

**Медицински Университет “Проф. Д-р Параскев
Стоянов” - гр. Варна**

Факултет “Медицина”

Катедра “Анатомия и клетъчна биология”

Ръководител: Доц. д-р Стоян Павлов, д.м.

Роля на транскрипционен фактор Pax6 в развитието на малкия мозък при мишка

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен**

“ДОКТОР”

НА РАДОСЛАВ ХРИСТОВ СПАСОВ

Научен ръководител: проф. д-р Антон Тончев, д.м.н.
Научна специалност: „Анатомия, хистология и цитология”
Варна, 2025 год.

СЪДЪРЖАНИЕ

СЪДЪРЖАНИЕ	1
Съкращения	5
1. Увод	5
3. Цел и задачи	10
4. Материали и методи	11
4.1. Опитни животни.....	11
4.1.1. Cre- рекомбиназа поставена зад регулаторен елемент “Tel”	11
4.1.2. Миши линии Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} и Tel-Cre::Rosa26.....	12
4.2. Добиване и обработване на тъканите.....	13
4.3. Имунохистохимия.....	14
4.4. Имунофлуоресценция.....	15
4.5. Заснемане на изготвените микроскопски препарати .	16
4.5.1. Светлинна микроскопия.....	16
4.5.2. Имунофлуоресцентна микроскопия	18
4.6. Оценка на количеството на заснетите данни	19
4.6.1. Оценка на количеството на морфометричните данни	19
4.6.1.1.Оценка на количеството на разликите в площта...	19
4.6.1.2.Оценка на количеството на разликите в дебелината	20
4.6.1.3. Количествена оценка на разликите в дължината.	20
4.6.1. Количествена оценка на разликите в броя на клетките	21
5. Резултати.....	23
5.1. Нормална експресия на Pax6 в развиващ се и завършил развитието си малък мозък.	23
5.2. Данни от миша линия Pax6(Tel)-Cre::Rosa26 - репортерна линия.	24

5.3. Данни от трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - намалени нива на гена Pax6	30
5.3.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период P21- обзорни данни от площта на малкия мозък и четвърти вентрикул	30
5.3.2.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на площ.	32
5.3.2.1.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на площта на “целия” малък мозък в медиални и латерални срезове.....	32
5.3.2.1.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на площта на кората на малък мозък в медиални и латерални срезове.....	33
5.3.1.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на площта на бялото вещество на малък мозък в медиални и латерални срезове.....	33
5.3.2.1.4. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на площта на зърнестия слой на малък мозък в медиални и латерални срезове	34
5.3.2.1.5. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на площта на молекулярния слой на малък мозък в медиални и латерални срезове.....	35
5.3.2.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на дебелина.	35
5.3.2.2.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на дебелината на зърнестия слой на малък мозък в медиални и латерални срезове	36
5.3.2.2.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на дебелината на молекулярния слой на малък мозък в медиални и латерални срезове.....	36

5.3.2.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на дължина	36
5.3.2.3.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на линията, минаваща от началото до края на зърнестия слой на малък мозък в медиални и латерални срезове	37
5.3.2.3.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на линията, минаваща от началото до края на молекулярния слой на малък мозък в медиални и латерални срезове	38
5.3.2.3.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на линията, минаваща от началото до края на слоя на Пуркиние на медиални и латерални нива	38
5.3.2.4. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на различия в клетъчни популации.....	39
5.3.2.4.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на зърнести клетки в малък, медиални и латерални срезове	39
5.3.2.4.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на клетки на Пуркиние в малък мозък, медиални и латерални срезове.....	43
5.3.2.4.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на клетки на Голджи в малък мозък, медиални срезове.....	44
5.3.2.4.4. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на еднополярни четковидни клетки в малък мозък, медиални срезове....	45
5.3.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период П90- обзорни данни	45
5.3.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период E13,5.....	46

5.3.2.4.4. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период E13,5 -количествена оценка на Pax6 позитивни клетки в малък мозък.....	46
5.3.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6 ^{fl/fl} - времеви период E17,5.....	50
6. Дискусия	53
7. Заключение	60
7. Изводи	62
8. Приноси	63
9. Публикации и научни съобщения, свързани с дисертационния труд.....	64

Съкращения

Съкращения на кирилица

А	Адултни - възрастни
ГАМК-ергични	Гама аминокиселина – ергични
Глу-ергични	Глутамат-ергични
ДТ	Див тип
Е	Ембрионален ден
ЗС	Зърнест слой
ММЯ	Малкомозъчни ядра
НС	Нервна система
ПНС	периферна нервна система
П	Постнатален ден
РНК	Рибонуклеинова киселина
РУ	Ромбичната Устна
ТФ	Транскрипционните фактори
ЦНС	Централната нервна система

Съкращения на латиница

AZ	Anterior zone	Предна зона на малкомозъчните гънки
bHLH	Basic Helix-loop-helix	Основна Спирала-примка-спирала
BSA	Bovine serum albumin	Говежди серум
Cb PI	Cerebellar Plate	Малкомозъчна плочка
Chk	Chicken	Пиле
CN	Cerebellar nuclei	Малкомозъчни ядра
CZ	Central zone	Централна зона на малкомозъчните гънки
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-диамидино-2-фенилиндол
EBF2	Early B-cell factor 2	Ранен В-клетъчен фактор 2

EGL	External granular layer	Външен зърнест слой
FGF8	Fibroblast growth factor	Фибробластген растежен фактор 8
GC	Granule cells	Зърнести клетки
GL	Granule layer	Зърнест слой
GPig	Guinea pig	Морско свинче
Gt	Goat	Коза
HSP25	Heat shock protein 25	Топлинно шок протеин 25
IGL	Internal granular layer	Вършен зърнест слой
IsO	Istmic organizer	„Истмичен организатор“
KO	Knockout	Кнокаут
Mo	Mouse	Мишка
ML	Molecular layer	Молекулярен слой
mRNA	Micro Ribonucleic acid	Микро рибонуклеинова киселина
Nrgn	Neurogranin	Неврогранин
NTZ	Nuclear transitional zone	Ядрено транзиторна зона
NZ	Nodular zone	„Възлеста“ зона
PBS	Phosphate-buffered saline	Сиалин с фосфатен буфер
PCL	Purkinje cell layer	Слой на Пуркиние
PFA	Paraform Aldehyde	Параформалдехид
P	Postnatal day	Постнатален ден
Pcc	Purkinje cell cluster	“Група” от клетки на Пуркиние
Pcp	Purkinje cell plate	Плоча от клетки на Пуркиние
Ptf1a	Pancreas transcription factor 1a	Транскрипционен фактор на панкреаса 1a
PZ	Posterior zone	Задна зона
Rb	Rabbit	Зяек

ROI	Region of interest	Регион на интерес
RL	Rhombic lip	Ромбична устна
R	Rhombomere	Ромбомер
SHH	Sonic hedgehog	Растежен фактор – "Соник таралежът"
VZ	Ventricular Zone	Вентрикулна зона
WM	White matter	Бяло вещество

1. Увод

Малкият мозък е част от централната нервна система (ЦНС), чиято роля в регулацията на двигателните функции, е добре известна. Нервните клетки в малкия мозък са най-голямата популация от неврони на ЦНС. Молекулните механизми, участващи в образуването на тези неврони, представляват голям интерес за фундаменталната и транслационна невронаука, поради тяхното участие не само в регулацията на двигателните функции, но и във функции като някои видове памет и емоции.

Молекулите, които регулират образуването на малкия мозък, могат да се групират в 4 групи: 1) транскрипционни фактори, 2) сигнални молекули, 3) рецептори и 4) сигнални цитоплазмени трансдукционни пътища в клетката. Централна роля в тези процеси има генът *Rax6*, който кодира транскрипционен фактор (ТФ), свързващ се с ДНК на таргетни гени и индуциращ тяхната експресия. *Rax6* е ключов регулаторен протеин в клетките на бозайниците. Той се експресира в малкия мозък, клетките на булбус олфакториус, крайномозъчната кора, очната ябълка - в роговицата, лещата, ретината, в малкия мозък, гръбначния мозък и в панкреаса.

Rax6 има силна експресия в малкомозъчния зачатък, точно в прогениторна ниша, известна като “ромбичната устна”. Това е зоната, чиито прогенитори генерират глутаматергичните клетки (Глу-ергични): церебеларни клетъчни популации. Това са една част от клетките на малкомозъчните ядра и мнозинството от клетките на зърнестия слой и еднополярните четковидни клетки. При общ нокаут на гена за *Rax6*, мишките демонстрират недоразвити очни ябълки, дизморфичен малък мозък и при раждането умират. Това показва, че транскрипционният фактор *Rax6* е жизнено важен за нормалното развитие на организма, но в същото време перинаталната смъртност на общия *Rax6* нокаут пречи да се установи ролята на *Rax6* за процеси, които протичат след раждането, каквато е неврогенезата в малкия мозък.

Вродени нарушения в правилното формиране на малкия мозък водят до разстройства в неврологичното развитие, например разстройства от аутистичния спектър. От туморните заболявания, най-често засягащи малкия мозък, следва да се отбележи медулобластомът. Той е най-честият неврологичен тумор в детската възраст и се смята, че произхожда от прогениторите на зърнестите клетки на малкия мозък, които пролиферират най-вече постнатално.

Повишаването на знанията ни в областта на регулаторните механизми, благодарение на които се образува малкият мозък, би допринесло за разкриване на механизмите на тези заболявания, ефективното им лечение и усъвършенстването на клиничната неврология.

3. Цел и задачи

Целта на настоящият дисертационен труд е да установи морфологичните промени в малкия мозък на мишка, които са резултат от намалената доза на гена *Rax6*.

За изпълнението на тази цел формулирахме следните задачи:

1. Да получим тъкани от малък мозък от контролни животни (с нормална доза на *Rax6* гена) и мутанти с понижена такава експресия специфично в малкия мозък, което ги прави жизнеспособни постнатално, когато е времевият прозорец от интерес в настоящия дисертационен труд.

2. Да обработим хистологично малкомозъчни тъкани от контролни и мутантни церебелуми на различни времеви интервали: (i) постнатален ден 21 (P21; когато процесът на невrogenеза в малкия мозък е приключил); (ii) адултен стадий (1 година); (iii) пренатални стадии (ембрионален ден 13 и 17, E13/17; когато генетичните програми за церебеларна невrogenеза се активират).

3. Да приложим панел от клетъчни и молекулни маркери за невrogenеза и глиогенеза, които да демонстрират промените в малкия мозък при намалена доза на *Rax6*.

4. Да извършим количествени изчисления за промените в морфологията и клетъчния състав на малкия мозък при редукция на *Rax6*.

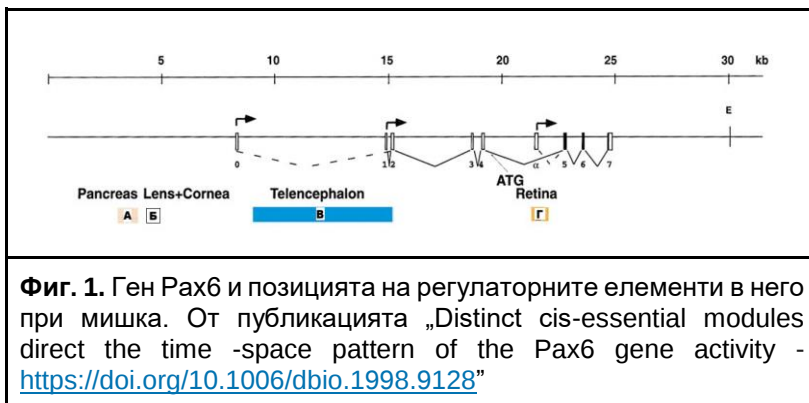
4. Материали и методи

4.1. Опитни животни

За да преодолеем перинаталната смъртност, характерна за глобалния нокаут на *Raxb*, в настоящото изследване използвахме специална трансгенна мишка линия, при която намаляването на *Raxb* се осъществява в ограничен брой тъкани, най-специфично в малкия мозък. Линията представлява кръстоска между две трансгенни линии:

4.1.1. Cre-рекомбиназа поставена зад регулаторен елемент “*Tel*”

Генетична линия, в генома на която е инкорпориран генът, кодиращ ензима Cre-рекомбиназа, зад регулаторен елемент на *Raxb* гена. Този регулаторен елемент се експресира силно в церебелума, но има ниска или нулева експресия в останалите части на мозъка и останалите органи (като панкреас), които нормално експресират *Raxb*. Както бе представено в литературния обзор, *Raxb* се експресира в различни зони при мишка - олфакторна луковица, роговица, леща, ретина, кората на главния мозък, малък мозък, гръбначен мозък и панкреас. Това е обосновка за много регулаторни елементи, зад който да бъде сложена Cre-рекомбиназата. Както знаем всеки от тях би поражда различно време и място (тъкан и клетки), в които да се експресира Cre-рекомбиназата. От литературата знаем, че генът за *Raxb* има 7 екзона. Преди 0-вият екзон има 4,6 kb регион, в който са налице два контролни елемента. Единият е 107 bp фрагмент, който е достатъчен за инициация на транскрипция на *Raxb* в очната леща, корнея и слъзната жлеза. Другият е по-дълъг - 1100 bp. Той инициира транскрипция на *Raxb* в панкреаса (Фиг. 1.).



Между екзон 0 и 1 /дължината, между които е 6,2 kb/ се намира регион с дължина 5 kb. В него е налице регулаторен елемент, който иницира транслацията в теленцефалона /задния мозък/, от който произлиза малкия мозък и гръбначния мозък. Между екзон 4 и 5, след екзон- α , се намира фрагмент с дължина 530 bp, който има регулаторни функции. Благодарение на него се иницира транслацията в ретината. От всички тези регулаторни места за гена на Pax6 има експресия в малкия мозък, когато Cre-рекомбиназата е поставена зад регулаторния елемент между екзон 0 и 1. Линията е обозначена като “Tel-Cre” или „Pax6-Cre”.

4.1.2. Миши линии Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} и Tel-Cre::Rosa26

Генетична линия, при която около ключови за функцията екзони от Pax6 гена са поставени т.нар flox-секвенции, е наречена Pax6^{fl/fl} генетична линия. При кръстосването на Tel-Cre с Pax6^{fl/fl}, получените двойно-трансгенни мутанти (Tel-Cre::Pax6^{fl/fl}) проявяват редукция на Pax6, но само в анатомичните локализации на активност на Tel-Cre, на първо място в церебелума.

Следователно мишките от линията Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} са мишки с “условен нокаут” на гена Pax6. Мишките са отгледани и генотипизирани от департамента по молекулярна клетъчна биология на в Макс Планк Институт по Биофизична Химия, Гьотинген, Германия, в

съответствие с етичните разпоредби на провинция Долна Саксония, Германия.

За да проверим дали мишките от линията Tel-Cre експресират Cre-рекомбиназа в специфична анатомична локализация (малък мозък), кръстосахме тази линия с т.нар. репортерна линия Rosa26-LacZ, която инициира ектопична експресия на ензима бета-галактозидаза, кодиран от гена LacZ, в клетките, в които Cre успешно изрязва flox-секвенциите. Тъй като LacZ нормално не се експресира в клетките на бозайниците, наличие на ензима бета-галактозидаза в дадена клетка се приема като доказателство, че Cre под контрола на даден регулаторен елемент (в случая Tel-Cre) е в състояние да изреже flox-секвенциите в тази клетка. Целта на изследването създадохме линията Tel-Cre::Rosa26, в която изследвахме чрез хистохимия или имунохистохимия локализацията на клетките, експресиращи бета-галактозидаза. Контролни мишки на линиите Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} и Tel-Cre::Rosa26 са мишки без генетични промени.

4.2. Добиване и обработване на тъканите

След анестезия, мишките са перфузирани с 4% разтвор на параформалдехид. За да бъде извършена перфузията беше направен разрез по средната линия, започващ от incisura jugularis и достигащ symphysis pubica. Сърцето беше отпрепарирано от стернума и белите дробове. Чрез достъп през стената на лява камера, игла беше поставена в aorta ascendens. Дясното предсърдие беше разрязано с цел дрениране на кръвта на опитното животно. Перфузията беше прекратена, когато черният дроб загуби нормалното си тъмно оцветяване и доби сив вид, индикативно за обезкървяването му.

След фиксацията продължихме с отпрепарирането на мозъците на мишките, като прерязахме кожата в срединната линия в областта на черепа и я отпрепарирахме от него. С пинцетите премахнахме тъпо тилната, теменната, челната кост, както и части на слепоочната кост - нейната люспа. Премахнахме с

твърдата мозъчна обвивка и всички черепномозъчни нерви, след което мозъкът бе екстрахиран от черепната кухина.

Екстрахираните мозъци бяха измити в 4°C PBS буфер и фиксирани за 12 - 16 часа в разтвор на PFA - 4%. След това беше направена криопротекция, както следва: фиксираните мозъци бяха поставени в 15% сукроза, след като тъканта потъна на дъното на съда последната беше преместена в 25% разтвор на сукроза. Когато криопротекцията беше завършена, тъканта беше извадена и включена в среда за замразени срези - Optimal Cutting Temperature (OCT).

Нарязвахме тъканите на замразяващ микротом с дебелина на среза - 18 μm . Срезите монтирахме върху адхезивни предметни стъкла, (Superfrost™ Plus) размерите на които бяха стандартни. Изготвените срезове оставихме за 24 часа на стайна температура, за да се дехидратират, и по-късно преместихме на -20°C за дългосрочно съхранение.

4.3. Имунохистохимия

При имунохистохимията с алкална фосфатаза стартирахме с:

1. Темперирание на тъканните препарати и реагентите. Последните бяха поставени от съответно -20°C и 4°C на стайна температура за 30 мин. Последва:
2. Промивка в разтвор на PBS 3x5 мин.
3. Антигенно възстановяване: поставихме препаратите в PT module за 5 мин. на 96 °C и охладихме след това до стайна температура.
4. Промихме отново в PBS 3x5 мин.
5. Подготвихме за оцветяване тъканите като ги оградихме с хидрофобен PAP реп, полагащ восьъчен филм, който е полезен за ограничаване на зоната за оцветяване и използване на по-малки количества от антигела. Продължихме:
6. Антигенен блок за 1 час с разтвор с 10% PBS/BSA (bovine serum albumin) и инкубиране за 12 до 16 часа на 4°C.

7. Втори антигенен блок с H_2O_2 3x5 мин. за предотвратяване на ендогенната ензимна активност. Продължихме:
8. Маркирахме с първично антитяло за 22- 24 часа (overnight).
9. Промихме в PBS 3x5 мин. за премахване на излишното количество първично антитяло
10. Маркирахме тъканите с вторично антитяло за 2 часа.
11. Промихме в PBS 3x5 мин. за премахване на излишното количество вторично антитяло.Приложихме:
12. Субстрата за 2-3 мин.
13. Промихме в PBS 3x5 мин. за премахване на излишното количество DAPI.
14. Поставихме покривна среда и монтирахме покривните стъкла.

4.4. Имунофлуоресценция

При имунофлуоресцентното “оцветяване” започнахме с:

1. Темперирание на тъканните препарати и реагентите. Последните бяха поставени от -20°C и 4°C на стайна температура за 30 мин. Последва:
2. Промиване в разтвор на PBS, 3x5 мин;
3. Антигенно възстановяване - поставихме препаратите в PT module за 5 мин. на 96°C и охладихме до стайна температура.
4. Промиване в PBS 3x5 мин.
5. Подготовка за оцветяване - тъканите бяха обградени с хидрофобен PAP rep, полагащ въсъчен филм, който ограничава зоната за оцветяване и намалява количествата от използваните антитела.
Продължихме с:
6. Антигенен блок за 1 час с разтвор с 10% PBS/BSA (bovine serum albumin) и инкубиране за 12 до 16 часа на 4°C .
7. Маркиране с първично антитяло за 22- 24 часа на 4°C ;
8. Промиване в PBS 3x5 мин. на тъканите за премахване на излишното количество първично антитяло

9. Маркиране на тъканите с вторично анти тяло, което свързва първичното. Поставяне на препарата за 2 часа на стайна температура.
10. Промиваме в PBS 3x5 мин. за премахване на излишното количество вторично анти тяло.
11. Повторихме стъпка 7, 8, 9 и 10 два или три пъти в зависимост от броя на каналите (2 или 3), в които флуоресцират препаратите. Като последно канал (трети или четвърти) добавихме
12. DAPI - маркиращ ядрата на клетки в м-фаза от клетъчния им цикъл.
13. Промиване в PBS 3x5 мин.
14. Покривна среда и монтиране на покривните стъкла.

За направата на основния буфер, с който промивахме препаратите, използвахме PBS под формата на таблетки, които директно разтваряхме в дестилирана вода. Антителата бяха разтворени в NGS/PBS. При имунофлуоресценция на ядрени белтъци към разтворите за антителата беше добавен и 1% разтвор на Triton с цел пермеабилзация на клетъчните и ядрени мембрани и последващо по-лесно проникване на антителата в ядрото. Също така инкубацията с първичните антитела беше предшествана с препермеабилзация с 1% разтвор на Triton в PBS. При този произход на първичното анти тяло, стъпките включващи NGS бяха пропуснати и антителата бяха разтворени в PBS/BSA, с цел да се избегне крос реакция.

4.5. Заснемане на изготвените микроскопски препарати

4.5.1. Светлинна микроскопия

Единични светлинно-микроскопски образи бяха заснети на Zeiss Axio Imager.Z2. Микроскопа е пригоден за сканиране на препарати с голяма повърхност чрез заснемане тип мозайка. Това е възможно благодарение на неговата моторизирана масичка и софтуер към него (Axiovision), които е снабден с модул за автофокус. Последния позволява по-консистентно фокусиране на отделните части от образите на препаратите при тяхна по-

голяма обща повърхност или наличие на малки топологични неравности. При изготвянето на светлинно микроскопските микрографии използвахме цветна камера MRc. Алгоритъма на работа беше следния:

1. Почистване на препаратите с ксилол;
2. Задаване на източник на светлина 3200K;
3. Осигуряване на последваща равномерност на осветяването за всеки от препаратите по Köller;
4. Премахване на артефакти от осветяването идващи от източника, предметното и покривното стъкло или оптичната система на микроскопа чрез опцията "shading correction" на Axiovision;
5. Задаване на времето за експозиция, така че хистограмата да се разгърне на 80% без да се предизвиква изрязване на сигнал;
6. Балансиране на белия цвят с вградената опция "interactive white balance" модула на Axiovision;
7. Поставяне на автоматични фокус точки с цел по-добре фокусирани микрографии от автоматичния фокус в софтуера Axiovision;
8. Правилно позициониране на контурите на микрографията спрямо препарата.

Файловете, които запазихме бяха във формат ".zvi"(Zeiss vision image), с цел да работим върху микрографиите и на други програми, бяха експортирани във формати - ".tiff" (Tag Image File Format) или ".png"(portable image file). Тези файлове за изображения са без загуба при компресията си (няма влошаване на качеството на изображението), затова ползваме тях. JPEG (Joint Photographic Experts Group) формата е със загуба при компресията си (има влошаване на качеството на изображението) и заради това не използваме него.

За сериини срези ползвахме по-стар модел на системата Aperio CS2, който се намира в катедрата по клинична анатомия в МБАЛ "Св. Марина". Алгоритъма на работа беше следния:

1. Предварително почистване с ксилол на препаратите;

2. Подреждането на препаратите в касети. Микроскопа автоматично може да заснеме до 100 препарата намиращи се в касетите;

3. Задаване в софтуера за всяко предметно стъкло на зоната, която да бъде заснета от микроскопа;

4. Автоматично сканиране от микроскопската система.

Софтуерната програма запазва микрографиите в “.svs” (slide and viewable storage) файлов формат. За да визуализираме последни файлове използваме безплатен софтуер - Aperio Image scope. От последните изображения с функцията на компютъра “print screen” поставяме запазеният образ в изображение отворено с софтуерната програма “Paint”. Там поставяме заснетата екранна снимка, модулитраме контурите ѝ и я запазваме в “.tiff” или “.png” формат.

4.5.2. Имунофлуоресцентна микроскопия

Част от образите бяха заснети на Zeiss Axio Imager.Z2. Този път за добиване на по-добри образи, поради слабия сигнал при имунофлуоресценцията, използвахме по-високочувствителна монохромна камера MRm. Тя заснема образите в сивата скала, но на следваща стъпка дигитално добавяме цвят към различните канали /виж по долу/. Алгоритъма на работа беше следния:

1. Почистване на препаратите със спирт;
2. Избиране на фокусната равнина спрямо DAPI канала;
3. Задаване на фокусния „offset” за останалите канали спрямо DAPI;
4. Задаване на времето за експозиция на всички използвани флуоресцентни канали, така че хистограмата да се разгърне на 80%, без да се предизвиква изрязване на сигнала;
5. Поставяне на автоматични фокус точки с цел по-добре фокусирани микрографии от автоматичния фокус в софтуера Axiovision.

Част от микрографиите, които ползваме, са заснети от проф. Тончев в Гьотинген, Германия на конфокален микроскоп AF6000 fluorescence microscope system с камера DFC 350 FX R2 с подобен алгоритъм при заснемането им.

Заснетите микрографии са запазени във формат “.lif” (leica image file). В един такъв файл може да има повече от един образ на един и същ или различни микроскопски препарати. През функцията експорт избираме експортирането им в “.tiff. Така за всеки от флуоресцентните канали ще е налице отделно изображение, но изображението ще е в сивата скала.

4.6. Оценка на количеството на заснетите данни

4.6.1. Оценка на количеството на морфометричните данни

4.6.1.1.Оценка на количеството на разликите в площта

За оценка на количеството на разликите в площта между мишките в контролните групи и мутантите с понижени нива на ТФ Рах6, използвахме софтуерната програма Fiji Image J 1.54p Java 20.0.1 (64-bit). Постигането на тази цел стана в няколко стъпки. 1.Отваряне на файловете на микрографиите; 2.Задаване контраста и яркостта; 3. Избиране на четвъртия активен бутон на програмата “Freehand selections”. С него маркираме грубо площта на целия мозък (кората на мозъка, бялото вещество, молекулярния слой, зърнестия слой, дълбоките ядра (на ниво латерални срезове)). Отбелязаната селекция с площта се записва в “ROI manager” като и се именува.

На следващ етап с десен бутон на мишката избираме втория бутон в програмата. От появилото се падащо меню избираме опцията “Selection Brush Tool”. С двоен клик на левия бутон на мишката върху същия активен бутон се появява меню, което ни позволява да избираме големината на “четката”, с която да разширяваме площта предварително селектирана в предната стъпка.

Промените се запазват в “ROI manager. Когато приключим с всички измервания калибрираме програмата - колко микрометра отговарят на един пиксел. В нашия случай не се налага, защото файловете на микрографиите имат тези данни в тях. Използвайки комбинацията Ctrl+M, която ни показва площта на селектирания регион в “ROI

manager”, можем да разберем площта на целия мозък (кората на мозъка, бялото вещество, молекулярния слой, зърнестия слой, дълбоките ядра (на ниво латерални срезове).

4.6.1.2. Оценка на количеството на разликите в дебелината

За да оценим количеството на разликите в дебелината на кората (молекулярния, зърнестия слой) на малкия мозък, използваме файловете на микрографиите и вече готовите селекции в “ROI manager” от предната стъпка. След това превръщаме зоните с площта в маски, чрез менюто (Edit/selection/ Create Mask). За по-точна дебелина на маските на площта използваме линия, която минава приблизително през средата на слоя, на който ще мерим дебелината. Дължината правим, като използваме петия активен бутон на програмата “Segmented Line”. Когато е активен, кликаме с ляв бутон на мишката приблизително в средата на слоя. Всеки клик е съединен с линия. Използвайки менюто Analyze/Local Thickness/Local Thickness (masked, calibrated, silent), програмата генерира нов образ тип “топлинна карта”. Колкото по бяло/жълт е цвета на слоя толкова е по-близо е той до максималната засечена. Колкото по тъмно/лилав е цвета, толкова повече дебелината се доближава до 0 микрометра. Отново използваме комбинацията Ctrl+M за всяка една от линиите, които предварително сме запазили в „ROI Manager“. По този начин програмата ни показва средната дебелина на кората.

4.6.1.3. Количествена оценка на разликите в дължината

Отново измерванията започват с зареждане на файловете на микрографиите и задаване на яркостта и контраста за по-ясно отграничаване на слоевете в изображенията. Както описахме в предната част, намираме дължината на слоя на Пуркиние, молекулярния и зърнестия слой, като използваме петия активен бутон “Segmented line”.

ВАРИАНТ 1. Когато измерваме слоя на Пуркиние кликаме левия бутон на мишката в средата на всяка клетка на Пуркиние, а когато измерваме зърнестия и молекулярния слой се стремим линията да минава през неговата среда. Всяко едно измерване запазваме в “ROI Manager” и посредством Ctrl+M разбираме дължината на линията при калибрирана скала.

ВАРИАНТ 2. Автоматично измерване на дължината на кората, зърнестия и молекулярния слой можем да направим по следния начин: зареждаме файловете на микрографиите, задаваме яркостта и контраста и зареждаме площите в “ROI Manager”, продължаваме с генерирането на дигитални маски от площите. Следва използване функционалността “Skeletonize” намираща се в Менюто Plugins/Skeleton/Skeletonize (2D/3D). През менюто Edit/Selection/Create selection генерираната линия може да се запази в “ROI Manager” и да бъде обработвана. На следваща стъпка увеличаваме изображението 32 пъти и избираме петия активен бутон “Segmented line”. Започваме да кликаме с левия бутон на мишката по автоматичната линия, която е с дебелина един пиксел. Всичките данни запазваме в “ROI Manager” и посредством Ctrl+M разбираме дължината на линията при калибрирана скала.

4.6.1. Количествена оценка на разликите в броя на клетките

За да определим разликата в броя на клетки между мишките от контролните и репортерните/мутантните групи (Pax6(Tel)-Cre::Rosa26/Tel Cre: Pax6^{fl/f}), използвахме софтуера – Fiji Image J 1.54p Java 20.0.1 (64-bit). Заредихме в програмата запазените “.tiff/.png” файлове съответно на каналите DAPI + тези които изброяваме (Pax6, Tbr2 и др.). Стартирахме и “Color histogram” - (Ctrl+Shift+C), на която зададохме яркостта и контраста. По този начин постигнахме по-ясно и отчетливо изображение. Ползвахме и софтуерната приставка “Windows Sync” . Тя превръща курсора ни в “маркер - под формата на кръст”, който едновременно показва на двете снимки едни и същи координати. По този начин, докато броим маркери, лесно

отграничаваме дали клетките са едновременно положителни за анализирания маркер, но и за DAPI - сигнализиращ наличие на ядро. Само двойно положителни (за специфичния маркер и за DAPI) клетки се броят и участват в статистическите измервания.

В двойките контрола - мутант (Tel Cre: Pax6^{fl/fl} - понижени нива на ТФ Pax6) преброяваме всички клетки на препарат, докато в двойката контрола/репортер (Pax6(Tel)-Cre::Rosa26) броим в рамки 300 на 100 μm . По правило, за да се избегне свръхброене, в рамките бяха избрани две страни в постоянна зависимост с топологията на тъканта и пресечните им клетки бяха включени в изброяването, а другите две - изключени. За преброяването на клетките използвахме „ROI manager“, който стартираме от менюто: „Analyze-> Tools -> ROI Manager. В него може да броим много и различни категории клетки, като различаването помежду им става, чрез различно наименование на категориите в „ROI manager“. За да броим клетките, използваме и софтуерната приставка „Multi count“, като настройваме програмата да огражда клетките с голям кръг. По този начин, маркирането на положителните клетки не пречи да виждаме интензитета на тяхното светене. Така се предпазваме от свръхброене на слабо интензивно оцветени клетки.

5. Резултати

5.1. Нормална експресия на Pax6 в развиващ се и завършил развитието си малък мозък.

На Фиг. 5.1. - 5.4. показваме нормалната експресия, така както е представена в публичните бази данни за *in situ* експресия на генома на мишка в тъканни срезове от мозък: това са базата данни на Allen brain atlas (<https://mouse.brain-map.org>) и базата данни GenePaint (<https://gp3.mpg.de/>). Тези бази данни са направени публично достъпни за изследователите. В тях се съдържа експресията на повечето или всички кодиращи гени от генома на мишката в мозъчни срезове по време на различни времеви интервали от развитието на мишката: E10.5 (ембрионален ден 10.5), E14.5, E15.5, P4 (постнатален ден 4), P10, P14, P56 Оцветяванията са направени чрез *in situ* хибридизация и са достъпни като виртуален интерактивен атлас. В тях с по-интензивно тъмен цвят се забелязва нормалната експресия на TF Pax6. По време на E 10,5, не се забелязва ясно зачатъкът на малкия мозък, който трябва да се намира в ромбичният мозък (Rh) като задебеление на епитела под неговото стеснение.

На стадий E13,5 и E15,5 се забелязва ясно зачатъка на малкия мозък (CB) каудално спрямо средния мозък (Mes) и над започващият от неговият връх хороиден плексус (Chor. Pl.). По време на този времеви период забелязваме, че горната ромбична устна (RL), роstralният миграторен поток (RMS) и ядрено-транзиторната зона (NTZ), са изпълнени с клетки позитивни за iPHK за TF Pax6.

На P4, P10 и P14 откриваме малкия мозък, по който вече се забелязват малкомозъчните гънки. Отново по-интензивно оцветени са зоните, позитивни за TF Pax6 - вътрешния и външния зърнест слой (EGL/IGL), като в молекулярния слой (ML), слоя на пуркинии (PCL) и бялото вещество (WM) не се забелязва такова интензивно оцветяване - липса на Pax6 позитивни клетки. Трябва да се отбележи, че по време на P4 IGL е по-силно положителен за Pax6, отколкото EGL. На P10 и P14 тази тенденция се

обръща, поради миграция на клетките от външния (EGL) във вътрешния зърнест слой (IGL).

По време на П 56 се забелязва, че неврогенезата е завършила. Всички клетки от външния зърнест слой (ембрионален) са емигрирали във вътрешния зърнест слой. По този начин кората на малкия мозък става от четири слойна - трислойна, като външния зърнест слой изчезва. Тези промени се забелязват и в медиални, и в латерални срезове през кората на церебелума.

5.2. Данни от миша линия Pax6(Tel)-Cre::Rosa26 - репортерна линия.

За да бъдем сигурни дали Cre-рекомбиназата (ензим от генома на бактериофаг, чиято цел е да инактивира таргетния ген Pax6) се експресира в същите зони, в които има нормална експресия Pax6, изследвахме експресията на Cre в репортерната миша линия - Pax6(Tel)-Cre::Rosa26. При тази линия няма инактивация на Pax6 (т.е. има нормална морфология на мозъка), но се визуализират клетките, в които Cre е активна, тъй като в тези клетки се отключва експресията на ген-репортер, например бета-галактозидаза (LacZ). Тъй като LacZ не се експресира нормално в мозъка на бозайниците, наличието на данни за експресия посредством оцветяване за LacZ (чрез хистохимия) означава, че Cre работи в клетките, позитивни за LacZ. Другият миши щам-репортер (Z/AP) представлява линия, в чиито геном намесата на Cre замества LacZ с ензима алкална фосфатаза (AP), който след това се визуализира чрез хистохимия. За да проверим в кои зони на мозъка се експресират LacZ и AP, използвахме срези в различни времеви интервали: E16.5, P10 за AP и E13.5, P7 за LacZ (Фиг. 5.2.1 - 5.2.4.). При сравнение на нашите микрографии със микрографиите взети от Allen Brain Atlas и GenePaint се забелязва, че на E13.5 и E16.5. Експресията на Cre-рекомбиназа и тези на Pax6 съвпадат като зони. А именно в горната ромбичната устна (RL), роstralният миграторен поток (RMS) и ядрено-транзиторната зона (NTZ).

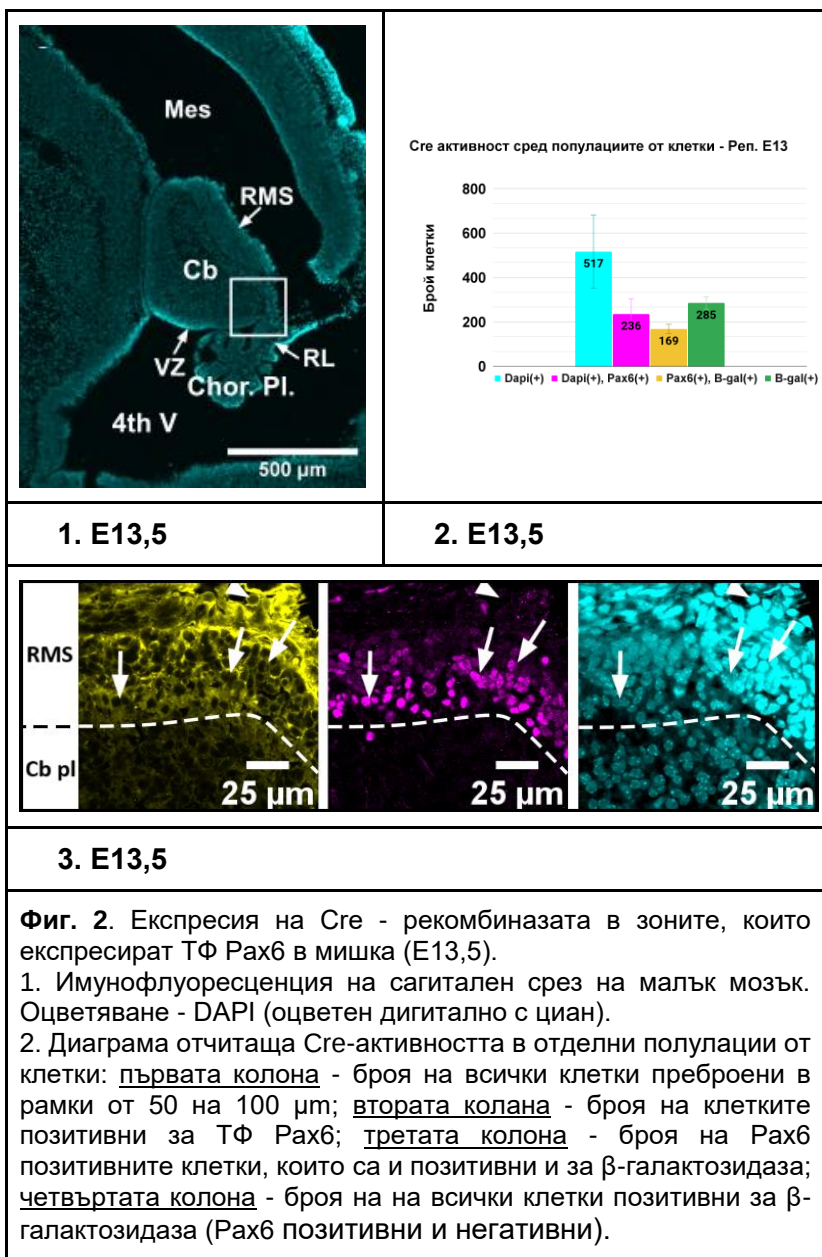
При сравнението между репортера и контролните мишки на П7 и П10 се вижда отново съвпадането на зоните, в които се експресира Cre-рекомбиназата и Рах6 позитивните клетки - във вътрешния и външния зърнест слой (EGL), (IGL).

На Фиг. 2.1. е обзорна имунофлуоресцентна микрография на малък мозък на E13,5 хистохимия за DAPI, маркер за всички ядра (клетки) на тъканния срез. Забелязва се зона на интерес, отбелязана в незапълнен квадрат с бял контур: малкия мозък с основните прогениторни зони - вентрикулна зона (VZ), ромбична устна (RL) и произлизащият от нея роstralен миграторен поток (RMS). На Фиг. 2.3. е представена зоната на интерес, която изобразява роstralния миграторен поток (RMS) и под него малкомозъчната плочка (Cb Pl), чрез 3 канала. Първия е DAPI (циан), вторият е Alexa Fluor 488 - дигитално оцветен с жълт цвят, който визуализира самия ензим β -галактозидаза. Тази ензимна активност се проявява само при условие, че има работеща активно Cre-рекомбиназа. С други думи, когато цитоплазмата на клетките е изпълнена с ензима, можем да бъдем сигурни, че има активна Cre-рекомбиназа. Последният канал Rhodamine, дигитално оцветен с цвят магента, маркира ядрената експресия на ТФ Рах6. Стрелките показват тройно позитивни клетки - DAPI, β -gal, Рах6 и двойно позитивни - DAPI, β -gal. От стълбчестата диаграма на фиг. 2.2. откриваме, че от първата колона клетките средно са 517 ± 165 . От тях 46,03% или 236 ± 69 кл. са позитивни за ТФ Рах6, (сравнявайки втората колона към първата). От всичките 236 ± 69 кл. Рах6 позитивните клетки около 60,76% или 169 ± 21 кл. са позитивни и за β -галактозидаза и (сравнявайки трета колона към втората). Последната колона представя, че всички клетки позитивни за β -галактозидаза са 285 ± 28 и от тях 59,08% или 169 ± 21 клетки са позитивни за Рах6 (сравнявайки третата колона към четвъртата).

Фиг. 3.1. е обзорна имунофлуоресцентна микрография на малък мозък на П6, заснета на Dapi канала, дигитално оцветена с циан. Забелязват се зона на интерес -

отбелязана в незапълнен квадрат с бял контур, малкомозъчните гънки и четирислойната им кора с външен зърнест и вътрешен зърнест слой (EGL, IGL) и между тях молекулярния слой (ML) и слоя на Пуркиние (PCL). (Фиг. 3.3.) е представена зоната на интерес, която изобразява външния зърнест слой (EGL) и подлежащият под него молекулярен слой (ML), чрез 3 канала. Първият е DAPI - дигитално оцветен с цвят циан. DAPI бележи ядрата на клетки в М-фаза. Вторият е Alexa 488 - дигитално оцветен с жълт цвят. На него виждаме натрупването в цитоплазмата β -галактозидаза (β -gal). Тази ензимна активност се проявява само при условие, че има работеща активно Cre-рекомбиназа. На последния канал Rhodamine -дигитално оцветен с цвят магента, се маркират ядрения ТФ Рах6.

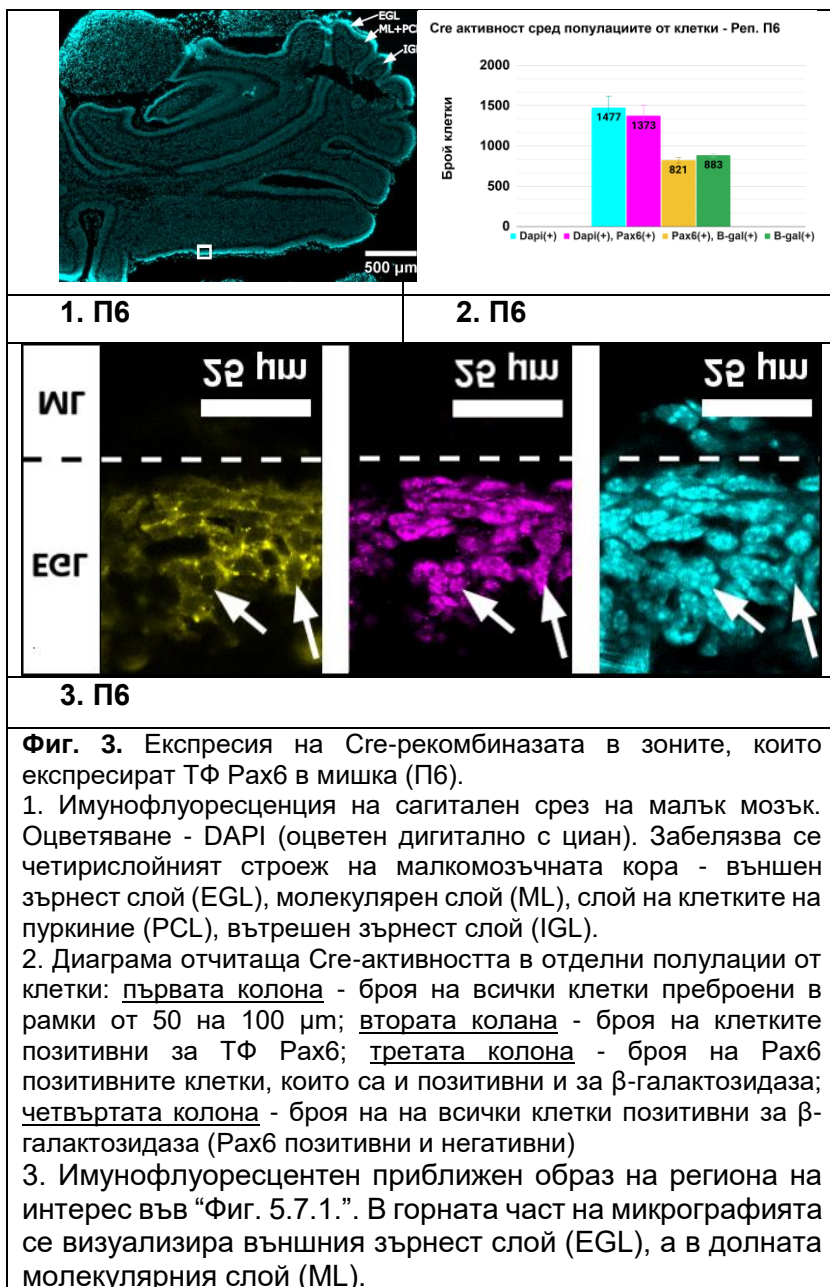
Стрелките показват тройно позитивни клетки - DAPI, β -gal, Рах6. Стълбчеста диаграма на Фиг. 3.2. визуализираща, че от първата колона клетките средно са 963 ± 92 . От тях 92,87% или 895 ± 88 кл. са позитивни за ТФ Рах6 (сравняваме втора колона към първа). От всичките 895 Рах6 позитивните клетки около 60,76% или 542 ± 23 кл. са позитивни и за β -галактозидаза (сравнявайки трета колона към втора). Последната колона представя, че всички клетки позитивни за β -галактозидаза са 586 ± 13 и от тях 92,55% или 542 ± 23 кл. са позитивни за Рах6 (сравняваме трета колона към четвърта).



Фиг. 2. Експресия на Cre - рекомбиназата в зоните, които експресират ТФ Pax6 в мишка (E13,5).

3. Имунофлуоресцентен приближен образ на региона на интерес от "1." Горната част на микрографията се визуализира роstralния миграторен поток (RMS), а в долната - малкомозъчната плочка (Cb Pl). Използвани 3 канала - FITZ (дигитално оцветен с зелено) - клетки позитивни за β -галактозидаза (β -gal); Rhodamine (дигитално оцветен с магента) - ядра позитивни за ТФ Pax6, DAPI (дигитално оцветен с циан) - всички ядра в М-фаза. Целите стрелки изобразяват клетки позитивни за DAPI, Pax6, β -gal, докато върховете на стрелките - DAPI, β -gal позитивни клетки.

Mes - mesencephalon, RL - rhombic lip, RMS - rostral migratory stream, VZ - ventricular zone, 4th V - fourth ventricle, Chor. Pl. - choroid plexus, Cb Pl - cerebellar plate.



Фиг. 3. Експресия на Cre-рекомбиназата в зоните, които експресират ТФ Pax6 в мишка (П6).

Използвани 3 канала - FITZ (дигитално оцветен с зелено) - клетки позитивни за β -галактозидаза (β -gal); Rhodamine (дигитално оцветен с магента) - ядра позитивни за ТФ Pax6, DAPI (дигитално оцветен с циан) - всички ядра в М-фаза. Целите стрелки изобразяват клетки позитивни за DAPI, Pax6, β -gal.

Mes - Mesencephalon, Cb - Cerebellum, RL - Rhombic lip, RMS - rostral migratory stream, VZ - Ventricular zone, 4th V - fourth ventricle, Chor. Pl. - Choroid plexus, EGL - external granular layer, ML - Molecular layer, PCL - purkinje cell layer, IGL - internal granular layer. β -gal - β -Галактозидаза, Cb Pl - Cerebellar Plate

5.3. Данни от трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - намалени нива на гена Pax6

След като установихме в репортерните мишки на стадии от развитието E13,5 и П6, че Cre- рекомбиназа успешно работи в зоните на физиологична експресия на Pax6, съответно в ембрионалните [ромбична устна (RL), роstralен миграторен поток (RMS), ядрено-транзиторната зона (NTZ)] и постнаталните [външния зърнест слой (EGL) и вътрешния зърнест слой (IGL)], ние потвърдихме, че използването на двойната трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} ще постигне понижена продукция на Pax6 в малкия мозък. Нашите, изчисления показват, че на стадии E13,5 и П6 съответно 75% и 61% от всички Pax6-позитивни клетки експресират активна Cre-рекомбиназа, което означава, че в двойните Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} мутанти намаляването на нивата на Pax6 ще е достатъчно за постигане на фенотипна изява.

5.3.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период П21- обзорни данни от площта на малкия мозък и четвърти вентрикул

За да установим дали освен на теория и на практика има такава фенотипна изява, използвахме мозъци добити по време на П21 от мишки на контролната и мутантната група. Още при макроскопско наблюдение на малкия мозък на мутантите се забелязва по-малката им площ, спрямо мишките от контролната група. Допълнително използвахме

медиални и латерални сагитални разреза на мозъци монтирани на предметни стъкла, които последващо оцветихме с крезил виолет и заснехме с по-стария модел на системата Aperio CS2. На микроснимките се забелязва намалената площ на малкия мозък на мутантите спрямо контролните мишки, както на ниво срединни срезове, така и на ниво странични срезове.

Допълнително откриваме и повишената повърхност на четвърто мозъчно стомахче в мутантите спрямо контролните мишки, отново на ниво срединни срезове, така и на ниво странични срезове.

След като доказахме “фенотипно проявление” в мутантната група - намалената площ на малкия мозък и увеличена площ на четвърто малко мозъчно стомахче, спрямо контролната група, продължихме с количествена оценка на наблюдавания феноти - колко мм² и колко процента по-малък е мозъкът в мутантите спрямо мозъка на контролните мишки. Като първа задача изследвахме медиалните срезове на P21.

За целта изготвихме 12µm срединни (медиални) и латерални срезове от контролни и мутантни мишки, които последващо оналедихме с маркерите NeuN и DAPI , съответно маркиращи ядрата на млади неврони и ядрата на всички клетъчни популации в М-фаза от своя клетъчен цикъл. Тъй като клетките в ЗС са гъсто разположени, можем да го отграничим от съседните слоеве, в които морфологично се намират на значително по-голямо разстояние едни от други. Допълнително за по-голяма яснота отдиференцирахме ЗС от по-външния спрямо него - слой на Пуркиние, ползвайки антителата Calbindin/Parvalbumin. Тези маркери бележат телата на клетките на Пуркиние. Също така разграничаваме ЗС и от по-вътрешния слой спрямо него - бялото вещество отново, чрез антителата Parvalbumin/Calbindin/Neurofilament, онагледяващи аксони съставлящи бялото вещество.

Заснемането на препаратите се осъществи с микроскоп Axio Imager Z2 Zeiss и камера AxioCam MRm и система AxioVisioner.

На базата на микрографиите извършихме последващото очертаване на площта с програмата Fiji Image J 1.54p Java 20.0.1 (64-bit).

5.3.2.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на площ.

Извършихме измерване на следните площи, на медиални и латерални малкомозъчни срезове:

1. на целия малък мозък;
2. на кората;
3. на бялото вещество;
4. на зърнестия слой;
5. на молекулярния слой.

5.3.2.1.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на площта на “целия” малък мозък в медиални и латерални срезове

Изготвихме дигитални маски на базата, на които количествено оценихме разликата в площта на “целия” малък мозък (вкл. всички слоеве на кората, бялото вещество и малкомозъчните ядра) между контролните и мутантните мишки.

Открихме, че площта на целия малък мозък в медиалните срезове на контролните мишки е средно $8,029 \pm 0,361 \text{ мм}^2$, а в мутантните - $4,582 \pm 0,119 \text{ мм}^2$. Ако приемем площта в контролата за 100%, то площта на мутанта е само $57,13\% \pm 02,16\%$ или има спад в площта от 42,87%. Статистическата зависимост доказахме с Т-тест, в който $p < 0.001$.

На следващ етап, минавайки през същите стъпки (на създаване на препарати, заснемане и очертаване на площ), продължихме с количествена оценка на разликата в площта на целия малък мозък между контролните и мутантните мишки на ниво латералните срезове.

Открихме, че площта на целия малък мозък в латералните срезове на контролните мишки е средно $5,151 \pm 0,255 \text{ мм}^2$, а в мутантните - $3,567 \pm 0,432 \text{ мм}^2$. Ако приемем площта в контролата за 100%, то площта на мутанта е само

69,12% $\pm$ 05,46% или има спад в площта от 30,88% ($p < 0.001$).

5.3.2.1.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на площта на кората на малък мозък в медиални и латерални срезове

След като установихме, че малкия мозък е с по-малка площ, решихме да установим дали това е за сметка на бялото вещество или кората - двата елемента, които изграждат мозъка. Предположихме, че трябва да е за сметка на площта на кората, защото в нея се намират зърнестите и еднополярните четковидни клетки, по точно техните тела, дендрити и аксони. Последните клетки съставляват около 80% от невроналната популация в ЦНС. Използвайки микрографиите на медиалните срезове и методите на програмата "ImageJ" очертахме кората на мозъка в мишките от контролната и мутантната група. Затова продължихме с количествена оценка на разликата в площта на кората на малкия мозък между контролните и мутантните мишки на ниво медиални и латералните срезове.

Открехме, че площта на кората на малък мозък в медиалните срезове на контролните мишки е средно 7,568 $\pm$ 0,342 мм², а в мутантните - 4,167 $\pm$ 0,089 мм². Ако приемем площта в контролата за 100%, то площта на мутанта е само 55,12% $\pm$ 02,15% или има спад в площта от 44,88% ($p < 0.001$).

Открехме, че площта на кората на малък мозък в латералните срезове на контролните мишки е средно 4,414 $\pm$ 0,252 мм², а в мутантните - 2,985 $\pm$ 0,334 мм². Ако приемем площта в контролата за 100%, то площта на мутанта е само 67,52% $\pm$ 04,41% или има спад в площта от 32,48 ($p < 0.001$).

5.3.1.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на площта на бялото вещество на малък мозък в медиални и латерални срезове

След като установихме, че кората на малкия мозък е с по-малка площ, решихме да проверим дали бялото

вещество остава с непроменена площ. Предположението ни беше, че площта му трябва да остане непроменена, тъй като аксоните, телата и дендритите на зърнестите и еднополярните четковидни клетки се намират в слоевете на кората. Отново използвахме микрографиите на медиалните срезове и методите на програмата "ImageJ". Този път очертахме бялото вещество на мозъка в мишките от контролната и мутантната група.

Открехме, че площта на бялото вещество на малък мозък в медиалните срезове на контролните мишки е средно $0,465 \pm 0,037 \text{ mm}^2$, а в мутантните - $0,396 \pm 0,003 \text{ mm}^2$. Ако приемем площта в контролата за 100%, то площта на мутанта е $85,51\% \pm 06,68\%$ или има спад в площта от 14,49% ($p < 0.05$).

Открехме, че площта на бялото вещество на малък мозък в латералните срезове на контролните мишки е средно $0,737 \pm 0,037 \text{ mm}^2$, а в мутантните - $0,582 \pm 0,105 \text{ mm}^2$. Ако приемем площта в контролата за 100%, то площта на мутанта е $78,88\% \pm 12,8\%$ или има спад в площта от 21,12% ($p < 0.05$).

5.3.2.1.4. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на площта на зърнестия слой на малък мозък в медиални и латерални срезове

След като установихме, че има спад на площта на кората на малкия мозък, решихме да прецизираме за сметка на кой конкретен слой от малкомозъчната кора е тази редукция. Насочихме вниманието си към ЗС, защото там се намират Pax6 позитивните зърнести и униполярни четковидни клетки - техните тела, дендрити и аксони, като трябва да се има в предвид, че за последните клетки само част от аксона е в слоя.

Открехме, че площта на зърнестия слой на малък мозък в медиалните срезове на контролните мишки е средно $3,374 \pm 0,132 \text{ mm}^2$, а в мутантните - $1,747 \pm 0,089 \text{ mm}^2$. Ако приемем площта в контролата за 100%, то площта на мутанта

е само $51,85\% \pm 03,63\%$ или има спад в площта от $48,15\%$ ($p < 0.001$).

Открихме, че площта на зърнестия слой на малък мозък в латералните срезове на контролните мишки е средно $1,968 \pm 0,183 \text{ мм}^2$, а в мутантните - $1,334 \pm 0,136 \text{ мм}^2$. Ако приемем площта в контролата за 100%, то площта на мутанта е само $67,85\% \pm 04,00\%$ или има спад в площта от $32,15\%$ ($p < 0.01$).

5.3.2.1.5. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на площта на молекулярния слой на малък мозък в медиални и латерални срезове

След като установихме, че има спад на площта на зърнестия слой на кората на малкия мозък, решихме да проверим дали има и промяна в молекулярния слой. Там не се намират Pax6 позитивни клетки, но се намират аксоните - паралелните фибри на зърнестите клетки, които са Pax6 позитивни. Очакваме слоя да е с по-малка площ, заради по-малкия очакван брой аксони на зърнестите клетки в слоя.

Открихме, че площта на молекулярния слой на малък мозък в медиалните срезове на контролните мишки е средно $3,791 \pm 0,139 \text{ мм}^2$, а в мутантните - $2,186 \pm 0,114 \text{ мм}^2$. Ако приемем площта в контролата за 100%, то площта на мутанта е само $57,67\% \pm 02,38\%$ или има спад в площта от $42,33\%$ ($p < 0.001$).

Открихме, че площта на молекулярния слой на малък мозък в латералните срезове на контролните мишки е средно $2,274 \pm 0,107 \text{ мм}^2$, а в мутантните - $1,514 \pm 0,224 \text{ мм}^2$. Ако приемем площта в контролата за 100%, то площта на мутанта е само $66,43\% \pm 07,49\%$ или има спад в площта от $33,57\%$ ($p < 0.01$).

5.3.2.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на дебелина.

Изследвахме дали има промяна в дебелината на слоевете на малкия мозък, по-точно на зърнестия и молекулярния слой.

5.3.2.2.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на дебелината на зърнестия слой на малък мозък в медиални и латерални срезове

Открихме, че дебелината на зърнестия слой на малък мозък в медиалните срезове на контролните мишки е средно $121,863 \pm 4,102 \mu\text{m}$, а в мутантните - $108,506 \pm 6,990 \mu\text{m}$. Ако прием дебелината на контролата за 100%, то дебелината на мутанта е $89,05\% \pm 04,04\%$ или има спад в дебелината от 10,95% ($p < 0.05$).

Открихме, че дебелината на зърнестия слой на малък мозък в латералните срезове на контролните мишки е средно $140,606 \pm 7,782 \mu\text{m}$, а в мутантните - $106,888 \pm 13,826 \mu\text{m}$. Ако прием дебелината в контролата за 100%, то дебелината на мутанта е $75,87\% \pm 06,81\%$ или има спад в дебелината от 24,13% ($p < 0.01$).

5.3.2.2.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на дебелината на молекулярния слой на малък мозък в медиални и латерални срезове

Открихме, че дебелината на молекулярния слой на малък мозък в медиалните срезове на контролните мишки е средно $125,555 \pm 3,289 \mu\text{m}$, а в мутантните - $122,990 \pm 6,080 \mu\text{m}$. Ако прием дебелината на контролата за 100%, то дебелината на мутанта е $97,95\% \pm 3,81\%$ или има спад в дебелината от 02,05%. Този спад няма обаче статистическа зависимост.

Открихме, че дебелината на молекулярния слой на малък мозък в латералните срезове на контролните мишки е средно $149,629 \pm 3,412 \mu\text{m}$, а в мутантните - $106,810 \pm 9,394 \mu\text{m}$. Ако прием дебелината в контролата за 100%, то дебелината на мутанта е $71,42\% \pm 6,70\%$ или има спад в дебелината от 28,58% ($p < 0.001$).

5.3.2.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на дължина

Отчитайки, че площите на зърнестия и молекулярния слой в медиалните срезове намаляват съответно с около 48% и

42% спрямо контролите, докато дебелините им спадат само с 11% или не спадат статистически значимо, изследвахме възможни причини за този феномен. Връщайки се към познанията по математика площта на някои фигури се извежда, че общата площ може да зависи не само от дебелината, но и от дължината на дадена структура. Поради тази причина това осъществихме измерване на дължината на основните церебеларни слоеве (молякулярен, зърнист и на Пуркиние) чрез измерване на дължината на линията, която минава от началото до края през тези слоеве.

5.3.2.3.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на линията, минаваща от началото до края на зърнестия слой на малък мозък в медиални и латерални срезове

Връщайки се на раздела „Материали и методи“, всички дължини са направени по **вариант 1**, с изключение на една фигура. Тя е отграничена със звезди “****” и **вариант 2**.

Открихме, че дължината на линията минаваща от началото до края зърнестия слой на малък мозък в медиалните срезове на контролните мишки е средно $27,957 \pm 0,948$ мм, а в мутантните - $15,867 \pm 0,150$ мм. Ако прием дължината и в контролата за 100%, то дължината и в мутанта е само $56,79\% \pm 01,54\%$ или има спад в дължината и от 43,21% ($p < 0.001$).

Открихме, че дължината на линията минаваща от началото до края зърнестия слой на малък мозък в латералните срезове на контролните мишки е средно $14,371 \pm 0,769$ мм, а в мутантните - $12,893 \pm 0,310$ мм. Ако прием дължината и в контролата за 100%, то дължината и в мутанта е $89,96\% \pm 06,32\%$ или има спад в дължината и от 10,04%, която обаче не е статистически значима.

ВАРИАНТ 2 за измерване на дължина

Открехме, че дължината на линията минаваща от началото до края зърнестия слой на малък мозък в латералните срезове на контролните мишки е средно $12,725 \pm 0,813$ мм, а в мутантните - $10,784 \pm 0,330$ мм. Ако прием дължината и в контролата за 100%, то дължината и в мутанта е $84,921\% \pm 04,08\%$ или има спад в дължината и от 15,08%, която обаче не е статически значима.

5.3.2.3.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на линията, минаваща от началото до края на молекулярния слой на малък мозък в медиални и латерални срезове

Открехме, че дължината на линията минаваща от началото до края молекулярния слой на малък мозък в медиалните срезове на контролните мишки, е средно $31,063 \pm 1,218$ мм, а в мутантните - $18,307 \pm 0,137$ мм. Ако прием дължината в контролата за 100%, то дължината в мутанта е само $58,99\% \pm 01,97\%$ или има спад в дължината от 41,01% ($p < 0.001$).

Открехме, че дължината на линията минаваща от началото до края зърнестия слой на малък мозък в латералните срезове на контролните мишки е средно $15,935 \pm 0,936$ мм, а в мутантните - $14,994 \pm 1,019$ мм. Ако прием дължината в контролата за 100%, то дължината в мутанта е $94,07\% \pm 01,67\%$ или има спад в дължината от 05,93%, която обаче не е статически значима.

5.3.2.3.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на линията, минаваща от началото до края на слоя на Пуркиние на медиални и латерални нива

Измерихме и дължината на линията, която минава през центъра на клетките на Пуркиние.

Открехме, че дължината на линията минаваща през клетките на Пуркиние в медиалните срезове на контролните мишки е средно $30,399 \pm 1,470$ мм, а в

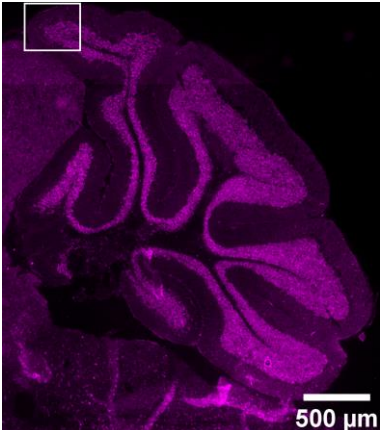
мутантните - $18,536 \pm 0,953$ мм. Ако прием дължината в контролата за 100%, то дължината в мутанта е само $61,150\% \pm 05,13\%$ или има спад в дължината от $38,85\%$ ($p < 0.001$).

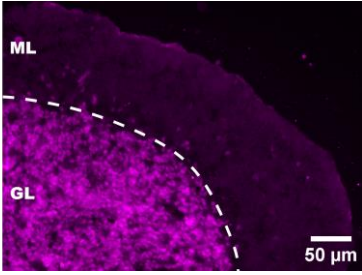
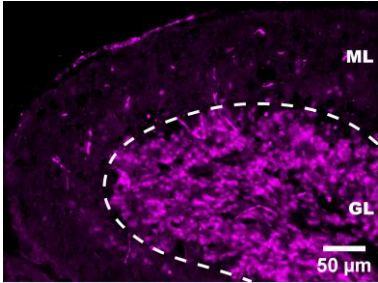
Открихме, че дължината на линията минаваща през клетките на Пуркиние в латералните срезове на контролните мишки е средно $16,048 \pm 0,939$ мм, а в мутантните - $14,625 \pm 0,394$ мм. Ако прием дължината и в контролата за 100%, то дължината в мутанта е $91,29\% \pm 03,82\%$ или има спад в дължината от $8,71\%$ ($p < 0.05$).

5.3.2.4. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на различия в клетъчни популации.

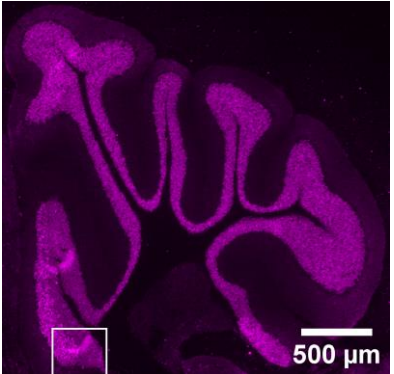
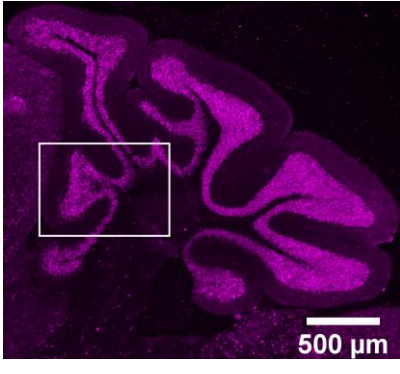
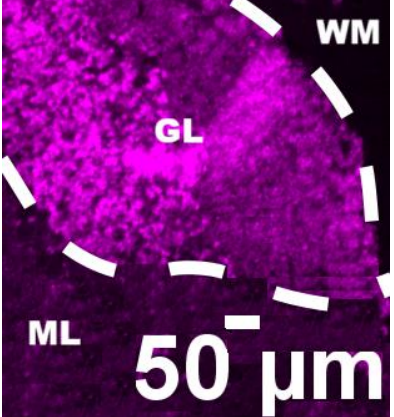
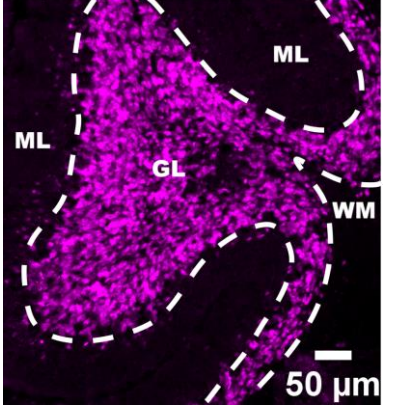
5.3.2.4.1. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на зърнести клетки в малък, медиални и латерални срезове

След площите продължихме с полуколичествен анализ на броя на клетките в зърнения слой (зърнести, еднополярни четковидни, които са Pax6 позитивни клетки и клетките на Голджи, които са Pax6 негативни). Всички могат да бъдат онагледени с маркера NeuN, който се експресира в “млади” неврони. Тъй като мнозинството от тези клетки са Pax6 позитивни, то намаляване на площта, в която се намират в мутантните мишки би означавала, че техния брой е по-малък отколкото в контролните мишки. На **фиг. 4.1. и 4.2** показваме обзорна микроснимка на мозъци от двете групи, а на **фиг. 4.3. и 4.4.** приближени такива. На последните микрографии отчитаме, че има леко понижаване в гъстотата на разположените клетки в зърнения слой.

	
1.контрола медиален срез	2.мутант медиален срез
4. Неврони в зърнестия слой на малък мозък в медиален срез - контрола и мутант оцветяване с NeuN, времеви период П21 1. и 2. обзорни микрографии, намален брой клетки в зърнестия слой, поради по-малката площ на слоя в малък мозък на мутанти. С незапълнен квадрат - зона на интерес <i>ML</i> - molecular layer, <i>GL</i> - granular layer	

	
3. контрола медиален срез	4. мутант медиален срез
4. Неврони в зърнестия слой на малък мозък в медиален срез - контрола и мутант оцветяване с NeuN, времеви период П21 3. и 4. микрографии с увеличение (зоната на интерес в 1. и 2.), запазена или леко понижена гъстота на клетките в зърнестия слой при мутантите доказваща по-малкия им брой. <i>ML - molecular layer, GL - granular layer</i>	

Направихме и полуколичествен анализ и на ниво латерални срезове. Отново забелязахме, че броя на невроните е по-малък отколкото в контролните мишки. На **фиг. 5.1. и 5.2** показваме обзорна микроснимка на мозъци от двете групи, а на **фиг. 5.3. и 5.4.** - приближени такива. На последните микрографии отчитаме, че има леко понижаване на гъстотата на разположените клетки в зърнестия слой.

	
1. контрола медиален срез	2. мутант медиален срез
	
3. контрола медиален срез	4. мутант медиален срез
5. Неврони в зърнестия слой на малък мозък в латерален срез - контрола и мутант оцветяване с NeuN, времеви период П21 1. и 2. обзорни микрографии, намален брой клетки в зърнестия слой, поради по-малката площ на слоя в малък мозък на мутанти. С незапълнен квадрат - зона на интерес.	

5. Неврони в зърнестия слой на малък мозък в латерален срез - контрола и мутант оцветяване с NeuN, времеви период П21
3. и 4. микрографии с увеличение (зоната на интерес от **1. и 2.**), запазена или леко понижена гъстота на клетките в зърнестия слой при мутантите доказваща по-малкия им брой.
ML - molecular layer, GL - granular layer, WM - white matter.

5.3.2.4.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период П21 - количествена оценка на клетки на Пуркиние в малък мозък, медиални и латерални срезове

Продължихме с преброяване на Calbindin позитивните клетки (клетки на Пуркиние) в контролните и мутантните мишки. Виждайки, че дължината на слоя на Пуркиние спада в медиалните и латералните нива съответно с 40% и 10%, то би следвало и клетките да намалеят с такъв процент, спрямо контролната група мишки. Друга възможност е клетките да останат същия брой, но да са по-гъсто населени.

Открихме, че клетките на Пуркиние само в слоя на Пуркиние в медиалните срезове на контролните мишки са средно 1023 ± 38 , а в мутантните - 611 ± 23 . Ако прием бройката им в контролата за 100%, то бройката им в мутанта е само $59,85\% \pm 03,52\%$ или има спад в броя от 40,15%. Ектопичните клетки, които открихме в бялото вещество на контролите са средно 7 ± 3 , а в мутантите 83 ± 7 , което е петнадесеткратно увеличение на ектопични клетки в мутантите (**$p < 0.001$**).

Ако изследваме бройката на всички клетки на Пуркиние (в слоя си и ектопични такива) в приемем, че в контролата са 100% и ги сравним със всички клетки на Пуркиние в мутанта, то бройката им в мутанта вече се повишава от $59,85\% \pm 03,52\%$ на $67,49\% \pm 06,12\%$. Спадът в броя съответно от 40,15% се увеличава на 32,51%.

Разделяйки броя на клетките на Пуркиние, които се намират в слоя на Пуркиние, на дължината на слоя на Пуркиние, се оказва, че в контролата клетките се намират

средно на $29,489 \pm 0,624 \mu\text{m}$. Тези в мутанта се намират на $30,273 \pm 1,407 \mu\text{m}$. Ако приемем, че дължината между отделните клетки на Пуркиние е 100% в контролата, то тази в мутанта е с 102,75%, което е с 02.75% повече. Не се установява статистическа значимост между двете групи.

Открехме, че клетките на Пуркиние само в слоя на Пуркиние в медиалните срезове на контролните мишки са средно 558 ± 17 , а в мутантните - 504 ± 14 . Ако прием бройката им в контролата за 100%, то бройката им в мутанта е $90,32\% \pm 04,16\%$ или има спад в броя от $09,68\%$ ($p < 0.05$). Ектопичните клетки, които открехме в бялото вещество на контролите са средно 3 ± 2 , а в мутантите 47 ± 4 , което близо шестнадесеткратно увеличение на ектопични клетки в мутантите ($p < 0.001$).

Ако изследваме бройката на всички клетки на Пуркиние (в слоя си и ектопични такива) в приемем, че в контролата са 100% и ги сравним със всички клетки на Пуркиние в мутанта, то бройката им в мутанта вече се повишава от $90,32\% \pm 04,16\%$ на $98,22\% \pm 04,98\%$. Спадът в броя съответно от 09,68% се увеличава на $32,51\%$. Установява се, че по този начин няма статистическа разлика между двете популации от клетки.

Разделяйки броя на клетките на Пуркиние, които се намират в слоя на Пуркиние, на дължината на слоя на Пуркиние, се оказва, че в контролата клетките се намират средно на $28,885 \pm 0,847 \mu\text{m}$. Тези в мутанта се намират на $29,690 \pm 1,122 \mu\text{m}$. Ако приемем, че дължината между отделните клетки на Пуркиние е 100% в контролата, то тази в мутата е с 102,79%, което е с 02.79% повече. Не се установява статистическа значимост между двете групи.

5.3.2.4.3. Трансгенна линия Tel-Cre::*Rax6^{fl/fl}* - времеви период P21 - количествена оценка на клетки на Голджи в малък мозък, медиални срезове

Продължихме с преброяване на *Rax2* позитивните клетки (клетки на Голджи) в контролните и мутантните мишки. Анализирайки медиалните срезове открехме, че клетките на Голджи в зърнестия слой в на контролните

мишки са средно 503 ± 28 , а в мутантните - 414 ± 21 . Ако прием бройката им в контролата за 100%, то бройката им в мутанта е $82.31\% \pm 02,98\%$ или има спад в броя от 17,69% ($p < 0.001$). Ектопичните клетки, които открихме (в бялото вещество и молекулния слой) в контролите са средно 5 ± 2 , а в мутантите 108 ± 11 , което е на двадесеткратно увеличение на ектопични клетки в мутантите ($p < 0.001$).

Ако изследваме бройката на всички клетки на Голджи и приемем, че в контролата са 100% и ги сравним със всички клетки на Голджи в мутанта, то бройката им в мутанта вече се повишава от 82.31% $\pm$ 02,98% на 101,97% $\pm$ 03,52%. Спадът в броя съответно от 17,69,15% се увеличава с 01,97% повече отколкото при контролата. Не се засича статистическа значимост между двете групи.

5.3.2.4.4. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P21 - количествена оценка на еднополярни четковидни клетки в малък мозък, медиални срезове

След това продължихме с анализ на броя на еднополярните клетки в зърнестия слой (Pax6 позитивни клетки). Маркера, който използвахме, за да ги онагледени е Calretinin. Той маркира субпопулация от всички еднополярни четковидни клетки.

Преброявайки клетките открихме, бройката им в медиалните срезове на контролните мишки в последните две малкомозъчни гънки е средно 324 ± 29 клетки, а в мутантните - 206 ± 19 . Ако прием броят на клетките в контролата за 100%, то тези в мутанта са $63,58\% \pm 04,82\%$ или има спад в дължината от 36,42% ($p < 0.01$).

5.3.2. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период P90- обзорни данни

На времеви период P90 данните съвпадат с тези, които показахме на P21 съответно за:

- полуколичествен анализ за намален брой на клетките в зърнестия слой (маркирани с Neun) в медиални и латерални срезове;
- намален брой на клетките на Пуркиние в мутанта (маркирани с Calbindin), увеличен брой ектопични

клетки в бялото вещество в мутанта, и еднаквата гъстота на клетките в слоя на пуркиние и в двете групи на медиално и латерално ниво;

- намален брой на клетките на Голджи в мутанта (Маркирани с Рах2), увеличен брой ектопични клетки в бялото вещество и в молекулния слой в мутанта на ниво медиални срези;
- намален брой на Еднополярните четковидни клетки (Рах6 позитивни) (оцветени с calretinin) в мутанта на ниво медиални срези.

5.3.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Рах6^{fl/fl} - времеви период E13,5

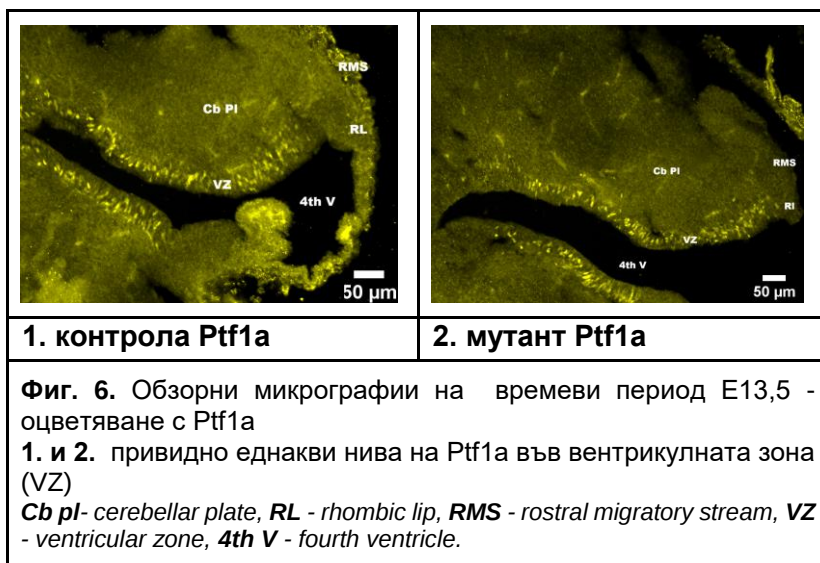
След установените морфологични промени на постнатален стадий, ние насочихме нашите анализи към ембрионалния период, когато експресията на Рах6 е ключова за развитието на малкия мозък.

5.3.2.4.4. Трансгенна линия Tel-Cre::Рах6^{fl/fl} - времеви период E13,5 -количествена оценка на Рах6 позитивни клетки в малък мозък

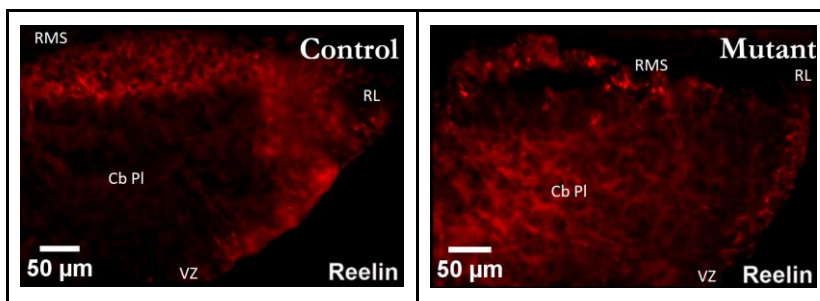
За целта използвахме мишки по време на ембрионален ден E13,5 от същата трансгенна линия. Първоначално изследвахме ТФ Рах6. Преброихме всички клетки, които се намират в ромбичната устна (RL), ростралния миграторен поток (RMS) и ядрено транзиторната зона (NTZ). В контролата има средно 208 клетки, докато тези в мутанта са 103. Ако приемем контролата за 100%, то в мутанта има 49,52% клетки, или това е намаляване с 50,48% (**p<0.05**).

На фиг. 5.45.1. и 5.45.2. забелязваме видимо непроменено количество клетки, позитивни за Ptf1a, който е ключов за всички на ГАМК-ергични неврони. Прогениторите на тези неврони се намират във вентрикулната зона (VZ) и тяхното образуване зависи от Ptf1a.

На **фиг. 6.1. и 6.2.** откриваме намалена експресия за маркера Reelin. Reelin се секретира във вентрикулната зона (VZ), ромбичната устна (RL), ростралния миграторен поток RMS, ядрено-транзиторната зона (NTZ), от прогениторни клетки, които се намират в тези зони. Съответно във вентрикулната зона (VZ) това са ГАМК-ергичните клетки, а в останалите зони - ГЛУ-ергичните клетки. За Reelin се знае, че стимулира миграцията на клетките на Пуркиние, като ги кара да се отдръпнат от него. По този начин зародишния “клъстер” от клетки на Пуркиние се разпръсква в монослой. Засечения по-нисък брой Pax6 позитивни клетки (виж по горе) довежда до по-ниска експресия на Reelin в ромбичната устна (RL), ростралния миграторен поток RMS, ядрено-транзиторната зона (NTZ).



От микрографиите на **фиг. 7.1. и 7.2.** откриваме по-ниската експресия за маркера Reelin.

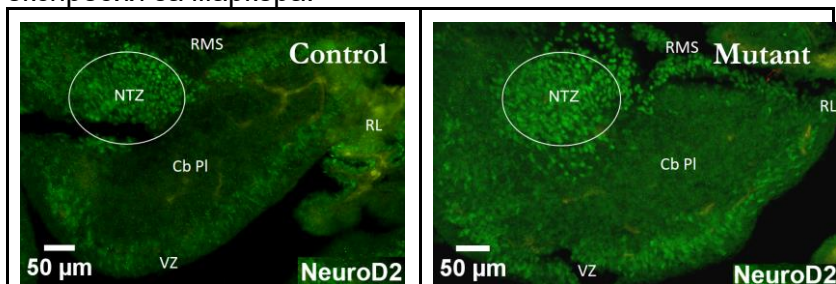


1. контрола Reelin

2. мутант Reelin

Фиг. 7. Обзорни микрографии на времеви период E13,5 - оцветяване с Reelin **1. и 2.** понижени нива Reelin в вентрикулната зона (VZ), ромбичната устна (RL), роstralния миграторен поток RMS, ядрено-транзиторната зона (NTZ) при мутантните мишки. *Cb pl*- cerebellar plate, *RL* - rhombic lip, *RMS* - rostral migratory stream, *VZ* - ventricular zone.

Един от маркерите, които са важни за развитието на зърнестите клетки, а и в последствие за съзряването на кошчевите и стеклатните клетки е NeuroD2. От микрографиите на **фиг. 8.1. и 8.2.** откриваме по-висока експресия за маркера.



1. контрола

2. мутант

Фиг. 8. Обзорни микрографии на времеви период E13,5 - оцветяване с NeuroD2 **1. и 2.** привидно високи нива на NeuroD2 в ядрено **8.** Обзорни микрографии на времеви период E13,5 - оцветяване с NeuroD2

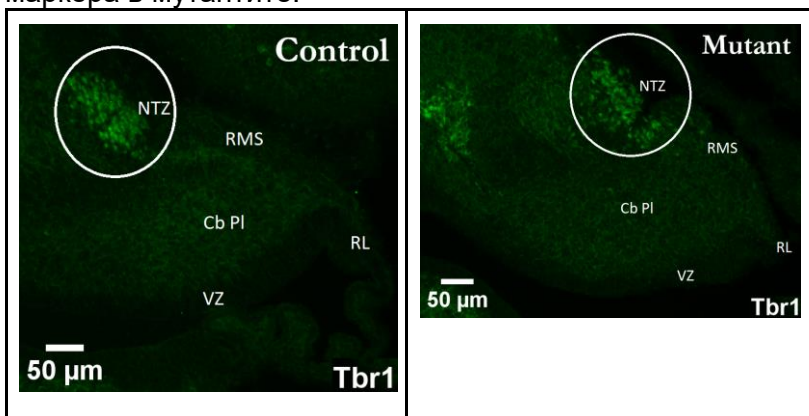
Фиг. 8. Обзорни микрографии на времеви период E13,5 - оцветяване с NeuroD2.

Ядрено-транзиторната зона (NTZ) на мутантните мишки.

Cb pl- cerebellar plate, **RL** - rhombic lip, **RMS** - rostral migratory stream, **NTZ** - nuclear transitional zone **VZ** - ventricular zone.

Един от маркерите, които е важен в развитието на Глутергични неврони на дълбоките ядра е *Tbr1*. Последните произлизат от популацията на *Rax6* позитивните клетки. При наличие на негова експресия Глутергични прогенитори мигрират в ядрено-транзиторната зона, а оттам към зоната, където ще се намират малкомозъчните ядра. От микрографиите на **фиг. 9.1. и 9.2.** откриваме непроменена експресия за маркера.

FoxP1, е необходим за узряването на клетките в малкия мозък, която при липсата му страда. От микрографиите на **фиг. 10.1. и 10.2.** откриваме по-висока експресия за маркера в мутантите.



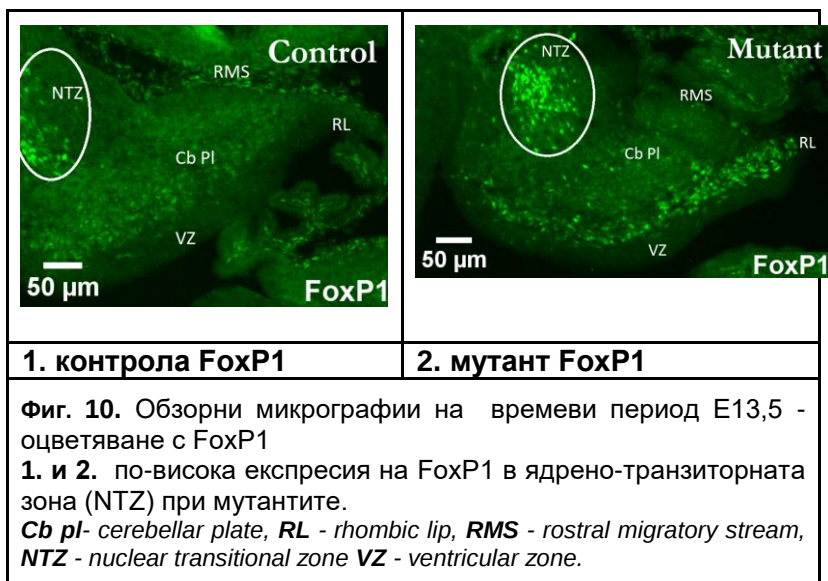
1. контрола Tbr1

2. мутант Tbr1

Фиг. 9. Обзорни микрографии на времеви период E13,5 - оцветяване с *Tbr1*

1. и 2. привидно еднакви нива *Tbr1* в ядрено-транзиторната зона (NTZ) и в двете групи животни.

Cb pl- cerebellar plate, **RL** - rhombic lip, **RMS** - rostral migratory stream, **NTZ** - nuclear transitional zone **VZ** - ventricular zone.



5.3.3. Трансгенна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl} - времеви период E17,5

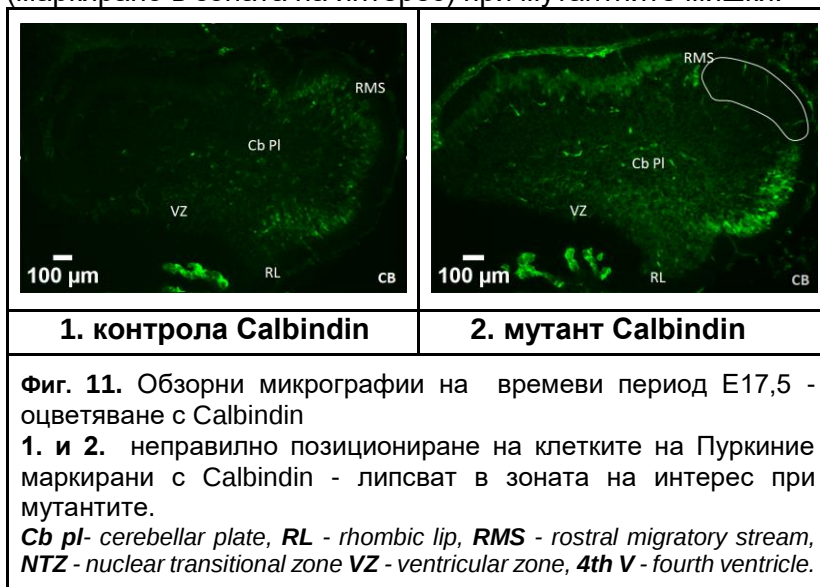
След анализа на E13,5 продължихме с такъв на времеви период E17,5 - малко преди раждането на мишките. Отново на първо място изследвахме ТФ Pax6 и засякохме по-ниските нива в мутантните мишки в ростралния миграторен поток (RMS)

Анализирахме след това Nestin маркер, който се експресира в активни клетки, в които се синтезират микротубули. Откриваме по-висока експресия за маркера в мутантите.

След това анализирахме маркера Ki67, той е протеин, позитивиращ се в клетки, които са навлезли в цикъл на делене. По този начин на базата на позитивните за маркера клетки може да съдим за пролиферативната активност в малкия мозък. Забелязваме по-ниските нива за маркера в мутантите, което съвпада с понижените нива на активиращия пролиферацията ТФ Pax6.

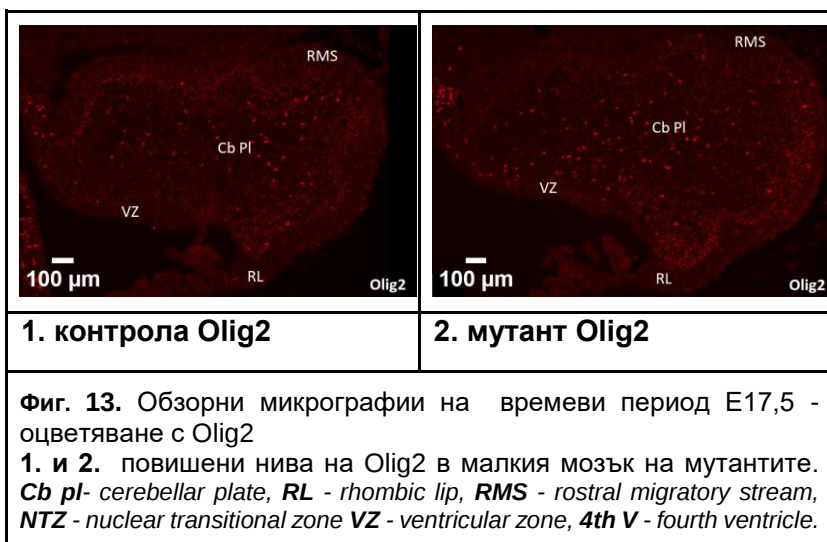
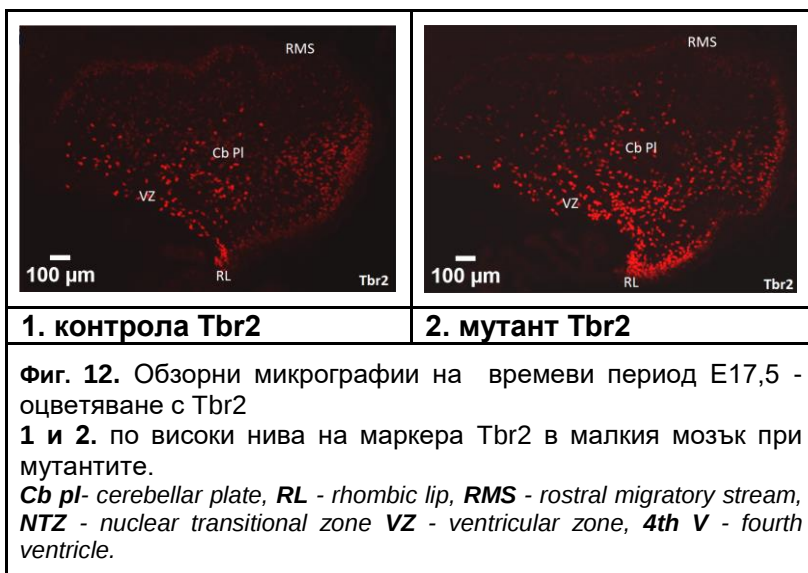
Изследвахме и маркера Calbindin. Още на E17,5 се забелязва неправилно позициониране на клетките на

Пуркиние, позитивни за Calbindin. На **фиг. 11.1. и 11.2.** се забелязва липсата на клетки в горно- десния квадрант (маркирано в зоната на интерес) при мутантните мишки.



На E17,5 изследвахме и маркера Tbr2. Той бележи еднополярни четковидни клетки, които произлизат от популацията на Pax6 позитивни клетки. Те се зараждат в ромбичната устна (RL) и мигрират през малкия мозък и се заселват във зърнестия слой. На **фиг. 12.1. и 12.2.** забелязваме по-високи нива на маркера в мутантите.

На E17,5 изследвахме и експресията на ТФ Olig2, който има директна билатерална антагонистична връзка с ТФ Pax6. Olig2 бележи прогенитори на клетките на Пуркиние, както и глиални клетки. . На **фиг. 13.1. и 13.2.** забелязваме по-високи нива на Olig2 в мутантите.



6. Дискусия

Настоящото изследване е първото, което успява да демонстрира *in vivo* постнатален церебеларен фенотип при намалена функция на ТФ Pax6. За да успеем да реализираме подобен фенотип, ние генерирахме двойно-трансгенна мишка, при която Cre рекомбиназа постига силна активност за “изрязване” на таргетния ген (Pax6) в малкия мозък, като тази активност е многократно по-силна от останалите региони на мозъка или други органи.

Полученият мутант Tel-Cre::Pax6 fl/fl показва дефекти във фолиацията и значително редуциран малък мозък.

Предишни разработки, които изследват влиянието на липсата на Pax6 върху церебеларна морфология използват глобален нокаут на Pax6 гена. Поради перинатална смъртност на глобалните (Sey/Sey) Pax6-нокаут мутанти, всички тези разработени представят фенотип единствено на пренатални стадии от развитието. В същото време, неврогенезата на гранулните клетки на церебелума се случва предимно постнатално.

От визираните по-горе изследвания, централно място има статията “Role of Pax6 in development of the cerebellar system” на Engelkamp и сътр. В тази публикация, авторите описват, че при мутанта с генерален нокаут притежават: еднакъв обем на зачатъка на малкия мозък спрямо контролните мишки, но при намален обем на вермиса и увеличен такъв в хемисферите; ектопична локализация на клъстери от клетки на Пуркиние в малкия мозък и извън него; засилена експресия на протеина Disabled-1 (Dab1) в зоните с клетки на Пуркиние; загуба на експресия на Reelin във външния зърнест слой и запазена такава в ядрено транзиторната зона и вентрикулната зона. В клетъчни култури установяват първоначално еднаква (ден 2), а впоследствие (ден 5 и нататък) - повишена пролиферативна активност, като мнозинството от тези клетки са позитивни за Math 1 (маркер характерен за незрели Глу-ергични клетки), засечени чрез маркера Tunnel, повишена апоптоза на пети ден в клетъчните

култури отново положителни за Math1, наличие на ниска чувствителност към растежния фактор Shh поради вече повишената вече пролиферативна активност, както и пониската зрялост, засечена с маркера Tuj1(намиращ се в невритите на зреещи неврони). Други публикации съобщават, че мутантите не формират премиграторен слой във външния зърнест слой, че зърнестите клетки не формират биполярни израстъци и мигрират хаотично, налице е също така редукция на Tbr1 позитивни неврони (Глу-ергични на дълбоките ядра) и намалено количество Tbr2 позитивни клетки.

В нашия трансгенен мутант ние отбелязахме съществуването на ектопични клъстери от церебеларни клетки, съдържащи като ГАМК-ергични, така и глутамат-ергични неврони, локализирани дълбоко в гранулния слой на границата с или в бялото вещество. Наличието на подобни ектопични огнища корелира с деформитета на разпределение на клетките на Пуркиние на стадий E17,5, нещо което се наблюдава и от Engelkamp и сътр (1999).

Ектопичните огнища в постнаталния церебелум с понижено ниво на Pax6 показва дефицит в миграцията на прогениторите. В своите изследвания, Engelkamp и сътр. установяват, че при глобалния Pax6-нокаут е налице дефицит на сигнални молекули, водещи миграцията на прогениторите в малкия мозък. Такива са Netrin и UNC. Netrin1 е „насочваща“ миграцията молекула, която насочва миграцията на клетките на Пуркиние, зърнестите клетки и клетките мигриращи в предния екстрамурален поток. Един от рецепторите за тази молекула е Dcc (Deleted in colon cancer). При сравнение на нивата на експресия на рецептора Dcc във външния зърнест слой не се засича сигнификантна разлика между двете групи мишки. Информацията събрана от оцветяването показват, че дори да има проблем в миграцията на клетките, тя не се обуславя от този рецептор.

Другият рецептор за нетрин е Unc5h3. Той започва да се експресира във външния зърнест слой по време на E15,5, като най-силната експресия на него се засича на стадий

E17,5. При мутантите експресията на Unc5h3 във външния зърнест слой липсва, докато при контролните мишки в същата зона и ембрионален ден, рецептора се експресира. Клетките на Пуркиние обаче продължават да експресират идентични нива на рецептора и в двете групи мишки. Данните показват, че липсата на рецептора в генералния нокаут за Рахб може да довежда до проблеми в миграцията на невроните.

Друга възможна причина за неправилното нагъване на кората при намалена функция на Рахб и ектопични гнезда от клетки е сигналната ос Reelin/DAB1.Disabled-1 (DAB1) е рецептор, благодарение на който се осъществява ефекта на Reelin върху клетките на Пуркиние (стимул за миграция). При контролите, се отчитат ниски нива на протеина, с изключение на определени субпопулации на клетките на Пуркиние. За последните се смята, че са клетки, които все още са активно мигриращи към многослойния все още слой на Пуркиние. При хетерозиготните мишки картината е подобна, с изключение на увеличена експресия на маркера в някои ектопични струпвания от клетки. При хомозиготния мутант активността на протеина е чувствително засилена (както в клетките на многослойния слой на Пуркиние, така и в ектопичните струпвания на клетките на Пуркиние. Засилена експресия на протеина в клетките, които не са успели да мигрират на мястото, на което би следвало да се намират, обяснява защо клетките не успяват да мигрират.

Reelin е белтък, който се отделя от глутамат-ергичните прогенитори в ромбичната устна, външния миграторен поток/външния зърнест слой, ядрено транзиторната зона и от ГАМК-ергичните прогенитори във вентрикулната зона. Той регулира миграцията на клетките на Пуркиние, като осъществява тяхната миграция от вентрикулната зона към церебеларния кортекс. При оцветяване срещу белтъка се наблюдават следните данни по време на различни ембрионални дни. На стадий E13,5 отчитаме високи нива на протеина във вентрикулната зона, ядрено транзиторната зона и външния зърнест слой на контролните мишки. В мишките с тоталният нокаут, нивата на Reelin са подобни на

тези в контролните мишки, с изключение на нивата във външния зърнет слой, където те са по-ниски.

На стадий E18,5 във външния зърнест слой в контролната мишка нивата на експресия на Reelin са още по-силно изразени. Бройката на клетките с високи нива на протеина в цитоплазмата е повече, като последните се намират освен във вътрешния слой на външния зърнет слой и в молекулярния слой, и все още в многослойния слой на Пуркиние. При мутанта клетките с високи нива на протеина в цитоплазмата са по-малко на брой в сравнение с контролата, като клетките се намират само във вътрешния слой на външния зърнет слой в сравнение с контролите. В молекулярния и в слоя на Пуркиние при мутанта - клетките липсват въобще.

От тези данни от литературата заключаваме, че намалената експресия за Reelin в нашите мутанти предполага участие в патогенезата на установените от нас дефицити на на Пуркиние.

Използването на мутантни, преживяващи постнатално, ни позволи да изследваме дали спада на площта в мутантите е за сметка на кората или на бялото вещество. Тъй като Рахб позитивните клетки (телата и израстъците им) се намират само в кората решихме, че спадът ще е само за сметка на площта на кората в мутантите. Измервайки кората и бялото вещество на медиални нива площта в мутантите спада съответно с около 40% и 15%, а в латералните нива съответно с около 30% и 20%. Оказа се обаче, че площта спада и в бялото вещество. Една от причините е намалената бройка на клетките на Пуркиние (медиално с 40% процента, латерално с 10%), тъй като техния аксон се намира в бялото вещество. Допълнително, възможно е да има редукция на количеството аферентни влакна за малкия мозък, защото има по-малко зърнести клетки, които да получават информация.

Допълнителна информация за механизмите на церебеларните дефицити при намалена функция на Рахб идва от използването на клетъчни култури. Отначало клетките в културите, произлизащи от контролите и

мутантите, нямат съществена разлика – клетките се разполагат равномерно в средата на клетъчните култури. Обаче при оглед на последните 36-48 часа след изготвянето им, клетките в мутантите образуват много повече на брой клетъчни струпвания, както и пространството между отделните клетъчни струпвания е по-голямо по площ, спрямо началните стадии и спрямо контролата, където клетките се разполагат все още предимно равномерно в средата. Към 96 час от началото на култивирането, в мутантите има клетъчни струпвания с много по-големи размери в сравнение с предния етап, докато клетъчните струпвания в контролите са отново с много по-малки размери. *От данните може да съдим, че в клетките на мутанта имат понижена склонност за миграция и повишена - за образуване на клетъчни агрегати.*

Клетъчните култури могат да се използват и за оценка на пролиферацията след Pax6 нокаут. След въвеждането на пролиферативния маркер BrdU в експерименталната постановка се установява, че 40% от всички клетки го акумулират т.е. са активно дялящи/пролифериращи клетки. При контролите, позитивните клетки са равномерно пръснати измежду негативните клетки. Забелязва се, че по време на 5-тия ден клетките са концентрирани в и около клетъчните струпвания. В мутантите не се наблюдава спад в пролиферацията на клетъчните култури, но при тях клетките, позитивни за BrdU, не се разполагат дифузно, а се концентрират в и около клетъчните струпвания. Тези резултати са в съответствие на натрупването на ектопични клетъчни клъстери при нашите мутанти и също така са индикатор, че при намалена функция на Pax6 клетките остават по-ниско диференцирани и с по-голяма пролиферативна склонност.

Ефект от липсата на Pax6 в зърнестите клетки

От преброяването на клетките във външния зърнест слой в мутантите се установява, че клетките са малко по-

малко на брой в сравнение с контролните мишки. При изследване за пролиферативна активност в слоя тя се оказва, че е еднаква и в двете миши групи. Въпреки нормалната пролиферация в целия мозък се забелязва медиално-латерален градиент. Пролиферацията е по-слаба в медиално направление и е усилена в латерално. Тези данни обясняват формата на малкия мозък при генералния нокаут като капковидна, както и нашите данни – спад на площта на целия малък мозък в медиалните нива съответно с 40%, докато латерално спадането е 25% по-малко от медиално - 30% спрямо контролата. Най-вероятно ТФ Рах6 има ефект върху клетъчната смърт във външния зърнест слой. Съдим за този факт благодарение на леко увеличената апоптоза по време на E18.

Данните за по-гъсто населения на външен зърнест слой, дезорганизираните 2 подслоя (герминативен и премиграторен), както и дезорганизираната подредба на нервните влакна показват, че слой е дезорганизиран като цяло. Последният факт може да се обясни с увредената миграция на клетките в слоя, породена от липсата на рецептора за Netrin, Unc5h3 и намалената експресия на Dil и TAG-1 (намалени тени нива сигнализират нарушеното образуване на паралелни влакна, както и на водещ израстък по време на миграцията).

Увреденото образуване на малкомозъчните гънки най-вероятно пак се дължи на увредената миграция в слоя. Другата причина, която би довела до такъв ефект е при увреда на експресията на маркерите PSA-NCAM и Рах2. Те показват местата на израстване на малкомозъчните гънки, но в настоящото изследване не са увредени в мутанта.

Ефект от липсата на Рах6 в клетките на Пуркиние

От изложеното дотук може да се направи заключение, че Рах6 спомага за правилното мигриране на клетките на Пуркиние. Както се вижда при мутанта има наличие на ектопични клетки в малкомозъчната кора. Това най-вероятно се осъществява благодарение на намалената

експресия на Reelin, синтезиран от Pax6-позитивни клетки. Reelin се смята за един от основните сигнали, регулиращ миграцията на клетките на Пуркиние във вътрешността на малкия мозък. Повишената експресия на рецептора Disabled1, който е важен елемент при предаване на сигналите от Reelin към клетките на Пуркиние, също доказва увреждане на механизма за миграция на клетките на Пуркиние.

Откритата по-ниска площ в мутантния церебелум на стадий P21, запазваща се до P90 смятаме, че може да е за сметка на намаления брой клетки в малкия мозък (зърнести, еднополярни четковидни клетки, клетки на Пуркиние и клетки на Голджи.). Новооткритият от нас поснатален спад с около 40% в медиалните и около 10% в латералните срези клетки на Пуркиние, поставя рамките за ново изследване – дали се дължи на базата на апоптоза при липса на правилно достигната позиция от клетката на Пуркиние или на апоптоза вследствие на намалена електрофизиологична стимулация от паралелните влакна на зърнести клетки, които също са с намалено количество.

Намаляването на количеството популацията на еднополярните четковидните клетки маркирани с calretinin съвпада с откритията на Yeung J. И сътрудници (2016), както и с тези в литературния обзор, че за развитието на еднополярните четковидни клетки е необходимо присъствието на TF Pax6.

Тъй като Cre-рекомбиназата започва да функционира около E13,5 и не премахва на 100% транскрипционния фактор Pax6 на 100% (а в 60/70%), в нашето проучване не забелязваме промяна в маркера за ГЛУ-ергичните неврони на дълбоките ядра маркирани с Tbr1.

7. Заключение

Малкият мозък е регионът в ЦНС, който съдържа най-голям брой неврони – над 70% от всички нервни клетки. 90% от тях са гранулни неврони, които се образуват предимно постнатално. В същото време, регулаторните генетични мрежи, които контролират образуването на тези клетки, се инициират пренатално, през ембрионалния период при мишка. Досегашните познания от биологията на развитието поставят транскрипционния фактор Рах6 като централен регулатор на ранното задно-мозъчно (вкл. церебеларно) развитие, но какъв е ефекта от намалена функция на Рах6 през постнаталния период - липсваше до момента. Причината такива данни да липсват е перинаталната смърт на мишките с глобален нокаут на Рах6 гена. Представения от нас модел на селективно намаление на Рах6 в малкия мозък позволи мишките да се родят жизнени, нещо повече - да имат продължителност на живота, сравнима с контролните индивиди. Това ни даде уникалната възможност, за първи път в света, да покажем морфологията на малкия мозък с понижени нива на Рах6, след завършването на церебеларната неврогенеза.

Нашите резултати показват, че недостатъчна функция на Рах6 води до дисгенезия на кората на малкия мозък, която се характеризира с намалена площ, изтънен гранулен слой, дисперсия на неврони в бялото вещество и наличие при мутантите на ектопични клъстери от неврони. Въпреки, че Рах6 се експресира основно в домена на глутамат-ергичните церебеларни неврони, при селективните мутанти ние наблюдавахме и дефицити на ГАМК-ергичните популации, включително клетки на Пуркиние и клетки на Голджи. Това е *in vivo* потвърждение на взаимозависимостта между тези две основни невронални популации в малкия мозък и отваря врата към бъдещи изследвания на механизмите, които се случват постнатално при съвместната регулация на неврогенезата на глутамат-ергичните и GABA-ергичните церебеларни неврони. При наличието на данни от последните години за

участие на малкия мозък в процеси отвъд контрола на баланса и моториката, като емоции и памет, селективните Рах6 нокаут мишки могат да се превърнат в ценен инструмент за изследване на малкомозъчното влияние върху висшите нервни функции.

7. Изводи

1. Сре-рекомбиназа, поставена под контрола на регулаторен елемент на *Rax6*.

гена, успешно и селективно постига инактивация на *Rax6* в малкия мозък.

2. Мишите мутанти със селективен *Rax6* нокаут се раждат жизнени и достигат.

възрастен стадий от живота. Това позволява да се изследва морфологията на малкия мозък с понижени нива на *Rax6*, след завършването на церебеларната невrogenеза.

3. Мутантите имат значителна редукция на площта на кората на малкия мозък и броя на фолиациите.

4. Мутантите имат редукция на броя на зърнестите клетки и площта и/или дължината, и/или дебелината на зърнестия слой.

5. Мутантите имат намаляване на броя на еднополярните четковидни клетки.

6. Мутантите експресират намален брой на клетки на Пуркиние и клетки на Голджи.

7. Мутантите имат наличие на ектопични клъстери от клетки на Пуркиние и клетките на Голджи в зърнестия слой и в бялото вещество на кората.

8. Налице е намалена дължина на слоя на Пуркиние.

9. Мутантите имат намалена площ на бялото вещество и молекулярния слой.

10. Мутантите имат понижена пролиферативна активност.

11. Мутантите имат понижени нива на спомагащия миграцията гликопротеин Reelin.

8. Приноси

1. За първи път се демонстрира жизнеспособен мутант със селективно заглушена експресия на Рахб в малкия мозък.

2. За първи път се представя редукция на площта и фолиациите на малък мозък в резултат на дефицит на постнаталната неврогенеза на гранулните клетки.

3. За първи път се докладват морфометрични данни за дължината, дебелината и площта на слоевете на малкия мозък при намалена функция на Рахб, на постнатален и адултен стадий от развитието.

4. За първи път се докладват намален брой на еднополярните четковидни клетки на постнатален и адултен стадий от развитието.

5. За първи път се докладват намален брой на клетки на Пуркиние и клетки на Голджи на постнатален и адултен стадий от развитието.

6. За първи път се докладват намалена дължина на слоя на Пуркиние на постнатален и адултен стадий от развитието.

7. За първи път се докладват на постнатален и адултен стадий от развитието.

8. За първи път се докладват ектопични клъстери от глутаматергични и GABA-ергични клетки в кората на малкия мозък на постнатален и адултен стадий от развитието.

9. Публикации и научни съобщения, свързани с дисертационния труд.

Публикации:

1. Atanasova D, Lazarov N, Stoyanov DS, Spasov RH, Tonchev AB, Tchekalarova J. Reduced neuroinflammation and enhanced neurogenesis following chronic agomelatine treatment in rats undergoing chronic constant light. *Neuropharmacology*. 2021 Oct;197:108706.

2. Mihailova V, Morfov S, Velikov I, Spasov R, Stoyanova I, Tonchev A. Astrocyte heterogeneity under physiological conditions and after brain injury. *Varna Med Forum*. 2023 Jan 17;12(1):39.

3. Velikov I, Spasov R, Morfov S, Mihailova V, Stoyanova II, Tonchev AB. Postnatal cerebellar development in a mouse. *Varna Med Forum*. 2023 Jan 16;12(1):59.

Доклади:

Иванов И., Спасов Р., Тончев А., Стайкова А. Оценка на намаляването на повърхността на малкия мозък при условна загуба на функция на Рах6. XII международен симпозиум по клинична анатомия и III европейски симпозиум по анатомични изследвания, 10-13. Октомври, 2024, Варна