

# VU Research Portal

## **Deciphering the gene regulatory network underlying successful neuronal regeneration**

Mac Gillavry, H.D.

2010

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

### **citation for published version (APA)**

Mac Gillavry, H. D. (2010). *Deciphering the gene regulatory network underlying successful neuronal regeneration*. Ipskamp Drukkers.

### **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](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## Nederlandse Samenvatting

### Zenuwschade en regeneratie

Het centrale zenuwstelsel, de hersenen en het ruggenmerg, staat in verbinding met de organen en zintuigen via het perifere zenuwstelsel. Zenuwcellen (neuronen) zenden elkaar en hun doelorganen elektrische signalen via lange uitlopers, axonen. Motorneuronen sturen zo de spieren aan, en sensorische neuronenv geven zo de gevoelsprikkels door naar de hersenen. Bij beschadiging van de zenuwbanen die deze axonen bevatten, kan dus verlies van beweging en gevoel optreden. De gevolgen van een beschadiging kunnen echter sterk verschillen. In het perifere zenuwstelsel vindt vaak vrij goed herstel, of regeneratie, van axonen plaats, terwijl beschadiging van axonen in het centrale zenuwstelsel meestal permanent is. De reactie van op perifere zenuwschade is dus fundamenteel anders dan de reactie op schade in het centrale zenuwstelsel. Dit verschil is enerzijds een gevolg van de directe omgeving van de beschadigde axonen. In het centrale zenuwstelsel vindt vaak een sterke ontstekingsreactie plaats, wat samen met de vorming van littekenweefsel de regeneratie van axonen sterk remt. In het perifere zenuwstelsel gebeurt dit niet en zijn er lokaal cellen aanwezig die de teruggroei van axonen stimuleren. Anderzijds is dit verschil een gevolg van de intrinsieke respons van het beschadigde neuron. Een neuron in het perifere zenuwstelsel is in staat om in reactie op de beschadiging specifieke groepen eiwitten aan te maken die de regeneratie van het axon bevorderen. De aanmaak van eiwitten in een cel is een strikt gereguleerd proces dat begint bij het activeren van een gen dat codeert voor het eiwit. Dit proces, het reguleren van genen die betrokken zijn bij axonregeneratie, is het onderwerp van mijn promotieonderzoek.

### Van gen tot eiwit; de regulatie van genexpressie

De kern van elke cel in ons lichaam bevat dezelfde genetische code, opgeslagen in het DNA. Over de lange DNA strengen verspreid, liggen ongeveer 23.000 losse gebieden, de genen, die ieder voor een ander eiwit coderen. Eiwitten zijn nodig voor de opbouw en onderhoud van de cel. Dit betekent dat tijdens de ontwikkeling in verschillende celtypen specifieke eiwitten moeten worden aangemaakt. Een levercel heeft bijvoorbeeld andere eiwitten nodig dan een neuron. Niet alleen tijdens de ontwikkeling, maar ook als een cel beschadigd raakt of signalen van buitenaf krijgt, worden specifieke genen geactiveerd om de benodigde eiwitten te produceren. Van een actief gen wordt dan een kopie gemaakt, een "messenger RNA" (mRNA), wat de celkern verlaat, alwaar de informatie op het mRNA wordt afgelezen en het juiste eiwit wordt geproduceerd. Dit hele proces wordt ook wel genexpressie genoemd. Genexpressie wordt heel nauwkeurig gereguleerd door een speciale groep eiwitten, transcriptiefactoren. Deze eiwitten binden aan het DNA om genen te kunnen reguleren. Naast de code om eiwitten te kunnen maken (genen), bevat het DNA dus ook de code die de activiteit van genen reguleert. Als een transcriptiefactor

aan het DNA vlak voor het begin van een gen (dit gebied heet de “promotor”) bindt, kan het de productie van mRNA, ofwel de expressie van dat gen stimuleren, maar ook remmen.

### **Transcriptionele netwerken**

Elke transcriptiefactor kan hele groepen genen reguleren. Omgekeerd, kan een gen door een verschillend aantal transcriptiefactoren worden gereguleerd. Deze interacties tussen genen en transcriptiefactoren wordt beschreven in “transcriptionele netwerken”. Mijn promotieonderzoek was gericht op het identificeren van genen die betrokken zijn bij de regulatie van axonregeneratie na schade én de transcriptiefactoren die deze genen reguleren. Uiteindelijk willen we het volledige netwerk van transcriptiefactoren en genen in kaart brengen dat succesvolle axonregeneratie reguleert. Als je weet welke genen in een proces betrokken zijn en hoe die genen worden gereguleerd krijg je beter inzicht in het verloop van het proces. Ook kun je dan beter de knelpunten in de regulatie aanwijzen. Samen zouden deze inzichten kunnen leiden tot een strategie om herstel na zenuwbeschade in het centrale zenuwstelsel te bevorderen.

### **Het meten van genexpressie na zenuwbeschade**

Voor het in kaart brengen van zo'n netwerk is het allereerst belangrijk te weten welke genen er gereguleerd worden, ofwel tot expressie komen. Dit kan met behulp van “microarrays” gemeten worden. Microarrays zijn glaasjes waar kopieën van genen op gespot zijn. Door uit cellen onder een bepaalde conditie de mRNAs te isoleren en op zo'n glaasje aan te brengen kan afgeleid worden welke mRNAs blijven binden aan de spots en dus aanwezig waren in die cellen. Door verschillende condities te vergelijken kan zo ook gekeken worden of genen na b.v. celschade meer of minder tot expressie komen.

Op deze manier hebben we in de rat genen geïdentificeerd die geactiveerd ofwel geremd worden na zenuwbeschade. We hebben hiervoor de neuronen in de dorsale wortelganglion bestudeerd. Deze, naast het ruggenmerg gelegen zenuwknop, bevat sensorische neuronen die gevoelsprikkels van de zintuigen doorgeven naar de hersenen. Interessant aan dit model is dat deze neuronen zowel een perifere axon hebben dat na beschadiging goed herstelt, als een centraal axon, dat niet herstelt na beschadiging. Met behulp van microarrays hebben we bestudeerd welke genen geactiveerd of geremd worden in deze sensorische zenuwcellen na zenuwbeschade. We hebben dit bestudeerd na een perifere zenuwbeschadiging én na een centrale zenuwbeschadiging. Deze studie geeft een volledig inzicht in welke genen geactiveerd (of opgereguleerd) zijn en welke genen geremd zijn na succesvolle en niet-succesvolle zenuwregeneratie. We zien bijvoorbeeld genen opgereguleerd waarvan al bekend is dat ze betrokken zijn bij zenuwuitgroei, maar ook genen waarvan de functie onbekend is, en die wellicht een rol spelen in het proces van zenuwregeneratie. Op basis van deze studie hebben we vervolgens op verschillende manieren geprobeerd inzicht te krijgen in de functie en regulatie van deze genen.

## **Het identificeren van transcriptiefactoren die zenuwregeneratie bevorderen of remmen**

Omdat we geïnteresseerd zijn in transcriptiefactoren, hebben we eerst gekeken welke van de gevonden genen coderen voor transcriptiefactoren en een rol kunnen spelen in zenuwregeneratie (Hoofdstuk 2). Van de paar honderd genen die gereguleerd zijn na zenuw schade, vinden we er ongeveer 70 die coderen voor transcriptiefactoren. In kweek-experimenten hebben we ieder van deze 70 transcriptiefactoren uitgeschakeld en het effect daarvan op de neuriet uitgroei van deze cellen getest. Als een model voor axon-regeneratie, maken we hier gebruik van zenuwcellen die gemakkelijk gekweekt kunnen worden en gestimuleerd kunnen worden om “neurieten” te groeien. We spreken hier van “neurieten” omdat deze zenuwuitlopers op dit moment nog geen volgroeide, functionele axonen zijn. Van de 70 door ons geteste transcriptiefactoren zijn er 10 die neuriet uitgroei stimuleren of remmen. Tot onze verassing ontdekten wij dat er ook factoren zijn die worden geactiveerd tijdens succesvolle regeneratie, maar een remmend effect hebben op neuriet uitgroei. Dit betekent dus dat het proces van succesvolle zenuwregeneratie ook factoren activeert die remmend werken op datzelfde herstelproces. Een voorbeeld van zo'n transcriptiefactor die deze paradox duidelijk illustreert en waar een groot deel van mijn onderzoek zich op gericht heeft is NFIL3.

## **NFIL3 en CREB vormen samen een transcriptioneel netwerk dat zenuwregeneratie reguleert**

Uit de eerste experimenten bleek dat van alle 70 transcriptiefactoren NFIL3 het sterkste remmend werkt op neuriet uitgroei. Echter, we hadden eerder gevonden dat als we de perifere zenuw van de rat beschadigen en dus zenuwregeneratie induceren, NFIL3 verhoogt tot expressie komt. Ook in diverse celmodellen zien we een sterke toename in NFIL3 expressie, wanneer neuriet uitgroei wordt gestimuleerd. Wanneer we nu deze toename in NFIL3 expressie voorkomen of we blokkeren de werking van NFIL3, wordt de neuriet uitgroei van deze cellen nog verder gestimuleerd. Kortom, NFIL3 expressie neemt toe tijdens neuriet uitgroei, maar remt dit proces vervolgens. Om deze paradox te kunnen verklaren zijn we gaan bestuderen hoe NFIL3 samen werkt met andere transcriptiefactoren, welke genen het reguleert, en dus hoe het transcriptionele netwerk rondom NFIL3 eruit ziet. We hebben ons daarbij gebaseerd op voorgaand werk van andere laboratoria. Het was bijvoorbeeld al bekend dat een aan NFIL3 verwante transcriptiefactor, CREB, een stimulerende werking heeft op genen die zenuwregeneratie bevorderen. In tegenstelling tot CREB is NFIL3 echter een remmende transcriptiefactor. Wij hebben nu kunnen aantonen dat deze twee transcriptiefactoren in principe dezelfde genen kunnen reguleren, maar dus in tegengestelde richting. Deze vindingen hebben geleid tot het identificeren van een eerste transcriptionele (sub-) netwerk dat betrokken is bij de regulatie van genen die zenuwregeneratie bevorderen. Dit netwerk bevat dus zowel een

positieve (CREB) als een negatieve (NFIL3) component die samen de regulatie van een groep genen controleren.

### **Is NFIL3 een target voor gentherapie?**

Deze resultaten illustreren dat het proces van zenuwregeneratie misschien wel versneld kan worden als we negatieve componenten zoals NFIL3 kunnen remmen. Dit is belangrijk als we denken aan een therapie die zenuwregeneratie bevordert. Een veelbelovende techniek die de laatste jaren in het medische biologisch onderzoek steeds verder is ontwikkeld is gentherapie. Hierbij wordt een (gemodificeerd) gen ingebracht als behandeling van een aandoening. Dit wordt bijvoorbeeld ontwikkeld voor de behandeling van aangeboren ziektes waarbij een gen mist of door een mutatie niet of minder werkt. Voor het inbrengen van het genetisch materiaal wordt vaak gebruik gemaakt van gemodificeerde virussen. Virussen zijn van nature in staat cellen binnen te dringen en zo ziekmakende genen in te brengen bij hun gastheer. Voor het doel van gentherapie zijn er nu virus varianten gemaakt die de ziekmakende genen missen en zich ook niet meer kunnen vermenigvuldigen. Door nu het gen naar keuze in te bouwen bij zo'n virus, kan dit virus gebruikt worden om een gen in cellen te brengen. Wij hebben gebruik gemaakt van virusdeeltjes om een gemodificeerde vorm van het NFIL3 gen in zenuwcellen van volwassen ratten te brengen (Hoofdstuk 3). Deze gemodificeerde vorm van het NFIL3 gen die wij ontwikkeld hebben werkt remmend op NFIL3 in zenuwcellen in kweek en bevordert daardoor neuriet uitgroei (Hoofdstuk 2). Met de virusdeeltjes die deze vorm dragen, zijn we nu dus in staat te testen of we door het remmen van NFIL3 zenuwregeneratie in de rat kunnen bevorderen. We hebben deze virussen geïnjecteerd in de sensorische zenuwcellen van de rat en vervolgens de perifere zenuw beschadigd, precies zoals in voorgaande experimenten. Zoals verwacht vinden we inderdaad meer regenererende axonen in de ratten behandeld met de remmende NFIL3 variant dan in de controle groep. Deze experimenten zijn bemoedigend, maar nog preliminair en worden herhaald om in meer detail te bestuderen wat de effecten zijn op de regeneratie van perifere en centrale axonen en het functioneel herstel van de gevoelsprikkelers.

### **Het identificeren van NFIL3 target genen**

In Hoofdstuk 2 hebben we laten zien dat NFIL3 en CREB samen een groep genen reguleert dat betrokken is bij zenuwregeneratie. Om dit transcriptionele netwerk uit te breiden wilden we weten welke genen nog meer door NFIL3, CREB of door NFIL3 en CREB samen worden gereguleerd. We hebben hiervoor een techniek gebruikt die "chromatin immunoprecipitation", ofwel CHIP wordt genoemd (Hoofdstuk 4). Met behulp van CHIP kun je de interacties van een transcriptiefactor met zijn target genen vastleggen en vervolgens identificeren. We hebben dit gedaan in gekweekte zenuwcellen voor zowel NFIL3 als CREB. Voor beide factoren hebben we zo de target genen kunnen identificeren en dus het netwerk kunnen uitbreiden.

**Het voorspellen van transcriptiefactoren die zenuwregeneratie reguleren**

In het gebied vlak voor het begin van een eiwitcoderende gen bevindt zich de “promotor”. Deze promotor bevat elementen die herkend worden door transcriptiefactoren. Elke transcriptiefactor herkent een specifieke DNA code en de aanwezigheid van deze code, of bindingsplaats in de promotor van een gen bepaalt dus of een transcriptiefactor kan binden of niet. Uit de promotor code van een gen kan dus worden afgeleid welke bindingsplaatsen er zijn en dus welke transcriptiefactoren effect kunnen hebben op dat gen. Uit de voorgaande beschreven microarray studie weten we precies welke genen geactiveerd of geremd worden tijdens succesvolle en niet-succesvolle zenuwregeneratie. Wij hebben de promotor regio's van al deze genen bestudeerd om te voorspellen welke transcriptiefactoren deze genen reguleren en welke transcriptiefactoren dus een rol kunnen spelen in zenuwregeneratie (Hoofdstuk 5). Voor dit werk is een nieuw wiskundig algoritme ontwikkeld door Geert Geeven van de afdeling Wiskunde aan de Vrije Universiteit wat heeft geleid tot betere en nieuwe voorspellingen die wij in het lab hebben getest. Op deze manier hebben we transcriptiefactoren geïdentificeerd die nog niet eerder in verband zijn gebracht met zenuwregeneratie.

**Conclusies**

De vindingen in mijn proefschrift geven meer inzicht in de transcriptionele regulatie van genen die betrokken zijn bij zenuwregeneratie. Door diverse invalshoeken en technieken te combineren hebben we nu een aantal transcriptiefactoren geïdentificeerd die betrokken zijn bij axonregeneratie. Daarnaast hebben we de eerste connecties tussen deze transcriptiefactoren en hun target genen kunnen blootleggen. Kortom, we beginnen inzicht te krijgen in het transcriptionele netwerk dat zenuwregeneratie reguleert. Een van de belangrijkste en nieuwe conclusies uit dit werk is dat het proces van succesvolle, perifere axonregeneratie gereguleerd wordt door zowel positieve als negatieve componenten. Niet alleen het stimuleren van positieve componenten, maar ook het wegnemen of remmen van zulke negatieve componenten zou wel eens net zo belangrijk kunnen zijn voor de ontwikkeling van een succesvolle (gen)therapie die de regeneratie van axonen na zenuwschade bevordert.