

The dissertation “Postnatal maternal separation affects hippocampal long-term potentiation in adult stressed rats: Molecular and hormonal mechanisms”

submitted by Msc. Han Wang

Abstract

Early-life stress has been reported to induce a series of emotional and cognitive disorders in adulthood. The present study focused on the effects of maternal separation (MS) from postnatal day (PND) 14 to 16 for everyday 6 hours on hippocampal plasticity with *in vivo* hippocampal long-term potentiation (LTP) as a cellular model of learning and memory formation. Then, the results showed that an acute exposure to elevated-platform-stress (EPF-stress) in 11-week-old male rats resulted in a reinforcement of the dentate gyrus (DG) LTP in control animals (MS-), while this emotional reinforcement of LTP was seriously repressed in maternally separated (MS+) rats. Since steroid hormones and their receptors play critical roles in the effects of early-life stress, we measured hippocampal concentrations of 17 β -estradiol, corticosterone and testosterone, as well as gene expression levels of their receptors after LTP-induction/EPF-stress in MS+ and MS- rats. The mRNA levels of mineralocorticoid receptor (MR) and estrogen receptor β (ER β) were upregulated 1h after EP-stress in MS- rats, but not in MS+ rats. The application of MR and ER β antagonists impaired the LTP-reinforcement in control rats, verifying their crucial roles in emotion induced LTP-reinforcement.

According to the long-lasting effects of MS on gene expression, the involvement of epigenetic mechanisms was considered. The application of the DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor 5-aza-2'-deoxytidine partly restored the LTP-reinforcement in MS+ rats, accompanied by a retrieval of ER β - but not MR-mRNA upregulation. In contrast, the application of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor trichostatin A did not affect LTP-reinforcement. DNA methylation assays then identified that MS+ and MS- rats showed different methylation patterns across CpG sites in the ER β gene promoter sequence 1 h after EPF-stress. These results indicate a key role of ER β in early-life-stress-mediated emotionality and emotion-induced late-LTP in adult male rats via DNA methylation mechanisms.

Behavioral tests on the elevated plus maze (EPM) showed a decreased anxiety-like behavior in MS+ rats in the second trial, accompanied by a lower level of serum corticosterone level as compared to MS- rats 15 min after the second trial. These results indicate a desensitization to stressful events during adulthood in MS+ rats in which the regulation and function of ER β plays a crucial role at the cellular level.

Die Dissertation “Postnatal maternal separation affects hippocampal long-term potentiation in adult stressed rats: Molecular and hormonal mechanisms”

vorgelegt von Msc. Han Wang

Zusammenfassung

Frühe Stresserfahrungen sind in der Lage, emotionale sowie kognitive Informationsverarbeitungsprozesse bei adulten Individuen zu beeinflussen. Die *In vivo* hippocampale Langzeit-Potenzierung (LTP), die in dieser Studie als ein zelluläres Modell für Lernen und Gedächtnisbildung um die Einflüsse maternaler Separation (MS) vom postnatalen Tag 14 bis 16 für täglich 6 Stunden auf die hippocampale Plastizität zu untersuchen. LTP im Gyrus Dentatus (DG) lässt sich in mindestens zwei Phasen gliedern: eine proteinsynthese-unabhängige frühe Phase und eine proteinsyntheseabhängige späte Phase. Die frühe Phase kann durch akuten Stress in einem bestimmten Zeitraum nach der LTP-Induzierung in eine späte Phase transferiert (verstärkt) werden. Eine solche Verstärkung ließ sich in der vorliegenden Arbeit durch akuten Stress ausgelöst durch den Aufenthalt auf einer erhöhten-Plattform (EPF-Stress) in 11 Wochen alten Kontrollratten (MS-) induzieren, während diese emotionale LTP-Verstärkung in den adulten früh gestressten Ratten (MS+) nicht zu beobachten war. Einflüsse des Steroidhormons Corticosteron und seiner Rezeptoren in der Regulation emotionaler Informationsverarbeitung sind bereits bekannt, die Rolle von Geschlechtshormonen und deren Rezeptoren sind dagegen noch wenig untersucht. Daher wurden die hippocampalen Konzentrationen der Steroidhormone Corticosteron, Testosteron und 17 β -estradiol und die Expression ihrer Rezeptoren erfasst. Die mRNA-Konzentrationen des Mineralocorticoid- (MR) und des Östrogen-Rezeptoren β (ER β) waren 1 Stunde nach LTP-Induzierung/EPF-Stress in MS- Ratten gegenüber MS+ Ratten signifikant erhöht. Die funktionelle Rolle von MR und ER β in der Verstärkung der LTP wurde durch die Applikation der spezifischen Antagonisten überprüft und bestätigt. Die Inaktivierung von MR führte zu einer unmittelbaren Depotenzierung, die von ER β zu einer Verminderung der späten Phase der LTP.

Die langfristigen Wirkungen der MS auf die hippocampale Genexpression machte die Rolle epigenetischer Mechanismen wahrscheinlich. Die Applikation des Inhibitors (5-aza-2'-deoxytidine) gegen DNA-Methyltransferase (DNMT) konnte teilweise die von EPF-Stress induzierte LTP-Verstärkung und die Expression von ER β - aber nicht MR-Genen in MS+ Ratten wieder herstellen, während die Applikation des Inhibitors Trichostatin A gegen die Histonedacetylase (HDAC) keinerlei Effekte hatte. DNA-Methylierungsanalysen ergaben

keine Unterschiede zwischen MS- und MS+ Ratten ohne EPF-Stress. Eine Stunde nach EPF-stress zeigten sich jedoch Unterschiede im Muster der methylierten CpG-Stellen der ER β -Genpromotorsequenz zwischen MS+ und MS- Ratten. MR und ER β regulieren demnach in konzertierter Aktion die LTP-Verstärkung und die emotionale Informationsverarbeitung nach akutem Stress. ER β wirkt dabei besonders auf die späte LTP und spielt wahrscheinlich eine Modulierende Rolle bei der Konsolidierung emotionaler Gedächtnisspuren.

Die Sensitivierung und Etablierung von stressinduzierten Gedächtnisinhalten durch frühkindliche Erfahrungen wird dabei durch epigenetische Mechanismen (DNA-Methylierung) reguliert. Das wird durch Untersuchungen im Erhöhten-Kreuzlabyrinth in adulten Ratten bestätigt. Hier zeigten MS+ Ratten eine geringere Anzeichen von Ängstlichkeit und geringere Corticosteron-konzentrationen im Blut als MS- Ratten.