

VU Research Portal

Adeno-associated viral vector-mediated delivery of transcription factors to promote axon regeneration

Fagoë, N.D.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Fagoë, N. D. (2014). *Adeno-associated viral vector-mediated delivery of transcription factors to promote axon regeneration*.

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 ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Adeno-geassocieerde virale vector-gemedieerde overexpressie van transcriptiefactoren ter bevordering van axon regeneratie

Nederlandse samenvatting

Zenuwcellen, ook wel neuronen genoemd, hebben lange uitlopers (axonen) die zenuwbanen vormen en signalen van en naar de hersenen doorgeven. Zo worden motorische signalen vanuit de hersenen en het ruggenmerg doorgegeven aan spieren en worden sensorische signalen over de omgeving doorgegeven door de zintuigen aan het ruggenmerg en de hersenen. Na schade aan neuronen en zenuwbanen van het centrale zenuwstelsel (gevormd door de hersenen en het ruggenmerg) vindt weinig tot geen herstel plaats, wat resulteert in blijvend functieverlies bijvoorbeeld verlamming na schade aan het ruggenmerg door een dwarslaesie. Een belangrijke reden voor het gebrek aan efficiënt herstel aan beschadigde axonen van neuronen in het centrale zenuwstelsel is dat er geen regeneratie geassocieerde genen (RAG) geactiveerd worden na schade. Neuronen van het perifere zenuwstelsel zijn, in tegenstelling tot het centrale zenuwstelsel, wel in staat om axonen opnieuw te laten uitgroeien na beschadiging. Dit gaat gepaard met een efficiënte intrinsieke respons van de perifere zenuwcel door de activatie van honderden RAG. Het RAG programma is essentieel voor het regenereren van axonen van de beschadigde neuron en omvat ook de activatie van regeneratie geassocieerde transcriptiefactoren (TF). TF zijn eiwitten die de expressie van verschillende genen tegelijkertijd kunnen coördineren. Regeneratie geassocieerde TF zijn dus belangrijk omdat ze de activatie van heel veel RAG tegelijkertijd kunnen coördineren. Daarnaast is het bekend dat verschillende regeneratie geassocieerde TF met elkaar kunnen samenwerken waardoor het potentieel mogelijk zou zijn om het complete RAG programma te activeren door een specifieke combinatie van TF tot expressie te brengen in beschadigde neuronen van het centrale zenuwstelsel.

Het doel van het onderzoek dat beschreven staat in dit proefschrift was om een combinatie van regeneratie geassocieerde TF in beschadigde neuronen tot expressie te brengen in het dorsale wortel ganglion (DRG) diermodel om zo het RAG programma te activeren teneinde de regeneratie van beschadigde axonen te bevorderen. In het eerste deel van dit proefschrift beschrijven we methoden om A) de neuronen van de DRG te infecteren (oftewel transduceren) met adeno-geassocieerde virale (AAV) vectoren om op die manier een gen tot expressie te brengen in deze zenuwcellen, en B) de ontwikkeling van een vector die het mogelijk maakt om twee genen tegelijkertijd tot expressie te brengen in DRG neuronen. In het tweede deel gebruiken we de technieken die zijn ontwikkeld in het eerste deel van dit proefschrift om A) combinaties van TF te testen in een celkweekmodel voor axon uitgroei en B) de effecten van een combinatie van regeneratie geassocieerde TF op axon regeneratie van DRG neuronen in een diermodel te bestuderen.

In **hoofdstuk 1** beschrijven we de gevolgen van een dwarslaesie en bediscussiëren wij studies met een focus op de regeneratie van axonen door het activeren van het RAG programma. Studies naar individuele RAG en regeneratie geassocieerde TF hebben tot op heden slechts beperkt effect laten zien op de regeneratie van axonen na ruggenmergletsel in diermodellen. Het tot overexpressie brengen van een specifieke combinatie van regeneratie geassocieerde TF door middel van AAV vectoren om het RAG programma te activeren in beschadigde neuronen zou een strategie kunnen zijn om de regeneratie van axonen te bevorderen.

Het gebruik van AAV vectoren is een efficiënte moleculaire techniek om de (over)expressie van een specifiek transgen in neuronen tot stand te brengen. In **hoofdstuk 2** beschrijven we twee verschillende toedieningsmethoden voor AAV vectoren aan DRG neuronen in vivo: de directe injectiemethode met een dunne glazen naald en intrathecale toediening via een katheter in het cerebrospinaal vloeistof. Beide manieren leiden tot efficiënte transductie van DRG neuronen. Elke methode heeft zijn voor- en nadelen. De voordelen van de directe injectiemethode zijn dat hoge transductie ratio's kunnen worden bereikt in specifieke DRG met kleine hoeveelheden vector (0.5 tot 1 μ l), maar deze techniek is complex, invasief en tijdrovend. De intrathecale injectiemethode heeft het voordeel dat het een snelle en simpele techniek is waarmee meerdere DRG bilateraal getransduceerd kunnen worden zonder chirurgische manipulatie van de DRG. De nadelen zijn dat een grotere hoeveelheid (10-20 μ l) vector nodig is en het lekken van vectordeeltjes vanuit het cerebrospinaal vloeistof naar het ruggenmerg en perifere weefsels.

Voor veel studies waarin de expressie van een transgen wordt gemanipuleerd met AAV vectoren is het nuttig om een fluorescerende marker tot co-expressie te brengen. In regeneratiestudies wordt axon uitgroei gekwantificeerd op locaties die vaak centimeters zijn verwijderd van het neuronale cellichaam. In deze studies zou het nuttig zijn om de regenererende axonen van getransduceerde neuronen te labelen met een fluorescerende marker om bijvoorbeeld de effecten van de overexpressie van een TF te kwantificeren. In **hoofdstuk 3** hebben we een unieke AAV vector met twee promoters ontwikkeld voor de expressie van twee genen tegelijkertijd. We laten efficiënte co-expressie van een rood (mCherry) en groen (eGFP) fluorescerend eiwit in DRG neuronen zien door middel van directe en intrathecale injectie (**hoofdstuk 2**) van deze “dubbele promoter” AAV vector. Kwantificatie van de eGFP-positieve neuronen laat zien dat 77 tot 85 procent van deze neuronen ook mCherry-positief zijn. We laten zien dat door gebruik van een gemodificeerde vorm van eGFP dat actief wordt getransporteerd (eGFPf) axonen op grote afstand van het neuronale cellichaam efficiënter gelabeld worden dan normaal eGFP, wat erg nuttig is voor regeneratiestudies. Deze “dubbele promoter” vector stelt ons dus in staat om de axonen van getransduceerde neuronen specifiek te labelen en kwantificeren na schade.

In **hoofdstuk 4** testen we combinaties van TF in twee modules (module 1: ATF3, c-Jun, Smad1 en STAT3; module 2: KLF7, Sox11, MEF2 en SRF) in een celkweekmodel voor axon uitgroei. Er zijn verschillende redenen waarom we deze combinaties van TF hebben onderzocht. Voor module 1 geldt dat ze zijn opgereguleerd na perifere zenuw schade, dat ze fysieke of functionele interacties hebben en hun DNA-bindings sequenties zijn overrepresenteerd in de promotoren van RAG. Voor module 2 geldt met name dat hun DNA-bindings sequenties zijn overgerepresenteerd in RAG-promotoren. We maken gebruik van de “dubbele promoter” AAV vector ontwikkeld in **hoofdstuk 3** en brengen een TF en eGFPf tot expressie in F11 cellen, een cellijn ontstaan uit de fusie van DRG en neuroblastoom cellen. In module 1 laten we relatief kleine uitgroei effecten zien met ATF3, verschillende combinaties van twee en drie TF en de complete combinatie van ATF3, c-Jun, Smad1 en STAT3. De effecten van de combinaties in module 1 waren echter niet groter dan van ATF3 zelf. In module 2 daarentegen zien we opmerkelijk sterke synergistische effecten op axon uitgroei met verschillende combinaties die significant groter waren dan de effecten van individuele TF.

Hoewel de effecten van de TF in module 1 (ATF3, c-Jun, Smad1 en STAT3) in F11 cellen beperkt zijn, waren er verschillende redenen om deze TF verder te bestuderen in een parallel dierexperiment. Ten eerste, het F11 model geeft slechts een beperkte weergave van de complexe omgeving waarin regeneratie plaats vindt, zoals de interactie tussen neuronen en andere celtypes. Daarnaast hebben F11 cellen al hoge endogene expressie van ATF3, c-Jun, Smad1 en STAT3, wat mogelijk kan verklaren waarom overexpressie van deze TF slechts beperkte effecten gaf. Ten tweede, uit verschillende onderzoeken in de literatuur blijkt dat deze vier TF individueel zijn geassocieerd met succesvolle regeneratie van beschadigde axonen. Ten derde, in de literatuur zijn directe en indirecte interacties tussen ATF3, c-Jun, Smad1 en STAT3 beschreven. Dit onderschrijft het idee dat het combineren van deze vier TF kan leiden tot synergistische effecten op axon regeneratie. In **hoofdstuk 5** gebruiken we de “dubbele promoter” AAV vector (**hoofdstuk 3**) om alleen eGFPf (controle groep), ATF3 en eGFPf of de combinatie ATF3/c-Jun/Smad1/STAT3 en eGFPf tot expressie te brengen in L4 en L5 DRG neuronen. We bestuderen de effecten op axon regeneratie na een laesie van de centrale DRG axonen op verschillende locaties in de dorsale wortel en in de dorsale kolom van het ruggenmerg. We laten succesvolle co-expressie van de individuele TF in eGFPf-positieve DRG neuronen zien en laten voor het eerst zien dat ATF3 de regeneratie van axonen bevordert na schade aan de dorsale wortel. De combinatie van ATF3, c-Jun, Smad1 en STAT3 leidt ook tot verbeterde regeneratie van dorsale wortel axonen, echter dit was niet effectiever dan overexpressie van alleen ATF3. We vonden geen verbetering van functie in sensorische testen gebaseerd op hitte en elektrische stimuli. We vonden echter een significante toename van het aantal dieren met autotomie gedrag in de ATF3 groep, en een trend in de combinatie TF groep. We vonden geen verbeterde axon regeneratie van overexpressie van TF na een dorsale kolom laesie.

DRG neuronen zijn een geaccepteerd model in regeneratiestudies. Echter, schade aan de centrale axonen van DRG neuronen in de dorsale kolom laat andere sensorische zenuwbanen intact die het functieverlies zouden kunnen compenseren, waardoor spontaan functieherstel optreedt binnen enkele weken. In **hoofdstuk 6** vergelijken we verschillende testen om functioneel herstel na een dorsale kolom laesie op een betrouwbare manier te meten. We gebruiken de tape test, touwbrug test, CatWalk™XT voortbewegingsanalyse, horizontale ladder test en een nieuw ontwikkelde test, de schuine rollende ladder, waarmee tegelijkertijd het verlies van proprioceptie en tastzin gemeten kan worden. De dieren kregen een cervicale (C4) of thoracale (T7) laesie en werden acht weken lang gevolgd. In de meeste testen werd binnen twee weken spontaan herstel gemeten. Echter, in sommige tests, waaronder de schuine rollende ladder test, werd voor een langere periode functieverlies gemeten. Hieruit blijkt dat naast enkele bestaande testen de schuine rollende ladder een goede test zou kunnen zijn voor regeneratiestudies waarin een experimentele behandeling wordt toegepast na een dorsale kolom laesie.

In **hoofdstuk 7** vatten we het werk dat beschreven staat in dit proefschrift samen en geven we een algemene discussie over onze ideeën waarom er geen synergistische effecten geobserveerd zijn na overexpressie van combinaties van TF uit module 1. We bediscussiëren het mengen van virale vector stocks voor de co-expressie van meerdere TF tegelijkertijd, de biologische activiteit van de TF die tot overexpressie zijn gebracht en de mogelijkheid dat de TF uit module 1 niet de centrale TF zijn die het RAG programma coördineren. Zoals bovenstaand genoemd gaven de TF uit module 2 sterk synergistische effecten op axon uitgroei in het F11 celkweekmodel. Deze TF worden momenteel door een andere promovendus, Callan Atwell, verder onderzocht in een parallelle onderzoekslijn.

