

РОСТРО-КАУДАЛЕН ГРАДИЕНТ В ЕКСПРЕСИЯТА НА ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР SOX2 ВЪВ ФЕТАЛЕН МОЗЪК ПРИ ЧОВЕК

Меглена Ангелова, Стоян Павлов, Веселина Михалева, Ваня Горанова,
Антон Тончев

*Катедра по анатомия, хистология и ембриология,
Медицински университет - Варна*

ROSTRO-CAUDAL GRADIENT IN THE EXPRESSION OF TRANSCRIPTIONAL FACTOR SOX2 IN THE FETAL HUMAN BRAIN

Meglana Angelova, Stoyan Pavlov, Vesselina Mihaleva, Vanya Goranova,
Anton Tonchev

Department of Anatomy, Histology and Embryology, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Транскрипционният фактор Sox2 е ключов компонент в мрежа от гени, които контролират съдбата на различни видове стволови и прогениторни клетки в развиващия се мозък. Доказана е неговата важна роля за самообновяване и поддържане мултипотентността на ембрионалните неврални прогенитори при редица видове бозайници. Данните за експресията и функцията на Sox2 в човешкия фетален мозък обаче са твърде недостатъчни и противоречиви. В настоящото изследване беше проучена експресията и проследена динамиката на Sox2 в ретро-каудална посока в човешки фетален теленцефалон през 20^{-та} гестационна седмица (г.с.). Чрез стандартна имунофлуоресцентна методика бяха визуализирани позитивните за този транскрипционен фактор клетки. Техният брой и относителен дял беше определен и след това сравнен между специфичните герминативни зони и на интересуващите ни нива и дялове на феталната крайномозъчна кора. Проучвайки експресията на Sox2 в трите основни герминативни зони на човешкия теленцефалон (вентрикулна, вътрешна субвентрикулна и външна субвентрикулна зона), установихме значителна разлика в броя на позитивните клетки в предно-задно направление. От роstralно към каудално делът на Sox2 позитивните клетки във вентрикулната зона не показва съществена промяна, във вътрешната субвентрикулна зона има значително намаление, а при външната субвентрикулна

ABSTRACT

Transcriptional factor Sox2 is a key component in a network of genes controlling the faith of diverse types of stem and progenitor cells in the developing brain. Its important role in self-renewal and maintenance of multipotency of embryonic neural progenitors is well established in a number of mammalian species. However, the data about the expression and function of Sox2 in the human fetal brain are scarce and controversial. In the present investigation, we studied Sox2 expression and its rostro-caudal dynamics in human telencephalon at 20th gestational week. Using a standard immunofluorescence technique positive cells for this transcriptional factor were visualized. Their numbers and relative portion were determined and compared in specific germinal zones at various levels and in different areas of the telencephalic cortex. When studying Sox2 expression we discovered significant differences in the numbers of positive cells in all three germinal zones (ventricular, inner subventricular and outer subventricular) in rostro-caudal direction. From rostrally to caudally the relative portion of Sox2 positive cells in the ventricular zone did not showed a significant change, in the inner subventricular zone there was a significant reduction and in the outer subventricular zone there was a slight increase. The differences described in the expression of transcriptional factor Sox2 may be of significance for a better understanding of processes related to the development, differentiation and migration of neural stem/progenitor cells in the human telencephalon during fetal neurogenesis in normal and pathological conditions.

зона има леко увеличение. Описаните различия във връзка с експресията на транскрипционния фактор Sox2 имат значение за по-добро разбиране на процесите на развитие, диференциация и миграция на невралните стволони/прогениторни клетки в крайния мозък при човека по време на феталната неврогенеза при нормални и патологични условия.

Ключови думи: Sox2, герминативни зони, човешки мозък, 20^{та} гестационна седмица

УВОД

Транскрипционният фактор Sox2 (SRY, sex determining region Y-box2) е част от групата Sox - транскрипционни фактори, към която се отнасят още Sox1 и Sox3. Той е ключов компонент в мрежа от гени, контролиращи съдбата на различни видове стволони клетки. Sox2 е и един от малкото фактори, които могат да иницират превръщането на диференцирани соматични в плурипотентни клетки (7,15). Доказана е неговата безспорна роля за самообновяването и поддържането мултипотентността на ембрионалните неврални стволони клетки. Той е един от най-рано активиращите се гени в невралната ектодерма и неговата експресия се поддържа през целия период на развитие на централната нервна система (6). Действието на Sox2 се свързва основно с потискане на диференциацията на прогениторните клетки (13). Това се осъществява чрез взаимодействие с други транскрипционни фактори, спрямо които Sox2 играе роля на активатор или репресор. Доказана е връзката му с експресията на гени като Oct3/4 и Nanog, които са ключови регулатори на ембрионалните стволони клетки. Сравнително нови проучвания потвърждават ролята на Sox2 и като транскрипционен репресор (11) с директно влияние върху Grg (groucho-related gene) корепресорите. Той потиска експресията на съществени за клетъчната диференциация гени, като Pax6 (pair-box protein 6) и по този начин влияе върху основните свойства на невралните прогенитори. Мутациите на Sox2 при човек причиняват анофталмия, когнитивни дефекти, нарушения в структурата на хипокампа и епилепсия (4).

Целта на настоящото изследване беше да проучим експресията на Sox2 в основните герминативни зони на човешкия фетален теленцефалон през 20^{та} г.с. и да проследим динамиката на този транскрипционен фактор в росто-каудална посока.

Keywords: Sox2, germinal zones, human brain, 20th gestational week

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

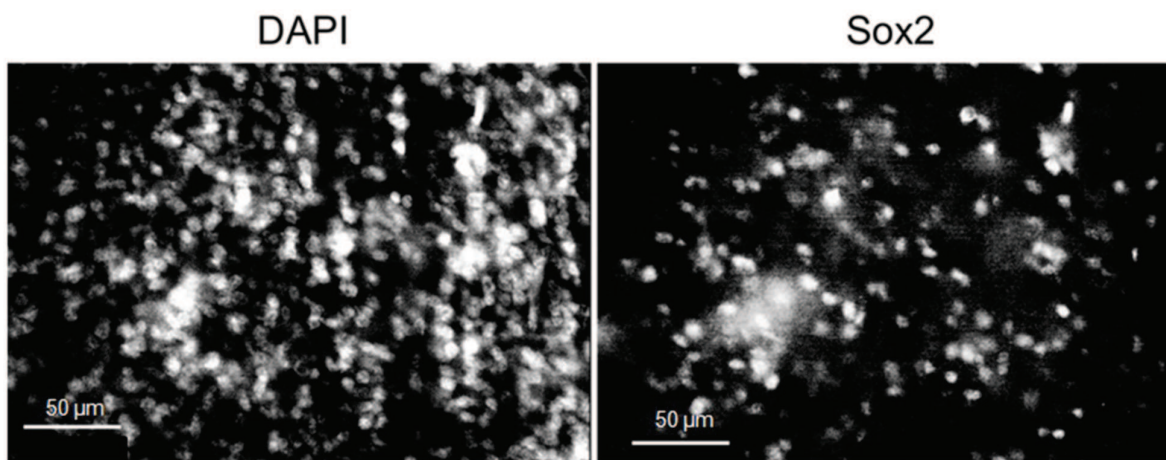
Тъканни проби от краен мозък на човешки фетуси в различни етапи на пренаталното развитие, получени в СБАГАЛ „Проф. д-р Димитър Стаматов” – гр. Варна след спонтанни аборти, бяха изследвани и групирани по възраст. В настоящото проучване бяха включени само тези на възраст от 20^{та} г.с. Всяка проба беше използвана след писмено съгласие на бременната жена според протокол №19/05.04.2012 г., одобрен от Комисията по етика на научните изследвания при МУ „Проф. Д-р П. Стоянов” – Варна.

Изследвахме само проби от краен мозък на фетуси, при които липсваше видима невропатология. Хистологичната обработка на материала включваше фиксация в 4% параформалдехид за две седмици, последвана от престой в 30% разтвор на захароза за криопротекция и замразяване в О.С.Т. (Optimal Cutting Temperature) среда. Криосрези с дебелина 20 µm бяха изготвени на криостат. Отделно тъканни проби бяха включени в парафин, а получените срези бяха оцветени с крезил виолет за обща тъканна ориентация и топография на слоевете. Криостатните срези бяха оцветени посредством стандартна имунофлуоресцентна методика за изтъкване на Sox2. Използвахме поликлонално анти-Sox2 (Y-17) антитяло от коза (sc-17320, Santa Cruz Biotechnology) при разреждане 1:50 и съответстващо второ антитяло, маркирано с Alexa Fluor® 488 (A-11055, Molecular Probes – Invitrogen) при разреждане 1:50. Ядрата на клетките бяха контрастирани с 4',6'-диамино-2-фенилиндол (DAPI) в синьо. Последващият анализ на препаратите беше осъществен с микроскоп Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss, Jena, Германия). Sox2-позитивните клетки бяха преброени в различни участъци по зони с помощта на камера AxioCam MRc и система AxioVisioner (Carl Zeiss). Получените резултати бяха подложени на статистически обработка чрез Excel 2010. За целта използвахме дескриптивен анализ за графично представяне на данните

и t-тест с p-параметри за сравняване на резултатите от отделните групи.

РЕЗУЛТАТИ

Изследвахме експресията на Sox2 през 20^{-та} г.с. на три нива във феталния краен мозък: рострално от латералната и медиалната ганглионни еминенции (ЛГЕ и МГЕ), на нивото на ганглионните еминенции и каудално от тях. Установихме наличие на Sox2 позитивни клетки и на трите нива във всяка от основни герминативни зони – вентрикулна (VZ), вътрешна субвентрикулна (iSVZ) и външна субвентрикулна зона (oSVZ) (Фиг. 1).



Фиг. 1. Визуализирани клетъчни ядра с DAPI и експресия на Sox2 в голяма част от клетките на вътрешната субвентрикулна зона през 20^{-та} г.с.

След това изчислихме процентното разпределение на Sox2-експресиращите клетки от всички визуализирани с DAPI клетъчни ядра за съответната зона на феталния теленцефалон на трите изследвани нива. На рострално ниво от ганглионните еминенции 70.58% от клетките във VZ на дорзалния теленцефалон експресираща Sox2, при iSVZ този процент беше 58.52%, а при oSVZ – 32.53%. Разликата между VZ и oSVZ беше статистически значима ($t=2.57$, $p=0.02$). Същевременно разликата между VZ и iSVZ беше отчетена като статистически недостоверна ($t=2.44$, $p=0.29$). Разликата между iSVZ и oSVZ показва статистическа значимост ($t=2.57$, $p=0.001$) (Фиг. 2A). На нивото на ганглионните еминенции процентното съотношение на Sox2+ клетки спрямо маркираните с DAPI клетъчни ядра беше 62.79% за VZ, 64.60% за iSVZ и 35.07% за oSVZ. Тук разликата в процентния дял на Sox2 експресиращите клетки във VZ и oSVZ също беше статистически достоверна ($t=2.36$, $p=0.01$), докато разликата между VZ и iSVZ беше отчетена като недостоверна ($t=2.44$, $p=0.85$). Разликата между iSVZ и oSVZ показва

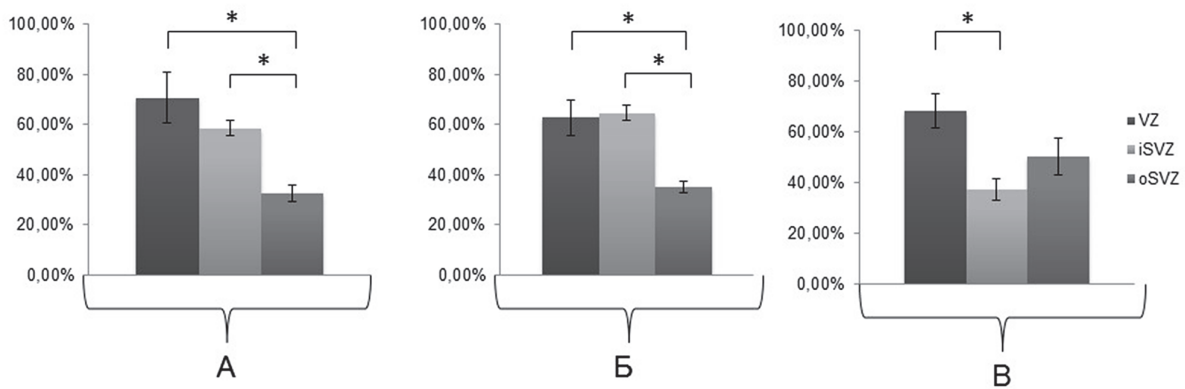
статистическа значимост ($t=2.57$, $p=0.0004$) (Фиг. 2B). Каудално от ганглионните еминенции в парietалния дял 68.14% от клетките на VZ бяха положителни за Sox2, за iSVZ този процент беше 37.21%, а за oSVZ – 50.11%. Приложеният от нас анализ на това ниво потвърди разлика в процентното съотношение на Sox2+ клетки само между VZ и iSVZ ($t=2.44$, $p=0.008$). Между VZ и oSVZ ($t=2.44$, $p=0.12$), както и между iSVZ и oSVZ ($t=2.44$, $p=0.18$) не открихме статистически значима разлика (Фиг. 2B).

Направихме сравнение на броя клетки с експресия за Sox2 в ростро-каудална посока във всяка от трите герминативни зони. При VZ не уста-

новихме статистически значима разлика в процентното съотношение на Sox2+ клетки спрямо общия брой от рострално към каудално ниво спрямо ганглионните еминенции ($t=2.44$, $p=0.84$). При iSVZ установихме статистически значима разлика между дела на Sox2+ клетки рострално от ганглионните еминенции към каудално ($t=2.44$, $p=0.005$), както и между нивото на латералната и медиалната ганглионни еминенции и нивото каудално от тях ($t=2.57$, $p=0.004$). Проследявайки експресията на Sox2 във oSVZ от рострално към каудално отбелязахме увеличение на фракцията на Sox2+ клетки от 32.53% във фронталния дял рострално от ганглионните еминенции до 35.07% в същия дял на тяхното ниво и до 50.11% каудално от тях в парietалния дял. Тази разлика обаче беше отчетена като статистически недостоверна ($t=2.57$, $p=0.11$) (Фиг. 3).

ОБСЪЖДАНЕ

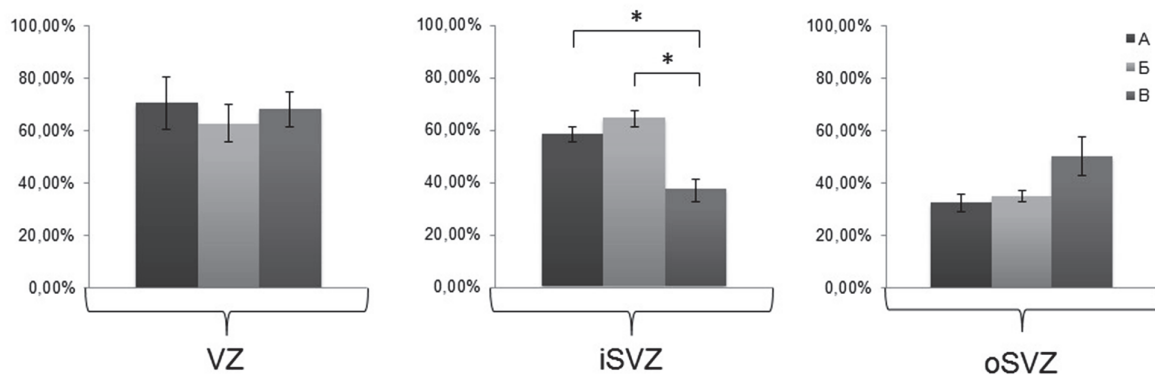
Представените данни за първи път доказват наличието на градиент (различна плътност като



Фиг. 2. Процентно разпределение на броя на Sox2-положителните клетки спрямо всички изтъкнати с DAPI клетъчни ядра през 20^{-ма} г.с. на трите изследвани нива. А - рoстрaлно от ЛГЕ и МГЕ; Б - на нивото на ЛГЕ и МГЕ; В - каудaлно от ЛГЕ и МГЕ; VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона; ЛГЕ - латерална ганглионна еминенция; МГЕ - медиална ганглионна еминенция; * Статистическа значимост на разликата при сравнение на посочените стойности

процент от всички клетки) на Sox2-позитивните прогенитори по рoстрo-каудaлната ос на развиващия се чoвешки дорзален тeлeнцефaлон. Наблюдавахме силно изявена експресия на Sox2 във вентрикулната зона на развиващия се тeлeнцефaлон при чoвек подобно на други проучвания при мишки (1).

в субвентрикулната зона на феталния тeлeнцефaлон през 20-24 г.с. определя позитивните клетки като пирамидни, проекционни неврони, които още не са мигрирали към кортикалната плоча. Счита се, че това са клетки, предназначени за горните слоеве на кората (3). Известно е, че Sox2 е ключов фактор в контрола на количеството на



Фиг. 3. Сравнение на процентното разпределение на броя на Sox2-положителните клетки спрямо всички изтъкнати с DAPI клетъчни ядра през 20^{-ма} г.с. във вентрикулната зона (VZ), вътрешната субвентрикулна зона (iSVZ) и външната субвентрикулна зона (oSVZ) на три различни нива: А - рoстрaлно от ЛГЕ и МГЕ; Б - на нивото на ЛГЕ и МГЕ; В - каудaлно от ЛГЕ и МГЕ; ЛГЕ - латерална ганглионна еминенция; МГЕ - медиална ганглионна еминенция; * Статистическа значимост на разликата при сравнение на посочените стойности

Многообразието при образуване на интерневрони в мозъчната кора при човека се осъществява с участието на различни транскрипционни фактори в края на пренаталното развитие и първите постнатални седмици (8, 9), като субвентрикулната зона на фронталния дял се посочва за място на генериране на такива неврони след 20^{-та} г.с. Експресията на определени транскрипционни фактори и глутамат-позитивни клетки

стволовите/прогенитерни клетки в развиващия се мозък (10,14). Наблюдаваната от нас динамика в експресията на Sox2 в отделните герминативни зони на три различни нива, както и в рoстрo-каудaлна посока определено показва участието на този транскрипционен фактор в герминативните процеси през 20^{-та} г.с. Той се експресира в радиалните прогенитори, които генерират изключително глутаматергични неврони в герми-

нативните зони на дорзалния палиум. Инактивация на Sox2 в тези клетки по време на развитието при мишка води до значителна редукция на броя на глутаматергичните неврони и дебелината на кортекса като цяло (2,12). При дефицит на Sox2 се развива невродегенерация и нарушена неврогенеза при възрастни мишки (5). Ето защо ние смятаме, че детайлното изследване на транскрипционния фактор Sox2 в човешкия фетален теленцефалон е от важно значение за разкриване генетичната основа на някои вродени неврологични заболявания на мозъка.

ИЗВОДИ

През 20^{-та} г.с. експресията на транскрипционния фактор Sox2 е силно изявена във вентрикулната зона и постепенно намалява в посока на външната субвентрикулна зона на развиващия се теленцефалон при човека. Ростро-каудален градиент на редуциране в експресията на Sox2 се наблюдава само във вътрешната субвентрикулна зона. При външната субвентрикулна зона има известна тенденция на увеличение, без да има ясно изразен ростро-каудален градиент.

ЛИТЕРАТУРА

- Bani-Yaghoob M, Tremblay RG, Lei JX, Zhang D, Zurakowski B, Sandhu JK et al. Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev Biol.* 2006;295(1):52-66.
- Cavallaro M, Mariani J, Lancini C, Latorre E, Caccia R, Gullo F et al. Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development.* 2008;135(3):541-57.
- Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A et al. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci.* 2005;25:247-51.
- Favaro R, Valotta M, Ferri AL, Latorre E, Mariani J, Giachino C et al. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci.* 2004;12:1248-56.
- Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A et al. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development.* 2004;131(15):3805-19.
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. Sox2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron.* 2003;39(5):749-65.
- Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell.* 2010;143:508-25.
- Inta D, Alfonso J, von Engelhardt J, Kreuzberg MM, Meyer AH, van Hooft JA et al. Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:20994-9.
- Jakovcevski I, Mayer N, Zecevic N. Multiple origins of human neocortical interneurons are supported by distinct expression of transcription factors. *Cerebral Cortex.* 2011;21:1771-82.
- Lee KE, Seo J, Shin J, Ji EH, Roh J, Kim JY et al. Positive feedback loop between Sox2 and Sox6 inhibits neuronal differentiation in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(7):2794-9.
- Liu YR, Laghari AZ, Novoa CA, Webster JRM, Goodwin PE, Wheatley SP et al. Sox2 acts as a transcriptional repressor in neural stem cells. *BMC Neurosci.* 2014;15(1):95.
- Miyagi S, Masui S, Niwa H, Saito T, Shimazaki T, Okano H et al. Consequence of the loss of Sox2 in the developing brain of the mouse. *FEBS Lett.* 2008;582(18):2811-5.
- Pevny LH, Nicolis SK. Sox2 roles in neural stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(3):421-4.
- Shimozaki K. Sox2 transcription network acts as a molecular switch to regulate properties of neural stem cells. *World J Stem Cells.* 2014;6(4):485-90.
- Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature.* 2010;465:704-12.

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@tu-varna.bg