
[Invloed van liganden op de glucocorticoïdreceptor: de mate van translocatie in vergelijking met cortisol en water]

Opdracht: Onderzoeksverslag

Versie: eindversie

Opdrachtspecifieke inleverisen: (zie bijbehorende thuisopdracht)

- het overzichtsartikel en het onderzoeksartikel zijn inhoudelijk gebruikt
- er is minstens 1 grafiek of tabel gebruikt om de resultaten weer te geven

Naam student: Dana Verhoeven

studentnummer: 11010088

ABV groep: 4

Naam docent: Laura Koenders

Opdracht, versie: onderzoeksverslag, eindversie

Inleverdatum: 30-3-2016

Aantal woorden: 2616

[Invloed van liganden op de glucocorticoïdreceptor: de mate van translocatie in vergelijking met cortisol en water]

[Inleiding]

Ieder mens ervaart wel eens een gevoel van stress tijdens zijn dagelijkse bezigheden. Dit gevoel van stress is niet alleen een psychologisch fenomeen maar kent ook een biochemische en neurobiologische zijde. Stress is namelijk een reactie van onder andere een verhoogd (nor)adrenaline en cortisol concentratie in het lichaam. (Nor)adrenaline geeft een directe reactie op stress, terwijl cortisol later wordt aangemaakt om het lichaam (en geest) te laten herstellen van stress. De werking van cortisol is dus essentieel voor de hersenen, want het beschermt tegen de initiële stressreactie en helpt bij leren en geheugen. Ook zorgen verhoogde cortisolconcentraties voor motivatie bij mensen (Kloet e.a. 2008). Cortisol kan binden aan twee typen receptoren: mineralocorticoïdereceptoren (MR) en glucocorticoïden (GR) (De Kloet et al., 2005). De MR initiëren een stressreactie. De functie van de GR om ervoor te zorgen dat een stressreactie niet zelf schadelijk wordt. De MR en de GR zijn met name te vinden in de in hippocampus, amygdala en prefrontale cortex, ook wel het limbisch systeem genoemd. In het limbisch systeem wordt met neurotransmitters tussen deze gebieden gecommuniceerd. De hormonen worden volgens een biologisch systeem eenmaal per uur afgegeven. De MR bindt met een veel hogere affiniteit cortisol dan GR. Hierdoor zijn MR receptoren bijna altijd bezet in de periode tussen pulsen door cortisol en blijft dit aan het DNA gebonden. Naast de pulsen die eenmaal per uur komen kunnen er ook pieken hormonen afgegeven worden wanneer zich er een stresssituatie voordoet in de omgeving. Hierna wordt de stressreactie weer hersteld door het lichaam. Het activeren en deactiveren van

deze stressreactie kan uit balans zijn. Een tekort of teveel aan hormonale stressreactie kan de oorzaak zijn voor een (psychiatrische) ziekte. Een voorbeeld hiervan is agressief gedrag, waarbij de positieve terugkoppeling van corticosteronafgifte zichzelf steeds beïnvloedt, wat uiteindelijk leidt tot een uitspatting van agressief gedrag (Haller & Kruk, 2006). Corticosteron en cortisol zijn homologe hormonen uit verschillende organismen met dezelfde functie (cortisol bij de mens, corticosteron bij de rat). Daarnaast leiden verhoogde glucocorticoïdconcentraties tot hersenbeschadiging, cognitieve aftakeling en grotere kans op psychiatrische stoornissen. De invloed van een glucocorticoïdreceptor op gentranscriptie wordt gereguleerd door meerdere eiwitten, waaronder transcriptiefactoren en coregulatoren en is niet als één cascade te beschrijven (Van der Laan & Meijer 2008). Uit eerder onderzoek met oestrogeen en bijbehorende receptoren bleek dat het kwantificeren van oestrogeen-geïnduceerde nucleaire translocatie van de GR-receptor een zeer robuuste methode is voor het screenen van dit ligand, met Z-waardes groter dan 0.7 en coefficients of variation (CV) kleiner dan 5% (Dull et al. 2013). Het huidige neurobiologisch stressonderzoek kan de kennis van de effecten van verschillende liganden versterken. Daarnaast is deze kennis zeer nuttig voor verdere onderzoeken in de medische en psychiatrische wereld. Dit onderzoek is gestart aan de hand van de onderzoeksvragen:

1. Wat is de invloed van verschillende liganden op de GR-translocatie?
2. Is het kwantificeren van ligand-geïnduceerde nucleaire translocatie van de GR-receptor een robuuste methode voor het screenen van GR-liganden?

In het onderzoek is gebruikgemaakt van 3 experimentaties. Bij experiment 1 is corticosteron (stresshormoon van ratten) toegevoegd aan humane GR in plaats van cortisol. Bij experiment 2 is de antagonist Mifepriston toegevoegd en bij experiment 3 de antagonist 17AAG. Het rattenhormoon zal minder affiniteit hebben met de

humane glucocorticoïdreceptor dan het humane hormoon, en de antagonisten zullen de receptor bezet houden zonder translocatie op te wekken, en dus zal er vrijwel geen translocatie plaatsvinden. Vervolgens wordt verwacht dat het kwantificeren van ligand-geïnduceerde nucleaire translocatie van de GR-receptor een robuuste methode voor het screenen van GR-liganden zal zijn. Het onderzoek is gestart met de insertie van de hGR sequentie in een expressieplasmide, met daarachter de green fluorescent protein (GFP) sequentie. De plasmide wordt vervolgens geplaatst in E.coli cellen en opgekweekt, om de plasmide vervolgens in HEK293 cellen te brengen (humane niercellen). Daarna wordt bekeken in welke compartimenten van de cel het glucocorticoïdreceptor green fluorescent protein fusie-eiwit tot expressie wordt gebracht. Daarna is met behulp van een translocatie assay geanalyseerd wat er gebeurd met het fusie-eiwit onder invloed van ratten corticosteron in plaats van cortisol, en met het toevoegen van de antagonisten Mifepriston en 17AAG voor het toevoegen van cortisol. Er wordt verwacht dat corticosteron translocatie zal laten zien, maar wel minder sterk dan cortisol (positieve controle). Van Mifepriston en 17AAG wordt verwacht dat zij de translocatie vrijwel volledig blokkeren en er nauwelijks translocatie plaatsvindt ondanks het toevoegen van cortisol.

Materiaal & Methode

Vorbereidende handelingen

De EGFP-hGR plasmide is gecreëerd door te beginnen met een PCR met ouderplasmide pBluescript SK+ met hGR gen, een forward en reverse primer, dNTP's, taq polymerase en PCR cocktail. De sequentie van de forward primer is 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' en de sequentie voor de reverse primer 5'AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'. Het PCR product (het lineaire hGR DNA) is daarna opgezuiverd met de Roche High Pure PCR product purification kit om het te ontdoen van contaminanten. Daarna is een restrictiedigestie uitgevoerd met Xho1 en

BamH1 op het PCR product en de pEGFP-C1 expressieplasmide. Vervolgens zijn de DNA fragmenten op een agarose gel op grootte gescheiden en is het DNA uit de gel geëxtraheerd en opgezuiverd met de Roche DNA extraction kit. Het opgezuiverde DNA, waarvan de grootte bekend is, wordt vervolgens geligeerd, waarbij het hGR in de pEGFP-C1 plasmide wordt geplaatst met behulp van sticky ends. Het hGR gen wordt voor het GFP gen geligeerd. Hierbij wordt gebruikt gemaakt van Quick T4 ligase en 5x rapid ligation buffer. De pEGFP-C1 plasmide met hGR insert wordt vervolgens in competente E.coli cellen getransformeerd en uitgeplaat op een agar plaat met kanamycine om te bepalen of de insertie heeft plaatsgevonden. De E. coli cellen worden met een Colony PCR gescreend op het wel of niet hebben van een insertie. Als bepaald is dat een kolonie een plasmide met het hGR insert bevat, wordt deze gebruikt om twee buizen aan te enten. Uit de twee buizen met bacteriegroei wordt het DNA geïsoleerd met behulp van een Mini-prep met de QIAprep Spin Miniprep kit. Ten slotte zijn er 90% confluente HEK293-cellen doorgezet op een 12 wells-plaat waarna het daadwerkelijke experiment van start ging.

Chemicaliën & Reagentia

Het experiment is uitgevoerd op HEK293 cellen die getransfecteerd zijn door middel van een calciumfosfaattransfectie met een EGFP-hGR plasmide.

Het medium waarop de cellen groeien is DMEM (met antibiotica gentamicine, glutamine, 10% foetaal kalfs serum en HEPES buffered saline). De positieve controle is uitgevoerd met cortisol, de negatieve controle met water en de experimentele condities met corticosteron, Mifepriston en 17AAG. Om de celpreparaten te creëren is er gebruikgemaakt van VECTAshield (met DAPI) hard set en de cellen zijn gewassen (om ze van het medium te ontdoen) met PBS dat 4% Paraformaldehyde bevat. De celpreparaten zijn gemaakt in 2 12 wells-platen.

Celcultuur

De celcultuur die gebruikt zijn HEK293 cellen die een EGFP-hGR plasmide bevatten. De concentratie van de cellen die gebruikt is voor de translocatie assay is $3,2E5$ per milliliter. In elk van de 24 wellen is 1 ml celsuspensie toegevoegd.

Plaatindeling

De plaat is 4 wellen breed en 3 wellen hoog. Elke groep heeft een kolom gekregen. De bovenste rij van de wellen bevat voor iedere groep negatieve controle met water. De tweede rij bevat voor iedere groep de positieve controle met cortisol. De onderste rij bevat voor iedere groep de experimentele conditie (corticosteron in plaats van cortisol, of er is eerst een antagonist toegevoegd óf Mifepriston, óf 17-AAG).

Translocatie Assay en fixatie

De 12 wells-platen bevatten cellen in DMEM medium. Een uur voor de translocatie assay is het medium vervangen met hetzelfde, schone medium. Bij het gebruik van antagonist is de gekozen antagonist (17AAG of Mifepriston) toegevoegd aan het medium in een 37 graden incubator (met 5% CO₂). Daarna zijn de cellen met cortisol (of corticosteron in de experimentele well) toegevoegd en zijn de cellen 30 minuten bij 37 graden en 5% CO₂ geïncubeerd. Na het incuberen is het DMEM medium verwijderd en zijn de cellen 5 min gewassen met PBS. Hierna is 300 microliter PFA toegevoegd voor 10 minuten. De PFA oplossing is ook verwijderd en de cellen worden nog 2 maal gewassen met 500 microliter PBS. Ten slotte is 20 microliter VectaSHIELD op een voorwerpglas gedruppeld en zijn de objectglaasjes uit de 12 wells platen hierop omgekeerd neergelegd.

Fluorescentiemicroscoop

Er is gebruikgemaakt van fluorescentiemicroscoop. De foto's van de celpreparaten

zijn gemaakt met twee filters (DAPI en GFP) en van elk preparaat zijn 3 fotos gemaakt met elke filter. De DAPI preparaten werden aangestraald met UV-licht, en de GFP preparaten met blauw licht. Per preparaat zijn er dus 6 foto's gemaakt. De oculair-camera-switch was ingesteld op oculair en daarna op camera en er is gebruikgemaakt van de 10X vergroting. De gain is gevarieerd tussen 0.30-0.50.

Foto Analyse

De foto's zijn geanalyseerd met het programma ImageJ. Gedownload via: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>. Per preparaat zijn de afbeeldingen van DAPI en GFP gemerged met de functie Merge Channels, waarbij C3 voor de DAPI filter is gebruikt en C2 voor de GFP filter. De cellen zijn geteld via de functie Cellcounter. Het vakje keep original is hierbij aangevinkt. Per controle en experimentele conditie zijn minimaal 50 cellen geteld per duo. Alle duo's hebben ten slotte hun data ingevoerd in een Excel file. Er is een gemiddelde en standaarddeviatie berekend voor de positieve controle, negatieve controle, corticosteron experiment, Mifepriston experiment en 17AAG experiment.

Met behulp van de gemiddeldes en standaarddeviaties van de positieve en negatieve controles is de Z-factor is berekend volgens deze formule:

$$Z' = 1 - \left| \frac{3\sigma_+ + 3\sigma_-}{\mu_+ - \mu_-} \right|$$

De Z-factor is geïnterpreteerd met behulp van het volgende overzicht:

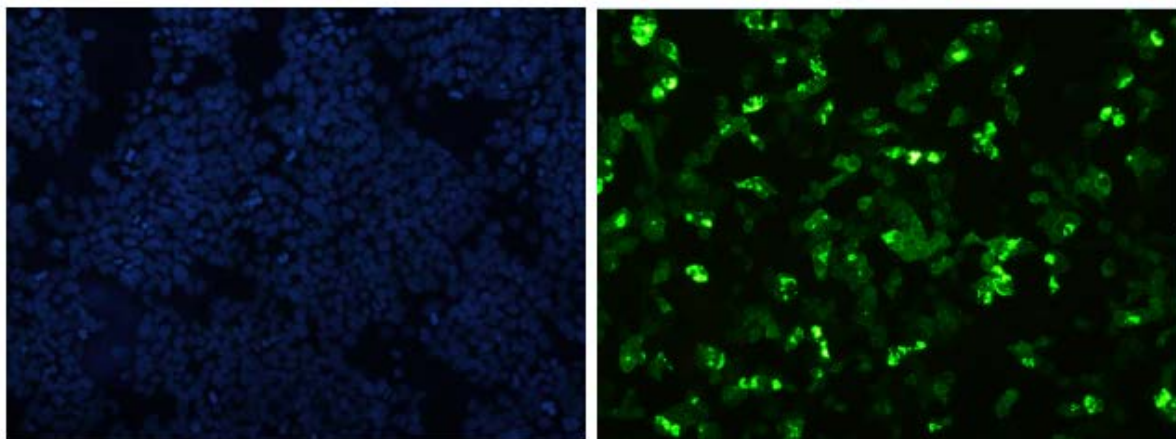
Tabel 1: Interpretatie overzicht Z-factor

| <u>Z-factor</u> | |
|-----------------|--------------------------------|
| 1.0 | Een perfect <u>assay</u> |
| 0.5-1.0 | Een goed <u>assay</u> |
| 0.0-0.5 | Een twijfelachtig <u>assay</u> |
| <0.0 | Een onbruikbaar <u>assay</u> |

Resultaten

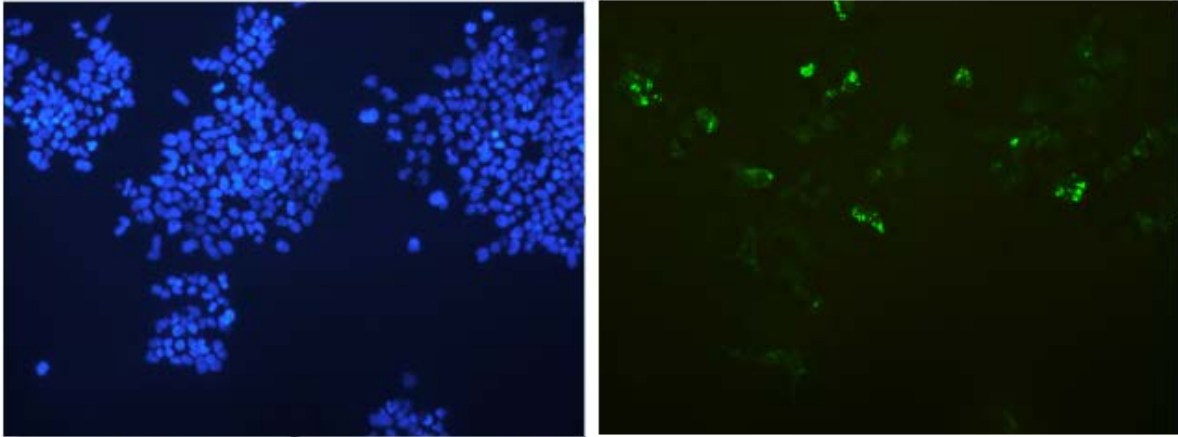
Microscopie resultaten

Eerst zijn de celpreparaten bekeken met de fluorescentiemicroscoop, waarbij de microscoop op oculair stond. Hieruit bleek dat het preparaat van de experimentele conditie, met corticosteron verkeerd om op het objectglaasje was gelegd. Er is daarom voor de foto's een preparaat van de andere practicumgroep gebruikt. Vervolgens is door elk duo van elk preparaat op 3 plekken een foto gemaakt van de cel met een blauwe filter (om de GFP kleuring mee aan te stralen) en met een UV filter (om de DAPI kleuring mee aan te stralen). De drie condities die we hadden waren de positieve controle (cortisol), de negatieve controle (H₂O) en de experimentele conditie (corticosteron). Figuur 1 laat een van de gefotografeerde plekken van het preparaat met de experimentele conditie zien.



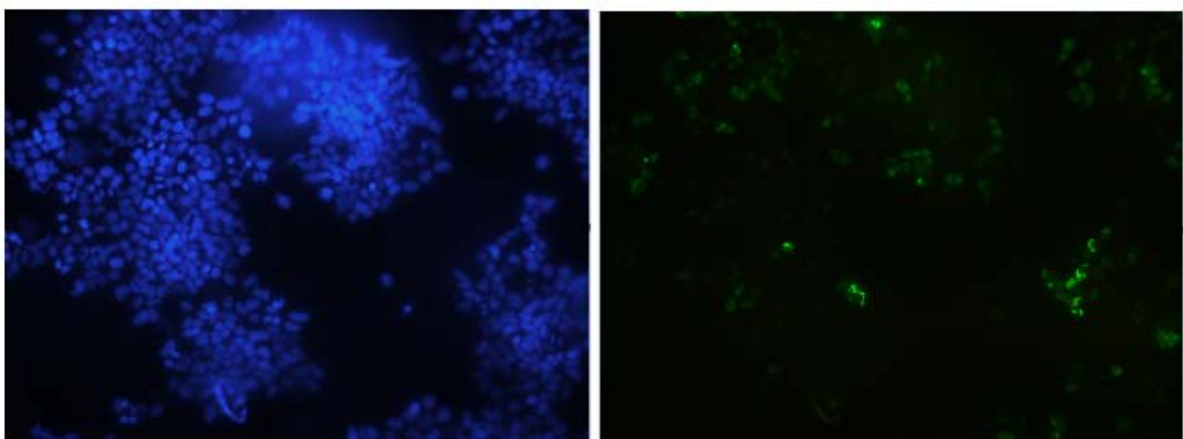
Figuur 1. HEK293 cellen met corticosteron L: DAPI-kleuring. R: GFP kleuring

Figuur 2 laat een van de drie plekken zien die gefotografeerd van een celpreparaat dat de negatieve controle translocatie assay bevatte.



Figuur 2. HEK293 cellen met H₂O. L: DAPI-kleuring. R. GFP-kleuring.

Als laatste laat figuur 3 de DAPI en GFP kleuring van een plek in het celpreparaat van de positieve controle zien. De afbeeldingen laten het experiment met corticosteron zien. Van de experimenten met 17AAG en Mifepriston zijn vergelijkbare foto's gemaakt. Echter leek bij Mifepriston de experimentele afbeelding op die van de positieve controle, en bij 17AAG leek de experimentele afbeelding op de negatieve controle. Dit komt overeen met resultaten uit de statistische analyse.



Figuur 3 HEK293 cellen met cortisol. L: DAPI-kleuring. R: GFP-kleuring

Statistische analyse

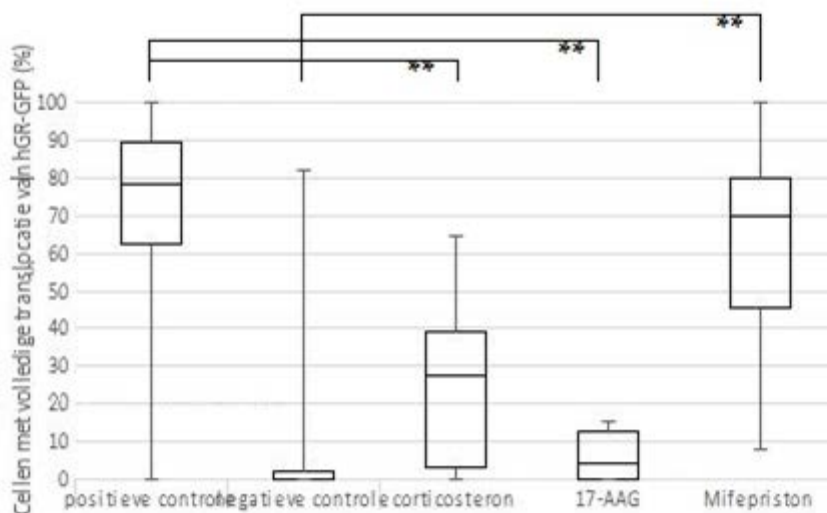
Voor de hele practicumzaal zijn de cellen geteld en hieruit volgde een gemiddelde en standaarddeviatie. Met de formule voor de Z-factor is vervolgens de Z-factor uitgerekend.

Tabel 2: De gemiddelde percentages translocatie naar de nucleus van de positieve controle, de negatieve controle, de liganden en de bijbehorende standaarddeviatie.

| | Gemiddelde percentage translocatie | Standaarddeviatie |
|--------------------|------------------------------------|-------------------|
| Positieve controle | 65,15 | 56,16 |
| Negatieve controle | 6,12 | 21,59 |
| Corticosteron | 26,44 | 30,00 |
| Mifepriston | 55,7 | 44,47 |
| 17AAG | 4,83 | 7,76 |

De uiteindelijke berekende Z-factor is $Z=-0.55$. Met het programma R-studio kon een Kruskal-Wallis en een post-hoc Tukey HSD-toets worden uitgevoerd. Daaruit volgde de onderstaande boxplot.

De dubbele asterisk geeft een p-waarde lager dan 0.01 aan.



Figuur 4: Boxplot met het percentage cellen met volledige translocatie van hGR-GFP (%)

Uit de Kruskal-Wallis test bleek dat er een significant verschil was tussen de experimentele condities tegenover de positieve en negatieve controle ($\chi^2(4) = 46.81, p = 1.67e-09$). Uit de post hoc Tukey HSD toets waren de volgende resultaten gekomen (waarbij de waarden tussen de haakjes achter het ligand/controlle de mediaan en de interkwartielafstand aangeven):

Er was geen significant verschil tussen de proportie volledige translocatie tussen corticosteron (27.27, 36.43) en de negatieve controle (0, 1.96, $T(73) = 1.673, p = 0.096223$). Er was wel een significant verschil tussen corticosteron (27.27, 36.43) en de positieve controle (78.64, 27.33, $T(73) = 3.202, p = 0.001627$).

Voor Mifepriston (69.72, 34.37) was er een significant verschil tussen de proportie volledige translocatie met de negatieve controle (0, 1.96, $T(73) = 4.304, p = 2.8e-05$) gevonden. Er was daarentegen geen significant verschil gevonden tussen de proportie volledige translocatie met de positieve controle (78.64, 27.33, $T(73) = 0.825, p = 0.410334$).

Ten slotte was er voor 17AAG (3.85, 12.34) een significant verschil tussen de proportie volledige translocatie gevonden met de positieve controle (78.64, 27.33, $T(73) = 4.412, p = 1.9e-05$), maar niet met de negatieve controle (0, 1.96, $T(73) = 0.094, p = 0.92542$).

Discussie

Uit de translocatie assay volgde een Z-waarde van $Z = -0.56$. Volgens het interpretatie overzicht van tabel 1 betekent dit dat het assay onbruikbaar is. Het beantwoord daarmee tevens onderzoeksvraag 2: Is het kwantificeren van ligand-geïnduceerde nucleaire translocatie van de GR-receptor een robuuste methode voor

het screenen van GR-liganden? Het is namelijk géén robuuste methode in het geval van de glucocorticoïdreceptor. Dit gaat tegen de verwachting in van de voorspelling omdat de methode vergelijkbaar is met de gebruikte methode in Dull et al. (2013), waarbij de methode wel robuust was gebleken voor oestrogeen. Ook wijkt corticosteron significant af van de positieve controle, Mifepriston van de negatieve controle en 17AAG van de positieve controle. Het is te verklaren door een bias in het tellen van de cellen doordat de cellen door een groot aantal verschillende mensen is geteld en deze niet goed met elkaar zijn gekalibreerd. Hierdoor is er veel spreiding, en door de vele spreiding is er veel overlap tussen de positieve (92.74 ± 14.22) en negatieve (18.78 ± 24.10) controle, wat resulteert in een negatieve Z-waarde. Het zou verbeterd kunnen worden door een klein, goed gekalibreerd team het onderzoek opnieuw te laten uitvoeren. Dit is te verklaren doordat corticosteron minder goed past op de GR receptor dan cortisol, zoals van tevoren was voorspeld. Ook 17AAG gedraagt zich zoals voorspeld. Het laat nauwelijks translocatie zien. Echter Mifepriston laat een onverwacht resultaat zien, namelijk een groot percentage translocatie, terwijl bij een antagonist verwacht wordt dat er weinig tot geen translocatie plaatsvindt. Mifepriston gedraagt zich eerder als een agonist. Dit is echter te verklaren doordat Mifepriston een ander aangrijpingspunt heeft dan antagonist 17AAG. 17AAG grijpt aan op de translocatie, waarbij Mifepriston aangrijpt op de expressie van mRNA na transcriptie. (Gallagher & Young, 2006). Uit de positieve controle is inderdaad gebleken dat cortisol bindt aan de glucocorticoïdreceptor, als in het onderzoek van De Kloet et al. (2005). Het is mogelijk om een van de antagonisten verder te onderzoeken, zodat ze uiteindelijk bruikbaar gemaakt worden als medicijn voor mensen met agressief gedrag, hersenbeschadiging, cognitieve aftakeling en psychiatrische stoornissen. Ook blijken beide antagonisten na het onderzoek en literatuurstudie een verschillende cascade te volgen binnen de cel. Dit is van belang voor het verder onderzoeken van deze en vergelijkbare antagonisten of liganden.

Enkele mogelijke suggesties voor vervolgonderzoek is het kloneren van het hGR gen na GFP in de plasmide, in plaats van eerst het hGR en daarna het GFP. In het huidige onderzoek is er namelijk mogelijk meer translocatie geweest, welke niet is waargenomen omdat er geen GFP aan vast getransleerd was. Dit komt omdat vanaf de promotor gezien, het hGR eerst werd afgeschreven. Als de transcriptie van het gen dus niet volledig was, is er ook geen volledig hGR-GFP fusie eiwit ontstaan, maar alleen een (gedeeltelijk) hGR eiwit. Dit hGR eiwit kan dus translocatie veroorzaken, die niet wordt waargenomen. Als men in toekomstige onderzoeken de plasmide andersom zou construeren, zou elke afgeschreven hGR gen ook daadwerkelijk zichtbaar zijn in de translocatie assay. Men kan ook nog vervolgonderzoek doen naar het precieze aangrijpingspunt van Mifepriston. Ten slotte kan men onderzoeken of de werking van de Mifepriston, 17AAG en corticosteron toepasbaar is als medicijn voor mensen. Vanzelfsprekend zal de kennis over het snijvlak tussen de psychologie, biochemie neurobiologie in de toekomst alleen maar toenemen.

Literatuurlijst

Boor, P.K.I., Wagemans, C., Beekman, M. Van Zelm, E., Hoekman, M.F. (2006). *Practicumhandleiding Celbiologie – Psychobiologie (3^e ed.)* Universiteit van Amsterdam.

Dull, A.B., et al. (2013), Identification of compounds by highcontent screening that induce cytoplasmic to nuclear localization of a fluorescent estrogen receptor D chimera and exhibit agonist or antagonist activity in vitro. *Journal of Biomolecular Screening*, XX(X), 1-11.

Gallagher, P., Young, A.H. (2006), Mifepristone (Ru-486) treatment for depression and psychosis: a review of the therapeutic implications. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2006:2(1), 33-42.

Haller, J., & Kruk M.R. (2006). Normal and abnormal aggression: human and novel laboratory models. *Neuroscience & Biobehavioral Review*, 30, 292-303

Kloet, E.R. de (2009). Stress: neurobiologisch perspectief. *Tijdschrift voor psychiatrie*, 51, 541-550.

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

Laan, S. van der, & Meijer, O.C. (2008). Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *European Journal of Pharmacology*, 585, 483-491.