

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623291>

# Гены семейства NeuroD контролируют выживание нейронов в развивающемся гиппокампе

А.Е. Филатьева<sup>1\*</sup>, Е.В. Кондакова<sup>1,2</sup>, М.С. Гавриш<sup>1</sup>, О. Бормут<sup>1</sup>, И. Бормут<sup>3</sup>, В.С. Тарабыкин<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Российская Федерация;

<sup>3</sup> Институт клеточной биологии и нейробиологии клиники Шарите, Берлин, Германия

## АННОТАЦИЯ

NeuroD 1/2/6 транскрипционные факторы относятся к семейству bHLH-содержащих белков, которые являются активаторами транскрипции и контролируют различные аспекты дифференцировки нейронов [1]. В развивающихся коре головного мозга и гиппокампе все 3 фактора имеют перекрывающиеся паттерны экспрессии, что предполагает частичное дублирование их функций в развитии [2]. Они также вносят свой вклад в формирование основных пучков аксонов, комиссур в головном мозге, в частности, самой большой из них — мозолистого тела. Его агенезия, полная или частичная, является одной из наиболее распространённых сопутствующих патологий при врождённых пороках развития человека и часто сочетается с отсутствием или недоразвитием гиппокампа [3].

Для того, чтобы изучить роль, которую играют эти факторы в развитии гиппокампальной формации, нами были созданы ряд аллельных серий генно-модифицированных мышей, несущих инактивирующие мутации во всех 3 генах. Оказалось, что инактивация NeuroD1 приводит к отсутствию зубчатой борозды. В то же время инактивация всех 3 NeuroD генов приводит к тому, что на поздних стадиях развития отсутствуют все 3 региона гиппокампальной формации (CA1, CA2, CA3), а также зубчатая борозда.

С целью исследования клеточных механизмов нарушения развития гиппокампальной формации нами была предложена гипотеза о том, что NeuroD транскрипционные факторы могут контролировать либо пролиферацию и дифференцировку нейронов, либо клеточную смерть. Для того чтобы проверить, какая из этих гипотез является верной, нами была проведена серия инъекций BrdU на E15 стадии развития с тем, чтобы проанализировать различные параметры пролиферации: пропорции клеток на разных этапах дифференцировки, выход из клеточного цикла, длина клеточного цикла, количество клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. Нами не было обнаружено никаких различий в параметрах пролиферации и клеточного цикла у эмбрионов, гомозиготных по всем 3 мутантным аллелям.

Для того чтобы проверить альтернативную гипотезу, нами был проведен анализ клеточной смерти — апоптоза. Для анализа клеточной смерти было выбрано 2 метода: анализ активности каспазы-3 — одного из белков, активирующих апоптоз, — а также анализ количества двухцепочечных разрывов (TUNEL-тест). Было обнаружено, что развивающийся гиппокамп тройных мутантов содержит большое количество позитивных клеток как по каспазе-3, так и по двухцепочечным разрывам ДНК. Оказалось, что количество апоптотических клеток в развивающейся гиппокампальной формации зависит от дозировки гена аллелей NeuroD 1/2/6.

Для определения стадии нейрональной дифференцировки, на которой нейроны подвергаются массивной клеточной смерти, нами была предпринята модификация BrdU-chase анализа. В данном анализе мы инъецировали BrdU на стадии E12, и эмбрионы были отобраны с разным временным интервалом (12, 18 и 24 ч). Такой эксперимент позволяет оценить временной период после выхода из митотического цикла, когда клетка запускает механизм апоптоза.

**Ключевые слова:** NeuroD транскрипционные факторы; нокаут; гиппокампальная формация; BrdU; клеточная смерть.

## Как цитировать:

Филатьева А.Е., Кондакова Е.В., Гавриш М.С., Бормут О., Бормут И., Тарабыкин В.С. Гены семейства NeuroD контролируют выживание нейронов в развивающемся гиппокампе // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 465–468. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623291>

Рукопись получена: 16.06.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Источник финансирования.** Работа выполнена при поддержке федеральной программы академического лидерства «Приоритет 2030» (тема Н-427-99\_2021–2023).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bertrand N., Castro D.S., Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types // *Nature Reviews Neuroscience*. 2002. Vol. 3, N 7. P. 517–530. doi: 10.1038/nrn874
2. Tutukova S., Tarabykin V., Hernandez-Miranda L.R. The Role of Neurod Genes in Brain Development, Function, and Disease // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2021. Vol. 14. P. 662774. doi: 10.3389/fnmol.2021.662774
3. Pânzaru M.-C., Popa S., Lupu A., et al. Genetic heterogeneity in corpus callosum agenesis // *Frontiers in Genetics*. 2022. Vol. 13. P. 958570. doi: 10.3389/fgene.2022.958570

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\* А.Е. Филатьева; адрес: Российская Федерация, 603022, Нижний Новгород, пр-т Гагарина, д. 23; e-mail: filatjevaanastasia@yandex.ru

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623291>

# NeuroD family genes regulate the survival of neurons in the developing hippocampus

A.E. Filat'eva<sup>1\*</sup>, E.V. Kondakova<sup>1,2</sup>, M.S. Gavrish<sup>1</sup>, O. Bormuth<sup>1</sup>, I. Bormuth<sup>3</sup>, V.S. Tarabykin<sup>3</sup><sup>1</sup> Institute of Neurosciences, National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;<sup>2</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation;<sup>3</sup> Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Germany

## ABSTRACT

NeuroD 1/2/6 transcription factors belong to the bHLH-containing protein family. They activate transcription and regulate various aspects of neuronal differentiation [1]. In the developing cortex and hippocampus, these three factors express overlapping patterns, indicating a partial redundancy of functions during development [2]. They aid in the creation of the brain's main commissures, particularly the largest one, the corpus callosum. Agenesis, whether total or partial, is a frequently occurring comorbidity in congenital malformations amongst human beings. It is usually associated with the underdevelopment or absence of the hippocampus [3].

To examine the contribution of these factors in hippocampal formation development, we created allelic genetically modified mouse strains with inactivating mutations in all three genes. The results indicated that the inactivation of NeuroD1 leads to the dentate gyrus' absence. In contrast, the absence of all three NeuroD genes results in the dentate gyrus' and other hippocampal formation regions' absence (CA1, CA2, CA3) at subsequent developmental stages.

To investigate the cellular mechanisms involved in the disruption of hippocampal formation development, it was hypothesized that NeuroD transcription factors may control either neuronal proliferation and differentiation or cell death. To test which of these hypotheses is correct, a series of BrdU injections were performed at the E15 stage of development. We examined several parameters related to proliferation, including the proportion of cells at various differentiation stages, cell cycle exit, cell cycle length, and the number of cells in the S phase of the cell cycle. The results showed no discernible differences in proliferation and cell cycle parameters between triple homozygous embryos and control littermates.

An analysis of programmed cell death, known as apoptosis, was conducted to test the alternative hypothesis. We used two methods to analyze cell death: firstly, we analyzed the activity of caspase-3 which is one of the proteins that activate apoptosis and, secondly, we analyzed the number of double-strand breaks using the TUNEL test. The findings revealed a significant increase in the number of cells positive for both caspase-3 and double-stranded DNA breaks in the developing hippocampus of triple mutants. The amount of apoptotic cells in the developing hippocampal formation relies on the gene dosage of NeuroD 1/2/6 alleles, as evident through their increment as the NeuroD gene dosage decreases. The double KO portrays an intermediate level of cell death, while the triple exhibits the highest level.

To determine the stage in which massive cell death occurs during neuronal differentiation, we modified the BrdU-chase assay. BrdU was injected during the E12 stage, and embryos were surveyed at various intervals (12, 18, and 24 hours) for analysis. This experiment permits estimation of the time period following exit from the mitotic cycle, during which the cell initiates the mechanism of apoptosis.

**Keywords:** NeuroD transcription factors; knockout; hippocampal formation; BrdU; cell death.

## To cite this article:

Filat'eva AE, Kondakova EV, Gavrish MS, Bormuth O, Bormuth I, Tarabykin VS. NeuroD family genes regulate the survival of neurons in the developing hippocampus. *Genes & Cells*. 2023;18(4):465–468. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623291>

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding sources.** The study was supported by the Federal Program of Academic Leadership "Priority 2030" (subject H-427-99\_2021-2023).

**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.

Received: 16.06.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

## REFERENCES

1. Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002;3(7):517–530. doi: 10.1038/nrn874
2. Tutukova S, Tarabykin V, Hernandez-Miranda LR. The Role of Neurod Genes in Brain Development, Function, and Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2021;14:662774. doi: 10.3389/fnmol.2021.662774
3. Pânzaru MC, Popa S, Lupu A, et al. Genetic heterogeneity in corpus callosum agenesis. *Frontiers in Genetics*. 2022;13:958570. doi: 10.3389/fgene.2022.958570

## AUTHORS' CONTACT INFO

\* A.E. Filat'eva; address: 23 Gagarin avenue, 603022 Nizhny Novgorod, Russian Federation; e-mail: filatjevaanastasia@yandex.ru