

Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
Факултет по медицина
Катедра „Анатомия и клетъчна биология“

Д-р Димо Стоянов Стоянов

**РОЛЯ НА ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР
ZBTB20 В РАЗВИТИЕТО НА ИНТЕРНЕВРОНИ
В КРАЙНОМОЗЪЧНА КОРА НА МИШКА**

АВТОРЕФЕРАТ
на дисертационен труд
за присъждане на научна степен
„Доктор“

Научна специалност
„Анатомия, хистология и цитология”
Шифър: 03.01.02

Научен ръководител:
проф. д-р Антон Божидаров Тончев, д.м.н.

Варна, 2022

Дисертационният труд е оформен върху 118 стандартни машинописни страници. Литературният обзор е подкрепен от 12 фигури. Резултатите са подкрепени от 34 фигури, 3 таблици и 160 литературни източника, от които всички са на латиница.

Официалната защита ще се състои на 27.01.2023, петък, 14:00 часа, III аудитория, в комбинация с предварително насрочена онлайн среща.

Външни членове:

1. Проф. д-р Николай Еленков Лазаров, д.м.н.
2. Проф. д-р Ивета Антонова Коева, д.м.
3. Проф. д-р Стефан Тодоров Сивков, д.м.

Резервен външен член:

Доц. д-р Николай Димитров Димитров, д.м.

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Антон Божидаров Тончев, д.м.н.
2. Доц. д-р Стоян Павлов Павлов, д.м.

Резервен вътрешен член:

Проф. д-р Ваня Горанова Стефовска, д.м.

СЪДЪРЖАНИЕ

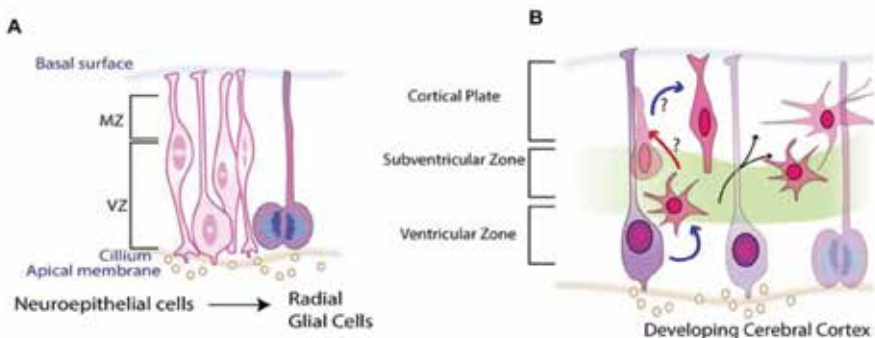
1. Увод	5
2. Материали и методи	7
2.1. Опитни животни	7
2.2. Добиване и обработване на тъканите	8
2.3. Имунофлуоресценция	9
2.4. Ин ситу хибридизация	11
2.5. Микрографии	13
2.6. Изброяване	13
2.7. Статистическа обработка и оформяне на фигурите	13
3. Резултати	15
3.1. Зона на експресия на <i>Zbtb20</i> в субпалиум	15
3.2. Основни дефекти в кортикалните интерневрони	20
3.3. Значима редукция в броя на MGE-CINs	20
3.4. Дефицити в броя на CGE-CINs	24
3.5. Динамика в експресията на регион неспецифични маркери ..	26
3.6. Не се наблюдава завишена апоптоза	27
3.7. Липса на преждевременна диференциация на интерневроналните прогенитори в <i>Zbtb20</i> ^{-/-} субпалиум	29
3.8. Нарушение в пролиферацията в ранен стадий от развитието на MGE-CINs	32
3.9. Нарушена времева динамика при генерирането на кортикалните интерневрони	35
3.10. Миграция на CINs	40
3.11. Експресия на транскрипционни фактори и молекулярни маркери, регулиращи ембрионалното развитие на CINs	41
3.12. Експресия на ZBTB20 в субпалиума на човек	48

4. Дискусия	52
4.1. <i>Zbtb20</i> води до занижаване в клетъчната гъстота на специфични CINs	52
4.2. Механизми, причиняващи постнаталните дефекти.	53
4.3. Нарушена динамика във времето на образуване на CINs.	54
4.4. Възможни недостатъци на експерименталната постановка	56
4.5. Експресията на <i>Zbtb20</i> в човешкия субпалиум	57
4.6. Предполагаемо място на <i>Zbtb20</i> в генетичната верига в MGE	58
5. Заключение.	60
6. Изводи	61
7. Справка за приноса на дисертационния труд	62
8. Публикации и доклади във връзка с дисертационния труд	63
9. Използвани съкращения	65
10. Благодарности	67

1. УВОД

Крайномозъчната кора при бозайници е изградена от шест клетъчни слоя, което я отличава от еволюционно по-старите: архикортекс и палеокортекс, състоящи се от три до пет слоя. От гледна точка на клетъчния състав неокортекът е изграден от невронни и глиални клетки. Невроните, от своя страна, се подразделят на инхибиторни и възбудни от гледна точка на своето действие. Възбудните неврони използват глутамат като невротрансмитер, имат дълги проекционни аксони и формират възбудни синапси. Инхибиторните се наричат още интерневрони, използват невротрансмитера ГАВА или глицин, пращат разклоненията само в близост до своята сома и образуват инхибиторни синапси. Интерневроните са около 25 до 30% от всички неокортикални нервни клетки. Те са много по-хетерогенна група в морфологично, молекулярно и функционално отношение – особеност, отразяваща разнообразието им функции (Ascoli *et al.*, 2008).

Нервната система произлиза от образуване на невроектодермата – нервната плочка. Тази структура е изградена от привидно многослоен цилиндричен невроепител, лежащ върху базална мембрана с апикална повърхност, насочена към кухината на амниона. След сформирването на нервната тръба – процес, наречен неврулация, се секвестрира малко количество амнион, който играе ролята на цереброспинална течност (Bueno and Garcia-Fernández, 2016). След завършването на неврулацията и оформянето на вентрикуларната система частта от нервната тъкан, разположена към вентрикула, се обозначава като апикална и отговаря на апикалната част на невроепителя, а тази от страната, граничеща с базална ламина – базална. В хода на ембриогенезата на ЦНС, след затварянето на нервната тръба, еднослойният епител пролиферира и постепенно образува две герминативни зони: разположената в непосредствена близост до вентрикула се нарича вентрикуларна зона (VZ), а лежащата базално от нея – субвентрикуларна зона (SVZ) (Фиг. 1.1 А, В).



Фиг. 1.1. Герминативни зони по време на развитието на ЦНС

- (A) В ранните етапи след затварянето на нервната тръба невроепителните клетки сформират привидно многослоен епител, изграждащ вентрикуларната зона (VZ);
- (B) Впоследствие благодарение на засилената пролиферация и генерирането на междинни прогенитори се сформира вторият слой в герминативната зона – субвентрикулната зона (SVZ).

* Модифицирано от „Polarity transitions during neurogenesis and germinal zone exit in the developing central nervous system“ (Singh and Solecki, 2015).

Теленцефалонът при мишки започва развитието си през E8, с експресията на транскрипционния фактор FoxG1 (Martynoga *et al.*, 2005, p. 1; Roth *et al.*, 2010, p. 1). Морфологично ембрионалният теленцефалон се дели на палиум, или още плащ, покриващ така наречения субпалиум. Синонимни термини за тези две области са дорзален и вентрален теленцефалон. Палиумът е прогениторната зона на глутаматергичните неврони, докато субпалиумът – на крайномозъчните интерневрони.⁶

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

2.1. ОПИТНИ ЖИВОТНИ

С цел изследване на влиянието на *Zbtb20* върху нормалното развитие на кортикалните интернейрони беше използвана глобална „knock-out“ мишка. Това беше постигнато чрез вмъкване на *LacZpolyA-pGKNeo-pA cassette* 12bp даунстрийм от старт кодона на екзон 6 на гена. По този начин се нарушава нормалната „reading frame“ на екзон 6 и транскрибирането на тази част от гена, в резултат на което се синтезира трункирана неактивна форма на протеина, неспособна да се свърже с DNK (Фиг 2.1.).



Фиг. 2.1. Генериране на трансгенни мишки

- (A) Проектираният вектор съдържа *LacZ* касета под контрола на промотора за *Zbtb20* и позитивен селектор *Neo*, създаващ резистентност срещу неомоцилин под контрола на *PGK* промотора. *pA* са места на полиаденилация, необходими за разделянето на двете иРНК за създаването на два отделни протеина и стабилизирането им в посттранслационния период;
- (B) Мястото на инсерция на вектора позволява нокаутването на *BTB* домейна от екзон 6 и първия цинков пръст на екзон 7;
- (C) Мутантият ген има запазени последните четири цинкови пръста, но протеинът е неактивен.

След генерирането на мутантите за *Zbtb20* ESC се създадаха химерни хетерозиготни мишки, които успешно предадаха мутантния алел в поколението си. От създадените *Zbtb20^{lacZ/+}* мишки се генерираха хомозиготните мутанти. Липсата на транскрипти на екзон 6 беше потвърдена с PCR и Southern blot (Rosenthal *et al.*, 2012). Всички опитни животни бяха третирани според „German Animal Protection Law“, след получаване на одобрение от етичната комисия Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)/ Oldenburg, с договор номер No 33.9-42502-04-11/0622 от 07.12.2011.

2.2. Добиване и обработване на тъканите

Първоначално беше направена повърхностна анестезия с етер. Впоследствие бе инжектиран интраперитонеално фенобарбитал. След установена липса на болкови рефлексии, провокирани чрез защипване с пинсета на кожата между първи и втори пръст, беше преминало към перфузия.

За перфузионен разтвор беше използван 4% разтвор на PFA. Беше направена срединна торакотомия и перфузията беше продължена, докато черният дроб загуби нормалното си тъмно оцветяване и доби сив вид, индикативно за обезкървяването му.

Впоследствие мозъкът беше отпрепариран от черепната кухина.

Екстрахираните мозъци бяха измити в 4°C PBS буфер и фиксирани за 12–16 часа в 4% разтвор на PFA. След това беше направена криопротекция с 15 и 25% разтвор на сукроза. Изчаква се отново да потъне. След включване в OCT, медиум, адаптиран за изготвянето на криосрезове, тъканите бяха нарязани на замразяващ микротом с дебелина на среза 16 микрометра. Използвани бяха адхезивни стъкла за криосрезове Superfrost™ Plus със стандартни размери. Вече изготвените срезове бяха оставени за 24 часа на стайна температура, за да се дехидратират, и впоследствие бяха преместени на –20°C за дългосрочно съхранение.

2.3. Имунфлуоресценция

Препаратите, съхранявани на -20°C , както и разтвори, съхранявани на 4°C , бяха оставени за 30 min на стайна температура за темперирание. След тази стъпка последва промиване в PBS 3x5 min, антигенно представяне за 5 min в PT module на 96°C , охлаждане до стайна температура, последвано отново от промиване в PBS 3x5 min. Тъканите бяха оградени с хидрофобен PAP rep, блокирани за 1 час с 10% PBS/BSA (bovine serum albumin) и инкубирани за 12 до 16 часа на 4°C с първично антитяло. След инкубацията с първичното антитяло тъканите бяха промити в PBS 3x5 min и инкубирани с вторично антитяло и впоследствие с DAPI за 5 min. След последната инкубация последва стандартното промиване в PBS 3x5 min и покриване, като за покривна среда беше използвана „ProLong™ Gold antifade reagent“, предназначена за работа с флуоресцентни препарати.

Беше използван PBS под формата на таблетки, предназначен за директно разтваряне в дестилирана вода. Антителата бяха разтворени 10% NGS/PBS. При работа с протеини с ядрена локализация към разтвора на първичните антитела беше добавен и 1% разтвор на Triton с цел пермеабилзация на клетъчните мембрани. Също така инкубацията с първичните антитела беше предшествана с преремеабилзация с 1% разтвор на Triton в PBS. При кози произход на първичното антитяло стъпките, включващи NGS, бяха пропуснати и антителата бяха разтворени в PBS/BSA с цел да се избегне кросреакция. Използваните първични антитела са изброени в таблица 1, а вторичните – в таблица 2.

Таблица 1

Антитяло	Производител	Продуктов номер	Използвана концентрация
Parvalbumin	Sigma Aldrich	P3088	1:300
Lhx6	Chemicon	ab22885	1:300
Sox6	Abcam	ab30455	1:500
Nkx2.1	Santa Cruz	sc-53136	1:200
Olig2	Abcam	ab9610	1:600
Ascl1	OriGene	TA330265	1:300

Антитяло	Производител	Продуктов номер	Използвана концентрация
Sp8	Santa Cruz	sc514779	1:400
Prox1	BioLegend (Covance)	PRB-238C	1:300
Calretinin	Chemicon	AB149	1:300
Calbindin	Santa Cruz	sc365360	1:100
Reelin	Synaptic Systems	MAB3820	1:300
Sox10	Santa Cruz	sc365692	1:200
NeuN	Synaptic Systems	266011	1:100
BrdU	Becton	347580	1:300
GABA	Abcam	ab9446	1:300
Shh	Santa Cruz	sc9024	1:100
Zbtb20	Sigma Aldrich	HPA016815	1:100
COUP-TF II	Perceus Proteomics	PP-H7147-00	1:400

Таблица 2

Антитяло	Производител	Продуктов номер	Използвана концентрация
Rb 488	Thermo Fisher Scientific	A-11008	1:300
Rb 555	Thermo Fisher Scientific	A27039	1:300
Rb 647	Thermo Fisher Scientific	A27040	1:300
Mo 647	Thermo Fisher Scientific	A-21235	1:300
Gt 488	Thermo Fisher Scientific	A-11078	1:300
Gt 596	Thermo Fisher Scientific	A-11055	1:300
Gpig 555	Thermo Fisher Scientific	A-21435	1:300
Chk 555	Thermo Fisher Scientific	A-21437	1:300
Rat 594	Thermo Fisher Scientific	A-11007	1:300
Gt 555	Thermo Fisher Scientific	A-21432	1:300

Използвани съкращения: Rb – rabbit; Mo – Mouse; Gt – Goat; Gpig – Guinea pig; Chk – chicken.

2.4. Ин ситу хибридизация

Всички използвани реактиви трябва да са свободни от РНКзи. Всички използвани буфери са описани към таблица 3. Секционираните тъкани бяха първо фиксирани в PFA за 25 min на стайна температура. Стъклата бяха измити с 0.9% NaCl два пъти по 2 min. След това стъклата бяха обработени с оцетен анхидрид, разтворен в ТЕА буфер за 2 пъти по 5 min. Препаратите бяха промити и дехидратирани във възходяща редица на етанол: 1xPBS за 2 min, 0.9% NaCl за 2 min 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% за 2 min, изсушени на 30°C за 30 min и бяха съхранени на -20°C. Преди започване на протокола за оцветяването тъканите бяха промити PBS за 5 min на стайна температура. Последва денатурация с 0.2N HCL за 10 min отново на стайна температура и промивка с PBS. След това беше извършено антигенно представяне чрез депроитенизация с буфер, съдържащ протиназа К, последвано отново от промивка с PBS. Тъканите бяха фиксирани с PFA за 15 min, промити с PBS и инкубирани на 60°C с хибридизационен разтвор. Маркираните с дигоксигенин рибопробите бяха нагreti до 95°C с цел денатурация и охладени върху лед, за да се предотврати рехибридизация, и разтворени в хибридизационен разтвор в концентрация 0.5–2µg/ml. Последва инкубация с рибопробите на 60°C за 12 до 16 часа. За да се намали фоновото оцветяване, бяха извършени серия от промивки с различни концентрации на солеви разтвори на натриев цитрат при различни температури, за да се отмият несвързаните рибопробите от препаратите, като се намали рискът от заличаване на специфично свързаните. Преди да се пристъпи към инкубация с антителата, предишните разтвори бяха отмити с PBST. Тъканите бяха блокирани с 10% SS/PBST (sheep serum – овчи серум). Анти-дигоксин антитялото беше разтворено в 10% овчи серум/PBST в концентрация 1:1000 за 1 ч. и 30 min, последвано от промивка с PBST с цел отмиване на излишните антитела от тъканта. Преди да се пристъпи към визуализацията, разтворите от предишните стъпки бяха отмити с TMN буфер/5mM Levamisole. Последва инкубация с 1 µl/ml NBT и 3.5 µl/ml BCIP, разтворени в TMN за два часа, като излишната течност се отми с PBS. Препаратите бяха покрити с Hydro-Mount.

Таблица 3

Реагент	Концентрация
PBST*	1x
HCL**	0.2N
протиаза К буфер***	10x
Солевия разтвор на натриев цитат****	20x
TMN *****	1X
Hyb-Buffer	Invitrogen™ AM8670

*** Приготвяне на PBST (1x)**

Към разтвора на PBS беше добавен 1% v/v Tween-20

**** Приготвяне на 0.2N HCL**

Към 250 мл дестилирана вода бяха прибавени 16.42мл 37% HCL

***** Приготвяне на протеаза К буфер (10x)**

25 ml 1M Tris-Cl (pH 8)

25 ml 0.5 M EDTA (pH 8)

200 ml H₂O

****** Приготвяне на солеви разтвор на натриев цитрат (20x)**

175.3 g NaCl

88.2 g sodium citrate

800 mL sterile dH₂O

Adjust to pH 5 using citric acid, fill to 1 L and autoclave

******* Приготвяне на TMN буфер**

1 ml 5m NaCl

2.5 ml 1M MgCl₂

5 ml Tris-Cl

25 µL Tween 20 (100%)

Добавя се H₂O

2.5. Микрографии

Микрографиите бяха изготвени на Zeiss Axio Imager.Z2 микроскоп, пригоден за сканиране тип мозайка чрез моторизирана предметна масичка, Axiovision софтуер, снабден с модул за автофокус, позволяващ по-консистентно фокусиране на отделните части от мозаечни образи при по-голяма обща повърхност или наличие на малки неравности. За изготвяне на светлинномикроскопските микрографии беше използвана цветна камера MRc, а за имунофлуоресцентните образи – по-високочувствителната монохромна камера MRm. Заснетите образи тип „мозайка“ бяха експортирани първо в монолитен .zvi и после в .tiff, позволяващ обработката в друг софтуер.

2.6. Изброяване

Използвахме FIJI за анализа. Микрографиите бяха експортирани в .tiff файл и нормализирани. Последва скалиране на образа спрямо метаданните от оригиналния. Инсталиран беше Multicut plug-in, позволяващ запазването на извършеното броене като анотации към образите. Поставени бяха ROIs в избрани зони, като изброяването се извърши ръчно. Получените „overlays“ от броенето и поставените ROIs бяха запазени като отделен .zip, позволяващ работа по образа, без да се нанасят промени върху информацията. По правило, за да се избегне свръхброене бяха избрани две страни в постоянна зависимост с топологията на тъканта и пресечените им клетки бяха включени в изброяването, а другите две изключени.

2.7. Статистическа обработка и оформяне на фигурите

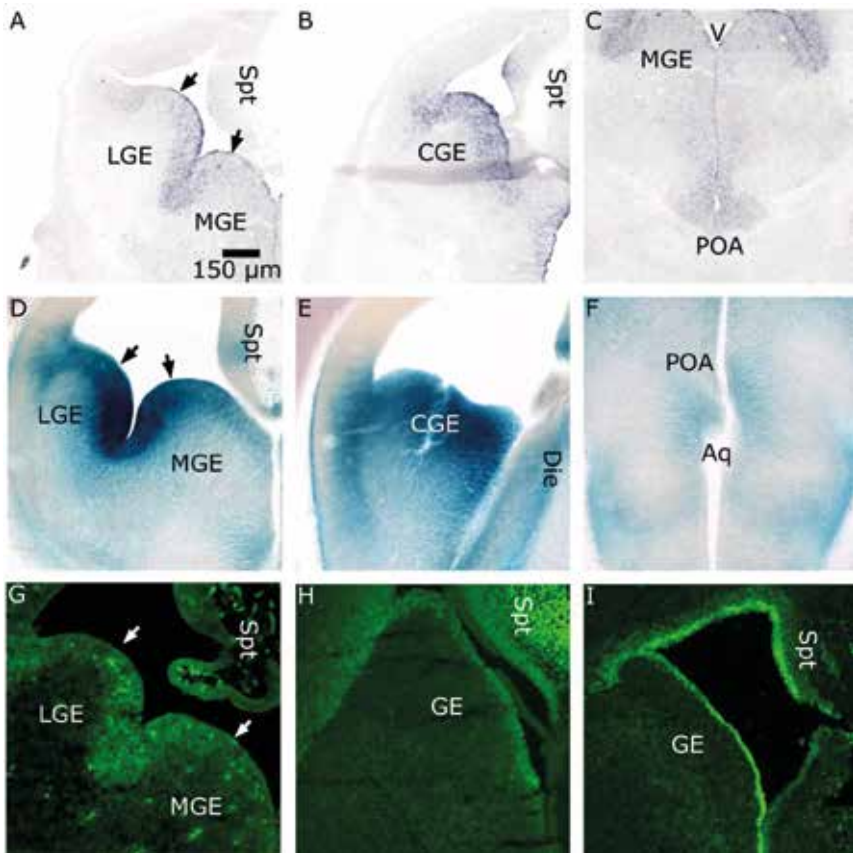
Ръчно изброените стойности бяха въведени в стандартни .xlsx таблици. Обработването и сортирането на данните беше направено в .xlsx, а за статистическия анализ и за направата на графиките беше използван R. „Error bars“ представят стойностите за 95% интервал на конфиденциалност. За всички бройни резултати и клетъчни гъстоти използвахме Student's t.test, при който интервалът на конфиденциалност беше изчислен като $1,95^*$ стандартно отклонение. Тъй като резултатите от анализите за изход от клетъчния цикъл са пропорции, в техния случай беше

използван Chi-square test. Интервалите на конфиденциалност (95%) бяха изчислени по метода на Clopper-Pearson. И в двата случая за минимална стойност, при която се приема статистическа значимост, беше избрана $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛТАТИ

3.1. Зона на експресия на *Zbtb20* в субпалиум

ISH за *Zbtb20* на E12.5 показва повсеместна експресия на mRNA във вентралния теленцефалон, като се наблюдава градиент в силата ѝ. Във вентралната част на LGE, LGE/MGE браздата, дорзалната част на MGE и цялата CGE експресията е силна, докато дорзалната част на LGE, вентралният участък от MGE и POA показват по-слаба експресия на *Zbtb20* mRNA (Фиг. 3.1 A–C). Във всички области VZ показва по-високи нива на експресия от SVZ. За да потвърдим тези резултати, използвахме *Zbtb20/betagal* мишки, в които се очаква силата на експресия на трасиращата молекула бета-галактозидаза да е пропорционална на генната експресия. Във VZ на MGE, LGE и CGE се забеляза градиент, аналогичен на вече наблюдавания (Фиг. 3.1 D-F). Транслацията на mRNA не доказва активната синтеза на протеин. Налични са пост-транслационни модификации, които могат да доведат до заглушаване на транскрипцията. За да проверим за наличието на протеина *Zbtb20*, направихме IF оцветявания, които потвърдиха вече получените резултати (Фиг. 3.1 G-I). Експресията на *Zbtb20* персистира и в късните етапи на развитието (Фиг. 3.1 G-I). Като последна стъпка от анализа проверихме дали *Zbtb20* продължава да се експресира от невроните в постнаталния неокортекс. За целта направихме оцветяване за *Zbtb20* и NeuN, маркиращ всички неврони в кортекса, включително и CINs. Не открихме двойно позитивни клетки (Фиг. 3.2.).

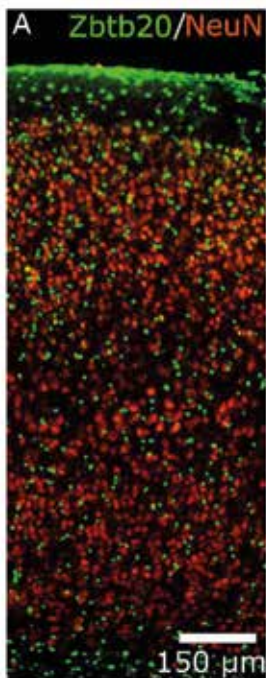


Фиг. 3.1. Експресия на *Zbtb20* в ембрионалния субпалиум

(A)–(C) *Zbtb20* uPHK показва силна експресия във *VZ* и слаба в *SVZ* на целия субпалиум на *E12.5*. В *MGE* и *LGE* се наблюдава дорзовентрален градиент. Силна област на експресия (разположена между стрелките) се намира в двете прилежащи части на еминенциите. Дорзално и вентрално от тази област експресията постепенно намалява. На този етап кортикалната експресия е ограничена само до най-вентралните части на латералния палиум.

(D)–(F) Потвърдена е активността на промотора на *Zbtb20* гена в субпалиума чрез експресията на трансгена бета-галактозидаза, поставен под контрола на неговия промотор. Оцветяванията потвърждават градиента, забелязан при *ISH* (стрелки);

- (G) Посттранслационни модификации е възможно да заглушат протеиновата синтеза, дори при наличие на иРНК. Наличието на *Zbtb20* протеина е потвърдено чрез имунофлуоресценция. Градиентът на експресия се наблюдава отново (стрелки);
- (H)–(I) Експресията на *Zbtb20* в VZ персистира и в късните ембрионални етапи (E15.5 и 18.5 съответно). Дорзовентралният градиент, наблюдаван на E12.5, липсва;
- (J) Липсва постнаталната невронална експресия на *Zbtb20* в соматосензорен кортекс.



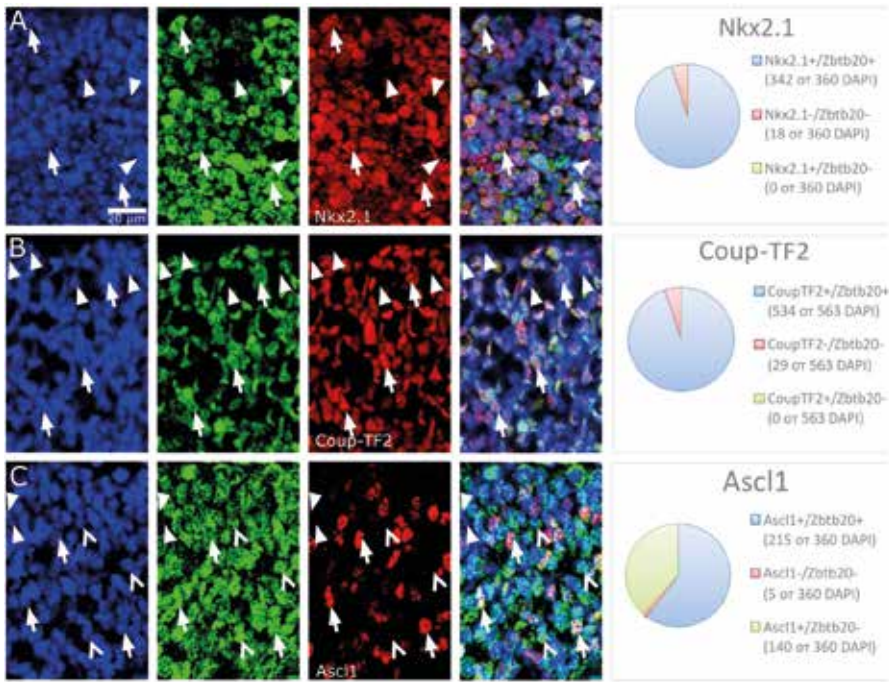
Фиг. 3.2. Промени в клетъчната гъстота на BrdU+/Sox6+ при *Zbtb20*^{-/-}

Клетъчната гъстота на BrdU+/Sox6+ клетки на E12 показва статистически значимо занижение при *Zbtb20*^{-/-}, докато на E14.5 и E16.5 мутанта и контролната група от MGE-CINs при *Zbtb20*^{-/-} спрямо характерните за този етап физиологични нива.

* => $p = 0.05$, ** => $p > 0.05$,
 *** => $p > 0.001$

Силната експресия на *Zbtb20* е ограничена във вентрикулната зона, където основната клетъчна популация е съставена от стволите клетки на областта – RG. Това повдигна въпроса дали *Zbtb20* е експресиран във всички VZ прогенитори или само в някоя субпопулация. За да отговорим на този въпрос, направихме оцветявания за два транскрипцион-

ни фактора, намиращи се във всички VZ прогенитори – панпалиалния *Coup-TF2* и MGE специфичния *Nkx2.1*. Избраохме двойно позитивните клетки в границите на SVZ, която определихме като регион на 100 μm от ветрикуларната повърхност. Почти всички клетки бяха двойно позитивни (*Coup-TF2*⁺/*Zbtb20*⁺ и *Nkx2.1*⁺/*Zbtb20*⁺). Наблюдавах се и единични двойно негативни клетки (*Coup-TF2*⁻/*Zbtb20*⁻ и *Nkx2.1*⁻/*Zbtb20*⁻). Интересно, нямаше клетки, които да са позитивни за *Zbtb20*, но негативни за *Coup-TF2* или *Nkx2.1* (Фиг. 3.3 А, В). Тези резултати потвърждават повсеместна експресия на *Zbtb20* в невроналните стволови клетки. Тъй като VZ е хетерогенна по отношение на клетъчния си състав, повторихме анализа, като този път избрахме за маркер *Ascl1*, който показва мозаечна експресия във VZ. За разлика от предишните два маркера, в случая само около две трети бяха двойно позитивни (*Ascl1*⁺/*Zbtb20*⁺). Също така тук наблюдавахме популация, липсваща при гореспоменатите два маркера – позитивна за маркера и негативна за *Zbtb20* (*Ascl1*⁺/*Zbtb20*⁻). Тя съставляваше около една трета от всички наблюдавани клетки. Бяха забелязани и единични двойно негативни клетки (*Ascl1*⁻/*Zbtb20*⁻) (Фиг. 3.3 С).



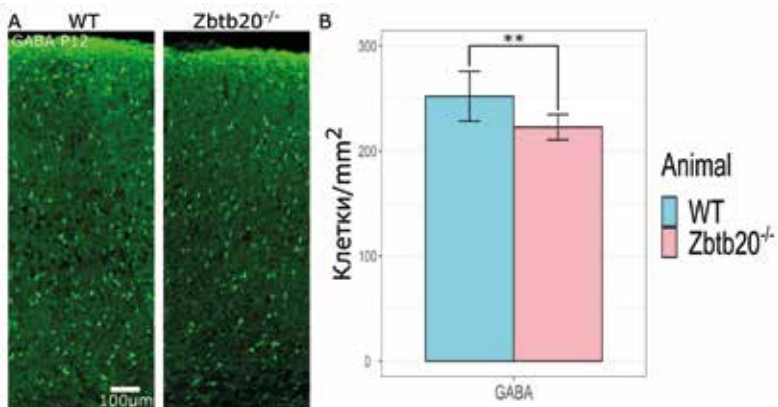
Фиг. 3.3. Експресия на Zbtb20 в невронални прогенитори

- (A) *Coup-TF2*, експресиран във всички невронални прогенитори във VZ на субпалиума, показва почти пълно припокриване със *Zbtb20*;
- (B) *Nkx2.1*, експресиран във всички невронални прогенитори във VZ на MGE, показва почти пълно припокриване със *Zbtb20*;
- (C) *Ascl1* е маркер, който започва да се експресира в началните етапи на диференциация на невроналните прогенитори. За разлика от предишните маркери около 1/3 от *Ascl1*⁺ клетки са *Zbtb20*⁻.

*Стрелките показват двойно позитивни клетки, плътните глави на стрелки – двойно негативни, а празните глави на стрелки – маркер⁺/*Zbtb20*⁻.

3.2. Основни дефекти в кортикалните интерневрони

Чрез GABA определихме общия брой на CINs в крайномозъчната кора. Използвахме животни на P12, тъй като на този етап от развитието процесите на постнатална миграция и апоптоза на CINs са завършили в голяма степен. След изброяване забелязахме малка разлика в клетъчната гъстота на GABA между контролните животни и *Zbtb20*^{-/-} мутантите (Фиг. 3.4.). Впоследствие преминахме към анализ на различните субпопулации CINs, произлезли от MGE и CGE. Това обхваща почти 100% от всички CINs.



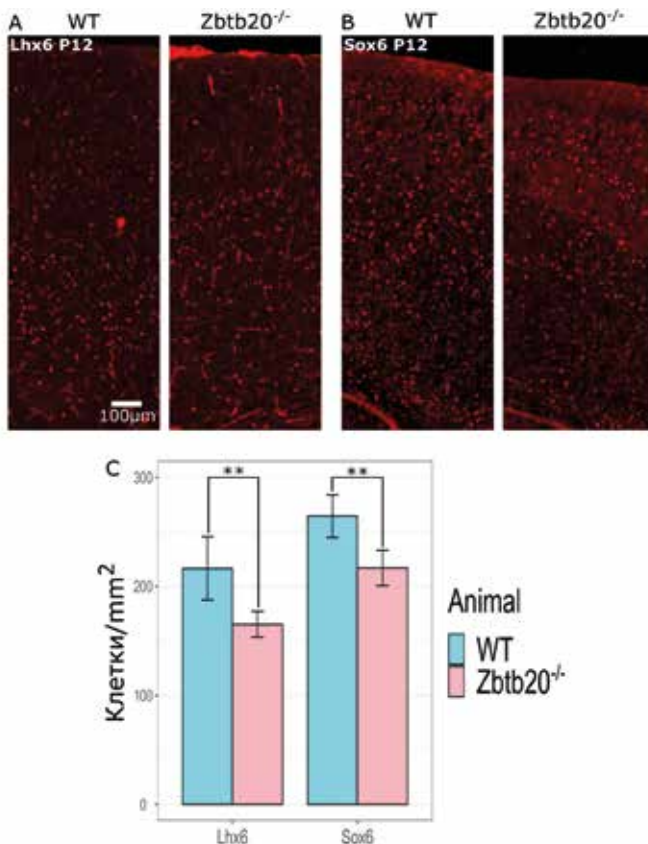
Фиг. 3.4. Запазена клетъчна гъстота на GABA-ергични CINs в соматосензорния кортекс

(A) CINs в соматосензорния кортекс от опитни животни на P12 са маркирани GABA. Не се наблюдават нарушения в броя и разположението им;
(B) Графиката представя резултатите от анализа на клетъчната гъстота.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.3. Значима редукция в броя на MGE-CINs

Lhx6 е TF, чиято експресия в постнаталния период е характерна само за произлезлите от MGE CINs (Miyoshi et al., 2010). Анализът на клетъчната гъстота на Lhx6⁺ клетки показва значимо понижение в броя им в соматосензорния кортекс на *Zbtb20*^{-/-} мутанти. Sox6 е друг подобен маркер, със сходно разпределение в кортекса на зрели животни (Batista-

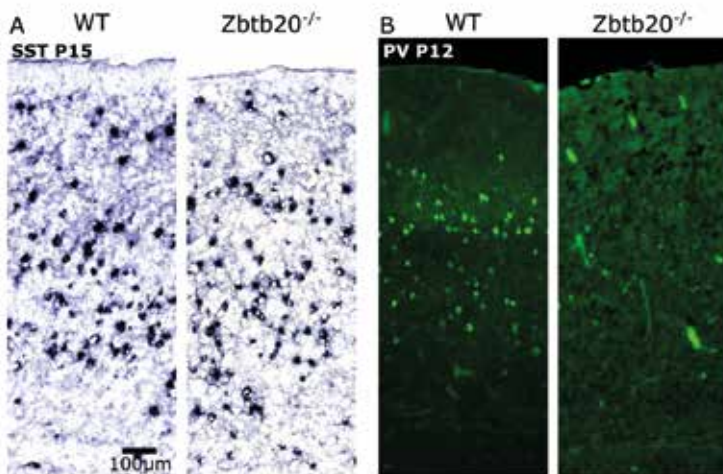
Brito *et al.*, 2009). При анализа на клетъчната му гъстота установихме същото понижение. Тъй като *Sox6* действа дистално от *Lhx6* в регулаторната каскада, сходните резултати бяха очаквани и взаимно потвърждаващи се (Фиг. 3.5).



Фиг. 3.5. Редукция в общия брой на MGE-CINs

(A) *Lhx6* показва занижение при *Zbtb20*^{-/-} спрямо контролните животни;
(B) *Sox6* показва сходно занижение при *Zbtb20*^{-/-} спрямо контролните животни;
(C) Графиката представя резултатите от анализа на клетъчната гъстота.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Както беше вече споменатото, MGE-CINs са съставени от две големи групи молекулярно диференцирани клетъчни популации, които не се припокриват. Те се различават на базата на експресията на калций свързващия протеин PV и неuropeптида SST. Започнахме с анализ на SST⁺ CINs (Hu *et al.*, 2017; Lim *et al.*, 2018). За целта използвахме ISH. Не се забелязва разлика между двете експериментални групи (Фиг. 3.6 А, С). Това предполага, че наблюдаваният Sox6 дефект най-вероятно се дължи на понижение в броя на PV⁺ CINs. Резултатите потвърдиха очакванията ни. При контролните животни се наблюдаваха многобройни PV⁺ клетки, докато при мутанта те почти изцяло липсваха (Фиг. 3.6 В, С). В ранните постнатални дни PV не се експресира. Синтезата му постепенно се засилва с матurationта на кортекса, като достига финалните си нива на P12 – периода, използван в анализа ни. Възможно е тези наблюдения да се обяснят със забавена матuration, в контекста на вече известните дефекти в глутаматергичните неврони при *Zbtb20*^{-/-} (Tonchev *et al.*, 2016). Трябва да се отбележи, че Lhx6 и Sox6 също бяха занижени, а те не са зависими от стадия на матuration – тоест се експресират в PV⁺ CINs, дори преди синтезата на PV да е иницирана. Тази комбинация от резултати предполага, че най-вероятната причина за наблюдавания фенотип е директен дефект в броя на PV⁺ CINs, намиращи се в неокортекса на опитните животни.



Фиг. 3.6. Редукция в броя на PV⁺, но не и на SST⁺ CINs

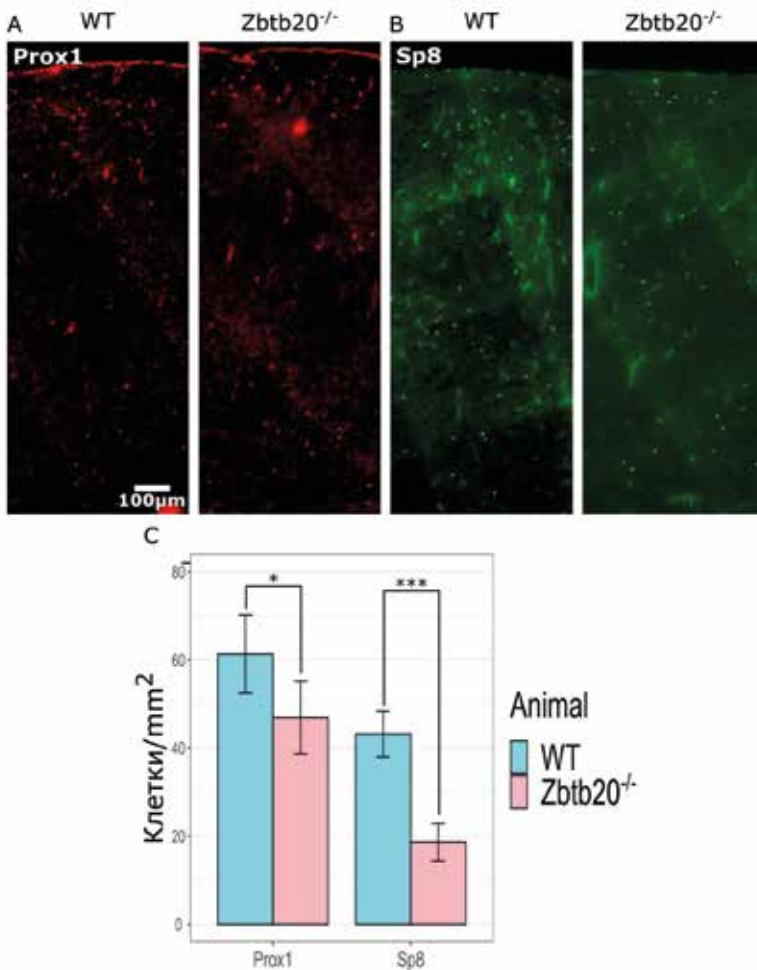
- (A) SST⁺ CINs са визуализирани чрез ISH. Не се наблюдава разлика в броя им между дивите и Zbtb20^{-/-} опитни животни;
- (B) PV⁺ CINs, визуализирани чрез имунофлуоресценция, показват почти пълна липса при Zbtb20^{-/-} мутанти;
- (C) Резултатите от анализа на клетъчната гъстота са представени на графиката.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.4. Дефицити в броя на CGE-CINs

Впоследствие пристъпихме към анализ на CGE-CINs. Prox1 е наскоро открит молекулярен маркер с експресия в CGE-CINs, предлагащ по-достъпна алтернатива на *5-HT3aR* трансгенните мишки за анализ на CGE-CINs. Само около 7% от изследваните CGE-CINs не са Prox1⁺, което го прави сравнително точен глобален маркер за CGE-CINs (Miyoshi *et al.*, 2015).

Основният му недостатък, докладван в предишни изследвания, е, че Prox1 антитялото (използваните в изследването са rabbit anti-Prox1, ReliaTech или goat anti-Prox1, R&D Systems) маркира и олигодендроцити (Rubin and Kessaris, 2013). За да адресираме този проблем, направихме двойно оцветяване за Prox1 и олигодендроцитния маркер Sox10. Интересно, при предварителните оцветявания не намерихме двойно позитивни клетки и почти всички Prox1 клетки бяха разположени основно в горните кортикални слоеве – разпределение, много типично за CGE CINs. Освен това не се наблюдаваше натрупване на Prox1⁺ в бялото вещество като corpus calosum и capsula interna. Тъй като използваното от нас антитяло е от различен производител (rabbit anti-Prox1, Covance), това може да обясни по-специфичното разпределение. Анализът разкри слабо понижение в клетъчната гъстота при мутанта спрямо контролата (Фиг. 3.7 А, С). Направихме допълнителен анализ с втори универсален маркер, Sp8, маркиращ 70% от CGE-CINs (Yozu, 2005; Ma *et al.*, 2012). Анализът на клетъчната гъстота на Sp8⁺ CINs разкри понижаване, потвърждаващо резултатите, получени за Prox1 (Фиг. 3.7 В, С).



Фиг. 3.7. Редукция в основни маркери за CGE CINs

(A) Имунофлуоресценция за *Prox1* показва натрупване на маркираните CINs предимно в горните кортикални слоеве, характерно за CGE-CINs. Забелязва се намален брой при *Zbtb20*^{-/-};

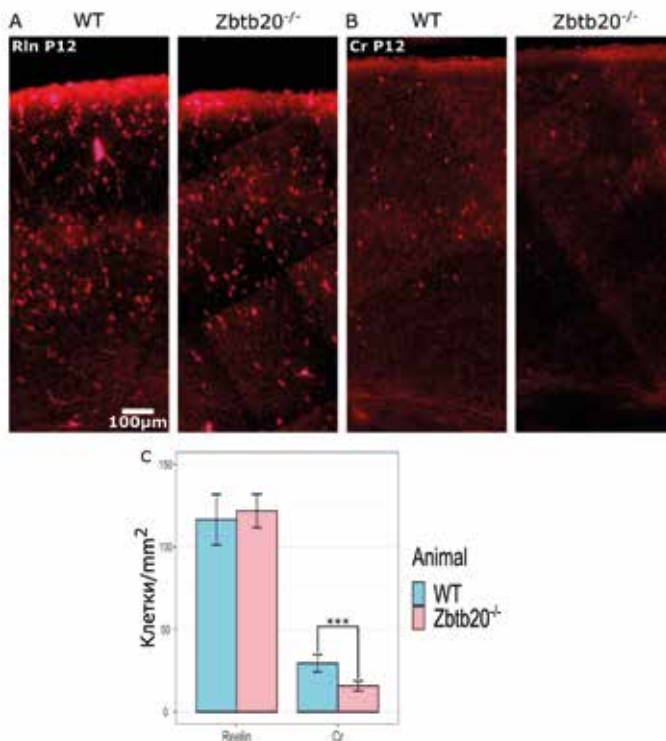
(B) *Sp8*, друг маркер, характерен за CGE-CINs, с подобно послойно разпределение на *Prox1*, показва аналогична разлика в общата клетъчна гъстота;

(C) Графика, представяща резултатите от анализа на клетъчната гъстота на *Prox1* и *Sp8*.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.5. Динамика в експресията на регион неспецифични маркери

Множество маркери се експресират в CINs, без да проявяват специфичност само към MGE или GCE, но маркират субпопулации, произлезли и от двете еминенции, като Rln и Cr данните от предишния ни анализ не показаха дефект в SST⁺ CINs. Следователно предположихме, че ако бъдат наблюдавани различия в Rln или Cr, те най-вероятно ще са за сметка на CGE. Не намерихме разлика в клетъчната гъстота на Rln (Фиг. 3.8 A). Интересно, Cr беше занижен в хомозиготния мутант (Фиг. 3.8 B).



Фиг. 3.8. Запазена клетъчна гъстота на Reelin и Calretinin *Zbtb20*^{-/-}

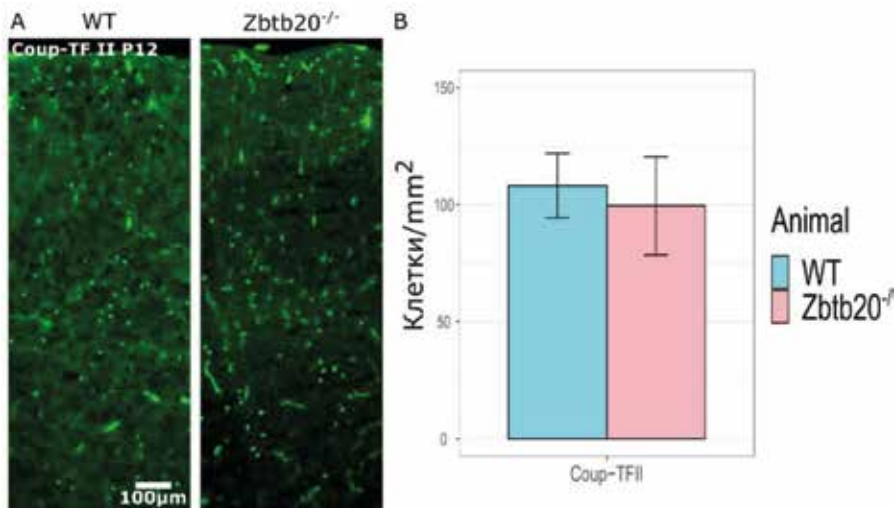
(A) Оцветявания за Rln не показват разлика в клетъчната гъстота;

(B) Занижение в клетъчната гъстота на Cr⁺ CINs;

(C) Графика, представяща резултатите от анализа на клетъчната гъстота на Rln и Cr.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Последният интерневронален маркер, който анализирахме, беше *COUP-TF II*, експресиран в SST^{+} CINs, разположени основно в кортикален слой 5, и CGE CINs (Kanatani *et al.*, 2008; Lodato *et al.*, 2011). Анализът не показва разлика в общата клетъчна гъстота (Фиг. 3.9).



Фиг. 3.9. Запазена клетъчна гъстота на Coup-TF II при *Zbtb20^{-/-}*

- (A) Оцветявания за Coup-TF II показва предоминантно разпределение в горните и пети кортикални слоеве. Не се наблюдава разлика в клетъчната гъстота;
- (C) Графика, представяща резултатите от анализа на клетъчната гъстота на Rln и Cr.

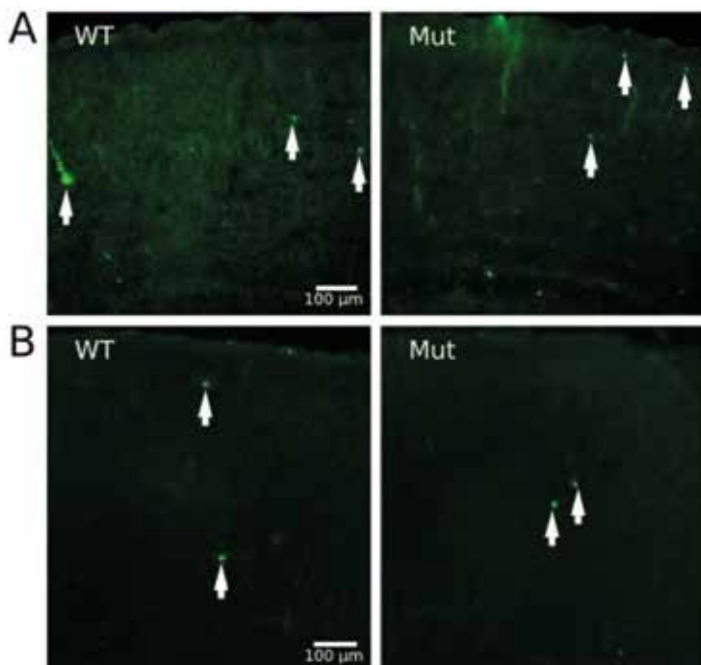
*Пунктираната линия показва границата между горните и долни слоеве

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.6. Не се наблюдава завишена апоптоза

По време на ембрионалното развитие CINs се продуцират в по-голямо от необходимото количество. След балансирането на кортикалните вериги част от тях не успяват да се интегрират успешно и претърпяват апоптоза поради липса на необходимите стимули. Имайки предвид и подлежащите дефекти в глутаматергичните кортикални неврони,

завишена апоптоза, причинена от вече наличните дефекти, може да е причината за наблюдавания фенотип. Основната вълна на апоптоза за MGE-CINs започва на P5 с рязък спад в броя им и завършва около P10. Въпреки че апоптозата на CINs продължава до P21, нивата ѝ са пренебрежимо ниски (Lim *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2018). За да маркираме апоптотичните клетки, използвахме активираната каспаза (aCaspase). Направените оцветявания бяха на P4 – преди основния апоптотичен период, и на P8 в средата му. Наблюдаваните клетки бяха единични, без да показват забележими различия между двете опитни групи животни (Фиг. 3.10.).



Фиг. 3.10. Липса на завишена постнатална апоптоза при ембрионални $Zbtb20^{-/-}$

(A) – (B) На P4 и P8 се забелязват единични апоптотични клетки, маркирани с aCaspase. Не се наблюдава разлика между двете експериментални групи животни.

3.7. Липса на преждевременна диференциация на интерневроналните прогенитори в *Zbtb20*^{-/-} субпалиум

Преждевременното диференциране може да доведе до ранно изчерпване на стволовоклетъчната популация и намаление в крайния брой на генерираните клетки. Това може да е причина за занижените нива на някой от CINs, които открихме в постнаталния неокортекс. За да отговорим на въпроса, преминахме към анализ на процента клетки, излезли от клетъчния цикъл. Този експеримент разчита на два основни маркера – Ki67 и BrdU.

BrdU е тимидинов аналог, който се инкорпорира отделящи се клетки по време на S-фазата от клетъчния цикъл. Когато е наличен в кръвообращението, се инкорпорира от всичкиделящи се клетки. Тъй като преминава през плацентарната бариера, инжектирането му по времето на втреутробното развитие ще маркира всички клетки, преминали през S-фазата в момента, когато BrdU е бил наличен в достатъчно висока плазмена концентрация. Ако стволовата клетка е преминала някакъв вид диференциращо делене, резултатът от това ще са дъщерни клетки, излезли от клетъчния цикъл, тоест в фаза G₀, с високи нива на BrdU в своето ДНК. Ki67 е стандартен маркер за клетки в процес на пролиферация, но не се наблюдава, ако те са в G₀.

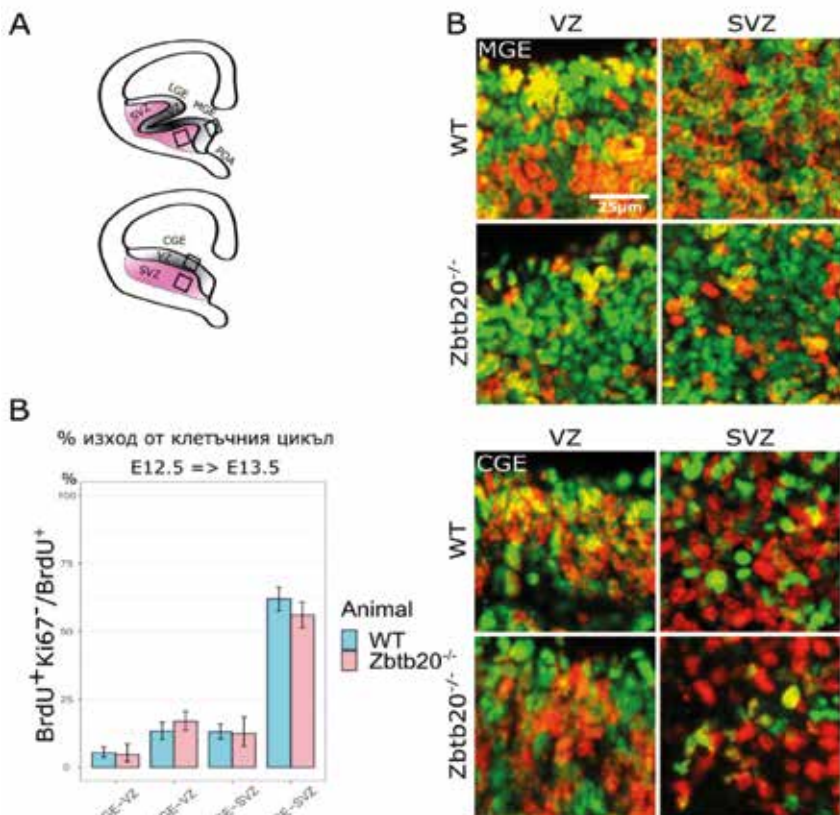
От изложеното до момента следва, че ще се наблюдават две групи от клетки:

1. Клетки, преминаващи през пролиферативно делене, които ще са позитивни и за двата маркера – BrdU⁺/Ki67⁺;

2. Клетки, преминаващи през диференциращо се делене, тоест извършващи едно последно делене, преди да излязат от клетъчния цикъл – BrdU⁺/Ki67⁻.

Отношението между излезлите от клетъчния цикъл клетки, дефинирани като BrdU⁺/Ki67⁻, и всички BrdU⁺ ще даде процента на клетки, излезли от клетъчния цикъл. Този индекс BrdU⁺Ki67⁻/BrdU⁺ е известен като „Percent Exit“ или „процент клетки, излезли от клетъчния цикъл“.

Започнахме с изчисляването му в ранните етапи на невrogenезата. За целта инжектирахме BrdU на E12.5 и дисецирахме ембрионите на E13.5 (24h BrdU). Изчислихме индекса за MGE и CGE, но не намерихме разлика между контролните животни и *Zbtb20*^{-/-} (Фиг. 3.11.).



Фиг. 3.11. Липса на преждевременно излизане от клетъчния цикъл на прогенитори за CINs на стадий E12.5 => E13.5 при Zbtb20^{-/-}

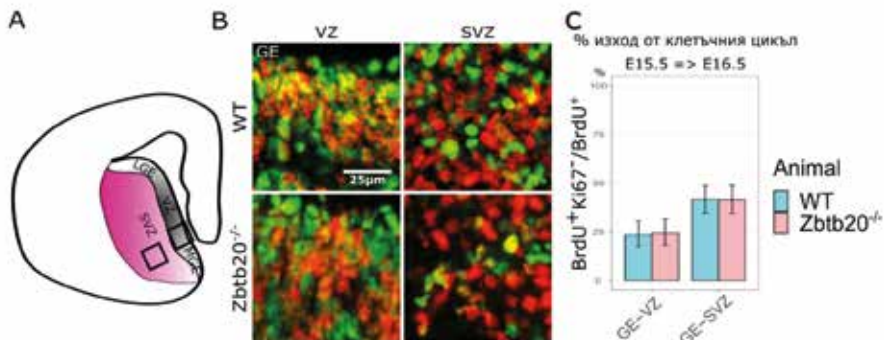
(A) Позицията на избраните региони на интерес за изброяването са показани с черни квадрати;

(B) Оцветяване за BrdU и Ki67 на E12.5 => E13.5. Двойно позитивните клетки показват популацията от делящи се клетки, докато BrdU⁺Ki67⁻ са клетките, излезли от клетъчния цикъл (показани със стрелки);

(C) Графика, показваща отношението на BrdU⁺/Ki67⁺ към общия брой BrdU⁺.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Като следваща стъпка проверихме за дефекти в диференциацията в късните етапи от неврогенезата. BrdU беше инжектиран на E15.5, а ембрионите – дисецирани на E16.5. След анализа на резултатите отново не намерихме разлика в процента клетки, напуснали клетъчния цикъл (Фиг. 3.12.).

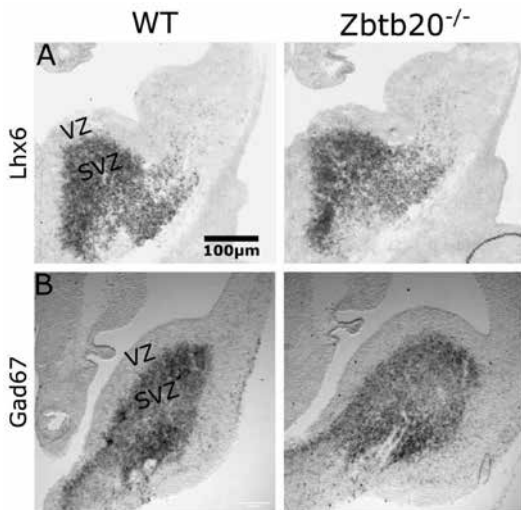


Фиг. 3.12. Липса на преждевременно излизане от клетъчния цикъл на прогенитори за *CINs* на стадий E15.5 => E16.5 при *Zbtb20*^{-/-}

- (A) Позицията на избраните региони на интерес за изброяването са показани с черни квадрати;
- (B) Оцветяване за BrdU и Ki67 на E15.5 => E16.5. Двойно позитивните клетки показват популацията от делящи се клетки, докато BrdU⁺Ki67⁻ са клетките, излезли от клетъчния цикъл (показани със стрелки);
- (C) Графика, показваща отношението на BrdU⁺/Ki67⁻ към общия брой BrdU⁺.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

При нормалните процеси на диференциация клетките постепенно променят своя молекулярен профил. Маркери за ранен етап от клетъчната съдба се заменят с такива, характерни за по-късен етап. Тъй като RG, която е популацията от незрели стволони клетки на областта, е разположена в VZ, тя не е позитивна за тези молекули. Следователно нормалната експресия на тези маркери е ограничена в областта на SVZ. Преждевременна диференциация в нервната система, и в частност субпалиума, може да се прояви с ектопична експресия на маркери, характерни за SVZ, на територията на VZ. В случая използвахме два от тези маркери – GAD-67 и Lhx6. Забеляза се рязка граница между VZ и SVZ и при двете експериментални групи, а маркерите бяха ограничени в рамките на SVZ (Фиг. 3.13.).

Взети заедно, данните за липса на промяна в изхода от клетъчния цикъл и липсата на експресия на молекулярните маркери GAD-67 и Lhx6 на територията на VZ взаимно се подкрепят и сочат към нормална скорост на диференциация на стволовите клетки в герминативната зона на CINs.

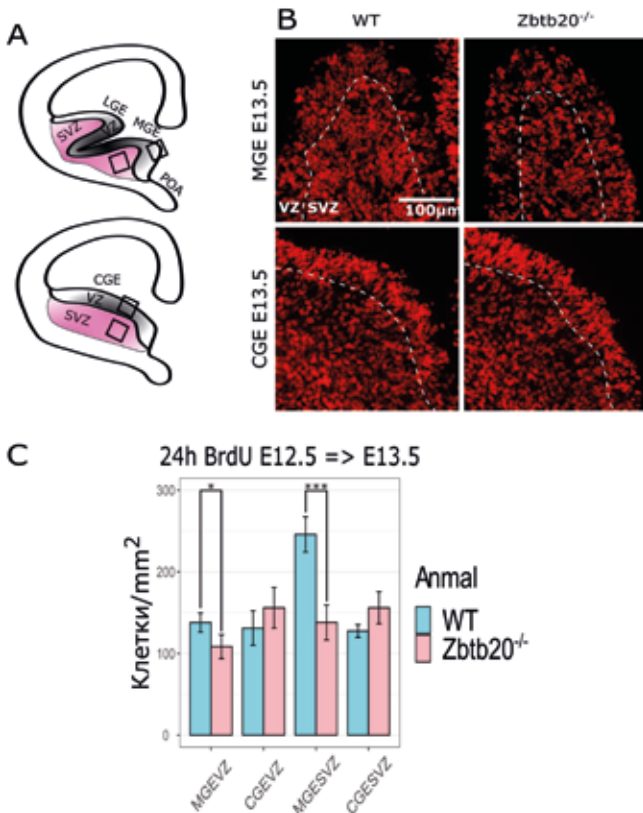


Фиг. 3.13. Липса на преждевременна диференциация на прогенитори при *Zbtb20^{-/-}*

- (A) Молекулярният маркер *Lhx6* не се експресира на територията на VZ и при двете експериментални групи;
- (B) Молекулярният маркер *GAD-67* не се експресира на територията на VZ и при двете експериментални групи.

3.8. Нарушение в пролиферацията в ранен стадий от развитието на MGE-CINs

За да проверим за дефекти в пролиферацията, направихме перфузия с BrdU на два етапа E12.5 и E15.5. Дисецирахме ембрионалните мозъци 24h след първата апликация на BrdU. Това ни позволи да оценим общата пролиферация за периодите на ранна E12.5 => E13.5 и късна неврогенеза E15.5 => E16.5. Общата гъстота на BrdU⁺ клетки беше намалена при мутанта както във VZ, така и SVZ на MGE в ранния период (Фиг. 3.13.). В CGE не се наблюдаваха дефекти (Фиг. 3.14.).



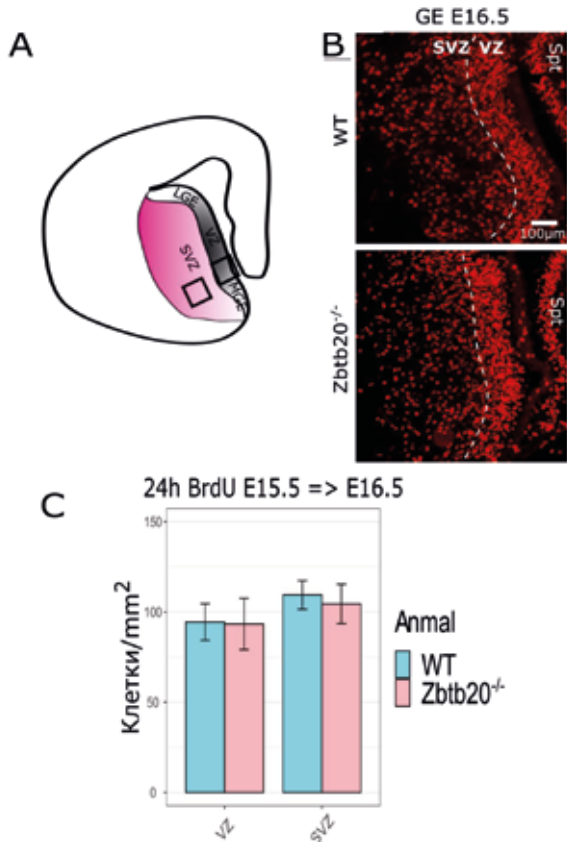
Фиг. 3.14. Нарушение в пролиферацията на MGE-CINs в *Zbtb20*^{-/-} на стадий E12.5 => E13.5

- (A) Схематично представяне на MGE, LGE, и GGE на E 13.5. С квадратчета са обозначени общата позиция на ROIs, използвани за анализа на клетъчна гъстота;
- (B) Микрографии на MGE и GGE, показващи силно намаление на BrdU⁺ клетки във VZ и SVZ на *Zbtb20*^{-/-} MGE, но не и на CGE. Пунктираната линия показва границата VZ/SVZ;
- (C) Графика, представяща резултатите от анализа на клетъчната гъстота на BrdU.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

На E15.5 от ембрионалното развитие на мишките MGE и CGE се сливат помежду си и са морфологично неразличими. Затова изчислихме

средната гъстота на BrdU⁺ клетки на цялата територия на ганглионарната еминенция отново за VZ и SVZ поотделно. Не се наблюдаваха различия между двете експериментални групи (Фиг. 3.15.).



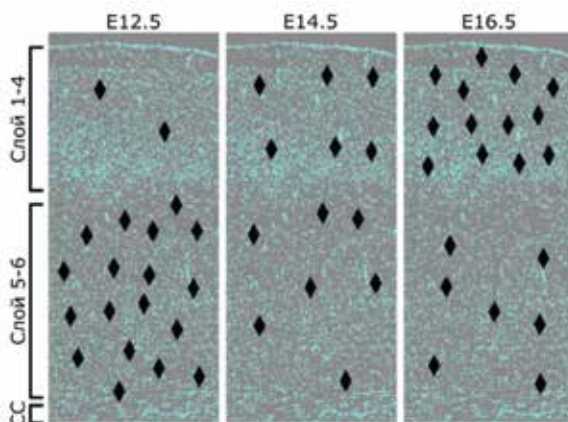
Фиг. 3.15. Нарушение в пролиферацията на MGE-CINs в *Zbtb20*^{-/-} на стадий E15.5 => E16.5

- (A) Схематично представяне на GE на E 16.5. С квадратчета са обозначени общата позиция на ROIs, използвани за анализа на клетъчна гъстота. Пунктираната линия показва границата VZ/SVZ;
- (B) Микрографиите на GE не показват разлика на BrdU⁺ между контролните животни и *Zbtb20*^{-/-};
- (C) Графика, представяща резултатите от анализа на клетъчната гъстота на BrdU.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.9. Нарушена времева динамика при генерирането на кортикалните интерневрони

По предишни данни *Zbtb20*^{-/-} мутантите имат нарушение в нормалното превключване между програмите за генериране на глутаматергични неврони за различните кортикални слоеве. Периодът от невrogenезата за генериране на слоеве 5–6 се удължава за сметка на този, предназначен за слоеве 1–4. Понижението в общия брой на Sox6 и наблюдаваните пролиферативни дефицити в MGE само в ранните етапи на невrogenезата, но не и в късните повдигна въпроса за времевата динамика при генерирането на кортикалните CINs и възможността за наличие на подобни дефекти. Във физиологични условия MGE–CINs заемат така наречената „inside-out” последователност на генериране. Подобно на глутаматергичните клетки по-рано родените CINs заемат предимно слоеве 5–6, а късно генерираните – предимно слоеве 1–4. (Pla *et al.*, 2006; Miyoshi *et al.*, 2007; He *et al.*, 2016) Тази зависимост е характерна само за MGE–CIN. Времевата зависимост в генериране на MGE–CINs зависимост е резюмирана за три основни етапа от ембрионалното развитие – E12.5, E14.5 и E16.5 на (Фиг. 3.16.).



Фиг. 3.16. Послойно генериране на CINs в зависимост от ембрионалния период

Представен е срез от соматосензорен кортекс, оцветен с DAPI. Черните ромбове схематично показват разпределението на MGE–CINs, генерирани на съответния ембрионален ден в различните кортикални слоеве.

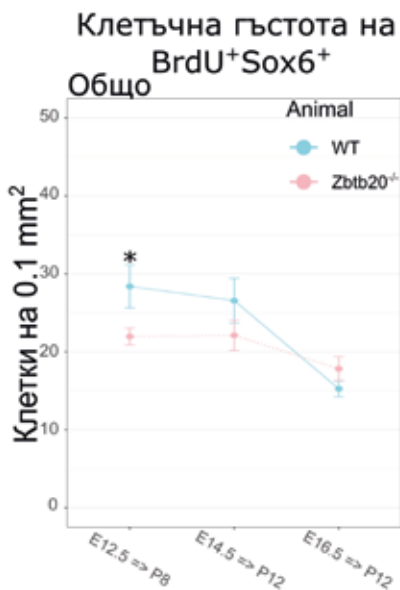
За да проверим за наличието на дефект, наподобяващ описания при глутаматергичните неврони, направихме „birth dating“ на Sox6⁺ CINs. Този метод позволява да се трасират произлезлите на даден етап от ембрионалното развитие клетки в постнаталния организъм чрез инжектиране на BrdU (Tonchev *et al.*, 2016). Експериментът разчита на два основни маркера – BrdU и маркер за клетъчната популация от интерес. Тъй като основните отклонения, свързани с нормалния фенотип, които установихме, бяха свързани с MGE-CINs, в случая избрахме Sox6. При този експеримент BrdU се инжектира на майчиния организъм пулсово за 24h по време на предварително избран период от вътреутробното развитие. Ако бремеността бъде продължена, новородените мишки ще имат инкорпорирано BrdU във всички свои клетки, произлезли по времето от вътреутробното развитие, когато той е бил наличен в кръвообращението. BrdU⁺Sox6⁺ клетки ще дефинират популацията от MGE-CINs, генерирани в съответния период на инжектиране.

За анализа на „birth dating“ избрахме три основни периода, на които да направим трасирането: E12.5; E14.5; E16.5. Мозъците бяха дисецирани на P12 или P8 в зависимост от преживяемостта на опитните животни.

За да трасираме родените на различни етапи CINs, направихме двойно оцветяване за Sox6/BrdU и изчислихме клетъчната гъстота на двойно позитивните клетки в соматосензорния кортекс. Забелязахме понижение в броя родени CINs на E12.5 при мутанта (Фиг. 3.17.). Интересно е, че в по-късните етапи на развитие, E14.5 и E16.5, тази разлика изчезна и мутантът достигна контролните нива (Фиг. 3.17.). Както очаквахме, ниските пролиферативни, установени на E12.5 в MGE, нива съответстват на по-малък брой MGE-CINs, произлезли в този период.

Вече споменахме зависимостта в послонното генериране на CINs. Липсата на разлика в броя генерирани клетки на E12.5 и E14.5 може да прикрива противоположно движещи се стойности между слоеве 1–4 и слоеве 5–6, подобно на докладваната за кортикалните глутаматергични неврони. За да адресираме тази възможност, разделихме анализа на неокортекса в две области според физиологичното време на генериране на MGE-CINs – слоеве 1–4 и слоеве 5–6. Резултатите за слоеве 1–4 показва значимо понижаване в броя генерирани CINs на E16.5 при *Zbtb20*^{-/-}. Въпреки че E12.5 и E14.5 не показва статистически значима разлика, се наблюдава тенденция за занижение (Фиг. 4.18 A). При слоеве 5-6

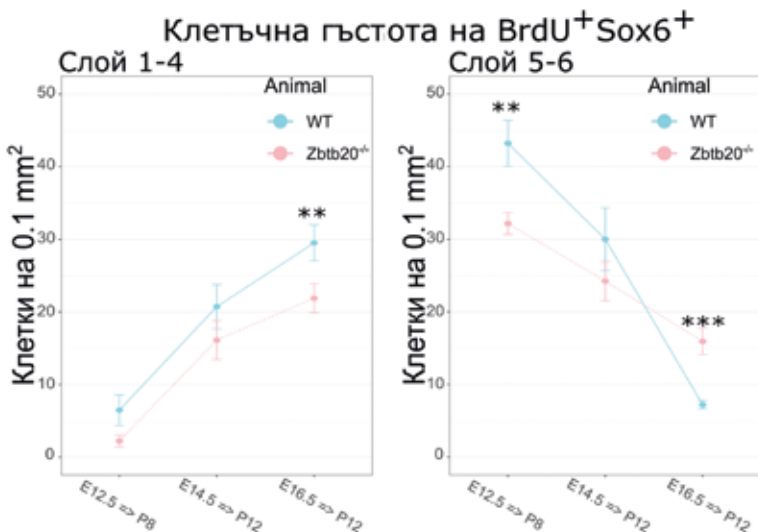
наблюдавахме намаление на броя CINs родени на E12.5 при мутанта. Интересно – на E14.5 резултатите, получени от контролната група и мутантите, се изравниха напълно, а на E16.5 мутантът изпревари контролата по брой генерирани CINs. На базата на тези данни изглежда, че мутантът започва неврогенезата за по-дълбоките слоеве 5–6 по-бавно от контролата. Впоследствие се изравнява с контролните животни и даже ги изпреварва в късните етапи по брой генерирани клетки (Фиг. 4.18 В). За сметка на това слоеве 1–4 никога не успяват да достигнат физиологични нива. Това се подкрепя и от предишните резултати, показващи пролиферативни дефекти в ранните, но не и в късните етапи на неврогенеза на територията на MGE.



Фиг. 3.17. Промени в клетъчната гъстота на BrdU⁺/Sox6⁺ при Zbtb20^{-/-}

Клетъчната гъстота на BrdU⁺/Sox6⁺ клетки на E12 показва статистически значимо занижение при Zbtb20^{-/-}, докато на E14.5 и E16.5 мутантът и контролната група постепенно се изравняват. Процентът на генерирани Sox6⁺ CINs при трасираните етапи показва сходна динамика на E12.5 и E14.5 въпреки занижения общ брой на E12.5. На E16.5 е генериран релативно по-голям процент от MGE-CINs при Zbtb20^{-/-} спрямо характерните за този етап физиологични нива.

* => $p = 0.05$, ** => $p > 0.05$, *** => $p > 0.001$



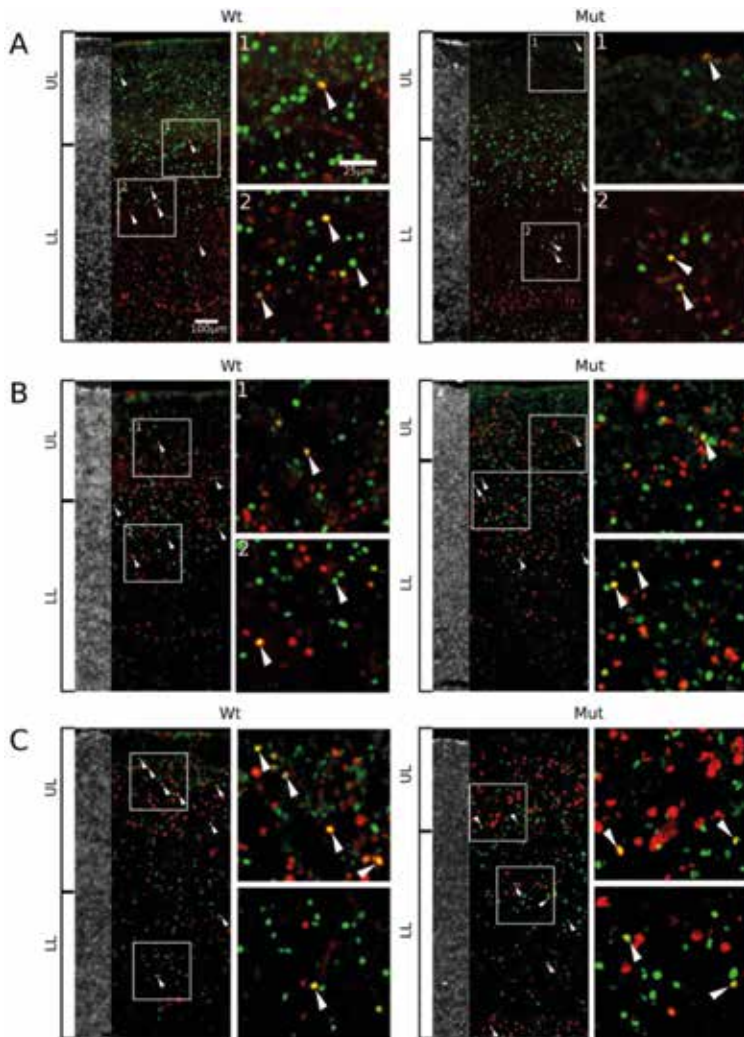
Фиг. 3.18. Промени в клетъчната гъстота на BrdU⁺/Sox6⁺ при Zbtb20^{-/-}

Клетъчната гъстота на BrdU⁺/Sox6⁺ клетки на E12 и E16 показва статистически значимо занижение при Zbtb20^{-/-}. Въпреки че E14 не достигна значими нива, се наблюдава тенденция на занижение. Клетъчната гъстота на BrdU⁺/Sox6⁺ клетки на E12 е по-ниска при Zbtb20^{-/-} спрямо контролата, като тази разлика изчезва на E14. На E16 Zbtb20^{-/-} запазва по-високи нива от контролните животни.

* => $p = 0.05$, ** => $p > 0.05$, *** => $p > 0.001$.

На E16.5 слоеве 1–4 при Zbtb20^{-/-} показва по-ниски стойности от контролата, докато на E16.5 слой 5–6 – по-високи. Наличието на двете стойности, които се движат в противоположни посоки, е причината тази разлика да не се забележи при данните, получени от анализа за цялата дебелина на кортекса. От друга страна, стойностите за двата участъка от кортекса на E12.5 се движат синергично и обединяването им води до значимата разлика при общия анализ.

На следващата фигура са представени репрезентативни микрографии от анализа. Добре забележима е разликата на E16.5, където има голямо повишение в броя на двойно позитивни клетки в горните слоеве и значимо по-малък брой в долните при WT спрямо мутанта. Обобщението на тези резултати е представено на Фиг. 3.19.



Фиг. 3.19. Послойно генериране на CINs в зависимост от ембрионалния период

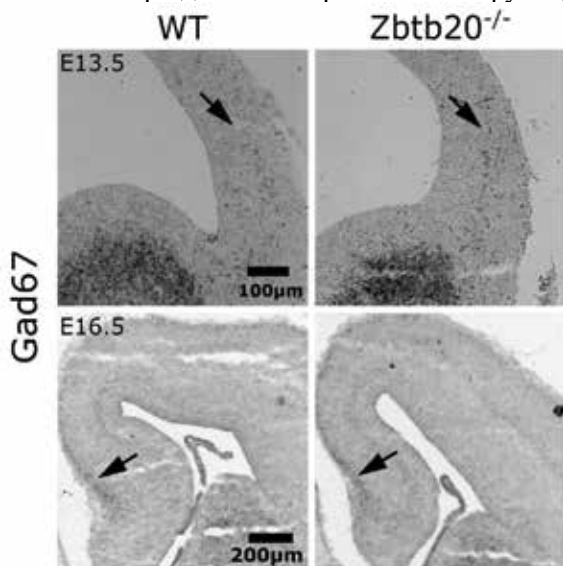
На фигурата са представени „Birth dating“ на три основни периода от интерневроналната неvroгенеза. BrdU е инжектирана съответно на E12.5, E14.5 и E16.5 и опитните животни са евтаназирани на P12.

(A) В ранните етапи (E12.5) BrdU позитивните клетки се намират главно в дълбоките слоеве;

- (B) На E14.5 разпределението им е по-хомогенно, тъй като MGE CINs се генерират за всички слоеве;
- (C) В края на неврогенезата (E14.5) CINs се генерират главно за горните кортикални слоеве и съответно BrdU⁺ клетки са концентрирани там в постнаталното животно.

3.10. Миграция на CINs

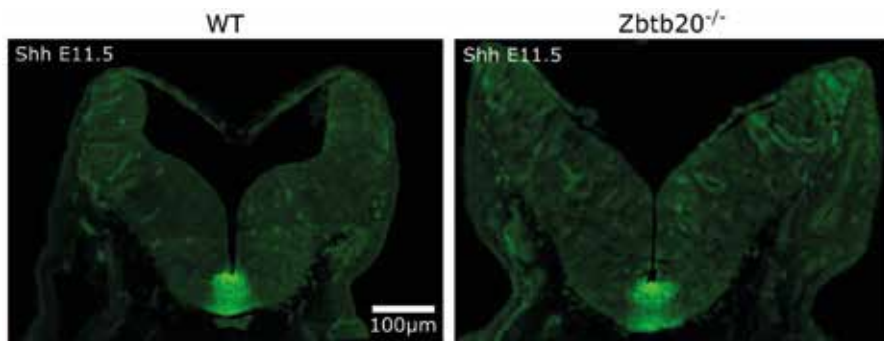
За да оценим миграционната активност на CINs, направихме ISH за *Gad67*, за да визуализираме тангенциалните миграционни пътища. На E13.5 CINs преминават през PSPB и постепенно инвазират кортикалната плочка. Степента на инвазия беше сходна при *Zbtb20*^{-/-} и WT. На E 16.5 CINs бяха преминали през цялата дължина на палиума и достигнаха хипокампалия зачатък и при двете експериментални групи (Фиг. 3.20.).



Фиг. 3.20. Нормално формиране на тангенциалните миграционни пътища
На E12.5 се вижда началният етап на тангенциалната миграция на CINs (маркирани с *Lhx6*) през територията на LGE, без още да са достигнали кортекса. Един ден по-късно те прекосяват границата палиум/субпалиум (маркирани с *GAD-67*) субпалиум и навлизат в кортекса. Дълбочината на кортикалната им инвазия изглежда сходна. На E16.5 и двете животни показват напълно формираните тангенциални пътища в MZ и SB. Броят на CINs, претърпели радиална миграция, е сходен.

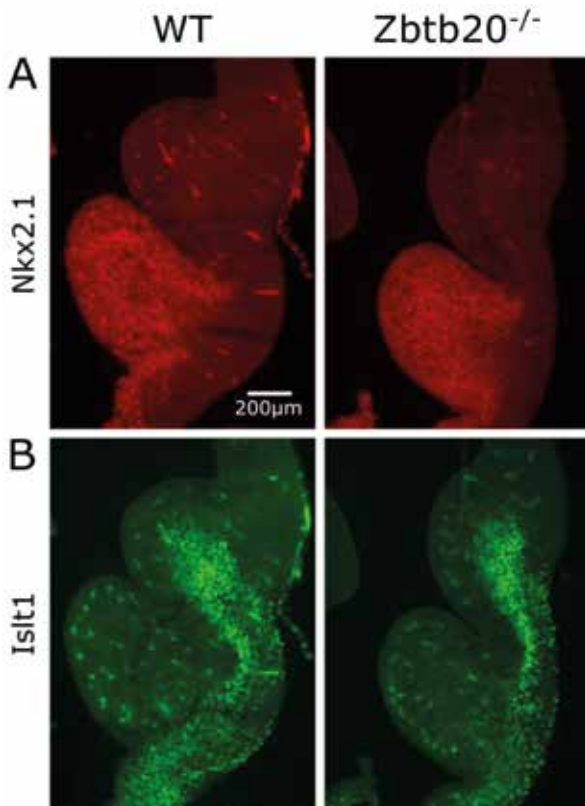
3.11. Експресия на транскрипционни фактори и молекулярни маркери, регулиращи ембрионалното развитие на CINs

Следващата ни цел беше да разкрием възможни молекулярни механизми, отговорни за наблюдаваните дефицити. За целта направихме ISH или IF оцветявания за панел от молекулярни маркери, отговорни за нормалното ембрионално развитие на субпалиума на различни етапи от ембриогенезата. Част от молекулите действат като морфогени и са отговорни за нормалното сформирание на субпалиума. Ранни дефекти в тяхната експресия водят до тежки малформации в тази област. В началните етапи от развитието дифузибилният лиганд Shh се секретира от малка група клетки във вентралната част на теленцефалона и промотира транскрипцията на фактори, дефиниращи бъдещата MGE (Gulacsi and Anderson, 2006). Направените оцветявания на E11.5 не показаха различия между WT и *Zbtb20*^{-/-} (Фиг. 4.21.).



Фиг. 3.21. Запазена експресия на SHH при *Zbtb20*^{-/-} на E11.5

Морфогенезата на субпалиума започва с молекулярното отграничаване на MGE от TF *Nkx2.1*. Нокаутирането му води до пълната загуба на MGE, която се замества от LGE (Sussel *et al.*, 1999). За да потвърдим нормалната морфогенеза на субпалиума, направихме оцветявания за съответните TF: *Nkx2.1*, *Islet1*. Избрахме *Islet1* като маркер за анализа поради специфичната му експресия в LGE SVZ. Регионите на експресия бяха идентични между двете групи опитни животни (WT и *Zbtb20*^{-/-}) (Фиг. 3.22.).

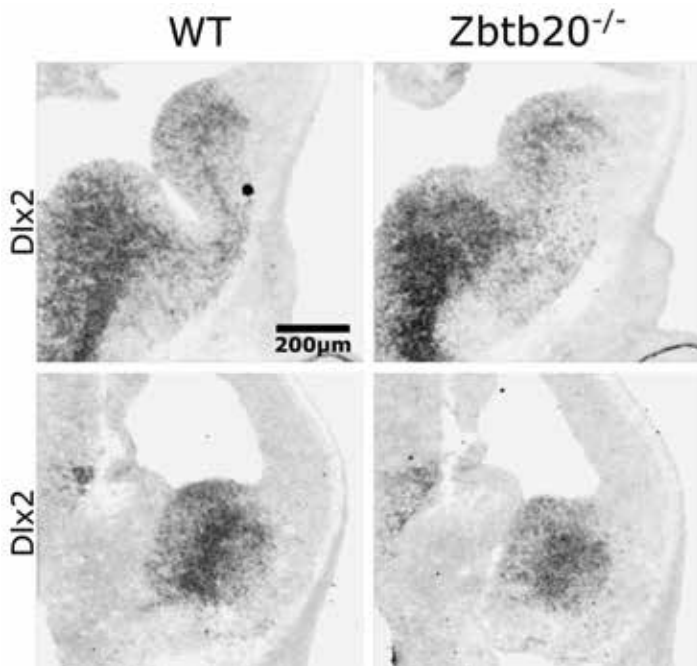


Фиг. 3.22. Нормално териториално молекулярно сформирание на MGE/LGE при *Zbtb20*^{-/-} на E12.5

- (A) *Nkx2.1* се експресира само в границите на MGE. На снимката се вижда нормално териториално разположение на маркера в MGE и липсата му в LGE;
- (B) *Islet1* се експресира в границите на LGE SVZ и мигриращите към олфакторния булб клетки. На микрографията се забелязва очакваната му липса в границите на MGE.

От Distalless хомеобокс гените двойките *Dlx1/2* и *Dlx5/6* се експресират в субпалиума. *Dlx1/2* се намират както във VZ, така и в SVZ и имат относително взаимозаменяема функция. Броят на експресиращите го клетки нараства в апико-базална посока. *Dlx1/2*^{-/-} мутанти показват

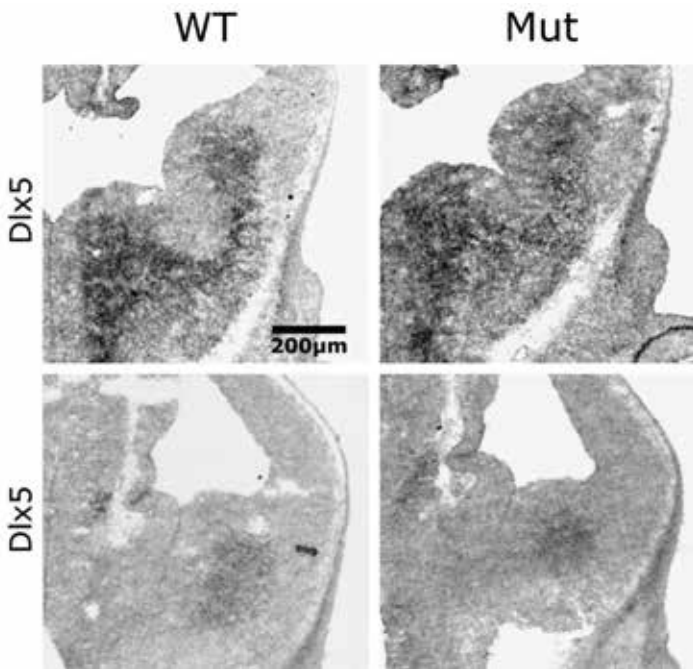
забавена диференциация, миграция и пролиферация главно в областта на SVZ (Anderson *et al.*, 1997; Petryniak *et al.*, 2007). Не се забелязва разлика между двете експериментални групи в зоната и сила на експресия на *Dlx2* (Фиг. 3.23.).



Фиг. 3.23. Нормална експресия на *Dlx2* при *Zbtb20*^{-/-} на E12.5

Dlx2 се експресира във VZ и SVZ на субпалиума. Наблюдава се еднаква експресия в MGE и LGE сходна граница палиум/субпалиум

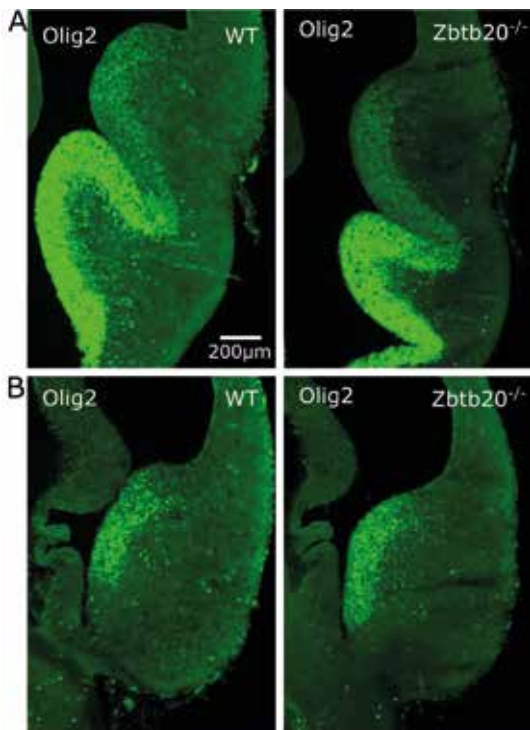
Дистално от *Dlx1/2* се намира двойката *Dlx5/6*. Трансплантирани MGE клетки от *Dlx5*^{-/-} или *Dlx5/6*^{-/-} мутанти в кортексите на контролни животни показват нормални нива на SST⁺ и силно занижение в броя на PV⁺ (Wang *et al.*, 2010, p. 6). Този фенотип на практика повтаря наблюденията от нас при *Zbtb20*^{-/-}. С тази цел направихме ISH за *Dlx5*, но не намерихме разлика (Фиг. 3.24.).



Фиг. 3.24. Нормална експресия на *Dlx5* при *Zbtb20*^{-/-} на E12.5

Dlx5 се експресира в SVZ на субпалиума. Наблюдава се еднаква експресия в MGE и LGE сходна граница палиум/ субпалиум. Липсва инвазия на територията на VZ, което говори за нормална диференциация на невроналните прогенитори.

Olig2 е директно репресиран от *Dlx1,2*, което обяснява силно завишените му нива при хомозиготните *Dlx1,2*^{-/-} мутанти (Petryniak *et al.*, 2007). Това води до преждевременна инициация на генетичната програма за формиране на олигодендроцити и повишение в техния брой, за сметка на CINs (Petryniak *et al.*, 2007). *Olig2*^{-/-} имат кортикален фенотип подобен на *Zbtb20*^{-/-}, свързан с експанзия на долните слоеве за сметка на горните. Данните за CINs обаче показват завишение на броя на PV⁺ CINs, което е в противоречие с наблюдавания от нас фенотип (Liu *et al.*, 2015). Оцветяванията за *Olig2* не показаха променени нива и територия на експресия, което подкрепя резултатите ни за дефектите в PV⁺ CINs *Zbtb20*^{-/-} (Фиг. 3.25.).

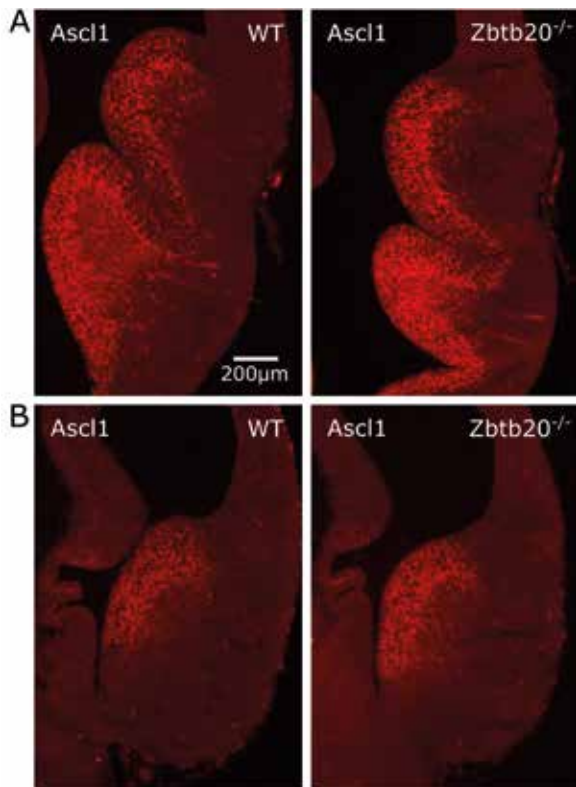


Фиг. 3.25. Запазена граница на експресията на Olig2 между VZ и SVZ в MGE и LGE при *Zbtb20*^{-/-} на E12.5

Olig2 се експресира в границите на VZ и SVZ. Броят на позитивни клетки постепенно намалява от VZ към SVZ. На (A) и (B) са представени MGE и CGE съответно. Липсва значима разлика.

Ascl1^{-/-} мутантите показват занижени нива на пролиферация на E12.5 и E15.5, маркирани чрез 1h BrdU. Това е съпроводено със засилен експресия на *Tuj1* и преждевременна експресия на SVZ маркери на територията на VZ – резултати, характерни за преждевременна диференциация на невроналните прогенитори. Не се наблюдава преждевременна апоптоза (Casarosa, Fode and Guillemot, 1999; Horton *et al.*, 1999). Получените от нас резултати показват занижена пролиферация на E12.5, но не и на E15.5, и то само на територията на MGE. Въпроса за преждевременната диференциация вече адресирахме с изчисляването на процента изход от клетъчния цикъл, който не показва разлика

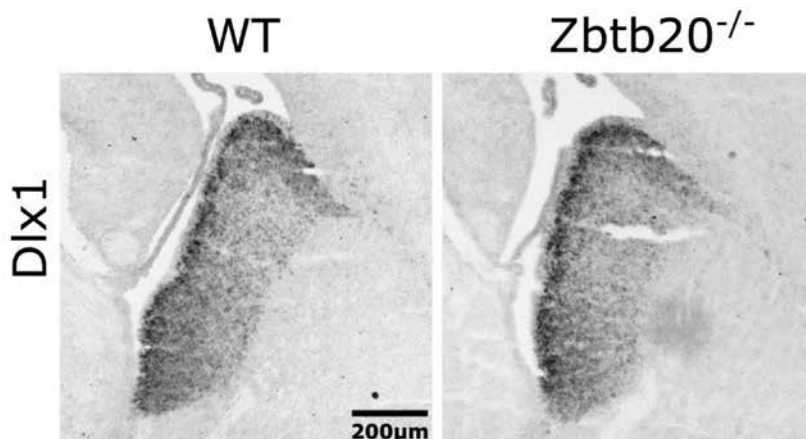
между двете опитни групи, и чрез ISH оцветявания за маркери като *Dlx5* и *Lhx6*, чиято територия на експресия е ограничена само в SVZ при нормални условия. За разлика от описаните по-горе дефекти при *Ascl1*^{-/-} мутанти, и при двете опитни групи тези два гена не навлязоха в територията на VZ. Тези резултати отхвърлят по-ранна диференциация на RG и допълнително се подкрепят от липсата на разлика в силата и територията на експресия на *Ascl1* във вентралния теленцефалон на *Zbtb20*^{-/-} (Фиг. 3.26.).



Фиг. 3.26. Запазена граница на експресията на *Ascl1* между VZ и SVZ в MGE и LGE при *Zbtb20*^{-/-} на E12.5

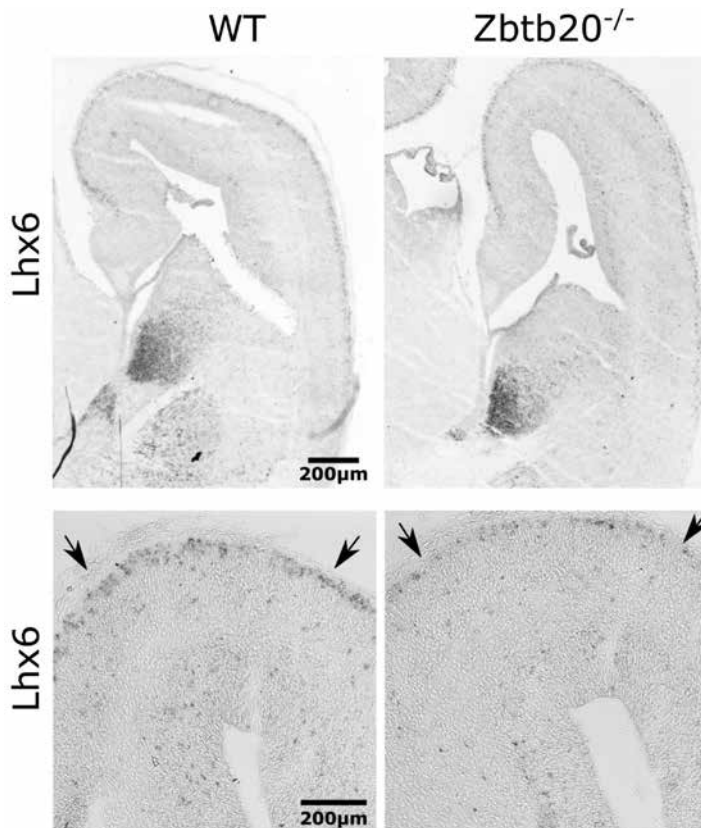
Ascl1 се експресира в границите на VZ и SVZ. Броят на позитивни клетки постепенно намалява от VZ към SVZ. На (A) и (B) са представени MGE и CGE съответно. Липсва значима разлика.

Продължихме анализа с оцветявания за *Dlx1* на E16.5, за да проверим за дефицити в късните етапи на невrogenезата. Експресията в субпалиума и на двата маркера беше нормална по сила и територия на експресия в WT и *Zbtb20*^{-/-} (Фиг. 3.27.).



Фиг. 3.27. Намален брой $Lhx6^+$, мигриращи в кортикалната плочка *Zbtb20*^{-/-}. Разпределението на *Lhx6* в субпалиума е сходно между двете групи. Мигриращите клетки в палиума като цяло са занижени при мутанта.

След това направихме оцветяване за *Lhx6* на E16.5. Експресията в субпалиума беше нормална в *Zbtb20*^{-/-}. Наблюдаваше се леко занижение в броя на мигриращи *Lhx6*⁺ CINs на територията на MZ миграционен път. Това може да се дължи на пролиферативните дефекти, които открихме в ранните етапи на невrogenезата, и отговаря и на адултния фенотип, където има занижение в броя на *Lhx6*⁺ и *Sox6*⁺ клетки (Фиг. 3.28.).



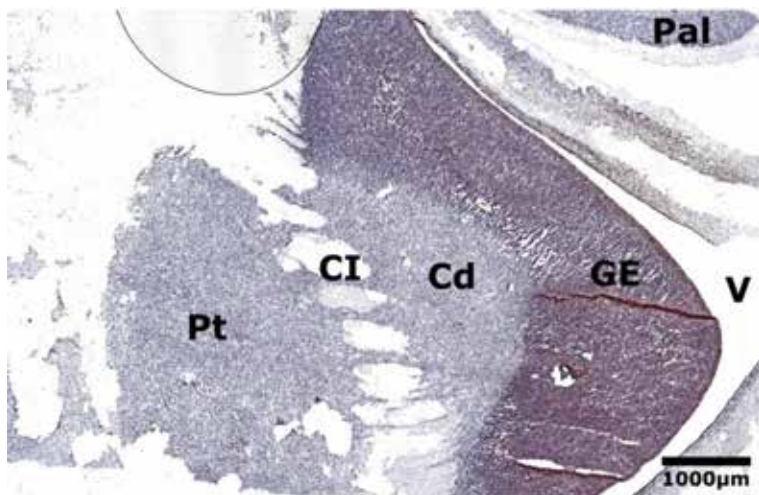
Фиг. 3.28. Нормално териториално разпределение на субпалиумния маркер *Dlx2* при *Zbtb20*^{-/-} на E16.5

Lhx6 има сходна сила и територия на експресия в рамките на субпалиума, но се наблюдава занижен брой мигриращи CINs в MZ миграционен път (показано със стрелки).

3.12. Експресия на ZBTB20 в субпалиума на човек

Синдромът на Primrose е асоцииран с мутации в *ZBTB20*. Много от симптомите му са свързани с дефекти в централната нервна система – микроцефалия, умствено изоставане и поведенчески отклонения (Cordeddu *et al.*, 2014). Това ни подтикна да проучим експресията на *ZBTB20* в субпалиума при човека. Избрахме етапа GW14, понеже съ-

ответства на началото на експресията при мишки. На този стадий от развитието стриатумът беше морфологично различим на стандартно оцветяване с хематоксилин. Герминативната зона на ганглионарните еминенции беше добре отдиференцирана като хиперцелуларна зона, покриваща n. Caudatus (Фиг. 3.29.).

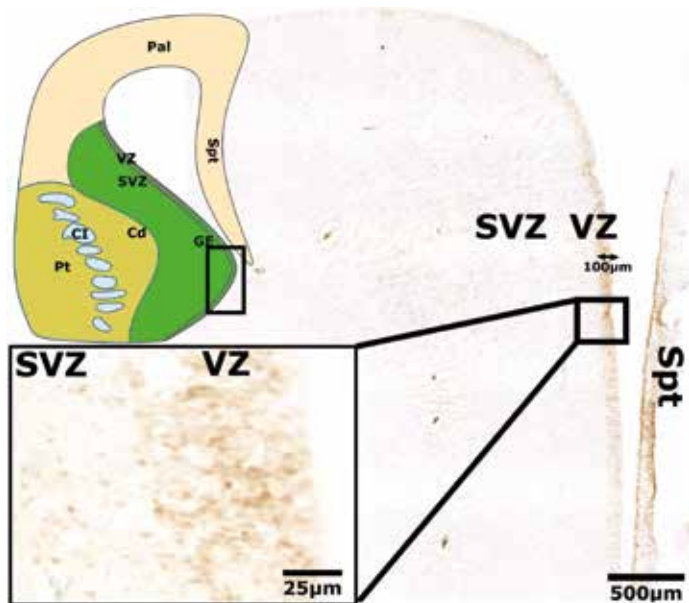


Фиг. 3.29. Морфология на субпалиума на човешки ембрион GW14

През GW14 стриатумът е морфологично различим. На този етап вече се наблюдава как Capsula Interna разделя n. Caudatus от Putamen. N. Caudatus все още е покрит от дебел активен герминативен слой на ганглионарните еминенции.

**CS – n. Caudatus; CI – Capsula Interna; GE – ганглионерна еминенция; Pal – палиум; PT – Putamen; V – вентрикул*

Като следваща стъпка направихме имунохистохимично оцветяване, за да оценим експресията на *ZBTB20* в субпалиума. Наблюдавахме модел на експресия, подобен на този в мишия субпалиум. На препаратата беше ограничена зона на силна експресия на 100 μm от вентрикуларната повърхност, което съответства на VZ. Базално от нея, на територията на SVZ, се наблюдаваха само единични разпръснати клетки (Фиг. 3.30.).

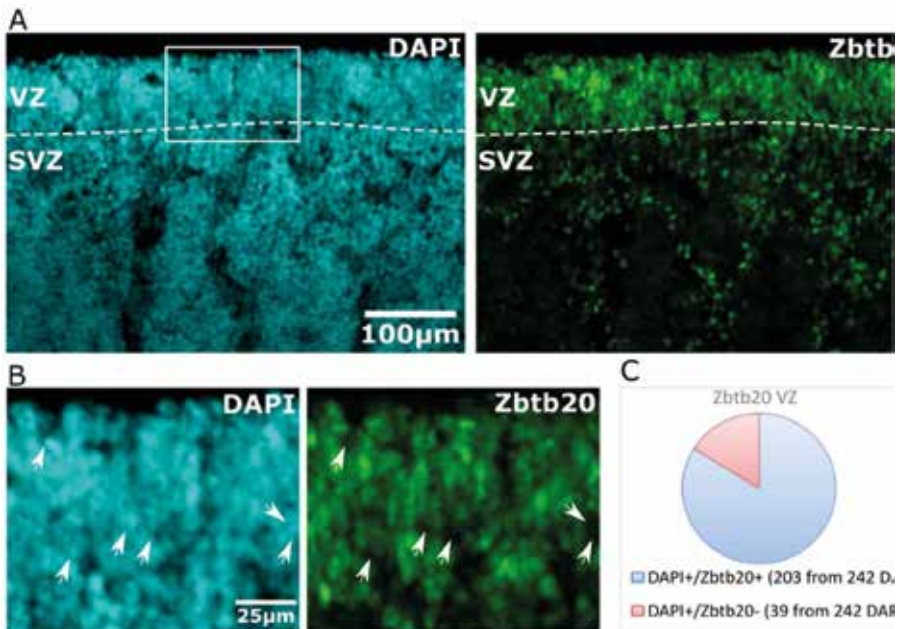


Фиг. 3.30. *Zbtb20* се експресира в SVZ на човешки субпалиум GW14

На GW14 се забелязва силна експресия на *Zbtb20* във VZ, докато в SVZ има разпръснати единични позитивни клетки. Зависимостта в разпределението на *Zbtb20* на територията на субпалиума е сходна с тази, наблюдавана при мишката.

*CS – *n. Caudatus*; CI – *Capsula Interna*; GE – ганглионерна еминенция; Pal – палиум; PT – *Putamen*

За да оценим по-добре границата VZ/SVZ, направихме флуоресцентно оцветяване за DAPI и ZBTB20. VZ се различава по значително по-високата клетъчна гъстота. Както и при мишката, в областта на VZ експресията беше много по-силна, отколкото в SVZ. Като следваща стъпка проверихме каква част от всички клетки във VZ експресират ZBTB20. По-голямата част от случайно избраните ядра бяха позитивни за ZBTB20 (203 от 242) (Фиг. 3.31.).



Фиг. 3.31. *Zbtb20* се експресира в SVZ на човешки субпалиум GW14

- (A) IF за *Zbtb20* в човешка ганглионарна еминенция. Забелязва се границата VZ/SVZ, демаркирана от клетъчната гъстота на DAPI. VZ е силно позитивна за *Zbtb20*. В SVZ се намират единични позитивни клетки.
- (B) По-голяма част от клетките, маркирани с DAPI, са позитивни за *Zbtb20* на територията на VZ. Стрелките показват единичните DAPI+/*Zbtb20*-клетки. (Представено е увеличение на прозореца от (A));
- (C) Графика, показваща каква част от DAPI са позитивни за *Zbtb20*.
- *VZ – венстрикуларна зона, SVZ – субвенстрикуларна зона

4. ДИСКУСИЯ

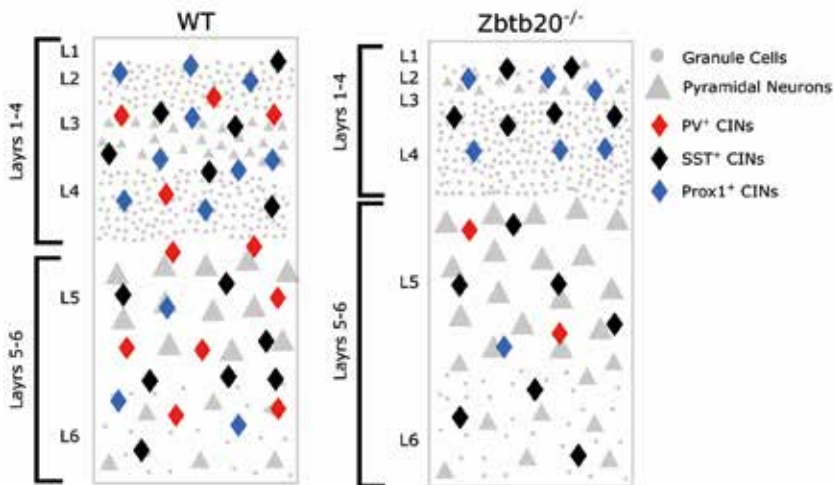
В настоящото изследване за пръв път показваме експресията на иРНК/протеина на *Zbtb20* в субпалиума на мишки и хора. Доказваме значението му за нормалното развитие на интерневроните в неокортекса. *Zbtb20*^{-/-} мутантите проявяват специфично намаление само на PV⁺ MGE-CINs и генерализирано занижение в CGE-CINs. Изтъкваме занижените пролиферативни нива по време на ранните етапи от неврогенезата в MGE, както и нарушението в последователността на послойно генериране на MGE-CINs като възможни основни механизми за наблюдаваните нарушения.

4.1. *Zbtb20* води до занижаване в клетъчната гъстота на специфични CINs

Един от основните резултати на дисертационния труд показва занижение в клетъчната гъстота на CINs, маркирани с GABA в *Zbtb20*^{-/-} мишки. Тези резултати дават отправна точка при проучването на значението на *Zbtb20* за нормалното развитие на CINs. Тъй като GABA маркира всички CINs (виж литературен обзор – 2.4. Молекулярна класификация на кортикалните интерневрони във възрастни животни), това създава нуждата от много по-детайлен анализ на основните им субпопулации. За да адресираме този въпрос, се възползвахме от панел от молекулярни маркери, които позволяват разграничаването на отделните видове CINs. Основата на анализа ни лежи на три главни маркера: *Lhx6* и *Sox6*, които бележат генерираните от MGE-CINs, и *Prox1* – маркиращ CGE-CINs (Liodis *et al.*, 2007; Batista-Brito *et al.*, 2009; Rubin and Kessararis, 2013).

Основният дефект в неокортекса на P12 *Zbtb20*^{-/-} мишка е свързан със значимо занижение както в броя на MGE-CINs, маркирани с TF *Lhx6* или *Sox6*, така и в броя на *Prox1*. По-детайлен анализ на MGE-CINs разкри, че занижението се дължи на PV⁺ субпопулацията, но не и на SST⁺ (Фиг. 4.1.). От всички използвани маркери най-силна редукция наблюдавахме в PV⁺ CINs.

В допълнение на горепосочените маркери разширихме анализа си и с протеините Cr, Rln и Coup-TF2, които бележат субпопулации от SST и *Prox1* CINs. Единствено в Cr⁺ CINs беше открита статистически значима разлика.



Фиг. 4.1. Схематично обобщение на фенотипа на CINs в соматосензорния кортекс при $Zbtb20^{-/-}$ на P12

MGE-CINs се делят на две големи групи SST⁺ и PV⁺. Основният фенотип е свързан с почти пълната липса на PV⁺ CINs (червени ромбове) в соматосензорния кортекс на $Zbtb20^{-/-}$. За сметка на това не се наблюдават значими разлики в SST⁺ CINs (черни ромбове). Наблюдава се и слабо, но значимо занижение в общата гъстота на CGE-CINs, маркирани с Prox1⁺.

4.2. Механизми, причиняващи постнаталните дефекти

Занижената клетъчна гъстота може да се дължи на множество фактори, засягащи биологията на невроналните стволови клетки или прогенитори по време на развитието: 1. Изначално намалена способност за пролиферация; 2. Завишена апоптоза; 3. Преждевременна диференциация, която води до постепенно изчерпване на стволовоклетъчния резерв.

4.2.1. Пролиферативни дефекти в ранните етапи на развитие

Чрез инжектиране на BrdU за период от 24h получихме представа за пролиферацията в рамките на периодите E12.5 => E13.5 и E15.5 =>

E16.5. Статистически значима редукция на пролиферацията беше открита само в MGE на E12.5 => E13.5. Този времеви интервал съвпада с пика на образуване на PV⁺ CINs, което е в пълно съответствие с нашите резултати, показващи драстично занижение на PV⁺ CINs на *Zbtb20*^{-/-} мутантите.

Сходният брой BrdU⁺ клетки в CGE е комбиниран с намалението на Prox1⁺ CINs в *Zbtb20*^{-/-}. Това означава, че е възможно фенотипът на Prox1⁺ CINs да е вторичен. Не може да се изключи и възможността да има слаба промяна в броя на BrdU⁺ клетки, която не може да бъде засечена с настоящото изследване.

4.2.2. Липса на дефекти в диференциацията и апоптозата при *Zbtb20*^{-/-}

Анализът на клетъчната диференциация беше извършен посредством изчисляването на процента клетки, излезли от клетъчния цикъл по вече описания начин, но не намерихме значима разлика между мутантните и контролните. Преждевременна диференциация може да се прояви и с разпространето на маркери за напреднал стадий на диференциация, като Lhx6 или Gad67, от територията на SVZ към VZ. Експресията им беше ограничена само в рамките на SVZ.

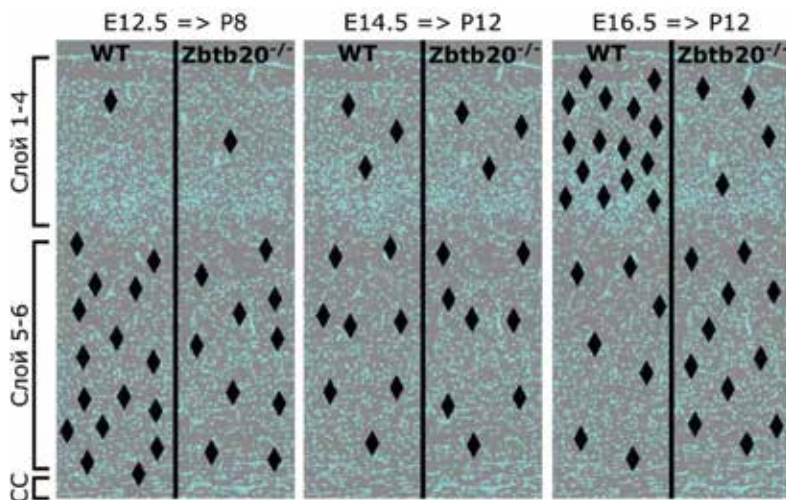
За да изследваме апоптозата, направихме оцветяване за aCaspase, но разлики не бяха открити в постнаталния неокортекс.

4.3. Нарушена динамика във времето на образуване на CINs

Няколко отделни групи показват, че заглушаването на експресията на *Zbtb20* води до дефекти в послейното генериране на неокортикалните глутаматергични неврони (Tonchev *et al.*, 2016; Medeiros de Araújo *et al.*, 2021a; Wang *et al.*, 2021). Тъй като MGE-CINs показват зависимост спрямо послейното си разположение в кортекса и времето за генериране, трасирахме MGE-CINs в хомозиготни *Zbtb20*^{-/-} мутанти според времето на раждане чрез вече описания „Birth Dating” метод. Общият анализ на CINs в соматосензорния кортекс разкри силно занижение в

клетъчната гъстота само на E12.5. Тези резултати съвпаднаха със занижената пролиферация на E12.5 => E13.5 при *Zbtb20*^{-/-}.

При послойния анализ разделихме соматосензорния кортекс на повърхностни (слоеве 1–4) и дълбоки слоеве (слоеве 5–6). Резултатите разкриха по-малък брой генерирани CINs за слоеве 5–6 MGE-CINs при *Zbtb20*^{-/-} на E12.5. Мутантът достигна стойности, близки до контролните на E14.5, и впоследствие се задържаха абнормно високи на E16.5. Тези относително по-високи стойности бяха съпроводени със занижение в генерираните CINs за слой 1–4 на E16.5 (Фиг. 4.2). Описаният фенотип силно наподобява времевите дефекти, докладвани за кортикалните глутаматергични неврони (Tonchev *et al.*, 2016).



Фиг. 4.2. Промени във времевата структура на BrdU⁺/Sox6⁺ при *Zbtb20*^{-/-}

На фигурата е представена област от соматосензорния кортекс, оцветена с DAPI. Черните ромбове показват схематично разположението на Sox6⁺/BrdU⁺ CINs. На E12.5 => P8 *Zbtb20*^{-/-} има относително занижение на броя генерирани Sox6⁺ CINs в слой 5–6, като по-късно достига нивата на WT на E14.5 => P12. И на двата етапа слой 1–4 имат сходна динамика. На по-късния етап E16.5 => P12 се вижда, че *Zbtb20*^{-/-} има по-високи нива на генерирани Sox6⁺ за долните слоеве, за сметка на силно занижения им брой в слой 1–4.

*CC – corpus callosum

4.4. Възможни недостатъци на експерименталната постановка

Недостатък на експеримента е използването на глобална КО мишка, което внася допълнителни променливи в анализа ни, като влиянието на странични фактори, свързани с хормонални промени и подлежащите промени в неокортекса. Въпреки че наблюдаваните дефекти в CINs могат да бъдат породени от тези фактори, смятаме резултатите за резултат на директното действие на *Zbtb20* върху развитието на CINs поради:

1. Експресията на *Zbtb20* в субпалиума предшества тази в кортекса, където на E12.5 тя тепърва започва. Малко вероятно е нокаутирането на *Zbtb20* в кортекса да доведе до промяна в генетичната регулация на субпалиума и до вторични дефекти.
2. Възможно е завишаване на броя на MGE-CINs в слоеве 5–6, генерирани на E16.5, съпроводено със и съответното намаление на тези за слоеве 1–4 да е продукт на преразпределението на нормален брой генерирани CINs между слоевете. Това може да е компенсаторна реакция от страна на CINs, породена от завишения брой глутаматергични неврони в слоеве 5–6, съпроводено за сметка на тези от слоеве 1–4. Това обяснение изключва наблюдаваното занижение в броя на MGE-CINs в слоеве 5–6, генерирани в по-ранния E12.5. Освен това промяна в разпределението на CINs не взема под внимание и пролиферативните дефекти, наблюдавани при 24h перфузия с BrdU, както и намалението на клетъчната гъстота на GABA⁺, Sox6⁺ и Lhx6⁺ CINs. Поради това смятаме наблюдавания фенотип за директен резултат от ефекта на *Zbtb20* върху ембрионалното развитие на CINs.
3. Кортикалният хем е отговорен за насочената миграция на CINs. При *Zbtb20*^{-/-} мутантите той е силно хипоморфен. При експериментални животни с липсващ кортикален хем се наблюдават дефекти в миграцията на CINs, свързани с преждевременна инвазия на кортикалната плочка от тангенциално мигриращи клетки, последвана от преждевременна радиална миграция.¹⁵⁸ Въпреки че миграционни дефекти не могат да бъдат напълно изключени, са малко вероятни, тъй като се наблюдава относително сравнително малка степен на инвазия на кортикалната плочка от тангенциално мигриращите CINs, маркирани с Lhx6 или GAD-67. Въпреки

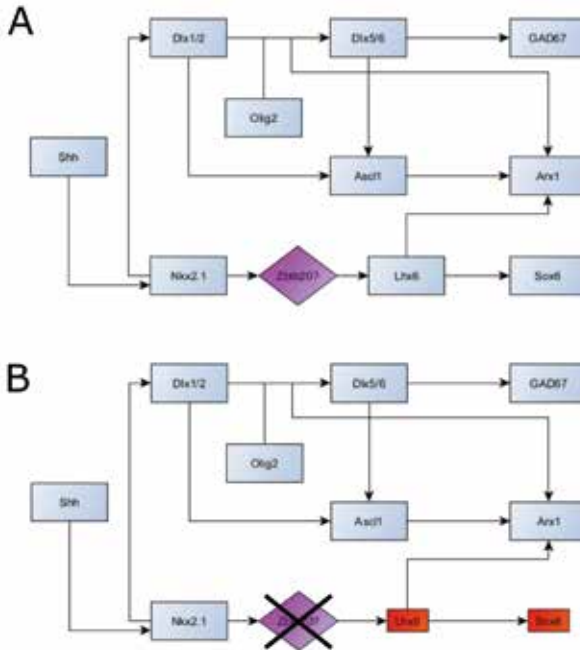
- че постнаталният хипокамп е силно хипоморфен, кортикалният хем, маркиран от TF Lmx1a, е наличен още в ранните етапи на развитието в *Zbtb20*^{-/-} мишки, докато докладваните миграционни дефекти са при опитни животни с пълна аблация на региона (Фиг. 5.3.) (Chizhikov *et al.*, 2010; Caronia-Brown and Grove, 2011; Rosenthal *et al.*, 2012). Освен това MGE хипокампални интерневрони достигат и се разпределят в хипокампа на *Zbtb20*^{-/-}, въпреки че силните морфологични дефекти не позволяват анализа им.
4. Възможно е хормонално влияние при глобалните мутанти върху развитието на ЦНС поради вече описаните дефекти в хипофизата и нарушения глюकोзен метаболизъм на *Zbtb20*^{-/-}. Трябва да се има предвид, че наблюдаваният дефект в послойното генериране на глутаматергичните неврони при глобалните *Zbtb20*^{-/-} мутанти беше докладван по-късно и при условни нокаут животни, което отрича повлияването на фенотипа от дефекти във физиологичните хормонални нива (Tonchev *et al.*, 2016; Medeiros de Araújo *et al.*, 2021b). Въпреки че това не изключва хормоналното влияние върху развитието на CINs, е малко вероятно да е основната причина за развитието на наблюдавания фенотип.

4.5. Експресията на *ZBTB20* в човешкия субпалиум

За първи път показахме експресията на *ZBTB20* в човешкия субпалиум. Наблюдаваният модел на разпределение силно наподобяваше този при мишки. Мутации в *ZBTB20* при хора води до синдрома на Primrose, при който част от симптомите са микроцефалия, поведенчески разстройства и умствено изоставане, диабет и преждевременна осификация на вътрешното ухо. Глобалните *Zbtb20*^{-/-}, използвани в това изследване, се характеризират с микроцефалия, нарушен глюкозен метаболизъм и забавен растеж. Силното сходство между двата фенотипа предполага и относително запазени междувидови функции. Скорошно изследване на Wang *et al.* прави междувидово сравнение (човешки и миши тъкани) на транскриптомните профили на невронални прогенитори от ганглионарни еминенции. При анализа си не откриват междувидови разлики в регулацията на *Zbtb20*, което потвърждава нашите резултати, получени от имунохистохимичното изследване. (Shi *et al.*, 2021)

4.6. Предполагаемо място на *Zbtb20* в генетичната верига в MGE

Генетичната регулация на MGE е добре проучена и множество данни вече са налични. Липсата на разлики в експресията на панела от молекулярни маркери, които използвахме (*Shh*, *Nkx2.1*, *Islet1*, *Olig2*, *Ascl1*, *Dlx1*, *Dlx5*) по време на ембрионалното развитие, ги изключва като възможни даунстрийм мишени на *Zbtb20*. Единствените разлики се наблюдаваха в експресията на *Lhx6* в късните етапи на невrogenезата, и то само на територията на миграционните пътища, но не и в субпалиумната герминативна зона. Това намаление най-вероятно се дължи на пролиферативните дефекти, които наблюдавахме, предизвикващи по-слабо генериране на CINs, а не на директно взаимодействие между TF *Zbtb20* и *Lhx6*. Въпреки това не може да се изключи възможността *Lhx6* да е даунстрийм ефектор (директен или индиректен) на *Zbtb20*. На фигура 4.3. представяме хипотетичното място на *Zbtb20* в генетичната регулация на субпалиума.



Фиг. 4.3. Предполагаемо място на *Zbtb20* в генетичната верига на субпалиума. На графиката са представени основните моменти от генетичната каскада, отговорна за регулацията на MGE. От данните от постнаталното околичествяване на CINs маркери в комбинация с данните от изследване на разпределението на основни ембрионални маркери предполагаме, че най-вероятното място, където *Zbtb20* се включва в регулационната каскада, е между *Nkx2.1* и *Lhx6*. Алтернатива на това е възможността *Zbtb20* да участва в ранната регулация на пролиферацията в MGE.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящото изследване представяме резултати за ролята на *Zbtb20* в нормалното развитие на CINs. За целта използвахме хомозиготни мутанти *Zbtb20*^{-/-}, при които генната експресия е заглушена. Постнаталният фенотип на *Zbtb20*^{-/-} се характеризира с генерализирано слабо занижение в клетъчната гъстота на CINs, маркирани с GABA. По-детайлен анализ разкри специфично занижение в само една от субпопулациите на MGE-CINs. Конкретно беше занижена гъстотата на PV⁺, но не и на SST⁺ CINs. Интересно – имаше и занижение в общата гъстота на CGE-CINs, маркирани с Prox1 или Sp8.

От гледна точка на механизмите по време на развитието, отговорни за по-ниската клетъчна гъстота, открихме занижена пролиферация в ранните етапи на невrogenезата на E12.5 => E13.5 само в MGE, но не и в CGE. В по-късния период на E15.5 => E16.5 разлики не бяха установени. Трасирането на „birth dating“ на MGE-CINs, маркирани със Sox6, показва нарушение в нормалните етапи на послойното им генериране. Не бяха открити разлики в процента на стволови клетки, излизащи от клетъчния цикъл, инвазията на VZ от молекулярни маркери за напреднал стадий на диференциация или в броя на a-Caspase позитивните клетки. Тези резултати отхвърлят апоптозата и преждевременната диференциация, водещи до изчерпване на стволовоклетъчния пул, и изтъкват пролиферативните дефекти и прехода между програмите за послойното генериране на CINs като основните причини за наблюдавания постнатален фенотип.

За първи път показахме и експресията на *Zbtb20* в човешкия субпалиум, където наблюдаваният модел на разпределение на протеина силно наподобяваше този при мишки.

6. ИЗВОДИ

1. *Zbtb20* се експресира във всички части на субпалиума в периода E12.5 – E18.5 при мишка. Всички стволови клетки във VZ, маркирани с Nkx2.1 или Coup-TF2, са позитивни за *Zbtb20* при мишка.
2. Заглушаването на експресията чрез нокаутиране на гена води до следните промени при *Zbtb20*^{-/-} мишки:
 - 2.1. Слабо занижение в общия брой на GABA⁺ клетки;
 - 2.2. Специфично занижение на PV⁺ MGE-CINs, но не и на SST⁺;
 - 2.3. Занижение в гъстотата на CGE-CINs, маркирани с Prox1.
3. Заглушаването на експресията на *Zbtb20* чрез нокаутиране на гена не води до промени в процента на клетките, напускащи клетъчния цикъл, или до инвазия на VZ от молекулярни маркери за напреднала диференциация, характерни за SVZ при мишка.
4. Заглушаването на експресията на *Zbtb20* чрез нокаутиране на гена води до нарушение във физиологичните прозорци, през които се генерират CINs за различните слоеве, и причинява занижение в нивата на пролиферация на стволовите клетки на E12.5 => E13.5 на територията на MGE при мишка.
5. Няма нарушение нормалната молекулярна регулация при формирането на субпалиума при *Zbtb20*^{-/-} мишки.
6. Нормално са сформирани миграционни пътища.
7. *Zbtb20* се експресира и в човешкия субпалиум на GW14 по начин, подобен на този при мишката.

7. СПРАВКА ЗА ПРИНОСА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път е околичествена експресията на *Zbtb20* в субпалиума на мишка.
2. Анализирани бяха ефектите на заглушаването на експресията на *Zbtb20* върху постнаталния фенотип на CINs в неокортекса на *Zbtb20*^{-/-} мишка.
3. Беше установена занижена пролиферация в MGE на E12.5 при *Zbtb20*^{-/-} мишка.
4. Стволовите клетки в *Zbtb20*^{-/-} показват нормална скорост на диференциация при *Zbtb20*^{-/-} мишка.
5. Беше установен дефект в нормалното време за генериране на CINs за слоеве 1–4 и слоеве 5–6 при *Zbtb20*^{-/-} мишка.
6. За пръв път беше показана експресията на *Zbtb20* в субпалиума на човек.

8. ПУБЛИКАЦИИ И ДОКЛАДИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Публикации

- 1.1. Stoyanov, D. S. & Tonchev, A. B. Transcription factor ZBTB20: What expression is telling us of its cellular function? *Biomed. Rev.* 31, 1–10 (2020). (Списанието е реферирано в Scopus към 2020, без impact factor)
- 1.2. Stoyanov, D. S., Ivanov, M. N., Yamashima, T., & Tonchev, A. B. (2022). Expression of Transcription Factor ZBTB20 in the Adult Primate Neurogenic Niche under Physiological Conditions or after Ischemia. *Genes*, 13(9), 1559. (Списанието е реферирано в PubMed, Scopus, Web of Science към 2022; impact factor 4.141 за 2021)
- 1.3. Pavlov, Stoyan, et al. „Feasibility of Haralick’s Texture Features for the Classification of Chromogenic In-situ Hybridization Images.“ *2020 International Conference on Biomedical Innovations and Applications (BIA)*. IEEE, 2020. (Списанието е реферирано в Scopus, Web of Science към 2022; без impact factor)

2. Доклади и постери

2.1. Национални

- 2.1.2. XXIII Congress of the Bulgarian Anatomical Society October 5-7 2017 October 5–7, 2017 Report
- 2.1.3. VII National Conference with International participation „Morphological Days” June 8–10 2018
- 2.1.4. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society May 31 – June 2 2019

2.2. Международни

2.2.1. X International Symposium on Clinical Anatomy October 6 – 8 2016 October 6 – 8

2.2.2. Humboldt Kolleg Science without borders: Alexander von Humboldt's Concepts in Today's World Varna, September 18-21, 2019

2.2.3. XI International Symposium on Clinical Anatomy October 2 – 4 2020 (virtual meeting)

9. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

5-HT3AR	5 - Хидрокситриптамиин 3А рецептор (5-hydroxytryptamin 3A Receptor)
a/b RG	Апикална/базална радиална глия (apical/basal Radial Glia)
AJ	Адхезивни връзки (Adherent Junctions)
AP	Апикални прогенитори (Apical Progenitor)
BAC	Бактериална изкуствена хромозома (Bacterial Brtificial Chromosome)
BP	Базални прогенитори (Basal Progenitors)
Cb	Калбайндин (Calbaindin)
ССК	Холецистокинин (Cholecistokinin)
CGE	Каудална ганглионарна еминенция (Caudal Ganglionic Eminence)
CINs	Кортикални интернеурони (Cortical Interneurons)
CP	Кортикална плочка (Cortical Plate)
Cr	Калретинин (Calretinin)
CSF	Цереброспинална течност (Cerebrospinal Fluid)
d/c/v MGE	Дорзална/централна/вентрална медиална ганглионарна еминенция (dorsal/central/ventral Medial Ganglionic Eminence)
ESC	Ембрионални стволони клетки (Embryonic Stem Cells)
GABA	Гама аминокиселина (Gama Amino Butyric Acid)
GFP	Зелен флуоресцентен протеин (Green Fluorescent Protein)
GIFM	Генетично индуцируемо трасиране (Genetically Induced Fate Mapping)
INM	Интеркинетична ядрена миграция (Interkinetic Nuclear Migration)
IZ	Преходна зона (Intermediate Zone)
LGE	Латерална ганглионарна еминенция (Lateral Ganglionic Eminence)
MGE	Медиална ганглионарна еминенция (Medial Ganglionic Eminence)

MSN	Малки шипчести неврони (Medium Spiny Neurons)
MZ	Маргинална зона (Marginal Zone)
NECs	Невроектодермални клетки (Neuroectodermal Cells)
nNOS	Невронална NO синтетаза (neuronal Nitric Oxide synthase)
NPCs	Нервни прогенитори (Neuronal Progenitors)
NPY	Невропептид Y (Neuropeptide Y)
oSVZ	Външна субвентрикуларна зона (outer Subventricular Zone)
POA	Преоптична област (Preoptic Area)
POH	Преоптично хипоталамична област (Preoptic-Hypothalamic Area)
PV	Парвалбумин (Parvalbumin)
Rln	Реалин (Reelin)
ROI	Област на интерес (Region Of Interest)
SAP	Субапикален прогенитор (Subapical Progenitor)
SNP	Къс невронален прогенитор (Short Neuronal Precursor)
SP	Субплайт (Subplate)
SST	Соматостатин (Somatostatin)
SVZ	Субвентрикуларна зона (Subventricular Zone)
TF	Транскрипционен фактор (Transcription Factor)
VIP	Вазоинтестинален пептид (Vasointestinal Peptide)
VZ	Вентрикуларна зона (Ventricular Zone)
YFP	Жълт флуоресцентен протеин (Yellow Fluorescent Protein)

10. БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на моя научен ръководител проф. Тончев за подкрепата и насоките, които ми оказа.

Благодаря на доц. Павлов за помощта, която ми оказа, и за отговорите на безкрайните ми въпроси. Благодаря за безкрайното търпение.

Благодаря на лаборантите Велина Кеновска, Елена Боева, Неранза Колева и Габриела Димитрова за проявените отговорност и прецизност при изготвянето на хистологичните препарати.

Благодаря на препараторите Лилия Даскалова и Диляна Димитрова за помощта, оказана при воденето на дирекционните упражнения.

Благодаря на колегите от катедрата по „Анатомия и клетъчна биология“ за прекрасната работна среда и морална подкрепа.

Благодаря на колегите от административния отдел Галина Ангелова и Ива Даскалова за добрата организация и безпроблемното протичане на семестъра.

Благодаря на доц. Минков, Мартин Иванов и Андреас Контни за баланса между професионална и приятелска атмосфера, създадена в кабинета. Благодаря на Мартин Иванов за стотиците преброени клетки. Благодаря на Андреас Контни за въвеждането ми в 3D принтирането.

Благодаря на семейството си за помощта, подкрепата и вярата в мен.

