

VU Research Portal

Spinal cord injury

Attwell, C.L.

2019

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Attwell, C. L. (2019). *Spinal cord injury: Can gene therapy with transcription factors drive axon regeneration?* [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

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

Nederlandse samenvatting

Beschadigingen van de hersenen of het ruggenmerg (het centrale zenuwstelsel) herstellen niet of maar zeer gedeeltelijk. Op dit moment zijn er geen behandelingen die regeneratie van dergelijke beschadigingen in patiënten stimuleren. Proefdier onderzoek maakt het mogelijk om potentiële behandelingsstrategieën te onderzoeken. De twee belangrijkste redenen waarom zenuwcellen in het centrale zenuwstelsel niet regenereren zijn 1. De remmende invloed van de cellen en moleculen in het laesie gebied op beschadigde zenuwuiteinden, en 2. Het niet opgang komen van een neuron-intrinsieke regeneratieve response na een beschadiging van de uitlopers (axonen) van de centrale zenuwcellen zelf. In dit proefschrift hebben we ons gericht op onderzoek naar (het ontbreken van) deze neuron-intrinsieke respons op een beschadiging.

Zenuwcellen met uitlopers in de periferie, bijvoorbeeld sensorische neuronen of motor neuronen, vertonen wel een succesvolle neuron-intrinsieke response na beschadiging. Deze neuronen activeren een gen programma dat wordt aangeduid als het regeneratie-geassocieerde gen (RAG) programma. Dit gen programma bestaat uit een paar honderd genen en activatie ervan is essentieel voor succesvolle axonale regeneratie. Transcriptie factoren zijn verantwoordelijk voor de regulatie van genexpressie. In dit proefschrift hebben we de hypothese getest dat overexpressie van een specifieke combinatie van transcriptie factoren het RAG programma kan induceren en axonale regeneratie kan stimuleren.

In **hoofdstuk 1** bediscussiëren we het laesie model dat we hebben gebruikt in onze studies en geven we een overzicht van de verschillende benaderingen die onderzoekers hebben gebruikt om in dit model regeneratie te stimuleren. De dorsale wortel ganglia (DWGs) liggen ter weerszijde van het ruggenmerg en bevatten sensorische zenuwcellen. Deze zenuwcellen hebben twee zenuwuitlopers, waarvan er een loopt naar de periferie en de huid en de spierspoeltjes innerveert, terwijl de andere uitloper projecteert naar het ruggenmerg en verantwoordelijk is voor het doorgeven van sensorische informatie aan neuronen in het ruggenmerg en de hersenen. Een belangrijk deel van de uitlopers die naar het ruggenmerg lopen verzamelen zich daar in de zogenaamde dorsale kolom. Het bijzondere van de sensorische neuronen is dat het RAG programma wordt geïnduceerd na een laesie van de perifere uitlopers, maar niet na een laesie van de centrale uitlopers in de dorsale kolom. Deze sensorische neuronen zijn daarom bij uitstel geschikt om het RAG-programma te bestuderen en ook om te onderzoeken of bepaalde transcriptie factoren het RAG-programma na een centrale laesie kunnen induceren.

In **hoofdstuk 2** hebben we 4 transcriptie factoren geselecteerd, te weten cJun, ATF3, STAT3 en Smad1, waarvan al bekend was dat ze individueel een klein effect of axonale regeneratie hebben. Deze vier transcriptie factoren werden via een adeno-geassocieerde virale

vectoren gezamenlijk tot expressie gebracht in de sensorische neuronen van twee lumbale sensorische ganglia en het effect op axonale regeneratie van de beschadigde centrale uitlopers werd vergeleken met over expressie van ATF3 alleen of expressie van een controle eiwit, een groen fluorescente eiwit (GFE). ATF3 en ook de combinatie van de vier transcriptie factoren stimuleerde de uitgroei maar het effect van de combinatie van factoren was niet groter dan dat van ATF3 alleen. Dit duidt erop dat ATF3, cJun, Smad1 en STAT3 geen synergistisch effect hebben op axon regeneratie van de centrale projecties van de sensorische neuronen in de lumbale DWGs.

In **hoofdstuk 3** hebben we een combinatie van transcriptie factoren getest geïdentificeerd werd door onderzoek te doen naar de overrepresentatie van transcriptie factor bindingsmotieven in de promotoren van RAGs. Deze analyse leverde 9 transcriptie factoren op. Deze 9 transcriptie factoren werden tot overexpressie gebracht in een DRW cellijn waarin vervolgens de neuriet uitgroei werd gemeten. Vervolgens werden ook combinaties van transcriptie factoren getest. Hieruit kwam naar voren dat de combinatie KLF7/MEF2c/ATF3 het meest potent was.

Vervolgens is in **hoofdstuk 4** onderzocht of deze combinatie ook axon regeneratie in vivo in het dorsale kolom laesie model kan bewerkstelligen. Dieren in dit experiment werden voor 11 weken gevolgd op de horizontale ladder, een functionele test die sensorimotor herstel kan meten. Na afloop van het experiment werd de zenuwvezel uitgroei geanalyseerd door middel van histologie. De combinatie KLF7/MEF2c had een significant stimulerend effect of axon sprouting in het laesie gebied, voorkwam retractie van axonen vanaf de laesie en had een positief effect op het functioneel herstel. De triple combinatie (KLF7/MEF2c/ATF3) had, tegen de verwachting in, geen effect.

Het doel van **hoofdstuk 5** was om meer inzicht te krijgen in wat de effecten zijn van de overexpressie van de transcriptie factoren uit hoofdstuk 4 op het RAG programma. De effecten van overexpressie van KLF7, MEF2c en ATF3 werden vergeleken met die van overexpressie van de combinatie van KLF7/MEF2c en de triple (KLF7/MEF2c/ATF3) door middel van RNA sequencing. Om dit te bereiken brachten we elk van de transcriptie factoren tot expressie samen met een specifiek fluorescent eiwit. Op basis van de expressie van het fluorescente eiwit konden met de laser capture microscoop sensorische neuronen worden geïsoleerd uit DWGs die een maand eerder waren geïnjecteerd met AAV vectoren coderend voor een specifieke transcriptie factor met zijn fluorescente eiwit. Gebruikmakend van de zogenaamde Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) – een methode die zoekt naar co-gereguleerde gen clusters in de totale gen expressie data set – werd gevonden dat in alle transcriptie factor groepen behalve de MEF2c groep ongeveer 40% een RAG-cluster induceerde dat ook door perifere zenuwschade werd geïnduceerd. Daarnaast namen we waar dat de combinatie

KLF7/MEF2c ook een groep myosine en actinine genen induceerde die betrokken zijn bij myofibril en spiercontractie. Deze genen werden alleen geïnduceerd in de KLF7/MEF2c groep. Deze observatie zou de verklaring kunnen zijn voor het synergistische effect van KLF7/MEF2c op axon groei en functioneel herstel in het in vivo experiment beschreven in **hoofdstuk 4**.

Hoofdstuk 6 beschrijft de ontwikkeling van een nieuwe test, de zogenaamde “inclined ladder”, om sensorimotor functie te kwantificeren na een dorsale kolom laesie. Deze test werd samen met een aantal andere al bestaande testen gebruikt in **hoofdstuk 4**.

In **hoofdstuk 7** bespreken we waar de wetenschap nu staat met betrekking tot de kennis van het RAG programma en bediscussiëren we onze resultaten in het licht van deze kennis. We hebben een combinatie van transcriptie factoren geïdentificeerd (KLF7/MEF2c) die axon groei stimuleert. Echter, we hebben ook ondervonden dat de combinatie ATF3/cJUN/STAT3/Smad1 niet effectiever was dan ATF3 alleen (**hoofdstuk 2**) en dat de combinatie KLF7/MEF2c/ATF3 wel effectief was in vitro in een cellijn maar niet effectief was in vivo (**hoofdstukken 3 en 4**). Er zijn verschillende mogelijke verklaringen voor deze resultaten. De synergie tussen transcriptie factoren kan beïnvloed worden door de timing van expressie, de expressie niveaus, de afwezigheid van andere essentiële partner transcriptie factoren en door epigenetische mechanismen, zoals de blokkade van de bindingsplaatsen voor transcriptiefactoren in de promotoren van targetgenen. Recent is er een toenemende hoeveelheid bewijs gepubliceerd dat een epigenetische blokkade van genexpressie kan bijdragen tot het onvermogen van centrale zenuwcellen om het RAG-programma te induceren na beschadiging van hun axonen. Dit duidt erop dat er verschillende niveaus van gen regulatie zijn die, naast transcriptionele regulatie, betrokken moeten worden bij onze pogingen het RAG-programma te induceren na een beschadiging van centrale zenuwcellen.