**Nog steeds translocatie bij aanwezigheid van mifepriston, geldanamycine of corticosteron bij glucocorticoïdereceptor**

**Opdracht: Onderzoeksverslag**

**Versie:** eindversie

**Opdrachtspecifieke inlevereisen: (zie bijbehorende thuisopdracht)**

* Er is minstens 1 grafiek of tabel gebruikt om de resultaten weer te geven.
* Het verslag is op Blackboard ingeleverd voor de deadline.

**Naam student:**

**studentnummer:**

**ABV groep:**

**Naam docent:**

1. Inleiding

Of het nou voor een deadline, toets, presentatie, hoge werkdruk, sociale situaties of een spin is, we kennen allemaal dat gevoel. Stress. Nu is een beetje stress hier en daar niet altijd slecht. Het kan immers alertheid stimuleren. Echter is het mogelijk dat deze stress doorslaat naar chronische stress, wat wel degelijk problematisch kan zijn.

Stress ontstaat door een stressor. De stressor activeert de hypothalamus, die op zijn beurt de hypofyse activeert. De hypofyse produceert vervolgens het hormoon ACTH. ACTH gaat naar de bijnierschors, en deze produceert cortisol. Cortisol kan binden aan twee receptoren; de mineralocorticoïde receptor (MR), en de glucocorticoïd receptor (GR). MR heeft een veel hogere affiniteit voor cortisol dan GR (Pavlides et al. (1995, aangehaald in DeBattista & Belanoff, 2006)), en cortisol bindt dus eerder aan MR. Cortisol bindt pas aan GR als MR verzadigd is. GR verplaatst vervolgens naar de nucleus en zorgt ervoor dat er eiwitten gemaakt worden, die een negatieve terugkoppeling hebben op de hypothalamus, waardoor er uiteindelijk weer minder cortisol geproduceerd wordt. Als dit systeem werkt, is er niks mis, maar als er iets fout gaat kan dit chronische stress als gevolg hebben, en een overmaat aan cortisol kan zelfs leiden tot depressie, het Cushings syndroom of angststoornissen.

MR en GR zijn ligand-afhankelijke transcriptiefactoren (Evans, 1988; Mangelsdorf et al., 1995; Bamberger et al., 1996, aangehaald in Bamberger, Wald, Bamberger &

Schulte, 1997). Dit betekent dat door het binden van de receptor met een ligand (in

dit geval cortisol) ervoor zal zorgen dat het receptormolecuul van structuur zal

veranderen, en zich naar de nucleus zal verplaatsen. Dit wordt een translocatie

genoemd. Op het moment dat de receptor zich naar de nucleus beweegt is het niet

meer mogelijk om nog te reageren met andere liganden.

Cortisol is een agonist, en zal dus zorgen voor een translocatie. Bij een overmaat aan cortisol zal de GR een stuk actiever worden en zal er veel translocatie plaatsvinden.

Uit eerder onderzoek blijkt dat Mifepriston gebruikt wordt bij patiënten met Cushings syndroom. (DeBattista & Belanoff, 2006)) Omdat dit een antagonist is zou deze een remmende werking kunnen hebben op de feedbackloops waardoor er minder GR receptoren zouden kunnen transloceren. Echter zorgt mifepriston volgens een ander onderzoek juist voor een negatieve feedback van cortisol op ACTH, waardoor er zowel een cortisol als ACTH toename plaatsvindt (Cadepond et al (1997, aangehaald in DeBattista & Belanoff, 2006)). Het is dus niet duidelijk wat voor effect mifepriston zou hebben op de GR receptoren. Een andere antagonist is Geldanamycine. Van geldanamycine is bekend dat deze

bindt aan de GR receptor, waardoor cortisol niet meer kan binden (Bamberger et al., 1997)). In theorie zou geldanamycine dus de translocatie moeten blokkeren.

Als laatste is er nog corticosteron. Deze agonist bevindt zich in grotere hoeveelheden in zoogdieren, maar ook in mensen is corticosteron te vinden, al dan niet in mindere mate dan cortisol. Corticosteron en cortisol hebben ongeveer dezelfde werking

(Raubenheimer, Young, Andrew, & Seckl, 2006). Cortisol heeft echter een extra

OH-groep, die corticosteron niet heeft. Het is niet bekend of dit chemische verschil invloed heeft op de mate van binding aan de GR receptor.

Hieruit volgt de vraag: Hoe beïnvloeden verschillende liganden de translocatie van glucocorticoïd receptor hGR? De verwachting is dat bij aanwezigheid van corticosteron er wel een translocatie van hGR zal zijn en dat mifepriston en geldanamycine zullen zorgen voor een blokkering van de hGR translocatie. Om er achter te komen wat voor invloed deze liganden zullen hebben op de translocatie, zullen humane cellen met een glucocorticoïd receptor gekweekt worden, waar vervolgens de verschillende agonisten en antagonisten aan toegevoegd zullen worden. Hierna zullen de cellen bekeken worden met een fluorescentiemicroscoop en is er te zien wat voor invloed de liganden hebben op de hGR receptor. Er wordt verwacht dat corticosteron zorgt voor een relatief lager aantal translocaties ten opzichte van de positieve controle, wat resulteert in dat GR-GFP zich deels in de celkern zal bevinden en deels in het cytoplasma, en dat mifepriston en geldanamycine de translocatie zullen blokkeren waardoor GR-GFP zich in het cytoplasma zal bevinden.

1. Materiaal & Methode

*2.1 Kloneren van humane glucocorticoïdreceptor in GFP-expressievector*

PCR is uitgevoerd op ouderplasmide pBluescript SK+ om de hGR te amplificeren. Hierbij werd gebruik gemaakt van de forward hGR 5’- AGATCCGCCACAACATCGAG-3’ primers en de reverse hGR 3’-TGATGGTTCACGTAGTGGGC-3’ primers. Het PCR product werd vervolgens gezuiverd. De restrictie-digestie vond plaats en er werd gebruik gemaakt van restrictie-enzymen BamHI en XhoI. Zowel de ouderplasmide als circulair expressieplasmide pEGFP-C1 werden geknipt, om sticky ends te maken. Ter controle en als zuivering is gelelektroforese uitgevoerd. ligase vond plaats en de hGR insert werd geplaatst in de expressieplasmide, waardoor pEGFP-C1\_hGR plasmide is ontstaan. Vervolgens is de pEGFP-C1\_hGR plasmide door middel van heatshock in de bacteriecellen E. coli geplaatst. Kolonies werden gekweekt en met behulp van kanamycine werden de kolonies geselecteerd met de pEGFP-C1\_hGR plasmide. PCR werd uitgevoerd op deze kolonies.

*2.2 Celkweek en calciumfosfaattransfectie*

Ter voorbereiding van de transfectie werd het pEGFP-C1\_hGR plasmide DNA geïsoleerd en werden de humane HEK293 cellen doorgezet in een 12-wells plaat met DMEM en trypsine. Door middel van calciumfosfaattransfectie (Graham, F; 1973) is het DNA van de pEGFP-C1\_hGR plasmide in de HEK293 cellen geplaatst. Dit vond plaats onder 37 ˚C voor 2 dagen.

*2.3 Translocatie-assay*

In de experimentele fase werden allereerst het DMEM vervangen voor FBS medium. Vervolgens werden de liganden (geldanamycine (100 µM), mifepriston (100 µM) of niks) toegevoegd aan glaasjes van de 12-wells plaat. Na een uur werd cortisol (10 µM)toegevoegd aan de wells met geldanamycine en mifepriston en corticosteron (10 µM) aan de wells zonder geldanamycine en mifepriston. Ook waren er 2 controles. In de positieve controle werd er geen ligand toegevoegd maar na een uur wel cortisol. In de negatieve controle werd geen ligand toegevoegd en geen cortisol, maar wel voedingsmedium. Ten slotte werden de wells geïncubeerd bij 37 ˚C voor 45 minuten.

Nadat het medium in de wells was verwijderd werden de cellen gewassen met PBS en gefixeerd met PFA (300µL 4%). Aan elke well werd DAPI toegevoegd om de celkernen onder de microscoop te kunnen bekijken. VectaSHIELD werd toegevoegd op het voorwerpglaasjes en de dekglaasjes met HEK293-cellen werden op de voorwerpglaasjes geplaatst. Deze werden tot gebruik in het donker bewaard.

*2.4 Statistische analyse*

Bij het cellen tellen werd onderscheid gemaakt tussen 3 soorten celtypen. Celtype 1 waren cellen waar HGR-GFP in de celkern zichtbaar was, en dus translocatie had plaatsgevonden. Celtype 2 waren cellen waar HGR-GFP deels in de celkern en deels in het cytoplasma zichtbaar was. Hierbij had partiële translocatie plaatsgevonden. Celtype 3 waren cellen waar HGR-GFP alleen in het cytoplasma zichtbaar was, en dus geen translocatie had plaatsgevonden. Van de voorwerpglaasjes werden met behulp van een fluorescentiemicroscoop foto’s gemaakt. Deze foto’s zijn bekeken via ImageJ. Foto’s met het DAPI filter en foto’s met het GFP filter zijn over elkaar geplaatst waardoor gezien kon worden of er translocatie had plaatsgevonden. De cellen werden geteld en deze gegevens werden ingevoerd in R-studio.

1. Resultaten

Zie figuur 1. In R-Studio is gekeken naar 5 condities. Conditie 1 (n=12) is met

corticosteron, conditie 2 (n=10) is met mifepriston, conditie 3 (n=6)is met

geldanamycine, conditie n (n=26)is de negatieve controle en conditie p (n=22) is de

positieve controle.

De verschillende type cellen zijn bij elkaar opgeteld: Type 1 telde als 1, type 2 als 0.5 en type 3 als 0. Dit is gedaan omdat er zo sprake was van continue variabelen, in plaats van categoriale variabelen, wat makkelijker te testen is. Uit de Shapiro-Wilk Normality Test kwam uit dat niet alle condities normaal verdeeld waren (conditie 1: W = 0.84263 ; *p* = 0.02981 ; conditie 2: W = 0.94837 ; *p* = 0.6493 ; conditie 3: W > 0.05 ; *p* = 0.00657 ; conditie n: W = 0.91645 ; *p* = 0.03715; conditie p: W = 0.7616 ; *p* = 0.0001329). Uit de Levene’s Test kwam uit dat de varianties van de condities wel gelijk waren (F = 0.4399 ; *p* = 0.7794). Omdat de varianties wel gelijk waren is er parametrisch getoetst, ondanks dat de condities niet normaal verdeeld waren. Hiervoor is de Kruskal-Wallis rank sum test gebruikt. Hieruit kwam dat er een post-hoc test gedaan kon worden (*F(df)*= 24.099 (4) ; *p* = 7.632e-05)en hiervoor is de Tukey multiple comparisons of means Test (Tukey HSD) gebruikt. Uit de Tukey HSD kwam dat er een significant verschil was tussen de gemiddelde translocatie van de negatieve controle (M±SD: 41.50 ± 31.50996) en conditie 1 (M±SD: 6.50 ± 28.34412 ; *p* = 0.0122257), tussen de gemiddelde translocatie van de negatieve controle en conditie 3 (M±SD: 25.50 ± 35.02442 ; *p* = 0.0287684) en tussen de gemiddelde translocatie van de negatieve controle en de positieve controle (M±SD: 65.50 ± 26.45212 ; *p* = 0.0000740). Tussen alle andere condities is er geen significant verschil gevonden.



Figuur 1: gemiddelde translocatie in procenten per conditie. Op te merken is dat in R-studio de type 1 cellen als 1 zijn gerekend, type 2 cellen als 0.5 en type 3 cellen als 0

en deze bij elkaar zijn opgeteld. M±SD per conditie: conditie 1: 6.50 ± 28.34412 ;

conditie 2: 17.50 ± 31.39751 ; conditie 3: 25.50 ± 35.02442 ; conditie n: 41.50 ± 31.50996 ; conditie p: 65.50 ± 26.45212.

p adj

2-1 0.7137394

3-1 0.9937225

n-1 0.0122257

p-1 0.9616155

3-2 0.5986356

n-2 0.4687458

p-2 0.2523291

n-3 0.0287684

1. Discussie

Uit de resultaten blijkt dat er geen significant verschil is tussen het percentage translocaties bij de verschillende condities, met uitzondering van het verschil tussen de negatieve controle met conditie 1, conditie 3 en de positieve controle.

Hieruit is te concluderen dat het binden van corticosteron en geldanamycine aan de GR receptor zorgen voor een translocatie en het binden van mifepriston aan de GR receptor zorgt voor een partiële translocatie.

Dit is opmerkelijk, aangezien op basis van eerder onderzoek juist verwacht werd dat mifepriston en geldanamycine zouden zorgen voor een blokkering van de translocatie.

In ieder geval is er wel een significant verschil tussen het percentage translocaties tussen de negatieve en positieve controle, waaruit blijkt dat er bij de negatieve controle inderdaad minder translocaties hebben plaatsgevonden.

Een verklaring hiervoor en voor de volledige translocatie van de GR gebonden aan geldanamycine is dat er iets volledig fout is gegaan tijdens het experiment. Bovendien bleek achteraf dat de VectaSHIELD die gebruikt was om de cellen vast te plakken aan de voorwerpglaasjes over de datum was. Om dit te controleren zou het hele onderzoek opnieuw uitgevoerd moeten worden. Een andere mogelijkheid is dat de geldanamycine niet lang genoeg de tijd had gekregen om te binden aan GR receptoren, waardoor er alsnog cortisol kon binden, en dus zorgen voor translocatie. Echter zou de verwachting dan eerder zijn dat er partiële translocatie zou hebben plaatsgevonden in plaats van complete translocatie, aangezien een deel van de GR receptoren wel degelijk gebonden zou zijn met geldanamycine.

Een verklaring voor de partiële translocatie van de GR gebonden aan mifepriston zou kunnen zijn dat deze antagonist niet de translocatie blokkeert, maar de translatie die hierna plaatsvindt in de nucleus. De translocatie zou alsnog plaatsvinden en mifepriston zou zijn taak daarna pas vervullen. Dit is ook gelijk een suggestie voor vervolgonderzoek: wat voor invloed heeft mifepriston op de translatie in de nucleus?

Ook is er dus geen significant verschil gevonden tussen corticosteron en cortisol. Ook dit komt niet overeen met eerder onderzoek. Dit zou wederom kunnen liggen aan de incubatietijd. Er blijkt dus wel dat het chemische verschil tussen cortisol en corticosteron niet uitmaakt voor de mate van binden aan hGR.

Een vervolgonderzoek voor verder in de toekomst is om te kijken wat voor invloed het stoppen van de translocatie kan hebben voor mensen met chronische stress en andere stoornissen.

De werking van geldanamycine en mifepriston zou uiteindelijk gevolgen kunnen hebben voor de mensen met chronische stress en andere stoornissen. Als deze antagonisten daadwerkelijk de translocatie zullen blokkeren, zou dit gunstige effecten kunnen hebben voor deze mensen.

Samenvattend, hebben corticosteron en geldanamycine geen invloed op de translocatie van de glucocorticoïd receptor GR, en zorgt mifepriston voor partiële translocatie van glucocorticoïd receptor GR.

1. Literatuurlijst

Bamberger, C.M., Wald, M., Bamberger, A.M. en Schulte, H.M. (1997). Inhibition of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor function by the heat shock protein 90-binding agent geldanamycin1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 131, 233-240

DeBattista, C. and Belanoff, J. (2006). The use of mifepristone in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Endocrinology and Metabolism*, 17, 3, 1043-2760. doi:10.1016/j.tem.2006.02.006

Raubenheimer, P.J., Young, E.A., Andrew, R., en Seckl, J.R. (2006). The role of corticosterone in human hypothalamic– pituitary–adrenal axis feedback. *Clinical endocrinology*, 65, 22-26. doi: 10.1111/j.1365-2265.2006.02540.x