemmingsstoornissen. Bij stemmingsstoornissen speelt stress een zekere rol (Criado-Marrero, Rein, Binder, Porter, Koren & Blair, 2017). Bovendien zijn er ook aanwijzingen gevonden dat hGR invloed heeft op depressie symptomen (De Kloet, 2014).

HGR verplaatst vanuit het cytoplasma naar de celkern waar het de genexpressie beïnvloedt (Bamberger, Wald, Bamberger& Schulte, 1997). Door onderzoek te doen naar manieren hoe de translocatie beïnvloed kan worden, kan nieuwe inzichten bieden in de behandeling van depressie en stemmingsstoornissen

Eerder onderzoek (Whitesell & Cook, 1996) heeft aangetoond dat 17-AAG(Geldanamycine) een antagonistische werking heeft op de translocatie van hGR. Een ander artikel stelt dat mifepriston een antagonist is van hGR(DeBattista & Belanoff, 2006). Ook wordt daarin gesteld dat hGR een rol speelt bij psychische aan doeningen en dat mifepriston in slaat lijkt te zijn psychische symptomen te verminderen. Uit eerder onderzoek van Raubenheimer, Young, Andrew & Seckl uit 2006 blijkt dat hGR een lagere affiniteit heeft voor corticosteron dan voor cortisol.

Aangezien de translocatie van hGR dus een rol speelt bij stress en psychische stoornissen en de stoffen 17-AAG, mifepriston en corticosteron een zeker effect uitoefenen op de mate van translocatie, is het nuttig om zelf te onderzoeken in hoeverre deze stoffen de translocatie van hGR beïnvloeden. In dit onderzoek is gekozen om de mate van translocatie van hGR te onderzoeken in HEK-293 cellen. Hiervoor zijn vijf condities ontworpen. Bij twee condities wordt er cortisol en een van de twee antagonisten toegevoegd, bij een conditie wordt corticosteron toegevoegd in plaats van cortisol en de overige twee condities zijn de positieve en negatieve controles.

De hypothese is dat bij toediening van 17-AAG of mifepriston de translocatie volledig uitblijft en dat bij de corticosteron conditie een deel van het hGR zal transloceren en een deel niet.

Om de hypothese te testen willen we de translocatie zichtbaar maken met fluorescentiemicroscopie. Dit willen we zichtbaar maken door een GFP(groen fluorescent proteïne) vast te maken aan hGR eiwitten. Bij de fluorescentiemicroscopie kan bepaald worden of er volledige, geen of gedeeltelijke translocatie op heeft getreden. Om het GFP aan het hGR eiwit te maken, maken we een plasmide met de genetische code voor GFP en hGR, zodat er na de transcriptie en translatie een fusie eiwit ontstaat. De cellen worden in gedeeld in types I,II en III. Hierbij is type I te herkennen aan een turquoise celkern en indiceert volledige translocatie binnen die cel. Type II is een cel met gedeeltelijke translocatie en heeft een turquoise celkern en een groen cellichaam.

De Type III cellen, cellen waarbij geen translocatie heeft plaats gevonden zijn te herkennen aan een groencellichaam zonder opvallend gekleurde celkern. Bij de negatieve, mifepriston en 17-AAG condities worden enkel type III cellen verwacht. Bij de corticosteron worden type II cellen verwacht en bij de positieve conditie worden enkel type I cellen verwacht.

**2. Materiaal en methode**

**2.1 Plasmiden**

Om onderzoek te doen naar de translocatie van hGR is een fusie-eiwit gemaakt van een hGR- en een fluorescerend GFP eiwit. Dit fusie-eiwit is gemaakt aan de hand van een fusie-plasmide. In het fusie-plasmide zijn de genetische codes voor beide eiwitten met sticky ends aan elkaar geplakt. Het ouderplasmide “pBluescript SK+ plasmide”, dit plasmide bevat de genetische informatie voor hGR. Het ontvangende plasmide wat gebruikt is, is het “pEGFP-C1” plasmide. Dit plasmide bevat de genetische informatie voor GFP en codeert voor resistentie voor het antibioticum kanamycine.

**2.2 Levend materiaal**

Tijdens het onderzoek is ook gebruik gemaakt van menselijke cellen,HEK-293(human embryonic kidney) cellen . Hierin vind de uiteindelijke translocatie plaats. Voor de transformatie van het fusie-plasmide zijn E.coli bacteriën gebruikt. De E.coli bacterien worden uitgeplaat op een peterischaal met een agar bodem met kanamycine(50µg/ml). De bacterien worden een dag op 37ºC geincubeert.

**2.3 Fusie plasmide creëren**

Eerst wordt de DNA-code voor hGR vermenigvuldigd door de PCR. Dit gebuurt met de forward T7 primer: 5’-TAATACGACTCACTATAGGG-3’ en de reverse T3 primer: 5’-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3’. Dit PCR product wordt gezuiverd. Vervolgens wordt er een dubbele restrictie digestie uitgevoerd op het pEGFP-C1 plasmide met de enzymen BamHI en XhoI. Zodat het hGR gen op de pEGFP-C1 plasmide geplaatst kan worden. Vervolgens zijn het gen en de plasmide van elkaar gescheiden doormiddel van gelelektroforese. Het hGR gen is 2342 bp groot en het overige plasmide is 4684 bp. Vervolgens is het hGR plasmide in het pEGFP-C1 geplaatst, voor de ligatie is Quick T4 ligase gebruikt.

**2.4 Transformatie en kolonie groei**

Het fusie-eiwit wordt in een suspensie gebracht met E.coli. Vervolgens nemen de bacteriën de fusie-eiwitten op, dit proces wordt opgang gebracht door een heatshock. Eerst wordt de plasmide-bacterie mix op ijsgeplaatst voor 20 minuten en vervolgens 45 in een 315,15 K waterbad geplaatst, waarna de mix weer op ijs wordt gezet. Hierna worden de bacteriën uitgeplaat op een bodem van LB agar met kanamycine (50µg/ml). Hier zullen de koloniën zich vermenigvuldigen.

**2.5 Transfectie voorbereiding en transfectie**

Na de incubatie van de E. coli worden de bacteriecellen vermenigvuldigd door middel van PCR. Hiervoor worden de forward hGR primer: 5’-AGATCCGCCACAACATCGAG-3’ en reverse hGR primer: 5’-TGATGGTTCACGTAGTGGGC-3’. Ook worden de HEK-293-cellen voorbereid, deze worden over 12-wells platen verdeelt. Op de bodem van de wells worden dekglaasjes geplaatst, hierop moeten de HEK-293 cellen hechten. Als de fusie-plasmiden geïsoleerd zijn en de HEK-293 cellen klaar zijn, dan worden deze bij elkaar gebracht en zal door endocytose de plasmiden opgenomen worden.

**2.6 Translocatie assay en fluorescentiemicroscopie**

Voor onderzoek naar de invloed van de agonisten wordt eerst de antagonist toe gediend. Voor mifepriston moet 1ml 1000nM worden toegevoegd per well, voor 17-AAG moet 1ml 10.000 nM worden gebruikt. Na een uur wordt 10 µL 10 µM cortisol oplossing toe gevoegd. Bij de corticosteron conditie wordt enkel, 10 µL 10 µM corticosteron oplossing toegevoegd. Bij de positieve conditie word enkel 10 µL 10 µM cortisol toegevoegd en bij de negatieve controle 10 µL water. Na een half uur incubatie worden de vloeistoffen weg gepipetteerd uit de 12-wells platen en worden de HEK cellen gereinigd. De volgende dag worden de preparaten bekeken een gefotografeerd, dit wordt zowel met een DAPI als met een GFP filter gedaan. Waarna de foto’s over elkaar geschoten worden. nu worden de cellen zichtbaar en kan bepaald worden of de translocatie compleet is de translocatie deels compleet is of dat er geen translocatie heeft op getreden.

**2.7 Analyse**

Eerst wordt met de Shapiro Wilks test bepaald of de data normaal verdeeld is. Vervolgens word de toets van Levene gebruikt om na te gaan of de variatie tussen de groepen significant is. Als de data parametrisch is wordt de ANOVA gebruikt, om na te gaan of de gemiddelde percentage van de condities significant van elkaar verschillen. Als de data non-parametrisch is wordt de Kruskal-Wallistoets gebruikt. Ook is er gebruik gemaakt van de Nemenyi test en de Tukey test om te kijken in hoeverre de groepen van elkaar verschillen.

**3. Resultaten**

Corticosteron brengt in ongeveer de helft van de gevallen volledige translocatie te weeg(mean=0.50) in vergelijking met de conditie waar enkel cortisol werd toe gediend(mean=0.98). Mifepriston lijkt niet de translocatie tegen te gaan(mean= 0.86). 17-AAG lijkt de translocatie wel te stoppen(mean= 0.06) de mean van de negatieve controle is namelijk (0.065)(figuur 1).



*Figuur 1 box plot van het percentage translocatie in de verschillende condities*

*Weergegeven is de gemiddelde hoeveelheid translocatie in decimalen, ook zijn de verdelingen van de kwartielen aangegeven net als de uitschieters(puntjes). Bij de negatieve controle is water toe gevoegd en bij de positieve controle is enkel de cortisol oplossing toe gevoegd. De mifepriston conditie verschilt significant met de negatieve conditie. De 17-AAG conditie verschild significant van de positieve conditie.*

De data van de corticosteron groep komt niet overeen met die van de positieve controle(p=0.0000094, α=0.05).De data van de mifepriston komt niet overeen met die van de negatieve controle(p =0.0000000, α=0.05) maar wel met die van de positieve controle(p=0.0675257, α=0.05). De data van de 17-AAG groep komt wel overeen met de negatieve controle(p=0.9969425, α=0.05) .

**4. Discussie**

Het doel van dit onderzoek was om te bepalen hoe corticosteron, 17-AAg en mifepriston translocatie van hGR beinvloeden. Er is gevonden dat corticosteron de helft zoveel translocatie teweeg brengt als cortisol. Ook is gebleken dat mifepriston de translocatie van hGR niet volledig onderdrukt. Tot slot is gebleken dat 17-AAG wel de translocatie tegengaat. Concludeert: corticosteron is half zo goed in het te weeg brengen van translocatie als cortisol. Mifepriston werkt niet goed als antagonist, 17-AAG wel.

Er zijn wel een paar onverwachte resultaten. Er werd namelijk verwacht dat corticosteron vergelijkbaar zou zijn met cortisol in hoeverre ze translocatie teweeg brengenen. Eiwitten zijn namelijk structuur specifiek en dan zou je dus verachten dat corticosteron of wel bind en dat er dan volledige translocatie optreed of corticosteron bind niet en er treed geen translocatie op. Een verklaring kan zijn dat de hGR eiwitten een klein beetje in vorm fluctueren en dat zo ongeveer de ene helft wel bij toediening van corticosteron transloceert en de andere helft niet. Verder valt ook op dat mifepriston niet goed als antagonist werkt. Dit is opvallend omdat het artikel van DeBattista en Belanoff uit 2006, compleet het tegenovergestelde beweerd. Wellicht is een uur wachten met het toedienen van cortisol niet optimaal voor het onderdrukken van de translocatie. Iets wat ook opvalt is dat er bij de negatieve controle er alsnog translocatie optreed, dit is toe te kennen aan meet/ invoer fouten en of door contaminaties. Zo is er namelijk in figuur 1 een meet waarde bij 1.00 te zien bij de negatieve controle dit is waarschijnlijk een invoerfout. Meet/invoerfouten en of contaminatie is waarschijnlijk ook de reden dat er meetwaardes van onder de 0.50 zijn bij de positieve controles.

Wat een limitatie aan dit onderzoek is, is het feit dat: cortisol, corticosteron, mifepriston en 17-AAG doorgaans werken in zenuw- en hersencellen. Het kan dus zijn dat de resultaten anders zijn, omdat we met HEK-293 cellen hebben gewerkt. Ook vinden ligand processen normaal in, in vivo situaties plaats terwijl dit onderzoek in vitro plaats vond.

De data uit dit onderzoek heeft bijgedragen aan de kennis over de antagonistische werking van 17-AAG en mifepriston. Ook heeft het onderzoek data opgeleverd over de mate van translocatie van hGR in HEK-293 cellen bij toediening van corticosteron. Echter moeten de resultaten wel met een korreltje zout genomen worden, er zijn namelijk opvallende uitschieters en moeilijk te achterhalen foutjes begaan tijdens de experimenten in sommige practicum groepjes. De data is niet goed bruikbaar om te gebruiken in onderzoek naar hGR en diens rol bij psychische stoornissen.

Nu we meer weten over het effect van verschillende liganden op de translocatie van hGR kan onderzoek gedaan worden naar hoe deze liganden kunnen bijdragen aan MR:GR balans. Een verstoring van het MR:GR balans is karakteristiek voor chronische stress(De Kloet, 2014).

Concluderend, corticosteron is de helft zo effectief in het teweeg brengen van translocatie van hGR. Mifepriston werkt niet als antagonist van cortisol, 17-AAG wel.

**5. Referenties**

1. DeBattista, C. & Belanoff, J.(2006). The use of mifepristone in the treatment of neuropsychiatric disorders, *TRENDS in Endocrinology and Metabolism (Vol.17 No.3 April 2006)*
2. De Kloet, E.R.(2014). From Receptor Balance to Rational Glucocorticoid Therapy, Endocrinology (August 2014, 155(8):2754–2769)
3. Bamberger, C.M., Wald, M., Bamberger, A.M.& Schulte, H.M.(1997). Inhibition of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor function bythe heat shock protein 90-binding agent geldanamycin, Molecular and Cellular Endocrinology 131 (1997) 233 – 24
4. Raumenberger, P.J., Young, E.A., Andrew, R. & Seckl, J.R. The role of corticosterone in human hypotalamic- pituirary- adrenal axisfeedback.