

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623236>

# Нарушение экспрессии протеинкиназ в нейронах коры мозга с делецией транскрипционного фактора *Satb1* вызывает гипервозбуждение нейрональной сети и определяет чувствительность к гипоксии

Х.К. Целис Суэскун<sup>1\*</sup>, М.С. Гавриш<sup>1</sup>, Е.А. Туровский<sup>1,2</sup>, Е.Г. Варламова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт нейронаук, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Российская Федерация;

<sup>2</sup> Институт биофизики клетки Российской академии наук «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

Нейрональные факторы транскрипции регулируют экспрессию многих рецепторов и внутриклеточных сигнальных молекул, участвующих в возбуждающей нейротрансмиссии. Большое внимание уделяется транскрипционному фактору *Satb1* с точки зрения его вклада в регуляцию роста и развития различных типов нейронов головного мозга как в эмбриональном, так и в постнатальном периодах. Изменение уровня экспрессии и активности таких белков, как рецепторы глутамата, протеинкиназы и регуляторы жизнеспособности клеток, при делеции фактора транскрипции *Satb1* можно считать одним из ключевых фундаментальных механизмов, определяющих запуск нейронной сети в состояние гипервозбуждения. Несмотря на достаточное количество работ, посвящённых роли *Satb1* в нейрогенезе, отсутствуют исследования, демонстрирующие изменения внутриклеточной передачи сигналов кальция и уровня экспрессии белков при его делеции в нейронах.

В исследовании использовали мышей с полной (*Satb1*-null) и частичной (*Satb1*-deficient) делецией транскрипционного фактора *Satb1*. Нейроглиальные культуры коры мозга получали из новорожденных мышей и культивировали в течение 10 суток *in vitro*. Далее клетки загружали кальций-чувствительным флуоресцентным зондом Fura-2 и с помощью флуоресцентного микроскопа регистрировали динамику цитозольного  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ). В клеточных культурах регистрировали спонтанную  $Ca^{2+}$ -активность, а также моделировали эпилептиформную активность с помощью общепринятых методов — исключение магния из среды (безмагниева модель) и добавление 10 мкМ бикикулина (бикикулиновая модель). Группой сравнения были клетки коры мозга, полученные из контрольных мышей. Для анализа паттернов экспрессии генов, кодирующих киназы, выделяли тотальную РНК из клеточных культур и проводили ПЦР-анализ в реальном времени.

Оказалось, что полная и неполная делеция транскрипционного фактора *Satb1* по-разному влияли на экспрессию протеинкиназ и генов-регуляторов жизнеспособности клеток. В нейронах с дефицитом *Satb1* происходило повышение экспрессии генов, кодирующих фосфоинозитид-3-киназу, протеинкиназу C, протеинкиназу B, митоген-активируемую протеинкиназу, а также гены *Bcl-2*, *Creb*, *Nf-kB*. Тогда как полная делеция *Satb1* в корковых нейронах вызывала повышение экспрессии только фосфоинозитид-3-киназы, экспрессия всех остальных исследованных протеинкиназ снижалась на фоне повышения провоспалительных факторов *Nf-kB*, *Caspase-3* и *Tnfa*.

На уровне нейротрансмиссии, полная делеция *Satb1* приводила к повышенной спонтанной  $Ca^{2+}$ -активности нейронов, а также большим частотам и амплитудам  $Ca^{2+}$ -осцилляций при моделировании эпилептиформной активности. Поскольку симптом гипервозбуждения сети показан в нейрональных сетях при гипоксии и реакции нейронов на гипоксию зависят от активности исследованных нами киназ, были проведены эксперименты по моделированию гипоксии в нейронах, полученных из мышей с делецией транскрипционного фактора *Satb1*. Одновременно с регистрацией  $[Ca^{2+}]_i$  производилось измерение парциального давления кислорода ( $pO_2$ ) с помощью соматического оксиметра. Пороговым значением уменьшения  $pO_2$  считали начало генерации  $Ca^{2+}$ -ответов в нейронах. Появление первых  $Ca^{2+}$ -ответов на гипоксию в WT-нейронах происходило в 8–10% клеток, когда парциальное давление кислорода снижалось до 40 мм рт.ст, при этом остальные клетки в поле зрения микроскопа не реагировали. *Satb1*-null нейроны начинали реагировать на гипоксию при 60 мм рт.ст, причем  $Ca^{2+}$ -ответы имели вид высокоамплитудных  $Ca^{2+}$ -осцилляций, регистрируемых в более чем 15% клеток. При этом *Satb1*-null нейроны реагировали появлением высокочастотных  $Ca^{2+}$ -осцилляций с выходом базового уровня  $[Ca^{2+}]_i$  на новый стационарный уровень уже при сни-

Рукопись получена: 23.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

жении р02 до 75–80 мм рт.ст, а с учётом высокого процента (более 20%) отвечающих нейронов, можно говорить о повышенной чувствительности Satb1-null нейронов к гипоксии.

**Ключевые слова:** Satb1; протеинкиназы; Ca<sup>2+</sup>; гипоксия.

**Как цитировать:**

Целис Суэскун Х.К., Гавриш М.С., Туровский Е.А., Варламова Е.Г. Нарушение экспрессии протеинкиназ в нейронах коры мозга с делецией транскрипционного фактора Satb1 вызывает гиперактивацию нейрональной сети и определяет чувствительность к гипоксии // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 456–459. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623236>

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Источник финансирования.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-24-00712.

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\* Х.К. Целис Суэскун; адрес: Российская Федерация, 603022, Нижний Новгород, пр-т Гагарина, д. 23; e-mail: [juancamilo1297@gmail.com](mailto:juancamilo1297@gmail.com)

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623236>

# Disruption of protein kinase expression in cortical neurons due to the deletion of transcription factor *Satb1* leads to neuronal network hyperexcitation and determines hypoxia sensitivity

J.C. Celis Suescun<sup>1</sup>\*, M.S. Gavrish<sup>1</sup>, E.A. Turovsky<sup>1,2</sup>, E.G. Varlamova<sup>2</sup><sup>1</sup> Institute of Neurosciences, National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;<sup>2</sup> Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Russian Federation

## ABSTRACT

Neuronal transcription factors regulate the expression of receptors and intracellular signaling molecules involved in excitatory neurotransmission. The transcription factor *Satb1* received significant attention for its role in regulating the growth and development of various types of brain neurons in both embryonic and postnatal periods. The depletion of the transcription factor *Satb1* can be considered a fundamental mechanism for triggering hyperexcitation in the neural network, given the alterations in the activity and expression levels of proteins, such as glutamate receptors, protein kinases, and cell viability regulators. Although numerous studies were conducted on the role of *Satb1* in neurogenesis, none showed any changes in intracellular calcium signaling or protein expression levels following *Satb1* deletion in neurons.

Mice with complete (*Satb1*-null) and partial (*Satb1*-deficient) deletion of the *Satb1* transcription factor were used in this study. Neuroglial cultures were obtained from the cerebral cortex of neonatal mice and were cultivated in-vitro for ten days. The cells were then loaded with a calcium-sensitive Fura-2 fluorescent probe and the dynamics of cytosolic  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) were recorded using a fluorescent microscope. Spontaneous calcium activity was observed in the cell cultures, and epileptiform activity was modeled using conventional methods, i.e. the medium was depleted of magnesium (magnesium-free model) and 10  $\mu$ M bicuculline was added (bicuculline model). The control group comprised cerebral cortex cells obtained from normal mice. To analyze expression patterns of genes encoding kinases, total RNA was extracted from cell cultures, and real-time PCR analysis was conducted.

Complete and incomplete deletion of the transcription factor *Satb1* had distinct effects on protein kinase expression and genes that regulate cell viability. *Satb1*-deficient neurons exhibited increased expression of phosphoinositide-3-kinase, protein kinase C, protein kinase B, mitogen-activated protein kinase, as well as *Bcl-2*, *Creb*, and *Nf-kB* genes. The deletion of *Satb1* in cortical neurons led to increased expression of only phosphoinositide-3-kinase, while the expression of all other studied protein kinases decreased in the presence of pro-inflammatory factors *Nf-kB*, *Caspase-3*, and *Tnfa*.

At the neurotransmission level, the complete deletion of *Satb1* led to heightened spontaneous  $Ca^{2+}$  neuron activity alongside amplified  $Ca^{2+}$  oscillation frequencies and amplitudes when modeling epileptiform activity. Since hyperexcitation of the network is a symptom observed in neuronal networks during hypoxia, and the response of neurons to hypoxia is dependent on the activity of the kinases being studied, experiments were conducted to simulate hypoxia using neurons obtained from mice who lack the *Satb1* transcription factor. Concurrently with recording  $[Ca^{2+}]_i$ , we measured  $pO_2$  using a somatic oximeter. The drop in  $pO_2$  signified the start of  $Ca^{2+}$  responses in neurons. Initially appearing in 8–10% of cells, hypoxia-triggered the first  $Ca^{2+}$  responses in WT neurons when  $pO_2$  dropped to 40 mm Hg. The remaining cells within the microscope field of view did not react. *Satb1*-null neurons responded to hypoxia at 60 mm Hg, exhibiting high-amplitude  $Ca^{2+}$  oscillations in over 15% of cells. Furthermore, *Satb1*-deficient neurons exhibited high-frequency  $Ca^{2+}$  oscillations and an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  baseline to a new stationary level when  $pO_2$  decreased to 75–80 mm Hg. With over 20% of neurons responding, this suggests that *Satb1*-null neurons are more sensitive to hypoxia.

**Keywords:** *Satb1*; protein kinases;  $Ca^{2+}$ ; hypoxia.

## To cite this article:

Celis Suescun JC, Gavrish MS, Turovsky EA, Varlamova EG. Disruption of protein kinase expression in cortical neurons due to the deletion of transcription factor *Satb1* leads to neuronal network hyperexcitation and determines hypoxia sensitivity. *Genes & Cells*. 2023;18(4):456–459. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623236>

Received: 23.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding sources.** This work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-24-00712.

**Authors' contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, and final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

## AUTHORS' CONTACT INFO

\* J.C. Celis Suescun; address: 23 Gagarin avenue, 603022 Nizhny Novgorod, Russian Federation; e-mail: juancamilo1297@gmail.com