

Identification and characterisation of stress-regulated genes in the central nervous system : in vitro and in vitro studies on rodents

Citation for published version (APA):

Föcking, M. (2009). *Identification and characterisation of stress-regulated genes in the central nervous system : in vitro and in vitro studies on rodents*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20090703mf>

Document status and date:

Published: 01/01/2009

DOI:

[10.26481/dis.20090703mf](https://doi.org/10.26481/dis.20090703mf)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The aim of the studies described in this thesis was to use the recently developed Proteomics technology in order to investigate differentially expressed proteins in an *in vivo* model of focal cerebral ischemia and an *in vitro* stress model and to get new insights into drug related findings.

Cell death and survival pathways in the brain are highly complex coordinated events, and we still know little about which proteins are the most important, how best to intervene in their function and what impact this has for the brain during recovery.

We hypothesised that protein expression patterns can be detected by high throughput techniques and eventually uncover surrogate end point biomarkers and novel mechanisms.

The models used in this thesis were chosen due to their ability to induce stress to the cerebral system on different pathways with distinct stress patterns and varying morphological changes, during and after the direct hit of the event.

These *in vivo* and *in vitro* models mimic the human situation to and certain extent and are well established and accepted in the analysis of ischemia and long-term stress.

Chapter 1 is a general introduction to this thesis and outlines the scientific background to stress generally and stress in two distinct diseases, ischemia and long-term stress as well as some background on Proteomics techniques.

In **Chapter 2** we demonstrated that the 2-D DIGE approach is a potentially fruitful proteomics technique for analysing brain development. First, the DIGE labelling is a sensitive technique with a large dynamic range, which makes the detection of proteins of both low and high abundance possible and quantitation robust. Secondly, the high significance levels that are reached reflect the reliability of the quantitative analysis and the normalization power when using an internal standard. Thirdly, the proteins that we identified showed expression patterns that are similar to expression patterns revealed in previous studies by using other techniques.

The similarities in effects on protein expression of both conventional and herbal antidepressants in a hippocampal neuronal cell line are described in **Chapter 3**. This study has investigated the protein expression profiles of hippocampal neuronal cells exposed to clomipramine, St John's Wort, Xiao Yao San or no treatment. The results from the comparison between the proteomic profiles of these samples suggest that the three treatments do share common molecular targets and that these appear to focus specifically on those proteins involved in the cytoskeleton, energy metabolism, cell signalling, protein synthesis and protein folding. They support previous work indicating that antidepressants increase neuronal plasticity and provide some novel findings regarding the mechanisms by which they may do this.

In **Chapter 4** we studied that chronic glucocorticoid receptor activation is related to the cyclic AMP response element-binding protein (CREB) transcriptional activity in clonal neurons. Excessive circulating levels of glucocorticoids are thought to be associated with cognitive impairment. We provide evidence that chronic activation of the glucocorticoid receptor in clonal neurons inhibits the transcriptional activity of CREB which is believed to be involved in memory processes. To investigate the underlying mechanism we studied the phosphorylation of CREB and found altered phosphorylation kinetics in neurons chronically treated with glucocorticoids. Our results provide evidence that long-term activation of the GR in clonal neurons inhibits CRE-regulated gene expression that indicates that a hitherto unrecognized crosstalk between the glucocorticoid pathway and CREB exists.

In **Chapter 5** the Multi-Western blot PowerBlot™ technique was used to investigate more than 400 proteins with brain extracts of mice submitted to transient focal ischemia. After MCA occlusion up to 45% of proteins were up- or downregulated in the ipsilateral hemisphere by a factor of 1.5 or more, as compared to sham-operated controls. In the non-ischemic hemisphere the number of regulated proteins was close to 50%, indicating a hitherto unrecognized involvement of the opposite side. The study provides further evidence for the complexity of multi-injury pathways in the evolution of ischemic brain damage it may help to identify key mediators of ischemic injury.

Chapter 6 describes our findings that statins potentiate apoptosis in immortalised neurons. Statins are lipid-lowering drugs that have been shown to reduce atherosclerotic cardiovascular morbidity and mortality. Our results demonstrated that statins potentiate caspase-3 activity in neurons and provide evidence that statins potentiate apoptosis, but do not initiate apoptotic pathways in clonal neurons. Therefore, in spite of the beneficial effects of statins by lowering blood lipids and by increasing endothelial NO our results provide evidence for a careful evaluation of whether patients with neurological diseases should be treated with statins.

In **Chapter 7** the results obtained are critically discussed in terms of their overall applicability and latest findings of work in progress are put into the context of the results presented.

In conclusion, the present work stresses the potential of using high throughput technologies to identify differentially expressed proteins, giving clues which proteins are the most important, how best to intervene in their function and what impact this has for the brain. This improves our understanding of the process of cell death following stroke and long-term stress. By using drug approaches on both, disease models as well as healthy controls, new insights can be obtained. Future studies are warranted to unravel how best to target this to protect the brain.

Samenvatting

Het doel van de studies beschreven in dit proefschrift was om gebruik te maken van de onlangs ontwikkelde *proteomics* technologie teneinde onderzoek te verrichten aan verschillende eiwitten in zowel een *in vivo* model van brein ischemie als een *in vitro* stress model om zodoende inzicht te krijgen in medicijn gerelateerde bevindingen.

Celdood en overlevings transductie routes in het brein zijn zeer gecompliceerde processen, en wij weten nog steeds weinig over welke eiwitten het meest belangrijk zijn, hoe te interveniëren in hun functie en wat voor een invloed dit heeft op het brein tijdens herstel na een specifiek voorval.

Wij veronderstelden dat eiwit expressie patronen gedetecteerd kunnen worden met *high throughput* technieken welke uiteindelijk zowel *biomarkers* als nieuwe werkingsmechanismen opleveren.

De modellen die in deze proefschrift gebruikt zijn, werden gekozen omdat zij de mogelijkheid bieden stress te induceren aan het hersen-systeem op verschillende transductie routes met specifieke stress patronen en verschillende morfologische veranderingen, gedurende en na een specifiek voorval.

Deze *in vivo* en *in vitro* modellen bootsen de humaan situatie tot zekere hoogte na en zijn geaccepteerd om ischemie en langaanhoudende stress te bestuderen.

Hoofdstuk 1 is een algemene inleiding en geeft een beschrijving van de wetenschappelijke achtergrond voor stress in het algemeen en in het bijzonder voor stress bij twee specifieke indicaties, namelijk ischemie en chronische stress. Daarnaast wordt enige achtergrond informatie gegeven over de *proteomics* technologie.

In **Hoofdstuk 2** hebben wij aangetoond dat de 2D-DIGE benadering in potentie een geschikte *proteomics* technologie is om de ontwikkeling van de hersenen te bestuderen.. Ten eerste, *DIGE labelling* is een sensitieve technologie met een groot dynamische bereik, wat de detektie van eiwitten in zowel lage als hoge hoeveelheden mogelijk maakt met een robuuste kwantificatie. Ten tweede, de hoge significantie niveaus die bereikt worden geven de betrouwbaarheid van deze kwantitatieve methode weer en de normalisatie capaciteit als het gebruikt wordt als een interne standaard. Ten derde, de eiwitten die wij hebben geïdentificeerd lieten expressie patronen zien die gelijk waren aan eerdere studies waarbij andere technieken gebruikt werden.

De overeenkomsten in effecten op eiwit expressie van zowel conventionele als ook kruidachtige antidepressiva in een hippocampale neuronale cellijn zijn beschreven in **Hoofdstuk 3**. De eiwit expressie profielen van hippocampale neuronale cellen werden onderzocht na behandeling met clomipramine, hypericum, Xiao Yao San of geen behandeling. Een vergelijking tussen de proteomics profielen van deze behandelingen toont aan dat ze alle drie gemeenschappelijke moleculaire doelen hebben en dat deze specifiek focussen op eiwitten die betrokken zijn bij het cytoskelet, energie metabolisme, signaal transductie, eiwit synthese en eiwit modificaties. Dit bevestigt eerder werk dat

aangaf dat antidepressiva de neuronale plasticiteit verhoogden en geeft nieuwe inzichten in mogelijke werkingsmechanismen hierbij.

In **Hoofdstuk 4** beschrijft de relatie tussen chronische glucocorticoïd receptor activatie en de transcriptie activiteit van *cyclic AMP responsive element binding protein* (CREB) in *clonal* neurons. Extreem hoge niveaus van glucocorticoïden worden verondersteld geassocieerd te zijn met een cognitieve achteruitgang. Wij leveren bewijs dat chronische activatie van de glucocorticoïd receptor in clonal neuronen de transcriptionele activiteit van CREB, welke verondersteld wordt in geheugen processen een rol te spelen, remt. Om het onderliggend mechanisme te onderzoeken hebben wij de fosforylering van CREB in neuronen bestudeerd die chronisch behandeld werden met glucocorticoïden. Onze resultaten tonen aan dat chronische activatie van de glucocorticoïd receptor in clonale neuronen de CRE-gereguleerde gen expressie remt en dat wijst op een tot dusver niet veronderstelde *cross-talk* tussen de glucocorticoïd transductie route en CREB.

In **Hoofdstuk 5** beschrijft een Multi-Western blot PowerBlot™ technologie welke gebruikt werd om meer dan 400 eiwitten met brein extracten van muizen met kortdurende focale ischemie te onderzoeken. Na *medial cerebral artery* (MCA) occlusie waren 45% of meer eiwitten op- of af-gereguleerd in de betrokken hemisfeer met een factor 1.5 of meer in vergelijking met sham geopereerde controle dieren. In de gezonde controle hemisfeer was het aantal van gereguleerde eiwitten bijna 50% wat op een tot dusver niet-aangenomen betrokkenheid van de niet-aangedane hemisfeer wijst. Deze studie levert tevens bewijs voor de complexiteit van multi-beschadiging routes in het ontstaan van ischemische hersenschade. Maar dit kan ons wel helpen om de sleutelspelers bij ischemische schade aan te wijzen.

Hoofdstuk 6 beschrijft de bevindingen van de door statines versterkte geprogrammeerde celdood in neuronen. Statines zijn lipide verlagende drugs die atherosclerotische cardiovasculaire morbiditeit en mortaliteit verminderen. De resultaten tonen aan dat statines de caspase-3 activiteit in neuronen laat toenemen en geeft aan dat statines de geprogrammeerde celdood versterken, maar niet de apoptotische routes in clonal neuronen initieert. Dus, ongeacht de positieve effecten van statines om zowel vetten in het bloed te verlagen als endotheliaal NO te laten toenemen, zijn er aanwijzingen dat een statine behandeling van patiënten met een neurologische ziekte zorgvuldig overwogen moet worden.

In **Hoofdstuk 7** worden de resultaten kritisch besproken in het kader van hun toepasbaarheid en de meest recente data wordt in de context van de huidige resultaten besproken.

Eindconclusies

Het gepresenteerde werk benadrukt het potentieel van een *high throughput* methode om differentieel tot expressie komende eiwitten te bepalen, geeft een aanwijzing welke eiwitten het meest belangrijk zijn, hoe het best te intervenieren is in hun functie en welke impact dit heeft op het brein. Dit verbetert ons inzicht in de processen van celdood bij ischemie en chronische stress. Door middel van een benadering met specifieke drugs kunnen nieuwe inzichten verkregen worden, zowel in ziekte als in gezondheid. Toekomstig onderzoek is nodig om te bepalen hoe dit het beste gedaan kan worden om voldoende het brein te kunnen beschermen.