



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Glucocorticoid receptor knockdown and adult hippocampal neurogenesis

Hooijdonk, L.W.A. van

### Citation

Hooijdonk, L. W. A. van. (2010, April 20). *Glucocorticoid receptor knockdown and adult hippocampal neurogenesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15275>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/15275>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

# 7

---

## SUMMARY/ SAMENVATTING

---

## SUMMARY

Glucocorticoid stress hormones and their glucocorticoid receptors (GRs) have a profound influence on the brain by modulating processes such as neuronal plasticity and cognition. Aberrant glucocorticoid signalling negatively affects cognitive performance and the integrity of neuronal structures and therefore, has been implicated with several stress-related neuropsychiatric disorders. In addition, many known drugs affect glucocorticoid signalling. This makes an in dept understanding of the effects of glucocorticoid signalling in the brain very important.

Particularly sensitive to stress hormones is the dentate gyrus of the hippocampus, a brain structure implicated in memory processes and encoding of spatial information. The dentate gyrus is a very heterogeneous structure, consisting of different cell types, of different age, origin and physiological properties. Of particular interest are the neuronal progenitor cells (NPCs), known to express GR. These cells are located in the sub-granular zone and are the substrate for adult hippocampal neurogenesis. Neurogenesis is a form of neuroplasticity. It involves the continuous process of development of new functional neurons from NPCs. Studies in rodents suggest that these newborn neurons may contribute to the function of the dentate gyrus in spatial and contextual memory.

The finding that newborn granule cells contribute to memory formation and that NPCs express GR has culminated in the **hypothesis that hippocampal GRs may affect hippocampal function by modulating neurogenesis**. The underlying mechanism is not clear and needs detailed study. The main objective of my thesis was therefore to investigate the role of the GR in hippocampal NPCs in relation to neuroplasticity (described in CHAPTER 4) and learning and memory processes (described in CHAPTER 5). Thus far, technical limitations have prevented the study of the function of GR in individual cell types. Because of this, the second objective of my PhD project was to investigate the applicability of a new refined technique to study GR in NPCs *in vivo*: lentiviral-shRNA injections in the dentate gyrus (described in CHAPTER 2 and 3). This approach makes it possible to down-regulate GR expression specifically in NPCs. The mouse model in which this approach was developed is further referred to as the shGR mouse model.

In CHAPTER 2 the design and optimization of effective RNA-interfering constructs targeting the glucocorticoid receptor were described. To achieve potent knockdown of the GR, we have designed four different sequence-specific short interfering RNA constructs. These constructs were cloned into pSuper vector in a short hairpin (sh) format. Subsequently, pSuper-shRNA constructs were transfected into a neuronal cell line and assessed for their potency to down-regulate GR protein levels. Using Western Blot analysis we determined the efficacy of the different constructs compared to sham, empty vector and corresponding mismatch shRNA. We found four effective pm- shRNAs, one (pm-GR3) with high potency to yield more than 90% GR protein knockdown, whereas the 3 others were less potent (pm-GR2 ~ 60%, pm-GR1 ~ 46% and pm-GR4 ~ 25%

respectively). Pm-GR3 was subsequently cloned into a lentiviral vector and its potency was verified, gaining > 70% GR protein knockdown. Using shRNA constructs it was possible to specifically down-regulate GR expression both via plasmid- and lentiviral vectors in a neuronal cell line. Therefore, this lentiviral vector was used in further studies to deliver shRNA into the dentate gyrus.

In CHAPTER 3 the cell types are described that are effectively transduced *in vivo* by the lentiviral vector. In contrast to the CA1 subfield of the hippocampus, lentiviral injection in the granule cell layer of the dentate gyrus revealed sub-field specific differences in transgene expression. Furthermore, lentiviral vectors were found to target primarily NPCs and immature neurons present in the sub-granular zone and more immature layers of the granule cell layer. The targeted cell population was further referred to as NPCs. Also, lentiviral vectors in the granule cell layer do not target mature granule neurons. These observations suggest the existence of intrinsic differences in the permissiveness to lentiviral transduction among various hippocampal cell types. Therefore, it was concluded that amongst hippocampal granule cells, only adult-generated neurons are target for lentivirus-mediated transgene delivery. These properties make lentiviral vectors excellent systems for over-expression or knockdown of genes in neuronal progenitor cells, immature neurons and adult-generated neurons of the mouse hippocampus *in vivo*.

In CHAPTER 4 the new approach of lentiviral-shRNA injections in the dentate gyrus was successfully used to study the effects of GR knockdown on neurogenesis. It was observed that specific GR knockdown in NPCs accelerated neuronal differentiation. Also, GR knockdown in NPCs led to altered morphological properties of the newborn neurons, as reflected by altered dendritic arborization, higher numbers of mature mushroom and thin spines and larger mossy fiber boutons. Strikingly, GR knockdown led to mis-positioning of adult newborn neurons, suggesting aberrant migration into the granule cell layer. In line with increased numbers of synaptic contacts, adult newborn neurons with GR knockdown exhibited increased mEPSC frequencies. Therefore we suggested that GR protein levels play a key role in the development of NPCs and the appropriate formation of hippocampal neo-circuits.

In CHAPTER 5 we further characterized the phenotype of the shGR mouse model at the behavioural level. The role of GRs in NPCs was studied in respect to the formation of contextual fear memory. To this aim, four weeks after lentiviral injections when NPCs were matured and expected to be functionally incorporated into the hippocampal circuitry, GR knockdown and control mice were trained and tested in a Pavlovian fear conditioning task. This task was designed to allow measurement of fear memory (expressed as freezing) for both context and cue within the same procedure. Results demonstrated the dependency of GR signalling in NPCs for facilitation of consolidation of fear memories. Knockdown of GR destabilized memory consolidation to the conditioned context, resulting in a less strong expression of fear behaviour; i.e. relatively less “passive” freezing and more “active” scanning coping style. In line with the results described in

CHAPTER 4, these data suggest a key role for GR in the formation of hippocampal neo-networks that coordinate hippocampal-dependent memory formation.

**In CHAPTER 6 the results are discussed leading me to argue in favour of the hypothesis that hippocampal GRs may affect hippocampal function by modulating neurogenesis. The data also demonstrate the validity of the newly developed shGR mouse model for further study on glucocorticoids and neurogenesis in adaptation to stress.**

## SAMENVATTING

Stresshormonen (glucocorticoïden) oefenen grote invloed uit op de hersenen. Hormonen die in het bloed circuleren, kunnen de hersencellen binnendringen en daar hun effect uitoefenen. Dit doen zij voornamelijk door middel van binding aan specifieke glucocorticoïdreceptoren (GR). Op deze manier beïnvloeden glucocorticoïden verschillende processen waarbij de hippocampus betrokken is, zoals cellulaire neuroplasticiteit en leer- en geheugenprocessen, die als doel hebben de aanpassing aan stress te bevorderen. Echter, in sommige situaties kan er sprake zijn van een verstoorde glucocorticoïdwerking, bijvoorbeeld bij langdurige stress of ziekte. Een verstoorde glucocorticoïdwerking heeft niet alleen een negatieve invloed op deze processen, maar ook een beschadigend effect op de hersenen zelf. Dit fenomeen wordt zelfs in verband gebracht met de ontwikkeling en het verloop van stressgerelateerde ziekten zoals depressie. Op dit moment weten we nog te weinig over het mechanisme dat hieraan ten grondslag ligt. Het is daarom erg relevant om te weten wat precies de effecten van glucocorticoïden in de hersenen zijn en hoe deze effecten via de GR tot stand komen.

Bijzonder gevoelig voor stresshormonen zijn de neuronen in de gyrus dentatus van de hippocampus. Het neuronale circuit dat deze neuronen vormen is betrokken bij geheugenprocessen, vooral wat betreft de tijd, plaats en context van met name emotionele ervaringen. De gyrus dentatus is een zeer heterogene structuur. Het bestaat uit verschillende celtypen en cellen van verschillende leeftijd en herkomst. Deze groepen neuronen hebben ieder hun specifieke eigenschappen. Interessant voor deze studie zijn vooral neuronale progenitorcellen. Deze cellen beschikken over de GR en zijn daarom gevoelig voor glucocorticoïden. Bovendien, in tegenstelling tot de meeste hersencellen, is dit celtype in staat zich te delen. Hierbij ontstaan nieuwe functionele neuronen die onderdeel worden van het neuronale circuit in de gyrus dentatus. Dit proces, neurogenese genoemd, duurt ongeveer een maand en bestaat uit verschillende ontwikkelingsfasen: celdeling, -selectie, -migratie, -differentiatie, -rijping en de daadwerkelijke functionele integratie van het volwassen neuron in het circuit. Er wordt daarom aangenomen dat deze nieuwe neuronen bijdragen aan de functie van de gyrus dentatus in het geheugen voor de context.

Deze achtergrond heeft geleid tot de **hypothese** die in dit proefschrift onderzocht is: **het glucocorticoïdhormoon beïnvloedt via GR in neuronale progenitorcellen de functie van de gyrus dentatus door modulatie van neurogenese**. Omdat het precieze mechanisme nog onduidelijk is, was het onderzoek naar de rol die GR speelt in neurogenese (Hoofdstuk 4) en gedrag (Hoofdstuk 5) de voornaamste doelstelling van mijn proefschrift. Voorheen was het technisch niet mogelijk om de functie van een gen (zoals de GR) te onderzoeken in verschillende celtypen in de muis. Omdat de GR tot expressie komt in verschillende celtypen en waarschijnlijk verschillende functies in deze cellen heeft, is het voor deze studie essentieel dat de GR alleen in neuronale progenitorcellen onderzocht wordt. Om deze reden was de tweede doelstelling van mijn

proefschrift het ontwikkelen van een nieuwe techniek (RNA-interferentie) om de expressie van de GR in neuronale progenitorcellen van muizen te manipuleren. Om RNA-interferentiemoleculen in de neuronale progenitorcellen te brengen zijn lentivirussen gebruikt als vector (Hoofdstuk 2 en 3). De lentivirussen zijn met behulp van een stereotact in de gyrus dentatus van muizen geïnjecteerd. Dit muismodel is het shGR-muismodel genoemd.

In Hoofdstuk 2 is de ontwikkeling en de effectiviteit van de shRNA-constructen beschreven. Om een goede downregulatie (verlaging) van GR-expressie te verkrijgen, zijn in eerste instantie vier verschillende constructen ontworpen. Deze constructen zijn vervolgens in een plasmidvector ingebouwd en getest in een neuronale cellijn. Met Western Blot zijn de GR-concentraties bepaald bij het toepassen van de verschillende constructen en specifieke controles. Alle vier constructen gaven enige downregulatie van de GR. Construct "pm-GR3" had de hoogste effectiviteit met een verlaging van meer dan 90% van de GR-expressie. Dit construct werd dan ook geselecteerd en ingebouwd in de lentivirale vector. Opnieuw werd de effectiviteit getest in de neuronale cellijn. Het lentivirus met het pm-GR3-construct gaf meer dan 70% downregulatie van GR. Daarom werd deze combinatie gebruikt in het vervolgonderzoek om de GR te verlagen in de neuronen van de muis.

In Hoofdstuk 3 werd eerst gekeken naar de soort celtypes in de gyrus dentatus die het lentivirus infecteert. Een week na stereotactische injecties in de gyrus dentatus van de muis werden de cellen gelabeld door het lentivirus, bestudeerd. In tegenstelling tot neuronen van een andere hippocampale structuur, bleek er in de gyrus dentatus een verschil te zijn tussen verschillende cellagen. Sommige cellagen werden geïnfecteerd, andere niet. Nadere bestudering van deze cellagen en hun cellen gaf aan dat het lentivirus vooral neuronale progenitorcellen en onvolwassen neuronen infecteert. Deze celpopulatie, bestaande uit neuronale progenitorcellen en nieuwgeboren neuronen in verschillende ontwikkelingsstadia, werd verder aangeduid als NPC. Het lentivirus infecteert geen volwassen neuronen in de gyrus dentatus. De mogelijke verklaringen voor deze eigenschap van het lentivirus werden geëvalueerd. Er werd bovendien geconcludeerd dat dit lentivirus erg geschikt is als vector om RNA-interferentie over te brengen in NPC's. Door deze eigenschap kunnen lentivirussen goed gebruikt worden in onderzoek naar de functie van genen in NPC's.

In Hoofdstuk 4 werd deze lentivirus-RNA-interferentie-aanpak succesvol toegepast. Er werd onderzocht wat de effecten van GR-downregulatie in NPC's zijn op neurogenese. Een week van GR-downregulatie in NPC's resulteerde al in een versnelde neuronale differentiatie. Bovendien bleek GR-downregulatie een effect te hebben op de morfologie van de NPC's. Dit kwam onder meer tot uiting in een veranderde structuur van de dendrieten-"boom", een toegenomen aantal dendritische spines met een volwassen fenotype, en een vergrote doorsnede van zogenaamde mossy fiber boutons. Opvallend was dat ook de positie van de NPC's met GR-downregulatie in de granulaire cellaag verschilde van de controlemuizen. Dit duidt op een foutieve migratie. De

effecten van GR-downregulatie waren in overeenkomst 1 en 5 weken na injectie. De morfologische resultaten wekken de indruk dat de synaptische contacten - de manier waarop neuronen contact leggen met andere neuronen in het neuronale circuit - toegenomen zijn. In overeenstemming met deze bevindingen, vonden we ook een toegenomen frequentie van mEPSC's wat wijst op een verhoogde excitabiliteit. Op basis van deze resultaten, samen met de veranderde migratie suggereerden we dat de GR-expressie mogelijk een cruciale rol speelt in de ontwikkeling van nieuwgeboren neuronen en de correcte integratie van deze neuronen in het neuronale circuit van de hippocampus. Ook werden de moleculaire mechanismen bediscussieerd die mogelijk ten grondslag liggen aan deze functie van GR.

In Hoofdstuk 5 is vervolgens angstgemotiveerd gedrag van de shGR-muis onderzocht. Hiertoe werd onderzocht hoe GR's in NPC's betrokken zijn bij het geheugen voor een stressvolle en angstige gebeurtenis. ShGR-muizen en controlemuizen werden vier weken na injectie met het lentivirus (waarbij werd verondersteld dat de door het lentivirus geïnfecteerde NPC's inmiddels volledig ontwikkeld waren) getest in een Pavloviaanse taak die "context and cue fear conditioning" heet. Tijdens context and cue fear conditioning is het mogelijk het angstgeheugen van de muizen te meten door herhaaldelijk de gedragsrespons op de omgeving (context) en op de geconditioneerde stimulus te meten. Angstgedrag bij muizen wordt gekenmerkt door immobiliteit en kan zowel door "freeze"- als door "scan"-gedrag tot expressie gebracht worden. Uit de mate van het angstgemotiveerd gedrag enkele dagen later kan een indruk worden verkregen van het verloop van de leer- en geheugenprocessen. Uit de resultaten bleek dat glucocorticoïdwerking via GR in NPC's belangrijk is voor de bevordering van de consolidatiefase van het geheugen. shGR-muizen leken een minder goed geheugen te hebben voor de angstige gebeurtenis.

In Hoofdstuk 6 werd de mogelijke betekenis van de resultaten uit de verschillende experimenten bediscussieerd. **De resultaten lijken de hypothese te ondersteunen dat de GR in neuronale progenitorcellen de functie van de gyrus dentatus beïnvloedt door modulatie van neurogenese. Bovendien ondersteunen de resultaten de validiteit van dit nieuw ontwikkelde shGR-diermodel voor verder onderzoek naar glucocorticoïden en neurogenese in aanpassing aan stress.**



