

# Роль генов *Mucin-2* и *Kaiso* в социальном поведении мышей

Е.Н. Кожевникова<sup>1</sup>, К.М. Ачасова<sup>1</sup>, В.С. Коростина<sup>2</sup>, Е.Б. Прохорчук<sup>2</sup>, Е.А. Литвинова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Воспалительные процессы в кишечнике приводят к нарушениям различных систем организма, в частности к изменению работы центральной нервной системы. Несмотря на то что механизмы такого влияния пока не известны, показано, что воспаление кишечника ассоциировано с тревожностью и депрессией. В данной работе мы использовали генетическую модель животных, которая связана как с воспалением кишечника, так и с нервной системой. Такой моделью послужили мыши с двойной мутацией в генах *Kaiso* и *Mucin-2*. Ген *Kaiso* кодирует транскрипционный фактор, который экспрессируется как в кишечнике, так и в мозге. А ген *Mucin-2* кодирует белок, который служит основой для синтеза протеогликана кишечной выстилки. *Mucin-2* является основным протеогликаном кишечника и выполняет множество функций, включая барьерную и защитную. Мы протестировали животных с мутацией в гене, кодирующем транскрипционный фактор *Kaiso*, в тестах на социальное поведение, но не обнаружили отличий от контрольных животных. Однако животные с двойной мутацией как в гене *Kaiso*, так и в гене протеогликана кишечника *Mucin-2* показали достоверные отличия в социальном поведении: снижение агрессии и увеличение садок на самца-интродера. Эти результаты говорят о том, что гомеостаз кишечной выстилки может иметь влияние на работу центральной нервной системы животного. На данный момент остается неизвестным, является ли влияние двух генов на поведение мышей синергическим или вклад в поведение животных дает только мутация в гене *Mucin-2*. Дальнейшие исследования помогут ответить на этот вопрос.

Ключевые слова: мыши; социальное поведение; кишечное воспаление; муцин-2.

## Role of the *Mucin-2* and *Kaiso* genes in the social behavior of mice

E.N. Kozhevnikova<sup>1</sup>, K.M. Achasova<sup>1</sup>, V.S. Korostina<sup>2</sup>, E.B. Prokhortchouk<sup>2</sup>, E.A. Litvinova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Inflammatory processes in the gut lead to abnormalities in various systems of the body, in particular, to changes in the activity of the central nervous system. Although the mechanisms of these effects are not yet known, it has been demonstrated that intestinal inflammation is associated with anxiety and depression. In this work, we used an animal model of intestinal inflammation, which might result in behavioral changes. The animals used were knock-out mice with double mutations in the *Kaiso* and *Mucin-2* genes. The *Kaiso* gene encodes a transcription factor that is expressed both in the brain and in the intestine. The *Mucin-2* gene encodes a protein that serves as a scaffold for the synthesis of intestinal proteoglycan. *Mucin-2* is a major proteoglycan of the intestinal mucus layer and performs multiple functions, including barrier and defensive ones. We used knock-out animals with a mutation in the transcription factor *Kaiso* in tests assessing social behavior, but did not observe any difference between test subjects and wild-type animals. By contrast, double knock-out animals that additionally had a mutation in *Mucin-2*, a major gene for intestinal proteoglycan, displayed significant changes in social behavior: lower aggression rates and higher rates of courtship behavior toward a male intruder. These results suggest that intestinal homeostasis might have a strong impact on the nervous system of the animals. It remains unclear whether the influence of the two genes is synergistic or the knock-out of the *Mucin-2* gene alone determines this behavior in mice. Further investigations will help clarify the matter.

Key words: mice; social behavior; intestine inflammation; Mucin-2.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Кожевникова Е.Н., Ачасова К.М., Коростина В.С., Прохорчук Е.Б., Литвинова Е.А. Роль генов *Mucin-2* и *Kaiso* в социальном поведении мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):410-412. DOI 10.18699/VJ15.053

### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Kozhevnikova E.N., Achasova K.M., Korostina V.S., Prokhortchouk E.B., Litvinova E.A. The role of the *Mucin-2* and *Kaiso* genes in the social behavior of mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):410-412. DOI 10.18699/VJ15.053

DOI 10.18699/VJ15.053

УДК 575.167

Поступила в редакцию 03.07.2015 г.

Принята к публикации 21.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

Известно, что воспалительные процессы в кишечнике приводят к образованию злокачественных опухолей и изменению состава симбиотической микрофлоры (Arthur et al., 2012). Такие воспалительные реакции могут быть вызваны инфицированием патогенными микроорганизмами, изменениями иммунного статуса, химическим отравлением. Также известны некоторые гены, мутации в которых приводят к воспалению кишечника. Одним из них является ген *Mucin-2* (*Muc2*), который кодирует основной протеогликан кишечного мукозального слоя. Муцин-2 формирует физический барьер между бактериальной микрофлорой и энтероцитами, защищая ткани кишечника от возможного прямого контакта с патогенными микроорганизмами (Bergstrom et al., 2010). У животных с мутацией в гене *Muc2* развиваются злокачественные новообразования кишечника, и эта линия мышей служит экспериментальной моделью для изучения воспаления и канцерогенеза (Velcich et al., 2002). В недавних исследованиях было показано, что в опухолях у животных с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2<sup>-/-</sup>*) значительно повышается экспрессия транскрипционного фактора Kaiso (Daniel, Reynolds, 1999), а животные с мутацией в этом гене (*Kaiso<sup>-/-</sup>*) демонстрируют устойчивость к развитию рака кишечника (Prokhorchouk et al., 2006). Белок Kaiso содержит домен «цинковые пальцы» и является транскрипционным фактором, который подавляет активность генов (Prokhorchouk et al., 2001; Lopes et al., 2008). Поскольку Kaiso инактивирует гены опухолевых супрессоров, то комбинация мутаций в генах *Muc2* и *Kaiso* может подавлять развитие злокачественных опухолей в кишечнике.

## Материалы и методы

Работа выполнена в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) на самцах мышей инбредной линии C57BL/6J в возрасте 8–12 нед и самцах инбредной линии Balb/cJ в возрасте 18 дн. (ювенильные интродеры). В ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН животные C57BL/6J и Balb/cJ поступили в 2013 г. из Jackson Laboratory (США). Животных *Kaiso<sup>-/-</sup>* и *Muc2<sup>-/-</sup>;Kaiso<sup>-/-</sup>* на генетическом фоне C57BL/6J получили из лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных (Институт биоинженерии, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва). В ходе теста взрослые самцы были рассажены по одному в индивидуально вентилируемых клетках (Optimice, США) за три дня до начала теста при искусственном световом режиме 14С : 10Т; корм и питье предоставляли *ad libitum*. Работу с животными проводили согласно биоэтическим нормам Директивы Евросоюза (ECC Directive 86/609/EEC). Протокол эксперимента утвержден комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Разрешение выдано 14.10.2013, № 18.4).

Для определения особенностей социального поведения животных был использован тест с ювенильным интродером. В день эксперимента в темное время суток к тестируемому самцам в клетки были посажены молодые (18 дн.) самцы линии Balb/cJ на 2 мин. Через 90 мин эти же животные были посажены снова на 5 мин. Во время второго предоставления регистрировали социальную активность животных-резидентов.

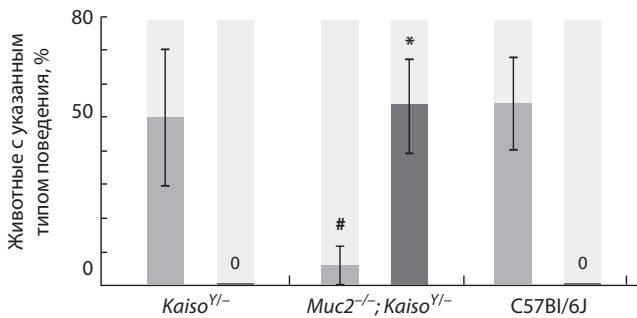
Для определения уровня гормонов в фекалиях животных использовался метод непрямого иммуоферментного анализа (ИФА). Пробы фекалий собирали из клеток самцов, высушивали при комнатной температуре до постоянного объема, перетирали и гомогенизировали в воде. Затем центрифугировали, 200 мкл надосадочной жидкости использовали для ИФА. Для определения количества кортикостерона использовали набор Corticosterone ELISA Kit (Enzo Lifescience, Германия), а для определения количества тестостерона – набор Тестостерон-ИФА (ХЕМА, Россия). Концентрации гормонов выражали в нг/мг.

## Результаты и обсуждение

В данной работе мы исследовали влияние генов *Kaiso* и *Muc2* на социальное поведение животных. Поскольку Kaiso является транскрипционным фактором, который экспрессируется в различных тканях мыши (Shumskaya et al., 2015) и влияет на активность и обучаемость у животных (Kulikov et al. Материал готовится к печати), то он также может влиять и на социальное взаимодействие у мышей. Мы протестировали самцов дикого типа и мутантных животных (*Kaiso<sup>Y/-</sup>* и *Muc2<sup>-/-</sup>;Kaiso<sup>Y/-</sup>*) в эксперименте на социальное взаимодействие с ювенильным интродером. Наши эксперименты показали, что у животных с мутацией в гене *Kaiso* не наблюдалось достоверных отличий в поведении от животных контрольной группы. К нашему удивлению, у животных с двойной мутацией (*Muc2<sup>-/-</sup>;Kaiso<sup>Y/-</sup>*) наблюдались достоверные отличия по количеству садок и актов агрессии от животных дикого типа и *Kaiso<sup>-/-</sup>*. Животные *Muc2<sup>-/-</sup>;Kaiso<sup>Y/-</sup>* демонстрировали увеличение количества садок на самца и уменьшение числа актов агрессии, показывая в целом менее агрессивное поведение по отношению к интродеру (рис. 1). Таким образом, мы видим, что двойная мутация генов *Kaiso* и *Muc2* приводит к достоверному изменению социальной реакции на ювенильного интродера.

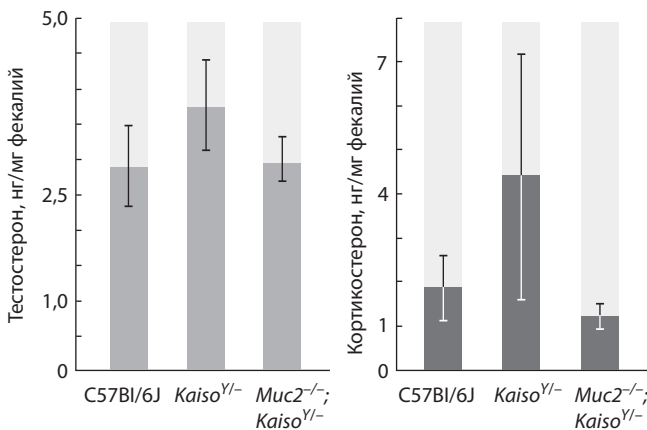
Отсутствие Mucin-2 приводит к сильному воспалению (Bergstrom et al., 2010), что, в свою очередь, может вызвать изменение уровня гормонов в крови животных. Таким образом, различия в социальном поведении могли бы быть объяснены изменением уровня тестостерона и кортикостерона (Goujon et al., 1995). Для того чтобы понять, связано ли изменение социальной реакции на ювенильного интродера с изменением уровня гормонов у животных *Muc2<sup>-/-</sup>;Kaiso<sup>Y/-</sup>*, мы измерили уровень тестостерона и кортикостерона в фекалиях трех групп животных. Измерения показали отсутствие достоверных различий между группами (рис. 2). Таким образом, изменение поведения у животных с двойной мутацией в генах *Kaiso* и *Muc2* не объясняется изменением гормонального фона самцов.

Белковый продукт гена *Muc2* экспрессируется в тканях кишечника, и его основной функцией является формирование мукозального барьера для патогенных микроорганизмов. Мы предполагаем, что изменения в поведении животных связаны с хроническим воспалением кишечника, вызванным отсутствием муцина. В пользу этого предположения говорит то, что у животных с нокаутом некоторых генов интерлейкинов развивается обширное воспаление кишечника (Scheinin et al., 2003), а у мутантов по интерлейкину 1 наблюдаются отклонения



**Рис. 1.** Мутация в гене *Muc2* вызывает изменения в социальном поведении самцов.

Садка (черный), агрессия (белый);  $n(C57Bl/6J) = 7$ ,  $n(Kaiso^{Y/Y-}) = 6$ ,  $n(Muc2^{-/-}; Kaiso^{Y/Y-}) = 17$ . # – между  $Muc2^{-/-}; Kaiso^{Y/Y-}$  и диким типом:  $p < 0,05$ ,  $\chi^2 = 5,45$ ; \* – между  $Muc2^{-/-}; Kaiso^{Y/Y-}$  и диким типом:  $p < 0,05$ ,  $\chi^2 = 4,94$ .



**Рис. 2.** У животных линий  $Muc2^{-/-}; Kaiso^{Y/Y-}$ ,  $Kaiso^{Y/Y-}$  и C57Bl/6J не наблюдается различий в уровне тестостерона и кортикостерона.

в поведении (Moshkin et al., 2001). Кишечное воспаление и изменение уровня интерлейкинов могут также приводить к изменениям поведения в случае мутации в гене *Muc2*. С другой стороны, муцин-2 является ключевым компонентом среды для размножения симбиотических бактерий в полости кишечника, состав которых тоже может оказывать влияние на поведение животных (Clarke et al., 2013). Таким образом, эффект мутации в гене *Muc2* на функцию нервной системы может быть опосредован как изменением состояния иммунитета, так и сдвигом в составе микрофлоры кишечника, вызванным воспалением и отсутствием муцина. В дальнейшем необходимо проверить, является ли изменение социальной реакции на ювенильного интродера животных  $Muc2^{-/-}; Kaiso^{Y/Y-}$  следствием синергического влияния двух генов или зависит исключительно от мутации в гене *Muc2*. Более того, наши данные говорят о том, что животные  $Muc2^{-/-}$  требуют более тщательного изучения в других поведенческих тестах. И наконец, необходимы функциональные эксперименты, для того чтобы объяснить механизмы взаимосвязи *Muc2* и работы центральной нервной системы. Данная работа является отправной точкой в изучении роли мукозального барьера в регуляции поведения животных.

## Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-32059.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Arthur J.C., Perez-Chanona E., Muhlbauer M., Tomkovich S., Uronis J.M., Fan T.J., Campbell B.J., Abujamel T., Dogan B., Rogers A.B., Rhodes J.M., Stintzi A., Simpson K.W., Hansen J.J., Keku T.O., Fodor A.A., Jobin C. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 2012;338:120-123. DOI: 10.1126/science.1224820
- Bergstrom K.S., Kisoos-Singh V., Gibson D.L., Ma C., Montero M., Sham H.P., Ryz N., Huang T., Velcich A., Finlay B.B., Chadee K., Vallance B.A. Muc2 protects against lethal infectious colitis by dissociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000902. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000902
- Clarke G., Grenham S., Scully P., Fitzgerald P., Moloney R.D., Shanahan F., Dinan T.G., Cryan J.F. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol. Psychiatr.* 2013;18:666-673. DOI: 10.1038/mp.2012.77
- Daniel J.M., Reynolds A.B. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 1999;19:3614-3623.
- Goujon E., Parnet P., Aubert A., Goodall G., Dantzer R. Corticosterone regulates behavioral effects of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta in mice. *Am. J. Physiol.* 1995;269:R154-R159.
- Lopes E.C., Valls E., Figueroa M.E., Mazur A., Meng F.G., Chiosis G., Laird P.W., Schreiber-Agus N., Grealley J.M., Prokhorchouk E., Melnick A. Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. *Cancer Res.* 2008;68:7258-7263. DOI: 10.1158/0008-5472
- Moshkin M.P., Tamagawa A., Kolosova I.E., Gerlinskaya L.A., Iwakura Y., Endo Y. Behavioral and endocrine effects of endotoxin in wild-type mice and mice deficient in interleukin 1: sickness behavior or adaptive response. *Dokl. Biol. Sci.* 2001;379:322-324.
- Prokhorchouk A., Hendrich B., Jorgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhorchouk E. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes. Dev.* 2001;15:1613-1618.
- Prokhorchouk A., Sansom O., Selfridge J., Caballero I.M., Salozhin S., Aithozhina D., Cerchietti L., Meng F.G., Augenlicht L.H., Mariadason J.M., Hendrich B., Melnick A., Prokhorchouk E., Clarke A., Bird A. Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol. Cell Biol.* 2006;26:199-208.
- Scheinin T., Butler D.M., Salway F., Scallan B., Feldmann M. Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2003;133:38-43.
- Shumskaya V.S., Zhigalova N.A., Prokhorchouk A.V., Prokhorchouk E.B. Distribution of Kaiso protein in mouse tissues. *Histochem. Cell Biol.* 2015;143:29-43. DOI 10.1007/s00418-014-1261-7
- Velcich A., Yang W., Heyer J., Fragale A., Nicholas C., Viani S., Kucherlapati R., Lipkin M., Yang K., Augenlicht L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin *Muc2*. *Science*. 2002;295:1726-1729.