

# Udział metaloproteazy macierzowej 9 (MMP-9) w powstawaniu zmian w zachowaniu społecznym w mysim modelu wczesnej stymulacji układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym

**Karolina Protokowicz; Pracownia Neurobiologii**

**Promotor: prof. dr hab. Leszek Kaczmarek**

Słowa kluczowe: neurodevelopmental disorders · inflammation · MMP-9 · early life immune activation · social behavior · early life stress

zaburzenia neurorozwojowe · stan zapalny · MMP-9 · wczesna aktywacja układu odpornościowego · zachowania społeczne · stres we wczesnym etapie życia

## Streszczenie

Odbieranie bodźców i odpowiednie reagowanie na nie są kluczowe dla przetrwania w złożonym środowisku, a koordynację tych funkcji zapewnia układ nerwowy. Jego rozwój jest precyzyjnie regulowany przez liczne czynniki, a zakłócenia tego procesu mogą prowadzić do powstawania zaburzeń neurorozwojowych (ang. *neurodevelopmental disorders*, NDD), takich jak zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. *autism spectrum disorder*, ASD), ADHD czy zespół Tourette'a. NDD charakteryzują się szerokim zakresem objawów, w tym dysfunkcjami społecznymi, niepełnosprawnością intelektualną oraz problemami somatosensorycznymi. Mimo, że dokładne przyczyny NDD pozostają niejasne, badania wskazują na wpływ czynników genetycznych i środowiskowych, w tym stanu zapalnego. Istotną rolę w regulacji stanu zapalnego odgrywa metaloproteaza macierzowa 9 (MMP-9), która uczestniczy również w procesach plastyczności synaptycznej. Dodatkowo w przebiegu wielu NDD wykryto podwyższony poziom MMP-9 we krwi i mózgu pacjentów.

Badania na zwierzętach często koncentrują się na okresie prenatalnym, modelując aktywację układu odpornościowego matki. Z uwagi na fakt, że rozwój układu nerwowego u ludzi i myszy jest kontynuowany po narodzinach, w niniejszej pracy skupiono się na okresie postnatalnym. Szczególną uwagę poświęcono krytycznemu etapowi rozwoju układu nerwowego – intensywnej synaptogenezie, która przypada na około 7 dzień życia myszy. W trakcie tego kluczowego etapu wystawiono układ odpornościowy zwierząt na pojedynczą iniekcję bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS, 0,05 mg/kg), a jako kontrolę zastosowano fizjologiczny roztwór soli (NaCl). Badania miały na celu ocenę wpływu wczesnej stymulacji układu odpornościowego na zachowanie dorosłych myszy.

W pierwszej kolejności postanowiono scharakteryzować zmiany w zachowaniu dorosłych zwierząt po wczesnej stymulacji układu odpornościowego. W tym celu wykorzystano testy behawioralne mierzące aktywność, emocjonalność oraz socjalność myszy

(obserwacja w klatce, test zawieszonoego labiryntu krzyżowego, test trójkomorowy oraz test w zautomatyzowanej klatce Eco-HAB™). Dorosłe zwierzęta poddane stymulacji układu odpornościowego były mniej aktywne oraz mniej lękliwe. Dodatkowo zauważono, że podanie LPS ma inny wpływ na zachowanie społeczne samców i samic. Samce traktowane LPS wykazywały słabsze zainteresowanie nieznanym bodźcem socjalnym przy wyższej preferencji do spędzania czasu w grupie. Natomiast w grupie samic zaobserwowano, że podanie LPS powodowało bardziej chętnie eksplorowanie nieznanego zapachu społecznego oraz spędzanie krótszego czasu w znanej grupie w porównaniu do samic z grupy kontrolnej.

W drugiej części eksperymentów zbadano molekularne zmiany u siedmiodniowych myszy po podaniu LPS. Analizowano stężenia białek związanych ze stanem zapalnym w surowicy, aktywność żelatynolityczną metaloproteaz oraz zmiany ekspresji genów w mózgu. Stymulacja za pomocą LPS prowadziła do wzrostu stężenia ośmiu białek we krwi, w tym MMP-9. Najsilniejsza odpowiedź odpornościowa pojawiła się 2 godziny po podaniu LPS. W mózgu zaobserwowano wyższą aktywność MMP-9 w korze mózgowej obu płci, a dodatkowo u samców w hipokampie. Oprócz tego po 6 godzinach od podania LPS stwierdzono wyższą ekspresję genów dla *tnf-α*, *il-6* i *mmp-9*, zwłaszcza w prążkowie.

W trzeciej części badań oceniono wpływ genetycznie obniżonego poziomu MMP-9 na rozwój zmian w zachowaniu wywołanych podaniem LPS u siedmiodniowych osesków. Eksperyment przeprowadzono na zwierzętach z uszkodzonym genem MMP-9 (nokauty, KO) oraz ich rodzeństwie z niezmiennym genotypem (WT). Przeanalizowano ich zachowanie w dorosłości, wykorzystując te same metody badawcze, co w części pierwszej. Podanie LPS, podobnie jak w pierwszym eksperymencie, obniżyło aktywność zwierząt. Oprócz tego zaobserwowano, że myszy linii MMP-9 KO są bardziej lękliwe. Podobnie jak w przypadku pierwszej grupy zwierząt samce traktowane LPS chętniej spędzały czas w grupie, natomiast samice unikały się wzajemnie. Najciekawsze wyniki uzyskano jednak w przypadku reakcji na nieznaną bodziec społeczny: samce WT z grupy LPS unikały nieznanego bodźca, natomiast samice WT LPS były bardziej zainteresowane nieznanym zapachem społecznym. Co ważne, takiego efektu nie zaobserwowano u zwierząt KO.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych badań można stwierdzić, że jednorazowe podanie LPS w okresie intensywnej synaptogenezy może być wykorzystywane jako nowy myszy model zaburzeń NDD. Dodatkowo w niniejszej rozprawie wykazano, że MMP-9 pełni istotną rolę w powstawaniu konkretnego typu zaburzeń społecznych – reakcji na nieznaną bodziec. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad molekularnym mechanizmem NDD oraz rolę MMP-9 w diagnozowaniu lub terapii niektórych NDD.

## **Abstract**

A rapidly changing environment requires a well-functioning nervous system to receive, process, and respond to numerous stimuli. Consequently, the development of the nervous system is tightly regulated and strictly timed. Due to the complexity and fragility of this process, any disruption can lead to abnormal brain functioning and, subsequently, to neurodevelopmental disorders (NDDs) such as autism spectrum disorder (ASD), ADHD, or Tourette syndrome. The above-mentioned NDDs are characterized by several symptoms affecting cognitive skills, sociability, or sensorimotor processing. Although the exact etiology of NDD remains unclear, research indicates the influence of genetic and environmental factors, including inflammation. One of the mediators of inflammation is matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), also known for its role in synaptic plasticity. Interestingly, elevated levels of MMP-9 were observed in the serum and brains of NDD patients.

Studies on NDDs and inflammation mainly focus on pregnancy and use animal models of maternal immune activation. Since nervous system development continues after birth, this thesis focuses on the postnatal period. One key development period is exuberant synaptogenesis, which occurs around postnatal day 7 (P7) in mice. During this time, mouse pups were injected i.p. with a single dose of bacterial lipopolysaccharide (LPS, 0.05 mg/kg) or physiological saline as a control (NaCl). The study aimed to evaluate the impact of early immune system stimulation on the behavior of adult mice.

First, changes in the behavior of adult animals following early immune system stimulation were characterized. Behavioral tests measuring mice activity, emotionality, and sociability were conducted (cage observation, elevated plus maze test, three-chamber test, and Eco-HAB™ automated cage test). After immune system activation, adult animals were found to be less active and less anxious. Additionally, it was observed that the administration of LPS had different effects on social behavior in males and females. Male mice treated with LPS showed reduced interest in an unfamiliar social stimulus while exhibiting a higher preference for spending time in a group. In contrast, in the female group, LPS administration resulted in greater exploration of an unfamiliar social scent and less time spent in a familiar group compared to the control group of females.

In the second part of the experiments, molecular changes were examined in P7 mice following LPS administration. The concentration of inflammation-related proteins in the serum, the gelatinolytic activity of metalloproteases, and gene expression changes in the brain were analyzed. LPS stimulation increased the levels of eight proteins in the blood,

including MMP-9, with the most potent immune response in blood observed 2 hours after LPS injection. In the brain, higher MMP-9 activity was detected in the cortex of both sexes and additionally in the hippocampus of males. Furthermore, 6 hours after LPS administration, increased expression of genes for *tnf- $\alpha$* , *il-6*, and *mmp-9* was found, particularly in the striatum.

The third part of the study assessed the impact of genetically reduced MMP-9 levels on the development of LPS-induced behavioral changes in P7 mice pups. The experiment was conducted on animals lacking MMP-9 (knock-out, KO) and their wild-type (WT) littermates. In adulthood, their behavior was analyzed using the same methods as in the first part of the study. As in the first experiment, LPS administration reduced the animals' activity. Additionally, it was observed that MMP-9 KO mice exhibited higher anxiety levels. Like the initial group, male mice treated with LPS preferred spending time in a group, whereas females avoided one another. These effects were observed regardless of the genotype. The most intriguing results concerned responses to an unfamiliar social stimulus: WT males from the LPS group avoided the unfamiliar social stimulus, whereas WT females from the LPS group were more interested in the unfamiliar social scent. Notably, this effect was not observed in KO animals.

In summary, based on this study's findings, it can be concluded that a single LPS administration during exuberant synaptogenesis can serve as a novel mouse model for NDDs. Additionally, this dissertation demonstrated that MMP-9 plays a significant role in developing a specific type of social impairment—responses to an unfamiliar stimulus. The results provide a foundation for further research into the molecular mechanisms underlying NDD and the role of MMP-9 in diagnosing or treating certain NDD conditions.

