

Мутация С1473G в гене *Tph2* мыши: от молекулярного механизма до биологических последствий

Хоцкий Н.В., Комлева П.Д., Арефьева А.Б., Базовкина Д.В., Куликов А.В.*

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

* v_kulikov@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: серотонин; триптофангидроксилаза 2; мутация; мозг; поведение; мыши

Мотивация и цель: Фермент триптофангидроксилаза 2 (ТПГ2) гидроксилирует L-триптофан до L-5-гидрокситриптофана – первую и лимитирующую стадию синтеза серотонина (5-НТ) в головном мозге млекопитающих [1]. Активность этого фермента является основным фактором, определяющим синтез 5-НТ. Некоторые мутации в гене *Tph2* человека ассоциированы с тяжелыми психопатологиями [2, 3]. Мутация С1473G в гене *Tph2* мыши приводит к замене Р447R в молекуле фермента и вдвое снижает активность фермента в мозге [4, 5]. Против мутантной G аллели идет естественный отбор в природных популяциях мышей [6].

Целью исследования является выяснение молекулярного механизма снижения активности мутантного фермента и выяснение биологических последствий данной мутации.

Методы и алгоритмы: Исследования проводили на молодых (3 недели) и взрослых (8 недель) самцах генотипов В6-1473С (дикий тип) и В6-1473G (мутантный тип), полученных скрещиванием их гетерозиготных родителей В6-1473СG. Эти мыши отличались только аллелями С и G. Влияние аллелей на стабильность молекулы фермента оценивали по величине свободной энергии температурной денатурации (dG). Активность ТПГ2, уровни 5-НТ, 5-Н1АА определяли с помощью ВЭЖХ, тогда как уровни белка ТПГ2 в мозге определяли с помощью вестерн блота. Влияние С и G аллелей на дистонию задних конечностей, физическое доминирование самцов, привлекательность самцов для самок изучали в тесте подвешивания за хвост, tube test и ольфакторном тесте соответственно. Вероятность передачи аллелей С и G потомкам исследовали в популяционном эксперименте. Активацию врожденного иммунитета проводили однократным введением бактериального липополисахарида (ЛПС, 2 мг/кг, в/б).

Результаты: Мутация С1473G снижала уровень белка ($F(1,15) = 8.84, p < 0.01$) и активность ТПГ2 ($F(1,15) = 8.24, p < 0.01$) в среднем мозге. Впервые было показано, что аллель G снижает величину dG термической денатурации молекулы ТПГ2: с 1.865 ± 0.064 ккал/моль (дикий тип) до 1.306 ± 0.051 ккал/моль (мутантный белок) ($F(1,15) = 46.7, p < 0.001$). Требуется затратить меньше энергии для денатурации мутантного белка, чем белка дикого типа. При одинаковом уровне экспрессии мутантного и дикого типа генов *Tph2* [7] снижение стабильности мутантного белка уменьшает его время жизни, концентрацию и, как следствие, активность.

Взрослые самцы В6-1473С (индекс доминирования, 1.55 ± 0.5) и В6-1473G (индекс доминирования, 1.44 ± 0.5) не различались по способности к физическому доминированию ($F(1,16) < 1$), по привлекательности их мочи для самок ($F(3,76) =$

1.34, $p > 0.05$). Более того, вероятности передачи аллелей С и G потомкам не различались ($\chi^2 = 0.09$, $p > 0.05$).

В то же время у молодых (3 недели) самцов генотипа В6-1473G наблюдалась дистония задних конечностей: в тесте подвешивания за хвост частота ($F(1,41)=7.28$, $p = 0.01$) и длительность ($F(1,41) = 7.44$, $p = 0.009$) скрещивания задних лапок у молодых самцов В6-1473G были выше, чем у молодых самцов В6-1473С. У взрослых самцов В6-1473G дистония исчезала.

Однократное введение 2 мг/кг ЛПС молодым самцам приводит к гибели 42 % самцов генотипа В6-1473G в течение 72 ч после введения, тогда как выживают все самцы генотипа В6-1473С ($p = 0.05$). Введение ЛПС сопровождается значительным увеличением уровня 5-НТ ($p < 0.01$) и его основного метаболита, 5-Н1АА ($p < 0.05$), в среднем мозге мышей генотипа В6-1473С, но не генотипа В6-1473G через 48 ч после введения токсина.

Выводы: Впервые было показано, что мутация С1473G: 1) снижает стабильность молекулы ТПГ2; 2) вызывает дистонию задних конечностей у молодых мышей; 3) повышает чувствительность молодых мышей к ЛПС. Последние два результата позволяют ответить на ключевой вопрос, почему аллель G не обнаружена в природных популяциях мышей [6]. В природных популяциях ведется естественный отбор против молодых мышей, гомозиготных по аллели G, из-за высокой вероятности дистонии задних конечностей при стрессе, когда они не способны убежать от хищника, и из-за их высокой реакции на стимуляцию врожденного иммунитета, когда они чаще умирают от многочисленных инфекций. Активация 5-НТ, по-видимому, необходима для выживания животного при стимуляции иммунитета. Вызванная мутацией низкая активность ТПГ2, по-видимому, не способна обеспечивать необходимую для выживания высокую скорость синтеза 5-НТ, что приводит к гибели молодых мышей, гомозиготных по G аллели. Данное исследование впервые позволило проследить цепь событий от молекулярного механизма снижения активности фермента до последствий этого снижения на уровне популяции.

Финансирование: РНФ грант № 24-15-00078.

The C1473G mutation in the mouse *Tph2* gene: from molecular mechanism to biological consequences

Khotskin N.V., Komleva P.D., Arefieva A.B., Bazovkina D.V., Kulikov A.V.*

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* v_kulikov@bionet.nsc.ru

Key words: serotonin; tryptophan hydroxylase 2; mutation; brain; behaviour; mice

Motivation and Aim: The enzyme tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) hydroxylates L-tryptophan to L-5-hydroxy tryptophan – the first and rate-limited reaction of 5-HT synthesis in the mammalian brain [1]. The enzyme activity is the main factor that defines the 5-HT turnover rate in the mammalian brain. Some mutations in the human *Tph2* gene are associated with mental disorders [2, 3]. The C1473G polymorphism in mouse *Tph2* gene results in P447R substitution and two-fold decrease in TPH2 activity in the brain [4, 5]. There is a natural selection process against the G allele in wild mouse populations

[6]. This study aims to clarify the molecular mechanism and the biological consequences of this mutation.

Methods and Algorithms: Experiments were carried out on young (3 weeks old) and adult (8 weeks old) male mice of B6-1473C (wild type) and B6-1473G (mutant) genotypes bred by intercrossing of their B6-1473CG heterozygous parents. These mice differ only in the C and G alleles. The effects of the C and G alleles on the enzyme stability is evaluated by free energy (dG) of its thermal denaturation. TPH2 activity, 5-HT, 5-HIAA levels and TPH2 protein concentration in mouse brain are assayed by HPLC and western blot, respectively. The effects of the C and G alleles on hind legs dystonia, male physical dominance and male attractiveness for females are studied in the tail suspension, tube competition and olfactory tests. The C and G allele transmission probabilities are evaluated in a population experiment. The innate immune system is stimulated by a single administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS, 2 mg/kg, ip). **Results:** The C1473G mutation decreased TPH2 protein levels ($F(1,15) = 8.84, p < 0.01$) and activity ($F(1,15) = 8.24, p < 0.01$) in midbrain. For the first time, it was shown that the G allele reduces the dG value of thermal denaturation of the TPH2 molecule: from 1.865 ± 0.064 Kcal/mol (wild-type) to 1.306 ± 0.051 Kcal/mol (mutant) ($F(1,15) = 46.7, p < 0.001$). Less energy is needed to denature a mutant than a wild-type protein. At the same level of expression of the mutant and wild type *Tph2* genes [7], the reduced stability of the mutant protein decreases the lifetime, protein concentration and, as a consequence, activity of the enzyme. Adult males B6-1473C (dominance index, 1.55 ± 0.5) and B6-1473G (dominance index, 1.44 ± 0.5) did not differ in their ability to physically dominate ($F(1,16) < 1$), or in the attractiveness of their urine to females ($F(3,76) = 1.34, p > 0.05$). Moreover, the probabilities of transmitting the C and G alleles to offspring did not differ ($\chi^2 = 0.09, p > 0.05$).

At the same time, in young (3 weeks) males of the B6-1473G genotype, hind limb dystonia was observed: in the tail suspension test, frequency ($F(1,41) = 7.28, p = 0.01$) and duration ($F(1,41) = 7.44, p = 0.009$) of hind leg crossings were higher in young B6-1473G males than in young B6-1473C males. In adult B6-1473G males, this dystonia disappeared. A single injection of 2 mg/kg LPS to young males leads to the death of 42 % of B6-1473G males within 72 hours after administration, while all B6-1473C males survive ($p < 0.05$). Administration of LPS is accompanied by a significant increase in the level of 5-HT ($p < 0.01$) and its main metabolite, 5-HIAA ($p < 0.05$), in the midbrain of mice of the B6-1473C genotype, but not of the B6-1473G genotype, 48 hours after the toxin administration.

Conclusion: The mutation (1) reduces the stability of the TPH2 molecule, (2) causes hind limb dystonia and (3) increases the sensitivity of young mice to LPS. The last two facts answer the key question: why the G allele is not found in wild mouse populations [6]. In wild populations, natural selection is carried out against young mice homozygous for the G allele: (1) they are not able to escape from a predator due to the stress-induced hind limb dystonia, and (2) they die from numerous infections due to their high response to stimulation of the innate immune system. Activation of the brain 5-HT system appears to be essential for the survival of the animal after immune stimulation. The low activity of TPH2 caused by the mutation seems unable to provide the high rate of 5-HT synthesis necessary for survival, which leads to the death of young mice homozygous for the G allele. The study trace the chain of events from the molecular mechanism of the decrease in enzyme activity to the consequences of this decrease at the population level.

Funding: Russian Science Foundation: grant No. 24-15-00078.

Список литературы/References

1. Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hörtnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*. 2003;299:76. doi 10.1126/science.1078197
2. Popova N.K., Kulikov A.V. Targeting tryptophan hydroxylase 2 in affective disorder. *Expert Opin Ther Targets*. 2010;14:1259-1271. doi 10.1517/14728222.2010.524208
3. Ottenhof K.W., Sild M., Lévesque M.L., Ruhé H.G., Booij L. TPH2 polymorphisms across the spectrum of psychiatric morbidity: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;92:29-42. doi 10.1016/j.neubiorev.2018.05.018
4. Zhang X., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*. 2004;305(5681):217. doi 10.1126/science.1097540
5. Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Popova N.K. Association between Tph2 gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains. *Genes Brain Behav*. 2005;4(8):482-485. doi 10.1111/j.1601-183X.2005.00145.x
6. Osipova D.V., Kulikov A.V., Mekada K., Yoshiki A., Moshkin M.P., Kotenkova E.V., Popova N.K. Distribution of the C1473G polymorphism in tryptophan hydroxylase 2 gene in laboratory and wild mice. *Genes Brain Behav*. 2010;9(5):537-543. doi 10.1111/j.1601-183X.2010.00586.x
7. Bazhenova E.Y., Fursenko D.V., Kulikova E.A., Khotskin N.V., Sinyakova N.A., Kulikov A.V. Effect of photoperiodic alterations on depression-like behavior and the brain serotonin system in mice genetically different in tryptophan hydroxylase 2 activity. *Neurosci Lett*. 2019;699:91-96. doi 10.1016/j.neulet.2019.01.041