

Establishment and Characterization of an Environmental Two-Hit Mouse Model Involving Prenatal Immune Activation and Stress in Puberty

Doctoral Thesis

Author(s):

Giovanoli, Sandra

Publication date:

2014

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010222450>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 21828

**Establishment and Characterization of an
Environmental Two-Hit Mouse Model Involving
Prenatal Immune Activation and Stress in Puberty**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

SANDRA GIOVANOLI

MSc ETH Biology

born on 22.10.1985

citizen of
Bregaglia, GR

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolfgang Langhans, examiner

Dr. Urs Meyer, co-examiner

Prof. Dr. Ina Weiner, co-examiner

2014

Summary

The etiology of chronic neuropsychiatric disorders with neurodevelopmental components likely involves multi-factorial pathological processes. Despite the advances in human epidemiological research, however, the extent to which specific genetic and environmental factors can interact with each other and cause chronic brain pathology remains largely elusive. Creating a model system that allows the comparison of single versus combined exposures to environmental (or genetic) factors is therefore highly warranted. In the present thesis, we aimed at developing such a model system by combining a model of prenatal immune challenge with a model of sub-chronic peri-pubertal stress exposure in mice. Each of these environmental factors has been implicated in the etiology of developmental psychiatric disorders, including schizophrenia, bipolar disorder, and autism, but the cumulative impact of combined exposure to these insults remain unexplored thus far.

The experimental series presented in this thesis were designed to examine the behavioral, neurochemical and immunological consequences of combined prenatal immune challenge and exposure to peri-pubertal sub-chronic stress in mice. For this purpose, a low dose of poly(I:C) (1 mg/kg, i.v.) was used to mimic physiologically relevant cytokine elevations during mid-pregnancy (gestation day 9), and a model of sub-chronic variable stress was applied to induce psychological stress across peri-pubertal development (see supplementary figure1, chapter 2).

We first compared the effects of single versus combined exposure to prenatal immune challenge and peri-pubertal stress on adult brain and behavioral pathology (chapter 2 and 3). Multiple phenotypic assays were used in the characterization of the long-term behavioral consequences of the two environmental hits. This first series of experiments revealed for the first time that the two environmental factors synergistically interact in the development of adult behavioral and neurochemical abnormalities, some of which are relevant especially for psychotic disorders such as schizophrenia (chapter 2). We further examined whether the precise timing, during which the second environmental hit (stress exposure) is applied, would have an impact on the nature of interactions between prenatal immune activation and postnatal stress.

To address this, we exposed prenatally immune-challenged and control offspring to sub-chronic stress at a later maturational period, namely late adolescence, and then again compared the single and combined effects of prenatal immune activation and adolescent stress on behavioral functions in adulthood. We found that exposure to stress during such later maturational periods failed to interact with prenatal immune activation with respect to the induction of key behavioral phenotypes, suggesting that the postnatal timing of stress exposure is crucial for such interactions to form (chapter 2). To study the onset of behavioral changes in our two-hit model, we conducted additional behavioral tests in peri-pubertal offspring shortly after exposure to the last stressor. The findings from these analyses suggest that many of the functional abnormalities show a delayed onset and thus only appear in adulthood (chapter 2).

The identification of key mechanisms that mediate the pathological interactions between prenatal immune challenge and peri-pubertal stress seems of high relevance as this would open ways for exploring and developing preventive therapeutic strategies. Thereby, we focused on possible convergence points between the immune- and stress-related manipulations. First, we assessed the consequences of the developmental exposures on basal and stress-induced secretion of corticosterone, which is one of the main effector hormones secreted by the adrenal cortex in response to activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) - axis. These endocrine investigations suggested that the synergistic interactions on brain and behavioral functions are unlikely to be explained by prenatally acquired changes in stress-induced corticosterone release (Chapter 2). On the other hand, our analyses of microglia and inflammatory markers revealed that prenatal immune activation strongly enhances the offspring's vulnerability to neuroinflammatory changes in response to peri-pubertal stress (chapter 2). Intriguingly, such neuroinflammatory abnormalities in stressed offspring of immune-challenged mothers appeared to be transient and only emerged during and shortly after exposure to stress.

Based on these latter findings, we went on to explore possible preventive interventions that would preferentially target the stress-induced activation of microglia and associated inflammatory processes in the maturing brain (chapter 4). For this purpose, the animals were treated with minocycline, a tetracycline with known

neuroprotective and immunosuppressive functions, during the course of stress exposure (chapter 4). We found that minocycline was sufficient to block stress-induced microglia over-activation and inflammatory cytokine production in prenatally immune challenged animals. Moreover, the pharmacological intervention was found to be effective in preventing the emergence of behavioral abnormalities typically seen in adult offspring with the double-hit exposure (chapter 4).

Taken together, the studies performed in the present thesis highlight that exposure to two environmental insults, each of which has been implicated in the etiology of multi-factorial psychiatric disease, can synergistically interact in the development of adult brain pathology. The presented work also indicates a potentially important role of peri-pubertal neuroinflammation in mediating these pathological interactions, opening avenues for future studies aiming at establishing preventive interventions that target abnormal inflammatory processes during critical stages of brain maturation.

Zusammenfassung

Die Ursachen von chronischen neuropsychiatrischen Erkrankungen mit einer vorangehenden Entwicklungsstörung scheinen von verschiedenen pathologischen Prozessen abhängig zu sein. Trotz des Fortschrittes durch epidemiologische Studien ist es unklar, in welchem Ausmass solche spezifischen genetischen oder Umweltfaktoren interagieren und eine chronische Erkrankung des Gehirns auslösen können. Aus diesem Grund ist es wichtig, Modellsysteme zu entwickeln, die es zulassen, Umweltfaktoren oder genetische Einflüsse sowohl im Einzelnen als auch im Zusammenhang erforschen zu können. Die vorliegende Dissertation hatte zum Ziel, ein solches Modell zu entwickeln und zu etablieren. Dazu verbinden wir ein Modell für pränatale immunologische Stimulation mit einem Modell für postnatalem Stress. Beide Umwelteinflüsse wurden mit den Ursachen von psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie, Bipolare Störung oder Autismus assoziiert, der kumulative Einfluss solcher Umwelteinflüsse ist jedoch noch weitgehend unerforscht.

Die experimentellen Studien in der vorliegende Dissertation wurden für die Untersuchung der Auswirkungen einer pränataler Infektion und späterem Stress auf mögliche Verhaltensstörungen und auf neurochemische oder immunologische Veränderungen im Gehirn, entworfen.

Um während der Schwangerschaft des Muttertiers eine physiologisch relevante Zytokin-Erhöhung, ähnlich wie bei einer Viruserkrankung, auszulösen, wurde eine niedrige Dosierung von poly(I:C) (1 mg/kg i.v.) appliziert. Die Nachkommen dieser kurzzeitig erkrankten Muttertiere wurden dann während der Pubertät einem sub-chronischen variablen Stress, bestehend aus verschiedene psychologische Stressoren, ausgesetzt (siehe „supplementary figure 1“, Kapitel 2).

Als Erstes verglichen wir die Langzeit Folgen der einzelnen Belastungen mit den Folgen einer kombinierten Belastung auf die Gehirnentwicklung und Verhaltensveränderungen (Kapitel 2 und 3). Dabei wendeten wir verschiedenste Tests an, die eine breite Phänotypisierung der erwachsenen Nachkommen erlauben. Die ersten Testserien zeigten zum ersten Mal, dass verschiedene Umweltfaktoren

interagieren können und dabei eine Verhaltensveränderungen auslösen, die durchaus vergleichbar sind mit Aspekten psychischer Erkrankungen wie Schizophrenie (Kapitel 2). In weiteren Untersuchungen testeten wir, ob die präzise Zeitspanne, während der der Stress erfolgte, einen Einfluss auf die Entstehung der pathologischen Veränderungen hat. Dazu setzten wir die Nachkommen der immun-stimulierten Mütter zu einem späteren Zeitpunkt dem gleichen Stress aus und erforschten wiederum die Langzeit Folgen auf das Verhalten. Diese Tests ergaben, dass die Zeit während der Pubertät tatsächlich relevant war um in einer synergistischen Weise mit der pränatalen Vorgeschichte zusammen zu wirken (Kapitel 2). Um herauszufinden, ob die Verhaltensveränderungen bereits kurz nach dem Stress hervortreten, haben wir die Nachkommen direkt nach dem Stress auf Verhaltensveränderungen getestet. Diese Ergebnisse zeigten, dass die funktionellen Störungen erst im Erwachsenenalter, also verzögert, hervortreten (Kapitel 2).

Die Identifizierung von Schlüsselmechanismen, welche diese pathologischen Interaktionen verursachen, ist hochrelevant, da dieses Wissen neue Wege für präventive Massnahmen eröffnen. Dazu untersuchten wir als Erstes die Auswirkungen der beiden Manipulationen auf die basalen und stress-induzierten Ausschüttungen von Kortikosteron, dem Haupteffektor der Hypothalamus-Hypophyse-Nebennieren-Achse. Aufgrund dieser endokrinen Untersuchungen, sind die Langzeit Folgen nicht erklärbar durch eine direkte pränatal induzierte Veränderung der Stress-Antwort-Achse (Kapitel 2). Im Gegensatz dazu haben weitere Analysen von Mikrogliazellen und immunologischen Mediatoren gezeigt, dass eine pränatale Immunstimulation die Stressverwundbarkeit stark erhöht und es dabei zu einer neuroinflammatorischen Stressantwort kommt. Wichtig dabei ist, dass diese neuroinflammatorische Stressantwort nur vorübergehend, das heisst während und kurz nach dem Stress, erscheint (Kapitel 2).

Aufgrund dieser Ergebnisse haben wir mögliche präventive Massnahmen getestet, welche die stress-induzierte Aktivierung von Mikrogliazellen und die damit verbundene Erhöhung des Zytokinpiegels im zentralen Nervensystem anvisieren (Kapitel 4). Dazu behandelten wir die Mäuse während des Stresses mit Minozyklin, einem Tetrazyklin mit neuroprotektiven und immunsuppressiven Wirkungen (Kapitel 4).

Diese Tests deuten darauf hin, dass Minozyklin ausreichte, um die stress-induzierte Immunaktivierung zu verhindern. Weiter hat sich gezeigt, dass diese präventive Massnahme auch gegen die Langzeitfolgen der beiden Umwelteinflüssen wirkte und die Verhaltensstörungen verhinderte (Kapitel 4).

Zusammenfassend zeigen die Studien der vorliegenden Dissertation, dass zwei Umwelteinflüsse, welche bei der Entstehung von komplexen psychiatrischen Krankheiten eine Rolle spielen, zusammenwirken können und dabei zur Entwicklung von Neuropathologien bei Erwachsenen beitragen. Die Arbeit zeigt weiter auf, dass dabei neuroinflammatorische Prozesse während der Pubertät eine wichtige Rolle spielen können. Dies eröffnet neue Wege für präventive Massnahmen durch Verhinderung von pathologischen inflammatorischen Prozessen während kritischen Stadien der Entwicklung.