

Исследование роли PDGFR β в процессе развития коры головного мозга

Целис Суэскун Х.К.^{1*}, Хорева Н.С.¹, Тарабыкин В.С.²

¹ Научно-исследовательский институт нейронаук, лаборатория генетики развития мозга, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

² Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charité-Universitätsmedizin, Берлин, Германия

*juancamilo1297@gmail.com

Ключевые слова: Кора; киназа; нейрогенез; PDGFR β ; in utero электропорация

Мотивация и цель: В процессе развития коры головного мозга, фосфорилирование белков играет значительную роль в сигнальных путях, контролирующих многие клеточные процессы, включая регуляцию клеточного цикла, пролиферацию, дифференцировку, метаболизм и апоптоз. В предыдущих экспериментах *in vitro* с использованием библиотеки ингибиторов киназ, рецептор тромбоцитарного фактора роста бета (PDGFR β) был идентифицирован как потенциальный регулятор клеточной судьбы развивающихся нейронов [1]. В связи с этим, была проведена серия экспериментов с применением метода in utero электропорации (IUE) для изучения роли PDGFR β в развитии коры головного мозга и определении клеточной судьбы.

Методы и алгоритмы: Первая серия экспериментов для изучения потенциальной роли PDGFR β в нейрогенезе была направлена на исследование влияния его повышенной экспрессии (OverExpression, OE) на процессы миграции и определения клеточной судьбы нейронов. С этой целью, нами был создан генетический конструктор pCAG-PDGFR β -Flag-IRES-eGFP, несущий открытую рамку считывания гена PDGFR β для экспрессии в нейронах, а также открытую рамку считывания гена eGFP выполняющего функцию репортного сигнала. Валидацию полученного конструктора проводили *in vitro* на первичных смешанных нейрональных культурах после ex utero электропорации (EUE) на стадии e14.5 эмбрионального развития. На 3DIV проводилось иммуноцитохимическое окрашивание прямыми антителами antiFlag-Cy3. Наличие в культурах флуорофора Cy3 совместно с eGFP свидетельствовало о накоплении белка PDGFR β в нейронах.

Дальнейшие эксперименты проводились *in vivo* с применением метода IUE на стадии e14.5 эмбрионального развития до начала спецификации нейрональных клеток верхних слоев с последующим анализом на стадии e18.5 на линии мышей BALB/c. В качестве контроля использовались конструкторы с репортными флуоресцентными белками: pCAG-eGFP и pCAG-Venus. После сбора биологических образцов производились фиксация и подготовка тканей с последующим иммуногистохимическим окрашиванием с помощью специфических антител против молекулярных маркеров Satb2 и Ctip2. Анализ послыонного распределения eGFP⁺ клеток, а также оценка изменения доли Satb2⁺/eGFP⁺ и Ctip2⁺/eGFP⁺ клеток проводили методом конфокальной микроскопии.

Предыдущие эксперименты *in vitro* показывали, что ингибирование PDGFR β сунитинибом приводит к увеличению доли Satb2⁺ клеток [1]. Для установления потенциальной роли исследуемой киназы в процессах нейрогенеза, была проведена вторая серия экспериментов по ингибированию (Knockout, KO) PDGFR β методом РНК интерференции. С этой целью, нами был создан генетический конструктор на основе плазмидного вектора pSuper.neo.retro+GFP, кодирующий shPHK («short-hairpin») специфический к кодирующей последовательности зрелой мРНК исследуемого гена. Валидацию полученного конструктора проводили *in vitro* на культуре клеток Neuro2A. Для этого, трансфицировали клетки одновременно двумя генетическими конструкторами – pCAG-PDGFR β -Flag-IRES-eGFP и pSuper-shRNA-PDGFR β , после чего оценивали накопление Flag-меченного белка PDGFR β методом Вестерн блотта. Снижение уровня экспрессии PDGFR β свидетельствовало об эффективной работе созданного генетического конструктора.

Эксперименты *in vivo* с применением метода IUE для KO PDGFR β с помощью РНК интерференции были проведены аналогично экспериментам по ОЕ. Смесь ДНК для трансфекции нейронов включала в себя pSuper-shRNA-PDGFR β , pCAG-eGFP и pCAG-Venus. В качестве контроля использовался конструктор, кодирующий бессмысленный «scramble» shPHK, а также конструкторы с флуоресцентными белками: pCAG-eGFP и pCAG-Venus.

Для исследования влияния KO PDGFR β на развитие коры головного мозга, была проведена дополнительная серия экспериментов *in vivo* по инактивации гена PDGFR β с помощью технологии CRISPR-Cas9. С этой целью, были созданы два генетических конструктора, на основе плазмидного вектора pX330-Cas9-hU6, для делеции большой последовательности ДНК гена PDGFR β . Эффективность работы созданных нами генетических конструкторов была проверена с помощью культур клеток HEK293T. Для этого, трансфицировали клетки одновременно двумя генетическими конструкторами: pX330-gRNA-PDGFR β несущий последовательность таргетной ДНК против гена исследуемой киназы, а также pEGF-PDGFR β -P несущий кодирующую последовательность флуоресцентного белка eGFP, экспрессия которого нарушена наличием вставки соответствующей кодирующей последовательности гена PDGFR β . При эффективной работе комплексов Cas9-гРНК, происходит разрезание pEGF-PDGFR β -P с последующим восстановлением экспрессии eGFP. Результаты валидирующих экспериментов оценивали с помощью метода проточной цитометрии.

Эксперименты *in vivo* с применением метода IUE для KO PDGFR β с помощью CRISPR-Cas9 системы были проведены аналогично экспериментам по ОЕ. Смесь ДНК для трансфекции нейронов включала в себя два pX330-gRNA-PDGFR β , pCAG-eGFP и pCAG-Venus. В качестве контроля использовался конструктор pX330-Cas9-hU6 а также конструкторы с флуоресцентными белками: pCAG-eGFP и pCAG-Venus.

Результаты: Результаты экспериментов с повышенной экспрессией PDGFR β демонстрируют изменения в определении клеточной судьбы электропорированных нейронов. Наблюдалось значительное уменьшение доли Satb2⁺/eGFP⁺ нейронов параллельно с увеличением доли Stip2⁺/eGFP⁺ клеток. Анализ послойного распределения электропорированных нейронов показал, что большая доля PDGFR β ОЕ клеток находилась в нижних слоях коры, что может свидетельствовать о нарушении миграционных механизмов. Данные результаты

подтверждают гипотезу о том, что исследуемая киназа может играть важную роль в определении клеточной судьбы развивающихся нейронов.

Результаты экспериментов IUE по КО PDGFR β демонстрировали что PDGFR β участвует в отрицательной регуляции экспрессии Satb2 в развивающихся нейронах. При пониженном уровне экспрессии PDGFR β наблюдалось значительное увеличение Satb2+/eGFP+ нейронов. Это коррелирует с полученными ранее результатами in vitro, при которых ингибирование PDGFR β сунитинибом приводило к увеличению количества клеток Satb2+ [1]. При инактивации исследуемой киназы, однако, не были обнаружены значительные изменения в доле Ctip2+/eGFP+ клеток.

Распределение PDGFR β КО клеток характеризовалось значительным увеличением количества элетропорированных клеток в нижних слоях, а также в некоторых верхних слоях коры головного мозга. Данные результаты демонстрируют, что инактивация PDGFR β приводит к нарушению цитоархитектуры коры головного мозга, вероятно, посредством нарушения механизмов миграции.

Выводы: Полученные результаты указывают на важную роль киназы PDGFR β в механизмах определения клеточной судьбы и миграции нейронов во время развития коры головного мозга. Полученные результаты подтверждают роль PDGFR β в отрицательной регуляции экспрессии Satb2.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWR-2023-0029).

Study of the role of PDGFR β in the development of the cerebral cortex

Celis Suescun J.C.^{1*}, Khoreva N.S.¹, Tarabykin V.S.²

¹ Research Institute of Neuroscience, Laboratory of Genetics of Brain Development, Nizhny Novgorod State University named after. N.I. Lobachevsky, Nizhny Novgorod, Russia

² Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Germany

* juancamilo1297@gmail.com

Key words: cerebral cortex; kinase; neurogenesis; PDGFR β ; in utero electroporation

Motivation and Aim: During cortical development, protein phosphorylation plays a significant role in the signaling pathways controlling many cellular processes, including cell cycle regulation, proliferation, differentiation, metabolism, and apoptosis. In previous in vitro experiments using a library of kinase inhibitors, platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR β) was identified as a potential regulator of cell fate in developing neurons [1]. In this regard, a series of experiments using in utero electroporation (IUE) technique were carried out to study the role of PDGFR β in cortical development and cell fate determination.

Methods and Algorithms: The first series of experiments to study the potential role of PDGFR β in neurogenesis was aimed at studying the effect of its increased expression (OverExpression, OE) on the processes of migration and determination of cell fate of neurons. For this purpose, we created the genetic construct pCAG-PDGFR β -Flag-IRES-eGFP, which carries the open reading frame of the PDGFR β gene for expression in

neurons, as well as the open reading frame of the eGFP gene, which functions as a reporter signal. Validation of the resulting construct was carried out *in vitro* on primary mixed neuronal cultures after *ex utero* electroporation (EUE) at stage E14.5 of embryonic development. At 3DIV, immunocytochemical staining with direct antiFlag-Cy3 antibodies was performed. The presence of the Cy3 fluorophore together with eGFP in the cultures indicated the accumulation of the PDGFR β protein in neurons.

Further experiments were carried out *in vivo* using the IUE method at stage e14.5 of embryonic development before the start of the specification of neuronal cells of the upper layers, followed by analysis at stage e18.5 in the BALB/c mouse line. Constructs with reporter fluorescent proteins: pCAG-eGFP and pCAG-Venus were used as a control. After collecting biological samples, tissues were fixed and prepared, followed by immunohistochemical staining using specific antibodies against the molecular markers *Satb2* and *Ctip2*. Analysis of the layer-by-layer distribution of eGFP $^{+}$ cells, as well as assessment of changes in the proportion of *Satb2* $^{+}$ /eGFP $^{+}$ and *Ctip2* $^{+}$ /eGFP $^{+}$ cells was carried out using confocal microscopy.

Previous *in vitro* experiments have shown that inhibition of PDGFR β by sunitinib leads to an increase in the proportion of *Satb2* $^{+}$ cells [1]. To establish the potential role of the kinase under study in the processes of neurogenesis, a second series of experiments on inhibition (Knockout) of PDGFR β by RNA interference was carried out. For this purpose, we created a genetic construct based on the plasmid vector pSuper.neo.retro+GFP, encoding shRNA (“short-hairpin”) specific to the coding sequence of the mature mRNA of the gene under study. Validation of the resulting construct was carried out *in vitro* on Neuro2A cell culture. To do this, cells were simultaneously transfected with two genetic constructs – pCAG-PDGFR β -Flag-IRES-eGFP and pSuper-shRNA-PDGFR β , after which the accumulation of Flag-tagged PDGFR β protein was assessed by Western blotting. A decrease in the level of PDGFR β expression indicated the effective operation of the created genetic construct.

In vivo experiments using the IUE method for KO PDGFR β using RNA interference were performed similarly to the OE experiments. The DNA mixture for neuronal transfection included pSuper-shRNA-PDGFR β , pCAG-eGFP, and pCAG-Venus. As a control, we used a construct encoding a nonsense “scramble” shRNA, as well as constructs with fluorescent proteins: pCAG-eGFP and pCAG-Venus.

To study the effect of KO PDGFR β on the development of the cerebral cortex, an additional series of *in vivo* experiments was conducted to inactivate the PDGFR β gene using CRISPR-Cas9 technology. For this purpose, two genetic constructs were created, based on the plasmid vector pX330-Cas9-hU6, to delete a large DNA sequence of the PDGFR β gene. The efficiency of the genetic constructs we created was tested using HEK293T cell cultures. To do this, cells were simultaneously transfected with two genetic constructs: pX330-gRNA-PDGFR β , which carries a target DNA sequence against the gene of the kinase under study, and pEGF-PDGFR β -P, which carries the coding sequence of the fluorescent protein eGFP, the expression of which is disrupted by the presence of an insertion of the corresponding coding sequence of the PDGFR β gene. When Cas9-gRNA complexes operate efficiently, pEGF-PDGFR β -P is cut, followed by restoration of eGFP expression. The results of the validation experiments were assessed using flow cytometry.

In vivo experiments using the IUE method for KO PDGFR β using the CRISPR-Cas9 system were performed similarly to the OE experiments. The DNA mixture for neuronal transfection included two pX330-gRNA-PDGFR β , pCAG-eGFP and pCAG-Venus. The

pX330-Cas9-hU6 construct as well as constructs with fluorescent proteins: pCAG-eGFP and pCAG-Venus were used as a control.

Results: Results from PDGFR β overexpression experiments demonstrate changes in cell fate determination of electroporated neurons. There was a significant decrease in the proportion of Satb2+/eGFP+ neurons in parallel with an increase in the proportion of Ctip2+/eGFP+ cells. Analysis of the layer-by-layer distribution of electroporated neurons showed that a large proportion of PDGFR β OE cells were located in the lower layers of the cortex, which may indicate a disruption of migratory mechanisms. These results support the hypothesis that the kinase under study may play an important role in determining the cell fate of developing neurons.

Results from IUE PDGFR β KO experiments demonstrated that PDGFR β is involved in the negative regulation of Satb2 expression in developing neurons. When PDGFR β expression was reduced, a significant increase in Satb2+/eGFP+ neurons was observed. This correlates with previous in vitro results in which inhibition of PDGFR β sunitinib led to an increase in the number of Satb2+ cells [1]. Upon inactivation of the kinase under study, however, no significant changes were detected in the proportion of Ctip2+/eGFP+ cells.

The distribution of PDGFR β KO cells was characterized by a significant increase in the number of electroporated cells in the lower layers, as well as in some upper layers of the cerebral cortex. These results demonstrate that inactivation of PDGFR β leads to disruption of the cytoarchitecture of the cerebral cortex, likely through disruption of migration mechanisms.

Conclusion: Our results indicate an important role for PDGFR β kinase in cell fate determination and neuronal migration during cortical development. Our results support the role of PDGFR β in the negative regulation of Satb2 expression.

Funding: The study was carried out with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FSWR-2023-0029).

Список литературы/References

- 1 Ambrozkiwicz M.C., Bessa P., Salazar-Lázaro A., Salina V., Tarabykin V. Satb2^{Cre/+} mouse as a tool to investigate cell fate determination in the developing neocortex. *J Neurosci Methods*. 2017;291:113-121