

Excessive aggression, ADHD- and ASD-like phenotypes in TPH2- and brain ganglioside-deficient mice

Citation for published version (APA):

Svirin, E. (2022). *Excessive aggression, ADHD- and ASD-like phenotypes in TPH2- and brain ganglioside-deficient mice: mechanisms and gene-by-environment interaction*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. OneBook.ru. <https://doi.org/10.26481/dis.20220111es>

Document status and date:

Published: 01/01/2022

DOI:

[10.26481/dis.20220111es](https://doi.org/10.26481/dis.20220111es)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

In our work, we investigated the mechanisms underlying human neurodevelopmental brain pathology associated with abnormal aggression and accompanying emotional abnormalities that are related to endophenotypes of developmental neuropsychiatric disorders. Specifically, we used genetically modified mice deficient for tryptophan hydroxylase-2 (TPH2), the rate-limiting enzyme of neuronal serotonin (5-HT) synthesis, and mice deficient in lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase (ST3GAL5), also called GM3 synthase, which synthesizes ganglioside GM3, the precursor of major brain gangliosides.

Genetic variation in the *TPH2* gene and *ST3GAL5* gene-dependent alterations in ganglioside synthesis and catabolism in humans were shown to contribute to neurodevelopmental disorders. Both TPH2- and ST3GAL5-deficient mice share features of neurodevelopmental and psychiatric disorders, including attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorders (ASD), such as hyperactivity as well as increased impulsivity and aggression. In addition, they display compromised cognitive control and signs of impaired brain myelination. Apart from genetic predisposition, environmental challenges, such as emotional stress or inflammatory stress caused by infectious diseases, are known to contribute to the pathogenesis of these disorders.

To investigate the contribution of environmental challenges in these experimental mouse models of disease, we used exposure to a predator or induction of inflammatory stress. In light of current views suggesting that genetic influence on psychiatric disorders involves genes

acting at early stages of neurodevelopment and the establishment of brain circuitry and, thus, conferring broad liability to psychiatric disorders, we sought to investigate two genetic models exhibiting partly similar behavioral phenotypes in order to facilitate identification of putative common neurobiological mechanisms leading to behavioral alterations, including increased aggression.

First, we used mice with a partial genetic deficiency of *Tph2*. In line with previously demonstrated abnormal aggression in male heterozygous *Tph2* (*Tph2*^{+/-}) mice subjected to environmental stressors, we showed increased aggression and dominant behavior, as well as deficits in neutral social behavior in both male and female mutants following rat exposure stress. Naïve *Tph2*^{+/-} male mice challenged with novelty exhibited increased exploratory activity and less behavioral despair in the modified swim test than wildtype (wt) control mice. Decreased floating was also found in naïve *Tph2*^{+/-} female mice, indicating stress resilience and locomotor hyperactivity which are a prominent feature of neurodevelopmental disorders. Thus, in both sexes in *Tph2*^{+/-} mice we observed increased stress resilience and stress-induced aggression.

We suggest similarities in neurobiological mechanisms of behavioral changes in male and female mice. Following previous research that found alterations in 5-HT metabolism, we used male mice for high-performance liquid chromatography (HPLC) assay of brain dopamine and norepinephrine. Stress-induced changes of dopamine and norepinephrine metabolism were most pronounced in the amygdala,

where dopamine concentration was drastically reduced and its turnover was heightened in stressed *Tph2*^{+/-} mice compared to wt controls and non-stressed mutants. Norepinephrine turnover in the amygdala was reduced in mutant mice. In the PFC of stressed *Tph2*^{+/-} mice we found strongly decreased dopamine concentration and elevated dopamine turnover compared to wt control mice, which may alter PFC activity and, thus, affect top-down control of impulsive aggression. We speculate that the observed neurochemical differences between wt controls and *Tph2*^{+/-} mice are implicated in the deficits of cognitive control dependent on the functional interplay between the PFC and amygdala.

RT-qPCR showed increased expression of 5-HT_{2A} in the PFC accompanying behavioral changes in stressed female *Tph2*^{+/-} mice of both genotypes. In *Tph2*^{+/-} female mice, 5-HT_{1A} receptor expression was downregulated. Together, these findings suggest stress × genotype interaction affecting the 5-HT system of the brain, which is essential for cognitive control. Expression of glycogen synthase kinase 3 beta gene (*Gsk-3β*) in the PFC was decreased in non-stressed *Tph2*^{+/-} female mice. GSK-3β is considered a molecular hub of distress and is a well-established physiological mediator of elevated synthesis of pro-inflammatory cytokines. Together with decreased behavioral despair in the modified swim test, lowered *Gsk-3β* expression may indicate reduced susceptibility of *Tph2*^{+/-} mutants to stress.

For the first time, we found elevated mRNA expression of four major myelin structural proteins: myelin basic protein (MBP), proteolipid protein 1 (PLP1), myelin-associated glycoprotein (MAG), and myelin

oligodendrocyte glycoprotein (MOG), in the PFC of non-stressed *Tph2*^{+/-} female mice. Stress lowered the expression level of these proteins in *Tph2*^{+/-} mice. Changes in the expression of myelination-related peptides were reciprocal to the changes in the *Gsk-3β* expression, which is in accordance with the literature. In non-stressed male *Tph2*^{+/-} mice we found lowered expression of *Plp1* and *Mbp* in the hippocampus. Taken together, these changes indicate the possibility of compromised myelination of neurons, which may contribute to the observed behavioral alterations, as dysregulated myelin formation disrupts conductivity and, thus, connectivity in the brain.

Overall, in *Tph2*^{+/-} mice of both sexes, we found a stress-induced increase in aggression, as well as decreased stress susceptibility and anxiety in naïve mice, the behavioral features similar to those observed in *Tph2* knockout mice (*Tph2*^{-/-}). We also showed signs of altered myelination and altered catecholamine metabolism in the brain regions implicated in aggression and emotional regulation.

Secondly, we used mice of both sexes with GM3 synthase knockout (*St3gal5*^{-/-}), which are lacking major brain gangliosides. Disruption in ganglioside metabolism in humans leads to devastating neurological impairments, but more subtle alterations may contribute to an increased risk of neurodevelopmental disorders, including ADHD. However, the role of ST3GAL5 in endophenotypes of ADHD and ASD has been poorly investigated and no data are available in the corresponding knockout mouse model. Our studies demonstrated elevated measures of aggressive and dominant behavior in mutants of both sexes. Notably, we

found decreased expression of PLP1 in the cerebral cortex of *St3gal5*^{-/-} mice at both gene and protein levels, suggesting compromised myelination. As there is an established link between neurodevelopmental disorders and infectious diseases suffered in a broad time window from the prenatal period to adolescence, we challenged *St3gal5*^{-/-} mice with a model of infectious disease causing inflammatory stress. It led to an aggravation of changes in the behavior of *St3gal5*^{-/-} mice, and an aberrant inflammatory response to systemic inflammation was found in the CNS and in the periphery. Altogether, our findings support the view that ganglioside deficiency, dysmyelination, and neuroinflammation are interrelated, which may underlie neurodevelopmental disorders of various genetic origins.

Thus, in both *Tph2* and *St3gal5* mouse lines, we found signs of inflammation and altered myelination. Our data has led us to hypothesize that impaired myelination and neuroinflammation may be sharing mechanisms leading to disrupted brain connectivity and subsequent aggressiveness, hyperactivity, and other behavioral alterations that are characteristic of ADHD- and ASD-like features. Based on our results, we speculate that these mechanisms are common for different genetic aberrations. Our results further support the findings from recent genome-wide association studies, suggesting that variation in multiple pleiotropic genes interacting with environmental challenges may cause similar dimensions of symptoms in neurodevelopmental psychiatric disorders.

Samenvatting

In ons werk onderzochten we de mechanismen die ten grondslag liggen aan menselijke neurologische ontwikkelingsstoornissen die gekenmerkt worden door abnormale agressie en emotionele afwijkingen, gerelateerd aan endofenotypen voor neuropsychiatrische ontwikkelingsstoornissen. Hiervoor zijn genetisch gemodificeerde muizen gebruikt met een gebrek aan tryptofaanhydroxylase-2 (Tph2), betrokken bij de synthese van serotonine (5-HT), en muizen met een gebrek aan lactosylceramide-alfa-2,3-sialyltransferase (ST3GAL5, ookwel bekend als GM3-synthase), verantwoordelijk voor de synthese van de precursor van de belangrijkste gangliosiden in de hersenen, GM3. Genetische variatie in het *TPH2*-gen en veranderingen in de synthese en afbraak van gangliosiden door het *ST3GAL5*-gen dragen bij aan neurologische ontwikkelingsstoornissen bij mensen. Zowel *TPH2*- als *ST3GAL5*-deficiënte muizen vertonen kenmerken van neurologische en psychiatrische ontwikkelingsstoornissen, zoals aandachtstekort-hyperactiviteitstoornis (attention-deficit hyperactivity disorder [ADHD]) en autismespectrumstoornissen (ASS), met kenmerken als hyperactiviteit, verhoogde impulsiviteit en agressie. Daarbij vertonen zij verminderde executieve functionaliteit en zijn er aanwijzingen voor achterblijvende myelinisatie van de hersenen. Naast genetische aanleg kunnen omgevingsfactoren, zoals emotionele stress en inflammatoire stress door infecties, bijdragen aan de pathogenese van deze stoornissen.

Om de bijdrage van omgevingsfactoren in experimentele muismodellen te onderzoeken, is gebruik gemaakt van blootstelling aan

een roefdier en geïnduceerde inflammatoire stress. De genetische invloed op psychiatrische stoornissen betreft volgens de huidige opvattingen genen die betrokken zijn bij de vroege neurologische ontwikkeling en de opbouw van hersencircuits, die bij deze processen een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van psychiatrische stoornissen. In dit licht hebben we twee genetische modellen gebruikt die gedeeltelijk vergelijkbare gedragsfenotypen vertonen, om de mogelijk gemeenschappelijke neurobiologische mechanismen te identificeren die leiden tot afwijkend gedrag, zoals verhoogde agressie.

Ten eerste hebben we muizen met een genetische gedeeltelijke deficiëntie van Tph2 gebruikt. In overeenstemming met eerder aangetoonde abnormale agressie bij mannelijke heterozygote Tph2 (*Tph2^{+/-}*) muizen die onderworpen werden aan omgevingsstressoren, vonden we na stressvolle blootstelling aan ratten zowel bij mannelijke als vrouwelijke mutanten een toename van agressie en dominant gedrag, en een gebrek aan neutraal sociaal gedrag. Naïeve mannelijke *Tph2^{+/-}*-muizen die werden uitgedaagd met onbekende omstandigheden vertoonden verhoogde exploratieve activiteit en minder hulpeloos gedrag dan *wildtype* (wt) controle-muizen in een aangepaste Porsolt zwemttest. Verminderde immobiliteit werd ook waargenomen bij naïeve vrouwelijke *Tph2^{+/-}*-muizen, hetgeen duidt op verminderde stressgevoeligheid en locomotorische hyperactiviteit. Dit is een belangrijk kenmerk van neurologische ontwikkelingsstoornissen. Bij beide geslachten van *Tph2^{+/-}*-muizen werden dus verhoogde stressbestendigheid en stressgeïnduceerde agressie waargenomen.

We suggereren overeenkomsten in de neurobiologische mechanismen achter gedragsveranderingen bij mannelijke en vrouwelijke muizen. In navolging van eerder onderzoek dat veranderingen in het 5-HT-metabolisme aantoonde, gebruikten we *high-performance liquid chromatography* (HPLC) om het gehalte van dopamine en noradrenaline in de hersenen van mannelijke muizen te bepalen. Stress-geïnduceerde veranderingen in het dopamine- en noradrenaline-metabolisme waren het meest uitgesproken in de amygdala. Daar waren bij gestreste *Tph2^{+/-}*-muizen de dopamineconcentraties drastisch verlaagd en de dopamineturnover verhoogd, in tegenstelling tot wt-controles en niet-gestreste mutanten. De turnover van noradrenaline in de amygdala was juist verlaagd bij de mutant-muizen. In de prefrontale cortex (PFC) van de gestreste *Tph2^{+/-}*-muizen vonden we een sterk verlaagde dopamineconcentratie en een verhoogde turnover, in vergelijking met wt-controlemuizen. Deze veranderingen zouden de activiteit van de PFC kunnen veranderen en zo de top-down controle van impulsieve agressie kunnen beïnvloeden. We speculeren dat de waargenomen neurochemische verschillen tussen wt-controlemuizen en *Tph2^{+/-}*-muizen betrokken zijn bij de gebreken in executieve functionaliteit, die afhankelijk is van de functionele interactie tussen de PFC en de amygdala bij mutanten.

Bij gestreste vrouwelijke *Tph2*-muizen van beide genotypen, toonde RT-qPCR een verhoogde expressie van 5-HT_{2A} in de PFC die gepaard ging met gedragsveranderingen. Bij vrouwelijke *Tph2^{+/-}*-muizen was de expressie van de 5-HT_{1A}-receptor gedownreguleerd. Samen

suggereren deze twee bevindingen een interactie tussen stress en genotype, die het 5-HT-systeem in de hersenen beïnvloedt, wat gevolgen heeft voor de executieve functionaliteit. De expressie van glycogeensynthase-kinase-3-beta (*Gsk-3β*) in de PFC was verlaagd bij niet-gestreste vrouwelijke *Tph2^{+/-}*-muizen. GSK-3β wordt beschouwd als een moleculair knooppunt van angst en nood, en is een bekende fysiologische mediator van verhoogde synthese van pro-inflammatoire cytokines. Samen met de verminderde hulpeloosheid in de gemodificeerde zwemtest, kan de verlaagde *Gsk-3β* wijzen op een verminderde gevoeligheid van *Tph2^{+/-}*-mutanten voor stress.

Voor het eerst vonden we in de PFC van niet-gestreste vrouwelijke *Tph2^{+/-}*-muizen een verhoogde expressie van vier belangrijke eiwitten voor de myelinedstructuur: basisch myeline-eiwit (MBP), proteolipide-eiwit 1 (PLP1), myeline-geassocieerd glycoproteïne (MAG) en myeline-oligodendrocyt glycoproteïne (MOG). Stress verlaagde het expressieniveau van deze eiwitten in *Tph2^{+/-}*-muizen. In overeenstemming met de literatuur was er een verband tussen veranderingen in de expressie van myelinisatie-gerelateerde peptiden en veranderingen in de *Gsk-3β*-expressie. In niet-gestreste mannelijke *Tph2^{+/-}*-muizen vonden we een verlaagde expressie van *Plp1* en *Mbp* in de hippocampus. Samen wijzen deze bevindingen op de mogelijkheid van gecompromitteerde myelinisatie van neuronen. Dit kan bijdragen aan de waargenomen gedragsveranderingen, aangezien ontregelde myelinevorming de geleiding, en dus de connectiviteit, in de hersenen verstoort.

Over het geheel vonden we bij *Tph2*^{+/-}-muizen van beide geslachten een stress-geïnduceerde toename van agressie, en een afname van stressgevoeligheid en angst bij naïeve muizen. Deze gedragskenmerken zijn vergelijkbaar met het waargenomen gedrag van *Tph2*-knockout-muizen (*Tph2*^{-/-}). Daarnaast vonden we aanwijzingen voor veranderingen in de myelinisatie en het catecholamine-metabolisme, in de hersengebieden die betrokken zijn bij agressie en emotieregulatie.

Ten tweede hebben we muizen van beide geslachten gebruikt met GM3-synthase-knockout (*St3gal5*^{-/-}), die daardoor belangrijke hersengangliosiden missen. Verstoring van het ganglioside-metabolisme bij mensen leidt tot verwoestende neurologische stoornissen, maar subtielere veranderingen kunnen bijdragen aan een verhoogd risico op neurologische ontwikkelingsstoornissen, waaronder ADHD. Echter, de rol van ST3GAL5 in endofenotypen van ADHD en ASS is slecht onderzocht en er zijn geen gegevens beschikbaar van het corresponderende knockout-muismodel. Onze studies toonden verhoogde maten van agressief en dominant gedrag aan bij mutanten van beide geslachten. In het bijzonder vonden we een verminderde expressie van PLP1 in de hersenschors van *St3gal5*^{-/-}-muizen op zowel gen- als eiwitniveau, hetgeen wijst op een verminderde myelinisatie. Omdat er een verband bestaat tussen neurologische ontwikkelingsstoornissen en infectieziekten optredend tussen de prenatale periode tot aan adolescentie, hebben we *St3gal5*^{-/-}-muizen geconfronteerd met een modelziekte waardoor inflammatoire stress werd veroorzaakt. Dit leidde

tot een verergering van het afwijkende gedrag van *St3gal5*^{-/-}-muizen. Een afwijkende ontstekingsreactie op systemische ontstekingen werd gevonden in het centraal zenuwstelsel en in de periferie. Onze bevindingen ondersteunen de opvatting dat ganglioside-deficiëntie, dysmyelinisatie en neuro-inflammatie met elkaar in verband staan, wat ten grondslag kan liggen aan neurologische ontwikkelingsstoornissen van verschillende genetische oorsprong.

We vonden dus zowel bij *Tph2*- als bij *St3gal5*-muizenlijnen aanwijzingen voor inflammatie en veranderde myelinisatie. Onze gegevens hebben geleid tot de hypothese dat verminderde myelinisatie en neuro-inflammatie mechanismen kunnen delen die leiden tot verstoorde hersenconnectiviteit en daaropvolgend agressiviteit, hyperactiviteit en andere gedragsveranderingen die kenmerkend zijn voor ADHD- en ASS-achtige beelden. Op basis van onze resultaten speculeren wij dat gemeenschappelijke mechanismen betrokken zijn bij verschillende genetische afwijkingen. Onze resultaten ondersteunen verder de bevindingen van recente genomwijde associatiestudies, die suggereren dat een variatie van meerdere pleiotrope genen, in wisselwerking met omgevingsfactoren, vergelijkbare symptoomdimensies van neurologische ontwikkelingsstoornissen kan veroorzaken.