

## Streszczenie

Czynniki środowiskowe oddziałujące na mózg w okresie prenatalnym mogą zakłócać formowanie się połączeń nerwowych i tym samym zwiększać ryzyko zaburzeń neurorozwojowych (ang. *neurodevelopmental disorders*, NDDs). Coraz więcej badań epidemiologicznych wskazuje, że jednym z tych czynników jest infekcja w ciąży, jednak mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska wciąż pozostają niewyjaśnione. Dowody z badań na modelach zwierzęcych wskazują, że aktywacja układu odpornościowego matki (ang. *maternal immune activation*, MIA) jest kluczowa dla wystąpienia deficytów rozwojowych u potomstwa. Zidentyfikowanie białek zaangażowanych w te procesy jest niezbędne dla lepszego zrozumienia patogenezy NDDs oraz potencjalnego opracowania strategii profilaktycznych czy terapeutycznych.

Lipokalina 2 (*Lcn2*) to białko związane z wrodzoną odpowiedzią odpornościową, które wydzielane pod wpływem infekcji hamuje wzrost bakterii poprzez sekwestrację żelaza. Ekspresja *Lcn2* jest silnie indukowana w mózgu w odpowiedzi na stan zapalny, a profil jej działania może być zarówno przeciwzapalny, jak i nasilający procesy patologiczne. Co istotne, zarówno badania *in vivo* jak i *in vitro* wskazują, że białko to może wpływać na morfologię i funkcjonowanie komórek nerwowych i gleju. U dorosłych myszy z delecją genu *Lcn2* obserwowano nieprawidłowości struktury drzewa dendrytycznego i kolców dendrytycznych oraz zaburzenia funkcji komórek nerwowych. Ponadto, zwierzęta te wykazywały zachowania lękowe, depresyjne oraz deficyty uczenia się przestrzennego. Funkcje jakie pełni *Lcn2* w rozwijającym się mózgu nie zostały jednak dotąd zbadane.

Głównym celem niniejszej pracy było określenie roli białka *Lcn2* w procesach leżących u podstaw zaburzeń rozwoju mózgu myszy wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki. Wykorzystano model infekcji bakteryjnej, w którym ciężarne samice otrzymywały dootrzewnowe iniekcje lipopolisacharydu (LPS), będącego endotoksyną bakteryjną, wywołującą nieswoistą odpowiedź odpornościową. W pierwszej kolejności wykazano, że *Lcn2* ulega ekspresji w rozwijającym się mózgu, a MIA powoduje wzrost poziomu mRNA *Lcn2* w mózgu płodów obu płci. Aby ocenić czy obserwowane zmiany ekspresji *Lcn2* mają znaczenie dla wystąpienia zaburzeń rozwojowych, przeprowadzono badania z udziałem zwierząt transgenicznych – ciężarne samice o genotypie *Lcn2* Het poddano procedurze MIA, a potomstwo o genotypie niezmienionym oraz z delecją genu *Lcn2* wykorzystano do dalszych

doświadczeń. Wykazano, że aktywacja układu odpornościowego matki indukuje zależną od płci potomstwa ekspresję cytokin prozapalnych w łożysku i mózgu płodów, a brak *Lcn2* modyfikuje przebieg odpowiedzi zapalnej. U myszy o genotypie prawidłowym MIA powodowała zmiany gęstości i kształtu kolców dendrytycznych oraz pobudliwości komórek piramidowych hipokampa, czemu towarzyszyły deficyty behawioralne, przypominające objawy zaburzeń neurorozwojowych. Co ciekawe, delecja genu *Lcn2* w warunkach kontrolnych spowodowała podobne do występujących u potomstwa MIA zaburzenia zachowania. Efekty MIA i wyciszenia genu *Lcn2* były zależne od płci potomstwa. Nie zaobserwowano jednak istotnego wpływu delecji *Lcn2* na zachowanie zwierząt, których matki w ciąży otrzymywały iniekcje LPS. Uzyskane wyniki nie pozwalają jednoznacznie określić roli *Lcn2* w rozwoju zaburzeń wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki, ponieważ samo wyciszenie genu *Lcn2* prowadzi do analogicznych deficytów behawioralnych. Rezultaty tych badań podkreślają jednak istotne znaczenie tego białka dla prawidłowego rozwoju mózgu w warunkach fizjologicznych.

## Abstract

Environmental factors affecting the brain during the prenatal period can disrupt the formation of neural connections, thereby increasing the risk of neurodevelopmental disorders (NDDs). A growing body of epidemiological evidence identifies infection during pregnancy as one such factor; however, the mechanisms underlying this phenomenon remain poorly understood. Studies conducted on animal models indicate that maternal immune activation (MIA) plays a pivotal role in the developmental deficits observed in offspring. Identifying the proteins involved in these processes is critical for deepening our understanding of NDDs pathogenesis and for developing potential preventive or therapeutic strategies.

Lipocalin 2 (Lcn2) is a protein associated with the innate immune response. It is secreted during infection and inhibits bacterial growth by iron sequestration. Lcn2 expression is strongly upregulated in the brain during inflammatory states, and its role can vary from anti-inflammatory to promoting pathological processes. Notably, both *in vivo* and *in vitro* studies suggest that Lcn2 influences the morphology and function of neurons and glial cells. In adult mice lacking the *Lcn2* gene, structural abnormalities in the dendritic tree and dendritic spines were observed, accompanied by impaired neuronal function. Moreover, these animals exhibited anxiety-like and depressive-like behaviors, as well as deficits in spatial learning. Despite these findings, the role of Lcn2 in the developing brain has yet to be investigated.

This study aimed to determine the role of Lcn2 in the processes underlying developmental disorders of the mouse brain caused by maternal immune activation. A bacterial infection model was employed in which pregnant mice received intraperitoneal injections of lipopolysaccharide (LPS), a bacterial endotoxin that induces an innate immune response. First, it was demonstrated that Lcn2 is expressed in the developing brain and that MIA increases *Lcn2* mRNA levels in fetal brains of both sexes. To evaluate whether these changes in Lcn2 expression influence developmental outcomes, transgenic mice were used. Pregnant Lcn2 Het females were subjected to the MIA procedure, and offspring with either wild-type or Lcn2-knockout genotypes were further analyzed. The results indicated that maternal immune activation induces sex-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in the placenta and fetal brain, while the absence of Lcn2 modulates the inflammatory response. In wild-type mice, MIA caused changes in the density and morphology of dendritic spines and influenced the excitability of hippocampal pyramidal neurons. These neural alterations were

accompanied by behavioral disturbances resembling symptoms of neurodevelopmental disorders. Interestingly, *Lcn2* deletion under baseline conditions resulted in behavioral deficits similar to those observed in MIA offspring. The effects of both MIA and *Lcn2* deletion were sex-dependent. However, *Lcn2* silencing did not significantly affect the behavior of animals whose mothers were exposed to LPS during pregnancy. These findings cannot conclusively determine *Lcn2*'s contribution to the development of disorders triggered by maternal immune activation, given that the absence of the *Lcn2* alone produces similar behavioral impairments. However, they underscore the pivotal role of *Lcn2* in proper brain development under physiological conditions.