ONDERZOEKSVERSLAG (OV) – PSYCHOBIOLOGIE (PB)

VOORBEELDOPZET INLEIDING

Elisa Remmers en Monique Quaedackers – aangepast door Nienke Broos (2016)

*NB:*

* *de tekst hieronder is (bijna overal) letterlijk overgenomen uit de oorspronkelijke bronnen; als je deze formuleringen tegenkomt in de verslagen van studenten dan hebben ze dus niet geparafraseerd*
* *In de toelichting staat aanvullende informatie die de studenten niet per se hoeven te vermelden in hun verslag. Het is achtergrond informatie die handig is om de theorie goed te begrijpen.*

**Inleiding**

Brede context

Stress treedt op wanneer een stimulus van buiten het lichaam de homeostase van een organisme verstoort. Dit zorgt voor een stressreactie binnen het organisme, waarbij het stresssysteem wordt geactiveerd. <HHP-as kan hier ook worden genoemd> In mensen is cortisol een van de belangrijkste hormonen die hierbij betrokken is. (de Kloet, 2009)

Cortisol heeft lipofiele eigenschappen waardoor het in staat is om door de celmembraan van de neuronen van de hippocampus te diffunderen waar het zich kan binden aan glucocorticoïde receptoren (GR). Naast de GR komt ook de mineralcorticoiden receptor (MR) tot expressie in neuronen (klapper Celbiologie).

Beide receptoren behoren tot de groep van de ligand geactiveerde transcriptiefactoren. Dat wil zeggen dat deze receptoren kunnen dienen als transcriptiefactor en hiervoor afhankelijk zijn van de aanwezigheid van ligand (in het geval van de GR zijn dit glucocorticoïden). In inactieve toestand bevinden de receptoren zich in het cytoplasma van de cel gebonden aan verschillende eiwitten, maar na binding van een ligand kan translocatie plaatsvinden naar de celkern (practicumklapper Celbiologie/studieboek *Life*) waar het complex in staat is genen ofwel te activeren ofwel te onderdrukken.

Via deze route blijkt de MR dan vooral, via modulatie van gen transcriptie, de productie van de eiwitten te activeren die belangrijk zijn om te voorkomen dat de zenuwcellen gedestabiliseerd worden. De GR blijkt door binding aan transcriptiefactoren (transrepressie) de primaire stressreactie te beteugelen, en via activering van transcriptie (transactivatie) herstel na stress te vorderen. In gedragsreacties zijn de genomische werkingen via de GR van belang voor de opslag van de nieuw aangeleerde informatie, zodat het individu voorbereid is op een eenzelfde ervaring (de kloet e.a. 2005).

Dus, bij stress bepaalt de MR, in samenwerking met andere signalen, de verdediging tegen de stressor, terwijl de GR van belang is bij herstel, verwerking van de stress en opslag van de ervaring in het geheugen (de Kloet, 2009). De balanstheorie gaat ervanuit het stresssysteem wordt gestuurd door een balans in beschermende en beschadigende signalen (de Kloet, 2009). en de mate van activatie van GR en MR is essentieel voor deze balans.

*Toelichting:*

*Zie ook http://en.wikipedia.org/wiki/Glucocorticoid\_receptor:*

*GR bevindt zich in afwezigheid van een ligand in het cytoplasma. Binding aan een ligand zorgt ervoor dat translocatie mogelijk is naar de celkern. Hier kan de GR-receptor via ofwel transactivatie (bindt direct aan een promotorregio in het DNA, fungeert als transcriptiefactor, en stimuleert via de activatie van gen transcriptie indirect de eiwitaanmaak) of transrepressie (bindt aan een andere transcriptiefactor waardoor deze zijn werk niet kan doen en onderdrukt via de inhibitie van gen transcriptie indirect de eiwitaanmaak).*

*Er moet dus eerst translocatie plaatsvinden voordat de genetische effecten kunnen plaatsvinden.*

*Zie ook: http://en.wikipedia.org/wiki/Selective\_glucocorticoid\_receptor\_agonist*

*Verschillende liganden (stoffen die binden aan GR) kunnen verschillende werking hebben: ze zijn ofwel antagonisten of agonisten. Dit kun je weer opdelen in volledige antagonisten of gedeeltelijk en ook in volledige agonisten of gedeeltelijk agonist.*

Maatschappelijke relevantie

Het is bekend dat een verstoring van het stresssysteem kan leiden tot cognitieve stoornissen (de Kloet, 2009). GR-antagonisten zouden een GR-MR inbalans weer kunnen herstellen. Zij zijn al gebleken effectief in de behandeling van cognitieve stoornissen zoals psychotische depressie en bij psychosen bij de ziekte van Cushing (waarbij de laatste gekenmerkt wordt door hoge basale cortisollevels) (de Kloet, 2009). Het vinden van nieuwe GR-antagonisten zou mogelijk kunnen bijdragen aan het behandelen van meerdere cognitieve stoornissen.

Eerder onderzoek

Eerder onderzoek van Dull *et al.* (2013) liet zien dat het mogelijk is de translocatie van de oestrogeen (ER)-receptor (welke tot dezelfde familie van receptoren behoort als de GR) te beïnvloeden met agonisten en antagonisten. Belangrijker nog, er werd een methode gebruikt die het mogelijk maakt vele liganden te testen met weinig moeite. Deze high-throughput screening bleek een zeer robuuste methode voor screening van ER-liganden (Z’ factor > 0,7). Na toepassing van de screeningsmethode op een bank van 224,891 liganden bleek 0,003% een effect te geven in de screening waarbij, naast een aantal bekende liganden, vijf nieuwe liganden werden gevonden.

*Toelichting:*

 *In dit onderzoek is een screeningsmethode beschreven voor het vinden van nieuwe ER liganden op basis van de kwantificering van de translocatie van een ER-chimeer van het cytoplasma naar de kern. Deze chimeer is een fusie eiwit van de N-terminus van GR en het ligand bindingsdomein van ER. De N-terminus van GR bevat namelijk een domein dat zorgt voor cytoplasmatische lokalisatie in de afwezigheid van een ligand (de N-terminus van ER bevat een domein dat zorgt voor constitutieve nucleaire translocatie van de receptor). De GR-ER chimeer bevindt zich dus zonder ligand in het cytoplasma en binding van een ER-specifiek ligand kan translocatie naar de kern veroorzaken (door een verandering in de eiwit-structuur). Op de manier is de GR-ER chimeer gebruikt worden als “sensor” voor een effectief ligand dat translocatie van de receptor kan veroorzaken.*

Wetenschappelijke relevantie
Hoewel er al van enkele GR-liganden al wel bekend is dat zij de translocatie kunnen beinvloeden is er nog geen “high throughput screeningstest” voor GR-liganden. Het is interessant om dit ook te onderzoeken voor GR-antagonisten. Dit zou een stap kunnen zijn in de ontwikkeling van medicatie voor ziektes waarin de MR-GR balans verstoord is.

Onderzoeksvraag:

Daarom is het doel van het huidige onderzoek om te kijken wat de invloed van verschillende GR-liganden is op de translocatie van de GR. Daarnaast heeft dit onderzoek tot doel om te bepalen of het kwantificeren van ligand-geïnduceerde nucleaire translocatie van de GR-receptor een robuuste methode voor het screenen van GR-liganden?

Hypothese:

Op basis van de resultaten van Dull *et al.* (2013) voor Estrogen Receptor (ER) translocatie (die tot dezelfde familie van receptoren behoord als de GR) wordt verwacht dat GR-translocatie beïnvloed kan worden door agonisten en antagonisten van de GR. Daarnaast wordt verwacht dat de gebruikte methode een robuuste methode voor screening is.

Opzet: de invloed van een specifiek ligand (corticosteron, een antagonist (17-AAG of mifepristone) )op de translocatie van de GR receptor wordt bestudeerd. M.b.v fluorescentie microscopie wordt de ligand-geïnduceerde nucleaire translocatie van het glucocorticoïde receptor green-fluorescent protein (GR-GFP) gekwantificeerd. Door de Z’-factor te berekenen kan een uitspraak worden gedaan over de mate waarin de assay geschikt is als screeningsmethode.

*Toelichting:*

*- zie Wikipedia site over Z’-factor:* [*http://en.wikipedia.org/wiki/Z-factor*](http://en.wikipedia.org/wiki/Z-factor) *en artikel Zhang et al. 1999 (referentie 21. in Dull et al.)*

*- in het artikel spreken ze over een Z’ value, hiermee bedoelen de de Z’ factor zoals eerder beschreven door Zhang* et al. *=> een Z’ value of score is eigenlijk iets anders (zie verwijzing in Wikipedia); de auteurs gebruiken dus helaas de verkeerde term*

Voorspellingen:

* De verwachting is dat corticosteron minder translocatie laat zien dan cortisol.
* De verwachting is dat beide antagonisten plus cortisol geen translocatie laat zien in vergelijking met cortisol alleen.
* . De verwachting is dat de Z’-factor voor ligand-geïnduceerde translocatie tussen 0,5 en 1 ligt, waardoor de assay als uitstekend geschikt voor screeningsmethodes kan worden aangemerkt.

**Literatuurlijst**

De Kloet, E.R. (2009). Stress; neurobiologisch perspectief. Tijdschrift voor Psychiatrie, 51, 541-550.

Dull, A. B., George, A. A., Goncharova, E. I., Evans, J.R., Wamiru, A., & Cartner L. K. (2013). Identification of compounds by high-content screening that induce cytoplasmic to nuclear localization of a fluorescent estrogen receptor α chimera and exhibit agonist or antagonist activity in vitro. *Journal of Biomolecular Screening, X, 1-11.*