

ЕКСПРЕСИЯ НА ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР SOX2 В ПОПУЛАЦИИ ОТ КОРТИКАЛНИ ПРОГЕНИТОРИ В ЧОВЕШКИ ФЕТАЛЕН ТЕЛЕНЦЕФАЛОН

Меглена Ангелова¹, Ваня Горанова¹, Десислава Маринова¹, Стоян Павлов¹,
Веселина Михалева¹, Тецумори Ямашима², Антон Тончев¹

¹Катедра по анатомия, хистология и ембриология,
Медицински университет – Варна

²Катедра по възстановителна неврохирургия, Медицински Факултет,
Университет на Каназава, Япония

EXPRESSION OF TRANSCRIPTIONAL FACTOR SOX2 IN POPULATIONS OF CORTICAL PROGENITORS IN HUMAN FETAL TELENCEPHALON

Meglana Angelova¹, Vanya Goranova¹, Dessislava Marinova¹, Stoyan Pavlov¹,
Vesselina Mihaleva¹, Tetsumori Yamashima², Anton Tonchev¹

¹Dept. of Anatomy, Histology and Embryology, Medical University, Varna,

²Dept. of Restorative Neurosurgery, University Graduate School of Medical Science,
Kanazawa, Japan

РЕЗЮМЕ

Кората на крайния мозък при бозайниците се образува главно през ембрионалния период от стволови и производните им прогениторни клетки в палиума на развиващия се теленцефалон. В процесите на диференцирането на крайномозъчните неврони участват редица гени в сложни взаимодействия. Транскрипционният фактор Sox2 играе ключова роля за самообновяване и поддържане мултипотентността на ембрионалните неврални стволови/прогениторни клетки. Данните за експресията и функцията на Sox2 в човешкия фетален мозък са твърде недостатъчни и противоречиви.

В настоящото проучване бяха изследвани тъканни проби от спонтанно абортирани човешки фетуси на възраст от 12 до 28 гестационна седмица (г. с.) чрез стандартна хистологична и имунохистохимична техника за парафинови срези. Проследена беше експресията на Sox2 в зоните на клетъчна пролиферация и миграция в окципиталния дял на човешки фетален теленцефалон главно през 17 г. с. Във вентрикулната и външната субвентрикулна зони отчетохме сходно количество приблизително 45% Sox2+ клетки, докато в интермедиерната зона, кортикалната

ABSTRACT

Cerebral cortex of mammals is mainly generated during the embryonic period by stem cells and their derivative progenitors in the palium of the developing telencephalon. Various genes in complex interactions are involved in the processes of differentiation of the cerebral neurons. Transcriptional factor Sox2 plays a key role for self renewing and sustaining multipotency of embryonic neural stem/progenitor cells. Data about the expression and function of Sox2 in human fetal brain are insufficient and controversial.

In the present study tissue samples of spontaneously aborted human fetuses aged between 12th to 28th gestational weeks (g. w.) were examined by a standard histological and immunohistochemical technique for paraffin sections. Sox2 expression was followed in the zones of cellular proliferation and migration in the occipital lobe of human fetal telencephalon mainly during 17th g. w. Within ventricular and outer subventricular zones we detected similar amount approximately 45% Sox2+ cells, whereas in the intermediate zone, cortical plate and marginal zone expression of Sox2 was not found.

The data obtained on the location and expression dynamics of Sox2 contribute to a more complete understanding of neural stem/progenitor cell biology

плочка и маргиналната зона не установихме експресия на Sox2.

Получените данни за локализацията и динамиката в експресията на Sox2 допринасят за по-пълното разбиране на биологията на невралните стволови/прогениторни клетки по време на ембрионалната невrogenеза в крайния мозък при човека.

Ключови думи: Sox2, кортикални прогенитори, фетален теленцефалон, човек

during embryonic neurogenesis in the human cerebral cortex.

Keywords: Sox2, cortical progenitors, fetal telencephalon, human

УВОД

Неокортекстът в кората на крайния мозък при бозайниците е еволюционно най-новата част, която заема около 90% от нейната площ. Има най-сложната организация в централната нервна система (ЦНС) и показва уникален строеж за всеки вид (5). Крайномозъчната кора при човека се образува предимно през пренаталния период от стволови/прогениторни клетки, локализиращи в палиума на развиващия се теленцефалон (1, 8). Броят и типът на деленията на тези клетки определят крайния брой на невроните, а допълнителни механизми на диференциация дефинират тяхната ламинарна и ареална идентичност. Еволюционните предимства за човешкия мозък са възникнали поради нови молекулярни и клетъчни взаимодействия, направлявани от експресията на специфични гени (10). Много проучвания са съсредоточени върху изясняване ролята на редица гени и кодираните от тях молекули като ендогенни регулатори при формирането, миграцията и диференциацията на крайномозъчните неврони. Транскрипционният фактор Sox2 (SRY, sex determining region Y-box2) има ключова роля за самообновяването и поддържането на мултипотентността на ембрионалните неврални стволови клетки (3). Sox2 се експресира от пролифериращите стволови клетки в невралната тръба, която е предшественик на ЦНС. Тази експресия се редуцира в процеса на тяхната диференциация като прогениторни и зрели постмитотични клетки. Натрупаните данни за ролята на Sox2 в ембрионалната невrogenеза е резултат на изследвания предимно при модели на мишки. Твърде малко се знае за експресията и функцията на Sox2 в човешките фетални мозъчни стволови/прогениторни клетки.

Целта на настоящото проучване беше да проследим точното местоположение и броя на прогениторните клетки, които експресират транскрипционния фактор Sox2 в три основни герминативни зони (вентрикулна, вътрешна и външна субвентрикулна) на човешки дорзален палиум в окципиталния дял през ембрионалния период.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

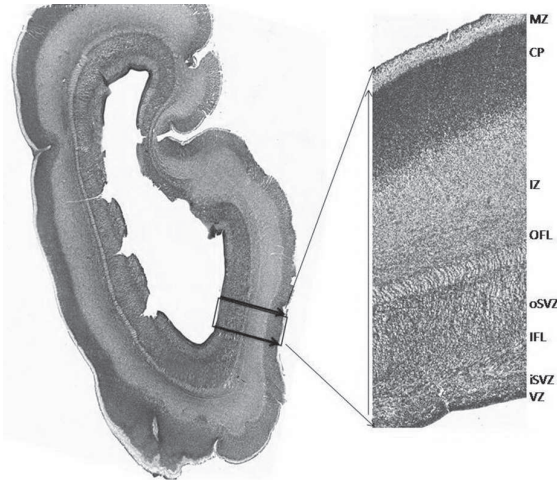
Изследвани бяха тъканни проби от човешки фетални теленцефалони в различни етапи на пренаталното развитие, получени в СБАГАЛ „Проф. д-р Димитър Стаматов” – гр. Варна в резултат на спонтанно абортирани човешки фетуси на възраст от 12 г. с. до 28 г. с. Всяка проба беше използвана след писмено съгласие от майката според протокол № 19/05.04.2012 г., одобрен от Комисията по етика на научните изследвания при МУ „Проф. Д-р П. Стоянов” – Варна.

Хистологичната обработка включваше фиксация в 4% параформалдехид за две седмици, последвана от престой в (%) разтвор на сукроза и О.С.Т. среда. Парафинови срези с дебелина 20 µm бяха изготвени на стандартен ротационен микротом. Изследвахме експресията на Sox2 само в проби от краен мозък на фетуси, при които не се установи видима невропатология. След депарафиниране някои от срезите бяха оцветени с кризил виолет за обща тъканна ориентация, а други – посредством стандартна имунофлуоресцентна методика. Използвахме поликлонално анти-Sox2 (Y-17) антитяло от коза (sc-17320, Santa Cruz Biotechnology) с разреждане 1:50 и съответстващо второ антитяло, маркирано с Alexa Fluor® 488 (A-11055, Molecular Probes – Invitrogen) при разреждане 1:100, като ядрата на клетките бяха контрастирани в синьо с 4',6'-диамино-2-фенилиндол (DAPI). Анализът на препаратите беше осъщест-

вен с микроскоп Axio Imager.72 Zeiss (Carl Zeiss Microscopy). С помощта на камера AxioCam MRc и система AxioVisioner (Carl Zeiss Microscopy) Sox2-позитивните клетки бяха преброени в различни участъци по зони. Броят на маркираните клетки бе определен като процент от общия брой клетки (DAPI+ ядра) в дигиталната рамка (100 x 100 µm) в отделните зони на окципиталния дял в развиващия се неокортекс.

РЕЗУЛТАТИ

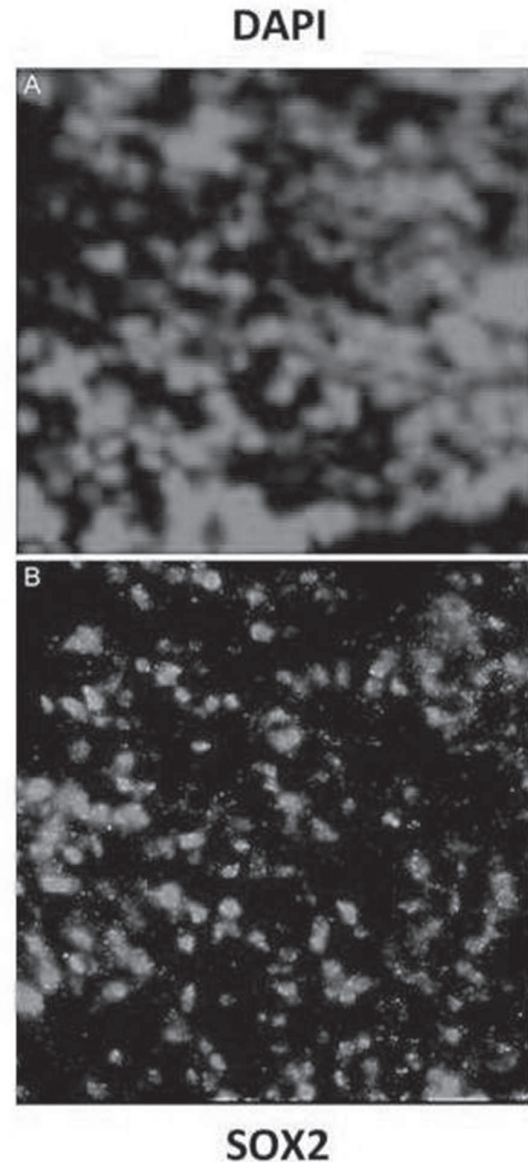
В окципиталния дял на човешки фетален теленцефалон през 17 г. с. бяха идентифицирани основните зони на клетъчна пролиферация и миграция (Фиг. 1), известни от литературата (2). Вентрикулната зона заема тясна ивица около кухината на предното стомахче на нервната тръба, а субвентрикулната зона е разположена по-навън. Тя е изградена от вътрешна и външна част, между които се наблюдава вътрешен фиброзен слой. Цялата зона е отграничена от външен фиброзен слой, след който следват междинна зона, кортикална плочка и маргинална зона. Върху последната лежи меката мозъчна обвивка.



Фиг. 1. Зони на развитие в окципиталния дял на човешки краен мозък през 17 г. с. VZ- вентрикулна зона; iSVZ - вътрешна субвентрикулна зона; IFL - вътрешен фиброзен слой; oSVZ - външна субвентрикулна зона; OFL - външен фиброзен слой; IZ - междинна зона; CP - кортикална плочка; MZ - маргинална зона. Оцветяване с кризил-виолет

Експресията на Sox2 беше проследена в отделните зони на окципиталния дял на човешки краен мозък в 17 г. с. и броят на позитивните клетки беше сравнен с броя на DAPI-визуализирани клетъчни ядра. Само в две от описаните зони наблюдавахме оцветяване за Sox2. Най-силна експресия се установява във външната субвентрикулна зона (Фиг. 2).

преся се установява във външната субвентрикулна зона (Фиг. 2).

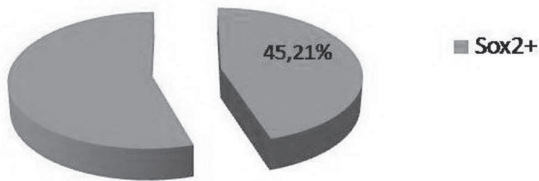


Фиг. 2. Оцветени с DAPI клетъчни ядра (A) и експресия на транскрипционния фактор Sox2, маркиран с Alexa Fluor 488 във външната субвентрикулна зона (B) на окципиталния дял на човешки краен мозък през 17 г. с.

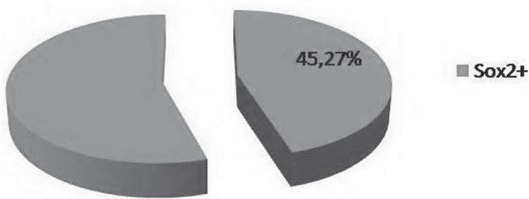
Във вентрикулната зона (VZ) Sox2+ клетки са 45.21% спрямо DAPI-визуализираните клетъчни ядра (Фиг. 3)

Във външна субвентрикулна зона отчетохме приблизително същия дял Sox2+ клетки – 45.27% (Фиг. 4).

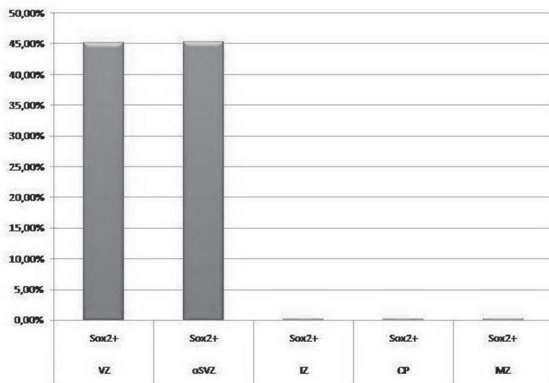
В интермедиерната зона, кортикалната плочка и маргиналната зона не се установява експресия на Sox2 (Фиг. 5).



Фиг. 3. Процентно съотношение на Sox2+ клетки спрямо DAPI-визуализираните клетъчни ядра на вентрикулната зона в окципиталния дял на човешки краен мозък през 17 г. с.



Фиг. 4. Процентно съотношение на Sox2+ клетки спрямо DAPI-визуализираните клетъчни ядра на външната субвентрикулна зона в окципиталния дял на човешки краен мозък през 17 г. с.



Фиг. 5. Сравнение на процентното съдържание на Sox2+ клетки спрямо DAPI-визуализираните клетъчни ядра в отделните зони на окципиталния дял на човешки краен мозък през 17 г. с. VZ – вентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона; IZ – интермедиерна зона; CP – кортикална плочка; MZ – маргинална зона

ДИСКУСИЯ

Транскрипционният фактор Sox2 е един от важните фактори, отговорни за пластичността на невралните стволони и прогениторни клетки. Вентрикулната и субвентрикулната зони са основното място на пролиферация, самообновяване и диференциране на невралните прогенитори (4,7). От там новообразуваните постмитотични клетки мигрират през интермедиерната зона към кортикалната плочка. Получените от нас резултати подкрепят известните в литературата данни за експресията на Sox2 от дялящи се и все още

недиференцирани клетки във вентрикулната и субвентрикулната зони по време на кортикогенезата. След приключване на митотичните деления дъщерните клетки в интермедиерната зона, кортикалната плочка и маргиналната зона не експресират този транскрипционен фактор. Освен това нашите резултати показват, че близо половината от кортикалните прогенитори в гериформативните зони не експресират Sox2. Функцията на Sox2 е да активира други транскрипционни фактори (9). Доказана е връзката му с експресията на Oct3/4, Nanog и др. Сравнително нови проучвания потвърждават ролята на Sox2 и като транскрипционен репресор (6) с директно му влияние върху Grg (groucho-related gene) корепресорите. Той потиска експресията на ключови за клетъчната диференциация гени, като Pax6 (pair-box protein 6), и по този начин влияе върху основните свойства на невралните прогенитори.

Представените резултати относно локализацията и динамиката в експресията на транскрипционния фактор Sox2 са от съществено значение за разбиране развитието на невралните стволони и прогениторни клетки в хода на ембрионалната невrogenеза при човека. Получените данни могат да подпомогнат изясняването на някои генетични нарушения в развитието на крайния мозък.

ЛИТЕРАТУРА

1. Borrell V, Reillo I. Emerging roles of neural stem cells in cerebral cortex development and evolution. *Dev. Neurobiol.* 2012;72:955-71.
2. Florio M, Huttner WB. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development.* 2014;141(11):2182-94.
3. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. Sox2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron.* 2003;39(5):749-65.
4. Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(9):3196-201.
5. Lewitus E, Kelava I, Huttner WB. Conical expansion of the outer subventricular zone and the role of neocortical folding in evolution and development. *Front. Hum. Neurosci.* 2013;7:424.

6. Liu YR, Laghari AZ, Novoa CA, Webster JRM, Goodwin PE, Wheatley SP, Scotting PJ. Sox2 acts as a transcriptional repressor in neural stem cells. BMC Neurosci. 2014;15(1):95.
7. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. Cell. 2011;146(9):18-36.
8. Nonaka-Kinoshita M, Reillo I, Artegiani B, Martínez-Martínez MA, Nelson M, Borrell V, Calegari F. Regulation of cerebral cortex size and folding by expansion of basal progenitors. EMBO J. 2013;32(13):1817-28.
9. Pevny LH, Nicolis SK. Sox2 roles in neural stem cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2010;42(3):421-4.
10. Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. Nat. Rev. Neurosci. 2009;10:724-35.

Адрес за кореспонденция:
проф. д-р Антон Тончев
Катедра „Анатомия, хистология и
ембриология“
Медицински университет – Варна
ул. „Марин Дринов“ 55, 9002 Варна
e-mail: anton.tonchev@mu-varna.bg