

ЕКСПРЕСИЯ НА ТРАНСКРИПЦИОННИТЕ ФАКТОРИ PAX2 И PAX6 В МАЛЪК МОЗЪК НА ПРИМАТИ ВЪВ ВЪЗРАСТОВ АСПЕКТ И СЛЕД ИСХЕМИЯ

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

¹Катедра по анатомия, хистология и ембриология,
Медицински Университет, Варна

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

EXPRESSION OF TRANSCRIPTIONAL FACTORS PAX2 AND PAX6 IN PRIMATE CEREBELLUM RELATED TO THE AGE AND FOLLOWING ISCHEMIA

Vesselina Mihaleva¹, Dessislava Marinova¹, Stoyan Pavlov¹, Meglena Angelova¹,
Vanya Goranova¹, Tetsumori Yamashima², Anton B. Tonchev¹

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

²Dept. of Restorative Neurosurgery, Medical Faculty, University of Kanazawa, Japan

РЕЗЮМЕ

Гените от фамилията Pax играят важна роля в пролиферацията на множествени клетъчни линии, при формирането на различни органи, включително в развитието и организацията на нервната система. В последно време беше установено значението на два транскрипционни фактора (ТФ) от тази група - Pax2 и Pax6, в тъканната регенерация - и специално за Pax6 гена - нова функция в сегментната организация на задния мозък (Metencephalon).

Целта на настоящото изследване беше да проучим присъствието, разпределението и динамиката на тези два ТФ в малкия мозък на новородени, едногодишни и половозрели в млада възраст японски маймуни (*Macaca fuscata*), при последните и след глобална мозъчна исхемия. Според възрастта (новородени, едногодишни и възрастни) и срока на преживяемост след исхемията при възрастните (съответно 9 или 15 дни) животните бяха разпределени в няколко контролни и експериментални групи. Приложихме флуоресцентна имунохистохимична техника за оцветяване на замразени срези от малкия мозък за изтъкване на Pax2 и Pax6.

При новородените животни единични Pax2(+) клетки се откриват предимно във вътрешния

ABSTRACT

The genes of Pax family play important roles in the proliferation of multiple cell lines, formation of various organs, including the development and organization of the central nervous system. Lately, it was found the significance of two transcriptional factors (TFs) of this group - Pax2 and Pax6 in tissue regeneration, especially for Pax6 gene - a novel function in the segmental organization of the hindbrain.

The goal of the present investigation was to study the presence, distribution and dynamics of these two TF in the cerebella of newborn, one-year old and young adult Japanese monkeys (*Macaca fuscata*), by the latter also after global brain ischemia. According to the age (newborn, one-year old and adult) and period of survival time after ischemia by the adults (9 or 15 days respectively), animals were distributed in several control and experimental groups. We applied fluorescent immunohistochemical technique for staining cryo-sections of cerebellum for demonstration of Pax2 and Pax6.

By the newborn animals Pax2(+) cells were found mainly in the inner granular cell layer of the cerebellum and in the layer of Purkinje cells. At a later age their quantity was reduced. In the ischemic groups single Pax2(+) cells were located in the Purkinje cell layer

зърнест слой на малкия мозък и в слоя на клетките на Пуркиние. В по-късна възраст количеството им значително намалява. В групите с исхемия единични Pax2(+) клетки се разполагат в слоя на клетките на Пуркиние и зърнестия слой без разлика в местоположението и количеството в сравнение с контролите.

Pax6(+) клетки се откриват в големи количества във всички слоеве на кората на малкия мозък при новородени животни, докато при едногодишните маймуни такива клетки се установяват основно във вътрешния зърнест слой. При възрастните животни от контролната група типичната им локализация е само в зърнестия слой без разлика в сравнение с групите с исхемия.

Получените данни потвърждават и допълват достъпната информация относно наличието и типичното разпределение на тези два TF в малкия мозък в хода на развитието, без да се установяват промени след глобална мозъчна исхемия.

Ключови думи: Pax2, Pax6, малък мозък, примати, исхемия

УВОД

Pax гените са група транскрипционни фактори (TF), които играят важна роля в клетъчната пролиферация по време на развитието на различни органи, особено при формирането на нервната система. Имат съществено значение за неврогенезата и окулогенезата през ембрионалния период, което е документирано с развитието на редица заболявания при човека в резултат на техни мутации (1, 4, 13). В последно време беше показано, че Pax гените участват в контрола на регенеративните процеси при израснали тъкани (8). Към представителите на тази фамилия спадат TF Pax2 и Pax6, които съдържат генетичната информация за синтеза на съответните протеини. Вземат активно участие в сигналния контрол при генерирането съответно на ГАВА-ергичните интерневрони от вентрикуларната зона и глутаматергичните неврони от ромбичната устна при развитието на малкия мозък (3). Pax6 е ключов регулатор в развитието на ЦНС и органа на зрението. Той има силна експресия в прекурсорите на зърнестите клетки в ромбичната устна и образуватите от тях постмитотични неврони, които мигрират на големи разстояния към различни дестинации в церебелума и даващи началото на ранните малкомозъчни ядра и зърнести-

te and granular cell layer without difference in the location and amount compared with controls.

Pax6(+) cells were found in large amount in all layers of the cerebellar cortex by newborn animals, whereas by one-year old monkeys such cells were found mainly in the inner granular layer. By adult animals of the control group their typical location was only in the granular layer, there was no difference in comparison with the ischemic groups.

The data received confirm and expand the available information related to the presence and typical distribution of these two TFs in the cerebellum in the course of postnatal development without establishment of changes following global brain ischemia.

Keywords: Pax2, Pax6, cerebellum, primates, ischemia

те клетки (2). Установено е, че Pax6 генът играе непозната до сега контролираща роля в сегментната организация на задния мозък в ранните етапи на развитието му (5).

Исхемията е нарушение на мозъчното кръвоснабдяване, което най-често води до тежки морфологични и функционални поражения. Все още съществуват редица неизяснени аспекти от участието на различни екзогенни и ендогенни фактори в хода на тъканното възстановяване след исхемични нарушения. Ролята на Pax гените е слабо проучена, особено при човека и най-близките до него в еволюционно отношение бозайници - приматите.

Целта на настоящото проучване беше да установим локализацията и динамиката на Pax2 и Pax6 в отделните слоеве в кората на церебелума при примати на различна възраст и след глобална мозъчна исхемия с различна продължителност. Получените данни могат да са от значение за разбиране ролята на тези транскрипционни фактори в процесите на възстановяване след исхемични лезии на малкия мозък при човек.

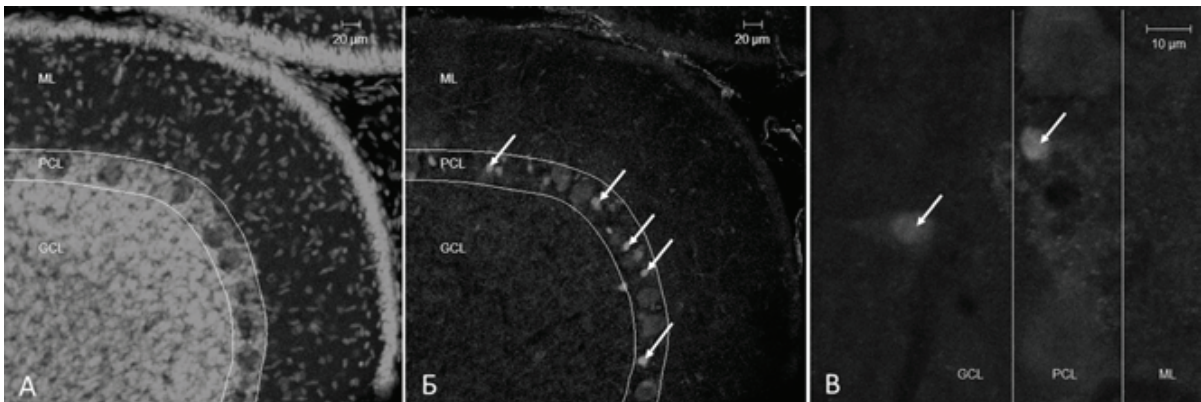
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментите и вземането на материала бяха проведени в медицинския факултет на Уни-

верситета в Каназава, Япония, според правилата на институционалната етична комисия. Изследвани бяха десет женски примата - японски маймуни (*Macaca fuscata*), разпределени в 5 групи по две според възрастта и срока на исхемията, т.е. 2 новородени, 2 ювенилни на 1 г. и 6 половозрели в млада възраст (5-9 г.), от които 2 контроли, 2 след исхемия на 9-ия ден и 2 след исхемия на 15-ия ден. Хирургическата процедура на глобалната мозъчна исхемия е осъществена за 20 минути и представена детайлно в Tonchev et al. (12). Мозъците на животните бяха извадени след приложението на интракардиална перфузия с 4% параформалдехид в 0.1 М фосфатен буфер, рН 7.4 под пълна упойка, след което бяха нарязани на подходящи парчета и постфиксирани за няколко

РЕЗУЛТАТИ

Клетъчните слоеве в кората на малкия мозък при новородено животно са представени на Фиг. 1А чрез флуоресцентния маркер за изтъкване на ядра DAPI. На тази възраст ясно се отличават характерните четири слоя. Рах2(+) клетки се откриват в слоя на клетките на Пуркиние и вътрешния зърнест слой (Фиг. 1Б). При едногодишните и възрастните животни количеството им значително намалява. В групите с исхемия единични Рах2(+) клетки в малко количество се откриват разпръснати предимно в слоя на клетките на Пуркиние и зърнестия слой (Фиг. 1В). Не открихме съществени качествени и количествени различия между възрастните контролни животни и всяка от двете изследвани групи с исхемия.



Фиг. 1. Флуоресцентно изтъкване на ядрата с DAPI в отделните слоеве в кората на малкия мозък (А) и имунохистохимично оцветяване за ТФ Рах2 (Б) при новородено и възрастно животно след исхемия на 15-ия ден (В). Рах2(+) клетки (стрелки) се разполагат предимно в слоя на клетките на Пуркиние (PCL). ML – молекулярен слой; GCL – зърнест слой.

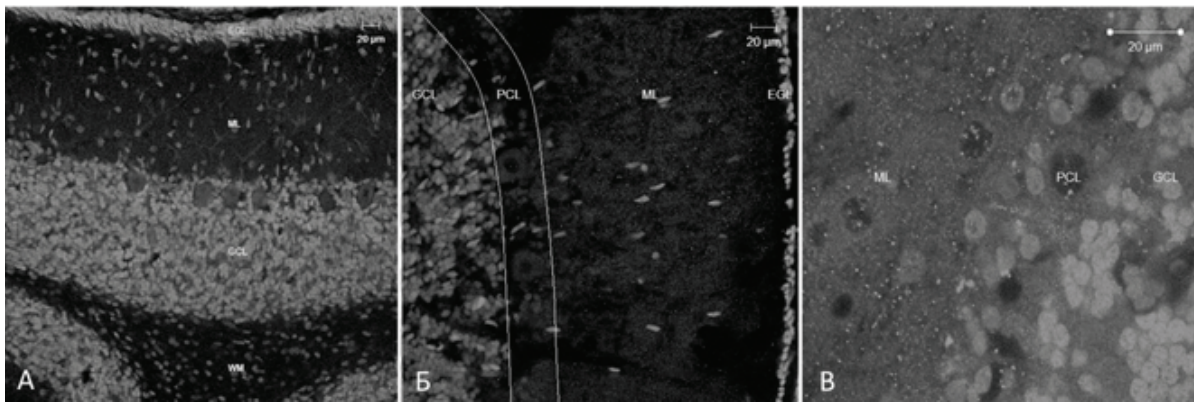
ко часа. След криопротекция и замразяване бяха направени парасагитални срези от малкия мозък с дебелина 40µm и съхранени при -20°C. За изтъкване на проучваните маркери беше приложена стандартна единична индиректна имунофлуоресцентна техника. Използвани бяха първично анти-Рах2 антитяло от заек (1:200, Covance, САЩ) и анти-Рах6 антитяло от заек (1:400, Covance, САЩ) за 2 дена при 4°C. След тях бяха приложени съответните вторични антитела, конюгирани с флуорохрома Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes, Eugene, OR, САЩ) за 2 часа при стайна температура. За изтъкване на клетъчните ядра беше използвано флуоресцентното багрило 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI), което проявява силен афинитет към ДНК.

Качествен анализ на оцветените срези бе осъществен с помощта на лазерен сканиращ конфокален микроскоп LSM700 (Zeiss, Германия) и софтуерна програма Zeiss ZEN.

При новородените животни Рах6(+) клетки се откриват в големи количества във всички слоеве на кората на малкия мозък: външния зърнест слой, молекулярния слой, слоя на клетките на Пуркиние и вътрешния зърнест слой (Фиг. 2А), който остава като окончателен зърнест слой след приключване на органогенезата. При едногодишните животни Рах6(+) клетки се установяват основно във вътрешния зърнест слой (Фиг. 2Б). При възрастните животни от контролната група типичната им локализация е само в зърнестия слой, като нямаше разлика в сравнение с групите с исхемия (Фиг. 2В).

ОБСЪЖДАНЕ

В настоящото проучване представяме данни за присъствието, разпределението и динамиката на ТФ Рах2 и Рах6 в отделните слоеве на кората на малкия мозък при новородени, ювенилни



Фиг. 2. Имунохистохимично оцветяване за ТФ Pax6 при новородено (А), едногодишно (Б) и възрастно животно след исхемия на 9-ия ден (В). Pax6(+) клетки присъстват в различни количества във външния зърнест слой (EGL), молекулярния слой (ML), слоя на клетките на Пуркиние (PCL) и вътрешния зърнест слой (GCL), който остава при възрастните животни като окончателен и единствен зърнест слой. WM - бяло вещество.

и възрастни примати в норма и след исхемия. Установихме, че експресията на двата фактора проявява възрастова зависимост с най-силна изява при новородените животни, значително намаление при едногодишните и още по-голямо редуциране при възрастните, с изключение на силно изразената експресия на Pax6 в окончателния зърнест слой при израсналите животни. Считаме, че Pax2(+) клетки при новородените и едногодишните са невронални прогенитори, които мигрират от бялото вещество и в следствие се диференцират като GABA-ергични интерневрони в съответните слоеве на малкомозъчната кора (6,7). С увеличаване на възрастта експресията на Pax2 и Pax6 в кората на малкия мозък при изследваните примати намалява. С изчезването на външния зърнест слой и запазването на дефинитивния зърнест слой на мястото на вътрешния зърнест слой броят на Pax2(+) клетки рязко намалява, а броят на Pax6(+) клетки в този слой се запазва значително висок. Pax2 маркерът е типичен за ранните прекурсори на инхибиторните неврони след напускането на вентрикуларната зона (11) в периода около последното им делене преди заемането на окончателното им местоположение в кората на малкия мозък (10).

В малкия мозък ТФ Pax6 е характерен за зърнестите неврони в кората (9). Той взаимодейства с множество други гени в ромбичната устна: Wls, Math1, Lmx 1a, Tbr2 (14), които активира и/или дезактивира в хода на неврогенезата на церебелума за правилното структуриране на всеки клетъчен слой. Неговите мутации водят до различни смущения най-вече в ранните етапи при развитието на мозъка и очите като: намаление в

обема на мозъка, аутизъм, липса на ирис, изтъняване и потъмняване на роговицата.

Глобалната мозъчна исхемия при възрастните животни в нашата експериментална постановка не оказва съществен ефект върху експресията на ТФ Pax2 и Pax6 в кората на малкия мозък. Необходими са някои допълнителни двойни и тройни имунохистохимични оцветявания за установяване на коекспресия на изследваните ТФ с други маркери, посочващи определени фази на клетъчната диференциация на невроналните прекурсори до зрели неврони и евентуалната им функционална специализация.

ИЗВОДИ

Изследваните ТФ Pax2 и Pax6 проявяват специфична локализация в отделните слоеве на кората на малкия мозък и характерна намаляваща възрастова експресия. Исхемичното увреждане в приложените срокове при възрастните животни не оказва съществен ефект върху експресията на двата фактора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davis LK, Meyer KJ, Rudd DS, Librant AL, Epping EA, Sheffield VC et al. Pax6 3' deletion results in aniridia, autism and mental retardation. Hum Genet. 2008;123(4):371-378.
2. Engelkamp D, Rashbass P, Seawright A, van Heyningen V. Role of Pax6 in development of the cerebellar system. Development. 1999;126(16):3585-3596.

3. Hashimoto M, Hibi M. Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev Growth Differ.* 2012;54(3):373-389.
4. Hever AM, Williamson KA, van Heyningen V. Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2. *Clin Genet.* 2007;69(6): 459-470.
5. Kayam G, Kohl A, Magen Z, Peretz Y, Weisinger K, Bar A et al. A novel role for Pax6 in the segmental organization of the hindbrain. *Development.* 2013;140(10):2190-2202.
6. Leto K, Bartolini A, Rossi F. The prospective white matter: an atypical neurogenic niche in the developing cerebellum. *Arch Ital Biol.* 2010;148(2):137-146.
7. Leto K, Rolando C, Rossi F. The genesis of cerebellar GABAergic neurons: fate potential and specification mechanisms. *Front Neuroanat.* 2012;6(6):1-10.
8. Mansouri A, Gruss P. Pax Gene. In: Hughes K, Maloy K, editors. *Brenner's Encyclopedia of Genetics.* San Diego: Elsevier Science; 2013. p. 246-248.
9. Martinez S, Andreu A, Mecklenburg N, Echevarria D. Cellular and molecular basis of cerebellar development. *Front Neuroanat.* 2013;7:1-18.
10. Schilling K, Oberdick J, Rossi F, Baader SL. Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(4):601-615.
11. Selvadurai HJ, Mason JO. Wnt/ β -catenin signalling is active in a highly dynamic pattern during development of the mouse cerebellum. *PLoS One.* 2011;6(8):e23012.
12. Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, Okano H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci.* 2003;23(2):292-301.
13. Walcher T, Xie Q, Sun J, Irmeler M, Beckers J, Öztürk T et al. Functional dissection of the paired domain of Pax6 reveals molecular mechanisms of coordinating neurogenesis and proliferation. *Development.* 2013;140(5):1123-1136.
14. Yeung J, Ha TJ, Swanson DJ, Choi K, Tong Y, Goldowitz D. Wls provides a new compartmental view of the rhombic lip in mouse cerebellar development. *J Neurosci.* 2014;34(37):12527-12537.

Адрес за кореспонденция:
Проф. д-р Антон Б. Тончев
Катедра „Анатомия, хистология и ембриология“
Медицински университет – Варна
ул. „Марин Дринов“ 55, 9002 Варна
e-mail: anton.tonchev@tu-varna.bg
phone: ++35952677082