u

**IN VERGELIJKING MET CORTISOLTOEDIENING, VINDT ER BIJ CORTICOSTERON- EN MIFEPRISTONTOEDIENING EVENVEEL EN BIJ GELDANAMYCINETOEDIENING MINDER TRANSLOCATIE VAN GLUCOCORTICOÏDERECEPTOREN IN HUMANE CELLEN PLAATS.**

**Opdracht: Onderzoeksverslag**

**Versie: eindversie ~~/herkansing~~**

**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 docent: Myrtille Gumbs**

**Inleverdatum: 02/04/2018**

**Aantal woorden (geen maximum): 2427**

**In vergelijking met cortisoltoediening, vindt er bij corticosteron- en mifepristontoediening evenveel en bij geldanamycinetoediening minder translocatie van glucorticoïdereceptoren in humane cellen plaats.**

**Inleiding**

~~Voorwaarde van het leven~~ is een accurate reactie op de diverse stressvolle situaties waar een individu gedurende zijn leven mee te maken krijgt. Een stressrespons zorgt voor de benodigde lichamelijke en mentale staat van alertheid om impulsief en accuraat te handelen én voor het herstel van de fysiologische en psychologische balans zodra het gevaar is geweken. Bij stress wordt bij de mens onder andere de HHB-as geactiveerd: de stressgevoelige afgifte van CRH door de hypothalamus, heeft via de afgifte van ACTH door de adenohypofyse een positieve invloed op de afgifte van de corticosteroïde cortisol door de bijnierschorsen. Cortisol werkt in op glucocorticoïde- (GR) en mineralcorticoïde receptoren (MR) in de limbische structuren en de prefrontale cortex van het brein. Deze receptoren bevinden zich in inactieve toestand in het cytoplasma, maar kunnen geactiveerd door ligandbinding met bijvoorbeeld cortisol als complex de kern binnendringen en de DNA-transcriptie beïnvloeden door als transcriptiefactor te binden aan responsieve elementen in de promotors van targetgenen (GREs) of door te interacteren met andere transcriptiefactoren. De meeste MRs zijn door de hoge affiniteit met cortisol in rusttoestand al bezet en oefenen als transcriptiefactor een positieve invloed uit op de neurogenese in de hippocampus en gaan destabilisatie en sterfte van neuronen tegen. Ook is gebleken dat actieve MRs de initiële stressreactie versterken door de synthese van membraangebonden receptoren (Joëls et al., 2012, aangehaald in De Kloet, 2014). Bij stress neemt met name het aantal GR-ligandcomplexen toe, dat bij transcriptie het herstel van de fysiologische balans na stress bevordert door negatieve feedback op de CRH- en ACTH-afgifte. De MR/GR-bezettingsbalans is dus van grote invloed op de regeling van de HHB-as en een MR/GR-disbalans is daarmee mogelijk de oorzaak van stressstoornissen die veroorzaakt worden door een ontregelde HHB-as zoals depressie en post-traumatische stress stoornis (PTSS) (De Kloet et al., 1998 en De Kloet et al., 2005, aangehaald in De Kloet,2014). Het manipuleren van de MR/GR-bezettingsbalans middels het beïnvloeden van de werking van GR met agonistische of antagonistische liganden is daarom een interessant uitgangspunt voor de ontwikkeling van effectieve behandelmethoden voor neuropsychiatrische stoornissen als depressie en PTSS. De hypersecretie van cortisol die geassocieerd wordt met depressie (Murphy et al., 1991, aangehaald in DeBattista and Belanoff, 2006) kan in de toekomst wellicht worden behandeld met een glucocorticoïdereceptor-antagonist en een cortisolpil zou uitkomst kunnen bieden voor individuen met een verhoogd risico op PTSS.

Welke liganden de meeste potentie hebben voor dit soort behandelingen is nog onbekend. Corticosteron lijkt een interessante GR-ligand voor de behandeling van stoornissen waar hyposecretie van CRH, ACTH of cortiosol aan ten grondslag liggen, wegens haar agonistische werking op GRs in knaagdieren (Ye et al., 2018). Het effect van corticosteron op humane glucocorticoïdereceptoren is nog onbekend. Voor de behandeling van hypersecretie van CRH, ACTH of cortisol, zoals bij depressie, zijn juist GR-antagonisten interessant. De GR-antagonist mifepriston heeft een uniek farmacologisch profiel dat potentie lijkt te hebben voor de behandeling van verschillende neuropsychiatrische stoornissen, zo is gebleken uit de literatuurstudie van DeBattista and Belanoff (2006). De moleculaire werking van de ligand is nog onbekend. Ook geldanamycine (17AAG) is een GR-antagonist. Geldanamycine maakt de binding van inactieve glucocorticoïdereceptoren met heathschockproteines 90, die GR tot ligandbinding normaliter beschermen tegen hitte, onmogelijk. Hierdoor kunnen er geen stabiele glucocorticoïdereceptoren meer worden gevormd (Bamberger et al., 1997).

Op basis van het eerder onderzoek lijken mifepriston en geldanamycine interessante antagonisten voor de behandeling van depressie. Corticosteron is mogelijk een relevante vervanger van cortisol in middelen ter preventie van PTSS. Belangrijk voor de selectie van de meest effectieve liganden voor PTSS- en depressie-therapieën is de grootte van het effect op de translocatie en daarmee het functioneren van glucocorticoïdereceptoren. Het is nog onbekend hoe groot de invloed van mifepriston, geldanamycine en corticosteron op de translocatie van GR is. Het huidige onderzoek richt zich op het beantwoorden van de vraag: Hoeveel translocatie van humane glucocorticoïdereceptoren vindt er plaats in humane cellen bij toediening van mifepriston, geldanamycine en corticosteron in vergelijking tot toediening van cortisol?

Naar verwachting vindt er evenveel translocatie van hGRs in humane cellen plaats bij toediening van corticosteron als bij toediening van cortisol. Corticosteron lijkt moleculair gezien erg op cortisol (het verschil is een extra OH-groep) ~~dus het verschil in intermoleculaire kracht tussen de ligand en bindingsplaats op hGR, die de bindingsaffiniteit bepaalt, zal verwaarloosbaar klein zijn. Tevens doet de agonistische werking van corticosteron in knaagdieren vermoeden dat ook in humane cellen de translocatie van glucocorticoïdereceptoren door corticosteron wordt bevorderd.~~ In de celpopulaties waar naast cortisol mifepriston of geldanamycine aan toegevoegd is, zal er veel minder translocatie van hGRs plaats hebben gevonden dan bij de populaties waar alleen cortisol aan is toegevoegd. Mifepriston en geldanamycine zullen de cortisol-gefaciliteerde translocatie van hGRs volledig tegengaan, omdat de bindingsaffiniteit van hGR met de antagonisten groter is dan die met cortisol.

Om de effectgrootte van de liganden op de translocatie van hGR te bepalen zijn GreenFluorescentProtein-gelabelde hGRs in humane cellen bestudeerd bij behandeling met cortisol, corticosteron, mifepriston en cortisol of geldanamycine en cortisol. Hiervoor zijn HEK293 cellen getransfecteerd met EGFP-C1\_hGR plasmides. Vervolgens is met de toediening van liganden eventuele translocatie van de getranslateerde EGFP-C1\_hGR’s mogelijk gemaakt. Na fixatie en toediening van DAPI, een kleurstof die nuclei aankleurt, is de translocatie van de hGRs bestudeerd met fluoriscentiemicroscopie. Uit het aantal cellen met volledige, partiële en geen translocatie kon vervolgens een translocatiepercentage berekend worden per conditie. De translocatiepercentages van de experimentele condities zijn posthoc vergeleken met dat van cortisol om te bepalen bij welke liganden er significant meer of minder translocatie van hGRs had opgetreden dan bij cortisol.

Naar verwachting is het gemiddelde translocatiepercentage van de HEK293 cellen die met corticosteron zijn behandeld significant overeenkomstig met het gemiddelde translocatiepercentage van de HEK293 cellen die behandeld zijn met cortisol. De HEK293 cellen die behandeld zijn met cortisol en een van de antagonisten mifepriston of geldanamycine zullen gemiddeld een significant lager translocatiepercentage hebben dan de HEK293 cellen die enkel behandeld zijn met cortisol (de positieve controle).

**Materiaal & Methode**

***Kloneren van humane glucocorticoïd receptor in GFP-expressievector***

Ter amplificatie van het hGR-gen is er een PCR uitgevoerd met Dream Taq Polymerases, forward hGR primers: 5’-AGATCCGCCACAACATCGAG-3’ en reverse hGR primers: 5’-TGATGGTTCACGTAGTGGGC-3’. Na het PCR-product te hebben gezuiverd, ~~is het voorzien van sticky ends door restrictiedigestie met~~ restrictie-enzymen BamHI en XhoI in een 1x Fast Digest Buffer. Middels dezelfde procedure is het expressieplasmide pEGFP-C1 gedigesteerd. Vervolgens is met een agarose (agarose opgelost in 1x TAE buffer en gekleurd met Midori Green) gelelektroforese vastgesteld of de restrictiedigestie succesvol was. Voor de extractie van de DNA-fragmenten uit de agarosegel is isopropanol gebruikt. Na een Xpose-concentratiemeting met gewenst resultaat, konden het geëxtraheerde hGR-construct en opengeknipte pEGFP-C1 expressieplasmide geligeerd worden met behulp van Quick T4 Ligase en 10x Rapid Ligation Buffer. Het ontstane pEGFP-C1\_hGR plasmide is vervolgens middels transformatie in LB medium in competente E. Coli bacteriën gebracht ter amplificatie. De getransformeerde E. Coli zijn uitgeplaat op agarbodems met kanamycine, ~~zodat de transformatie-efficiëntie bepaald kon worden~~. Uit de transformatie-efficiëntie is het aantal bacteriekolonies, met een maximum van 2 kolonies, afgeleid dat tot homogene bacteriesuspensie is bereid voor verder gebruik. Nadat met kolonie-PCR (met dezelfde forward en backward hGR primers als bij de amplificatie van het hGR-gen) en agarose gelelektroforese (zelfde condities als voorheen) is vastgesteld dat de geselecteerde E. Coli kolonies het pEGFP-C1\_hGR plasmide bevatten, is de bacteriesuspensie geïncubeerd in LB medium met kanamycine bij 37 graden Celsius en 2~~50 rpm~~. Het plasmide-DNA is vervolgens uit de opgehoopte E. Coli geïsoleerd door middel van een mini-prep ~~met lysis buffer, neutralisatiebuffer, anti-endonuclease buffer, ontzoutingsbuffer en elutiebuffer.~~

***Celkweek en calciumfosfaattransfectie***

Een gezonde HEK293 celsuspensie in differentiatiestadium met een confluentie van 80-90% is getrypsiniseerd en vervolgens gekweekt in DMEM. Alvorens de transfectie zijn calcium-fosfaat-DNA precipitaten gevormd door het pEGFP-C1\_hGR plasmide te behandelen met 2.5 M CaCl2-oplossing en 1x HBS. Nadat deze transfectiemix op de HEK293 cellen ~~is gedruppeld~~ zijn de HEK293 cellen bij 37 graden Celsius geïncubeerd in een CO2 stoof.

***Translocatie-assay***

Aan de getransfecteerde HEK293 cellen uit de experimentele conditie mifepriston en geldanamycine is 1 µL toegevoegd van de betreffende antagonist. Vervolgens zijn de HEK293 cellen een uur geïncubeerd bij 37 graden Celsius. Daarna is 10 µL cortisol toegevoegd aan de wells met antagonisten en aan de positieve controle wells. Aan de wells uit de experimentele conditie 1 (corticosteron) is 10 µL corticosteron toegevoegd. Vervolgens zijn de HEK293 cellen 30-45 minuten bij 37 graden Celsius geïncubeerd.

Na de incubatie zijn de HEK293 cellen met 4% PFA gefixeerd en met DAPI gestaind. Voor de bereiding van de celpreparaten is FluorSave gebruikt. De celpreparaten zijn droog en donker bewaard bij 4 graden Celsius. Met fluoriscentiemicroscopie en het programma ImageJ konden de aantallen Type I, Type II en Type III HEK293 cellen in de experimentele condities en controles worden bepaald.

***Statistische Analyse***

Uit de aantallen Type I, Type II en Type III HEK293 cellen in de preparaten kon het percentage translocatie berekend worden middels de formule: *Translocatiepercentage = (aantal type I cellen + 1/2\*aantal type II cellen)/totaal aantal getelde cellen*. Vervolgens is voor elke conditie een gemiddeld translocatiepercentage berekend. Om te bepalen of deze gemiddelde translocatiepercentages van de experimentele condities en controles significant van elkaar verschilden is een ANOVA toets gebruikt. De assumpties van de ANOVA zijn voorafgaand aan de ANOVA getoetst met de Levene’s test en de Shapiro-Wilk toets. Met de Posthoc Tukey-Kramer methode is vervolgens vastgesteld welke condities significant van elkaar verschillen. Alle statistische toetsen zijn uitgevoerd met het programma RStudio versie 1.1.442.

**Resultaten**

\*\*\*\*

\*\*

\*

\*\*

*Figuur 1: Gemiddelde translocatiepercentages van humane glucocorticoïdereceptoren (hGRs) in HEK293 cellen per conditie, 30-45 minuten na toediening van de agonistische ligand. Foutbalken representeren standaardfouten (SEEC1=11.332, SEEC2=10.749, SEEC3=6.788, SEPC=4.360, SENC=5.782) van 8-25 geanalyseerde HEK293 kolonies per conditie (nEC1=8, nEC2=12, nEC3=10, nPC=25, nNC=23). \*p ≤ 0.05; \*\*p ≤ 0.01; \*\*\*p ≤ 0.001; \*\*\*\*p ≤ 0.0001. Afkortingen: EC1, experimentele conditie 1 (corticosteron toegevoegd); EC2, experimentele conditie 2 (mifepriston en cortisol toegevoegd); EC3, experimentele conditie 3 (geldanamycine en cortisol toegevoegd); PC, positieve controle (cortisol toegevoegd); NC, negatieve controle (geen ligand toegevoegd).*

Er waren significante verschillen tussen de translocatiepercentages (zie figuur 1) van de experimentele conditie corticosteron [gem ± SD: 57.817 ± 32.052; W(8) = 0.938, p = 0.587], de experimentele conditie mifepriston [50.640 ± 37.235; W(12) = 0.911, p = 0.221], de experimentele conditie geldanamycine [30.622 ± 21.464; W(10) = 0.891, p = 0.174], de positieve controle cortisol [70.140 ± 27.730; W(25) = 0.879, p = 0.007] en de negatieve controle geen ligand [17.946 ± 21.798; W(23) = 0.787, p<0.001; L(4,73) = 2.399, p = 0.058; F(4,73) = 24.77, p<0.001].

Er was geen verschil in de mate van translocatie van humane glucocorticoïdereceptoren dat plaats had gevonden tussen de HEK293 cellen waar corticosteron was toegediend en de HEK293 cellen uit de positieve controle (cortisol) [diff = 12.323, p = 0.806]. Er had meer translocatie van humane glucocorticoïdereceptoren plaatsgevonden in de HEK293 cellen waar corticosteron was toegediend dan bij de HEK293 cellen uit de negatieve controle (geen ligand) [diff = -39.871, p = 0.006]. Er was geen verschil in de mate van translocatie van humane glucocorticoïdereceptoren dat plaats had gevonden tussen de HEK293 cellen waar mifepriston was toegediend en de HEK293 cellen uit de positieve controle (cortisol) [diff = 19.501, p = 0.270]. Er had meer translocatie van humane glucocorticoïdereceptoren plaatsgevonden in de HEK293 cellen waar mifepriston was toegediend dan bij de HEK293 cellen uit de negatieve controle (geen ligand) [diff = -32.693, p = 0.012]. Er had minder translocatie van humane glucocorticoïdereceptoren plaatsgevonden in de HEK293 cellen waar geldanamycine was toegediend dan bij de HEK293 cellen uit de positieve controle (cortisol) [diff = 39.518, p = 0.002]. Er was geen verschil in de mate van translocatie van humane glucocorticoïdereceptoren dat plaats had gevonden tussen de HEK293 cellen waar geldanamycine was toegediend en de HEK293 cellen uit de negatieve controle (geen ligand) [diff = -12.676, p = 0.743]. Er had meer translocatie van humane glucocorticoïdereceptoren plaatsgevonden in de HEK293 cellen uit de positieve controle (cortisol) dan in de HEK293 cellen uit de negatieve controle (geen ligand) [diff = 52.194, p<0.001].

**Discussie**

De gemiddelde translocatiepercentages van experimentele conditie 1 (corticosteron) en experimentele conditie 2 (mifepriston) verschilden niet significant van de positieve controle (cortisol). Het gemiddelde translocatiepercentage van experimentele conditie 3 (geldanamycine) was significant kleiner dan dat van de positeve controle (cortisol) en niet significant verschillend van de negatieve controle (geen ligand). Uit de resultaten kunnen we concluderen dat er evenveel translocatie van humane glucocorticoïdereceptoren (hGRs) in humane cellen bij corticosterontoediening en mifepristontoediening plaatsvindt als bij cortisoltoediening. Bij geldanamycinetoediening vindt er minder translocatie van hGRs in humane cellen plaats dan bij cortisoltoediening (positieve controle).

De resultaten van liganden corticosteron en geldanamycine zijn in lijn met het eerder onderzoek van Ye et al. (2018) en Bamberger et al. (1997). De geleverde evidentie met betrekking tot mifepristontoediening is verassend. Dit onverwachtse resultaat doet vermoeden dat mifepriston niet de translocatie van hGR, maar een ander proces in aanloop naar het transcriptionele functioneren van hGR in de nucleus blokkeert. Ook voor liganden corticosteron en geldanamycine geldt dat er uit dit onderzoek alleen een conclusie kan worden getrokken over het effect van de ligand op de translocatie: een effect op het functioneren van hGR in een andere orde van grootte is niet uitgesloten. Tevens gaan de getrokken conclusies over de werking van de liganden op celpopulatieniveau: hoe de liganden op moleculair niveau de translocatie van humane glucocorticoïdereceptoren hebben beïnvloed kan niet op basis van deze resultaten worden geconcludeerd. Voor eventuele medische toepassingen van de GR-agonisten en –antagonisten is het noodzakelijk meer inzicht te krijgen in de werking en effectiviteit van de liganden. Met een northern blot kan bijvoorbeeld in het vervolg de grootte van het effect van de liganden op het transcriptionele functioneren van glucocorticoïdereceptoren worden onderzocht. Uit de effectiviteit van de liganden kan uiteindelijk worden afgeleid welke ligand het meest geschikt is voor medisch gebruik en welke dosis het gewenste effect zal opleveren. De werking van de liganden kan onder andere nader bestudeerd worden met computerstimulaties en zou in de toekomst kunnen worden ingezet om de effectiviteit van de liganden te vergroten, bijvoorbeeld door de bindingsaffiniteit met hGR te vergroten.

Het is duidelijk dat het gebruik van glucocorticoïden bij de behandeling van neuropsychiatrische stoornissen als depressie en PTSS nog verre van nabije toekomst is. Wel hebben we dankzij het huidige onderzoek meer inzicht verkregen in het effect van de toediening van liganden corticosteron, mifepriston en geldanamycine op de translocatie van hGR in humane cellen: in vergelijking met cortisoltoediening, vindt er bij corticosteron- en mifepristontoediening evenveel en bij geldanamycinetoediening minder translocatie van glucorticoïdereceptoren in humane cellen plaats.

**Literatuurlijst**

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

DeBattista, C. & Belanoff, J. (2006). The use of mifepristone in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Sciencedirect,* 17(3),117-121.

De Kloet, E. R. (2014). From Receptor Balance to Rational Glucocorticoid Therapy. *Endocrinology*, 155(8), 2754-2769.

De Kloet, E. R., Joëls, M. & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature*, 6, 463-475.

De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S. & Joëls, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrinology*, 19, 269-301.

Joëls, M., Sarabdjitsingh, R.A. & Karst, H. (2012). Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity rapid, slow and chronic models. *Pharmacol Rev.,* 64, 901-938.

Murphy, B.E. (1991). Treatment of major depression with steroid suppressive drugs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.,* 39*,* 239–244.

Ye, S., Yang, R., Xiong, Q., Yang, Y., Zhou, L. et al. (2018). Acute stress enhances learning and memory by activating acid-sensing ion channels in rats. *Biochemical and biophysical Research Communication*, 498(4), 1078-1084.