



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea
The University of the Basque Country

Doktorego Tesia

DLK 1 ETA DLK2.REN KARAKTERIZAZIOA
SAGUEN LISTU-GURUIN
GARAPENEAN

CELL BIOLOGY AND HISTOLOGY DEPARTMENT

ZELULEN BIOLOGIA ETA HISTOLOGIA SAILA

Patricia Garcia Gallastegui

Leioa, 2015

LABURPENA

Organogenesisia seinalizazio bide ezberdinez gidatutako prozesu konplexua da. Askotan organu ezberdinen garapena seinalizazio faktore berdinez dago erregulatuta. Gainera, seinalizazio bideen ikerketa garapena ezagutarazteko erabiltzeaz aparte, minbizia eta ehunen birsorkuntza zelan gertatzen diren jakiteko ere balio digu.

Lan honetan, listu-guruinaren garapena aztertu dugu. Listu-guruinaren organogenesisia adarkatze morfogenesisia deituriko prozesuaren bidez ematen da. Garapen prozesu hau beste organo batzuetan ere ematen da, esaterako, birikietan, giltzurrunetan eta ugatz guruinetan.

NOTCH seinale bidea, garapenean dauden ehunetan, seinalerik aztertuenetako bat da, non orain dela gutxi deskribatu diren DLK1 eta DLK2 lotugai ez kanonikoak dauden.

Gure lanaren helbururik nagusia, DLK1en eta DLK2ren funtzioa ezagutzea izan zen. Batetik NOTCH seinalizazioan duten efektuak argituz eta bestetik baraila azpiko listu-guruinaren (SMG: submandibular salivary gland) garapenean jokatzeko duen rola aztertuz. Hau egiteko, sagu enbrioien SMG-en hazkunde organotipikoak egin genituen, sDLK1 edo DAPTrekin (γ -sekretasaren inhibitzaile erreaktiboa). Bestalde, *Dlk1* (-/-) saguarekin ere esperimenduak egin genituen.

Gure emaitzek DLK1 eta DLK2 lotugaiak garapeneko listu-guruinaren maila altuetan adierazten direla erakutsi zuten. Aldiz, sagu helduko listu-guruinetan DLK1-2ren adierazpen mailak murriztu egiten dira, emaitza hauek DLK1-2 SMGaren morfogenesisian parte hartu dezaketelaren ideia eman zigun.

Bestalde, enbrioien SMG hazkuntzetan, sDLK1 edo DAPTrekin inhibituriko NOTCH seinale bideak, listu-guruinaren adarkatze morfogenesisia kaltetzeaz aparte, inerbazioa murriztu eta azinoen barneko zelula progenitore epitelialen apoptosia eragiten zuen.

NOTCH seinalearen inhibitzaileek SMGaren inerbazioa oztokatzen dutenez, karbakola (CCh) erabili genuen, inerbazio kolinergikoaren ordezkotza bezala, modu honetan SMGaren garapena berreskuratzeko. CChak SMGaren adarkadura morfogenesisia partzialki laguntzen zuela ikusi genuen, baina NOTCH seinale bidearen inhibizioa eteten zenean baino ez. Eraberean, konturatu ginen NOTCH inhibizioak sortutako morfogenesi akasduna ez zela bakarrik inerbazioa kaltetuaren ondorioz, isolatutako epitelioen morfogenesisian DLK1ek eta DAPTk eragina zutela ikusi baigenuen.

Dlk1 (-/-) saguaren listu-guruinen analisiarekin, DLK1en gabeziak listu-guruinaren tamaina murrizten duela ondorioztatu genuen. Gainera, pilokarpina bidezko estimulazioaren ondoren denboran neurtutako listu jariakina murriztuta dago sagu KOean. Sagu DLK1 KOaren listu-guruinen histologia eta TEMko argazkiek SMG normalak eta osasuntsuak aurkeztu zituzten, baina ama/progenitore zelulen populazioa handituta agertzen zen.

Orokorrean, lan honek NOTCH seinalizazioko lotugai ez kanonikoek, DLK1 eta DLK2, saguen listu-guruinen garapenean duten garrantzia deskribatzen du. Ondorio gisa, DLK1en adierazpen mailak garapenean dauden guruinen ama/progenitore zelulen sorkuntzaren sustapen eta eragozpen arteko mekanismoaren oreka finean parte hartzen du.

AURKIBIDEA

<u>1. SARRERA</u>	<u>1</u>
1.1 LISTU-GURUINAK	2
1.2 LISTU-GURUINAREN GARAPENA	4
1.3 SMG ORGANOGENESIAREN SEINALE BIDEAK	7
1.4 NOTCH SIGNALIZAZIO BIDEA	9
1.4.1 NOTCH ERREZEPTOREAK	9
1.4.2 NOTCH LIGANDOAK	12
1.4.3 SIGNALEAREN TRANSDUKZIOA	13
1.5 NOTCH ETA GARAPENA	15
1.6 DLK1 ETA DLK2 PROTEINAK	16
1.6.1 <i>Dlk1</i> ETA <i>Dlk2</i> ADIERAZPENA	18
1.6.2 DLK1 ETA DLK2 FUNTZIOA ETA AKZIO MEKANISMOA	19
<u>2. HELBURUAK</u>	<u>21</u>
<u>3. MATERIAL ETA METODOAK</u>	<u>23</u>
3.1 SAGU ARRAZAK	24
3.2 SAGUEN GENOTIPATZEA	24
3.3 BARAIL AZPIKO LISTU-GURUINAREN HAZKUNDE ORGANOTIPIKOA	26
3.4 EPITELIO-MESENKIMA DISEKZIOA ETA HAZKUNDEA	27
3.5 TINDAKETA	28
3.5.1 HEMATOXILINA -EOSINA	28
3.5.2 INMUNOFLUOREZENTZIA	29
3.6 TRANSMISIO ELEKTRONIKO MICROSKOPIOA	30
3.7 ZELULEN HAZKUNDEA	31
3.8 LUZIFERASA ENTSEGUA	31
3.9 POLIMERASAREN ERREAKZIO KATEATU KUANTITATIBOA	33
3.10 WESTERN BLOTA	35
3.11 LISTUAREN NEURKETA	36
3.12 TRATAMENDU ESTATISTIKOA	36

<u>4. EMAITZAK</u>	37
4.1. DLK1, DLK2 ETA N1CD DISTRIBUZIOA SAGUKO LISTU-GURUIN GARAPENEAN	38
4.2 DLK1 ETA DLK2k NOTCH1 SEINALIZAZIO BIDEA INHIBITZEN DUTE LISTU GURUIIN EPITELIO JATORRIZKO HSG ZELULETAN	43
4.3 NOTCH SEINALIZAZIOAREN INIBIZIOA SMG.EN ADARKATZE MORFOGENESIA ETA INERBAZIOA MURRIZTEN DITU	46
4.4 AKTIBAZIO KOLINERGIKOAK EZ DU SMG.AREN ADARKATZE MORFOGENESIA NORMALA BERRESKURATZEN, BAINA PSG.AREN INERBAZIOA AREAGOTZEN DU, sDLK1 EDO DAPT-REKIN HAZITAKO SMG.ETAN	52
4.5 AKTIBAZIO KOLINERGIKOAK SMG.AREN ADARDURA MORFOGENESIA SUSTATZEN DU sDLK1 EDO DAPT.A KENDU OSTEAN	57
4.6 NOTCH SEINALIZARIOAREN INHIBIZIOAK <i>IN VITRO</i> HAZITAKO LISTU-GURUINETATIK ISOLATUTAKO EPITELIOEN ADARKATZE KALTETZEN DU	59
4.7 <i>Dlk1</i> KNOCK OUT SAGUA	61
4.7.1 <i>Dlk1</i> KO.EN LISTU-GURUINAREN FENOTIPOA	63
4.7.2 SMG.AREN ANALISI FUNTZIONALA	68
4.7.3 LISTU-GURUINAREN MARKATZAILEAK	72
<u>5. EZTABAIDA</u>	77
5.1 DLK1 ETA DLK2 SMG.AREN GARAPENEAN AGERI DIRA	78
5.2 DLK1 ETA DLK2 NOTCH SEINALE BIDEAREN INHIBITZAILEAK DIRA	79
5.3 NOTCH SEINALIZAZIOAREN INHIBIZIOAK GARAPENEN SMG.EN ADARKATZE MORFOGENESIA ETA PSG.AREN INERBAZIOA KALTETZEN DITU	81
5.4 AKTIBAZIO KOLINERGIKOAK NOTCH INHIBITUTA DUTEN SMG.EN MORFOGENESIA BERRESKURATZEN DU	83
5.5. <i>Dlk1</i> (-/-) SAGUAREN LISTU-GURUINAK TXIKIAGOAK DIRA ETA CK14 PROGENITOREEN MARKATZIALEA AREAGOTUTA DAUKATE	84
<u>6. ONDORIOAK</u>	90
<u>7. BIBLIOGRAFIA</u>	91
<u>8. ERANSKINAK</u>	103*

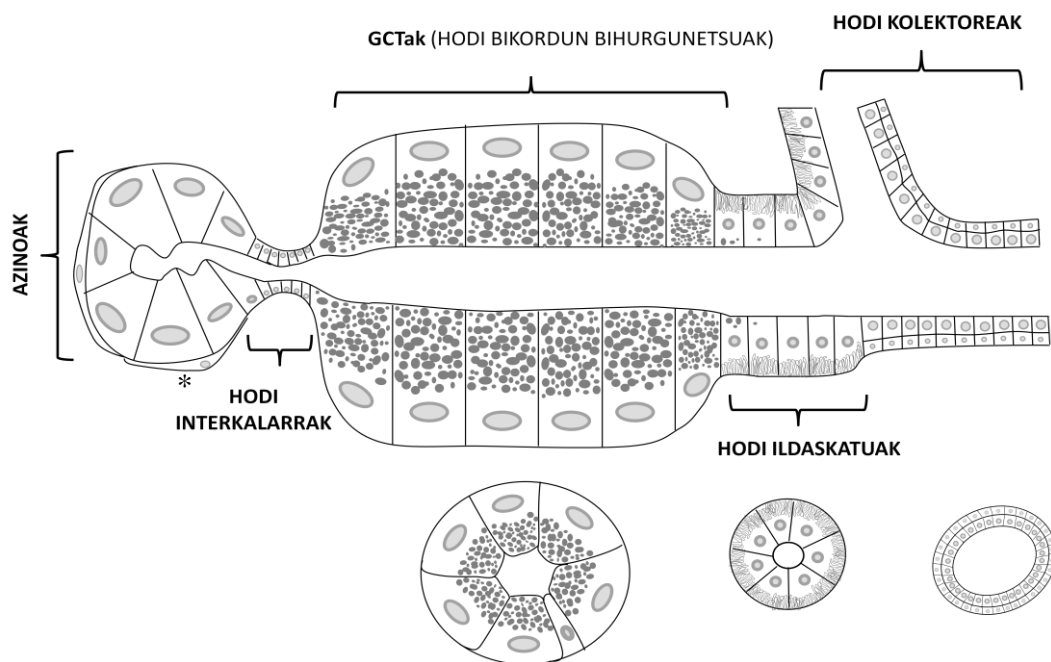
*ingelesezko bertsioaren aldetik

1. SARRERA

1.1 LISTU-GURUINAK

Listu-guruinak aho barrunbearekin loturiko organoak dira. Hauen funtzioa listua ekoiztea da. Listua hitz egiteko, dastamenerako, murtxiketarako, irenketarako eta digestiorako ezinbestekoa da. Listuak, lubrikazio, aho immunitatea eta homeostasia funtzioa du. Aldi berean, aho barrunbeto zaurien osatzean ere parte hartzen du, hazkunde faktoreak eta peptido biologikoak kantitate txikian listuan disolbaturik daudelako.

Gizaki eta karraskarien listu aparatua hiru guruin nagusiz dago osatuta: barailpeko listu-guruina (submandibular salivary gland edo SMG), listu gehien jariatzen duena, mihipeko listu-guruina (sublingual edo SLG) eta parotida (parotid edo PG). Guztiak aho barrunbearekin konektaturik daude jariapen-hodi baten bitartez. Gainera, aho eta mingaineko mukosak listu-guruin txikiz beterik daude (600-1000) eta hauen hodiak motzak eta adarkatuak dira (Tucker AS, 2007).

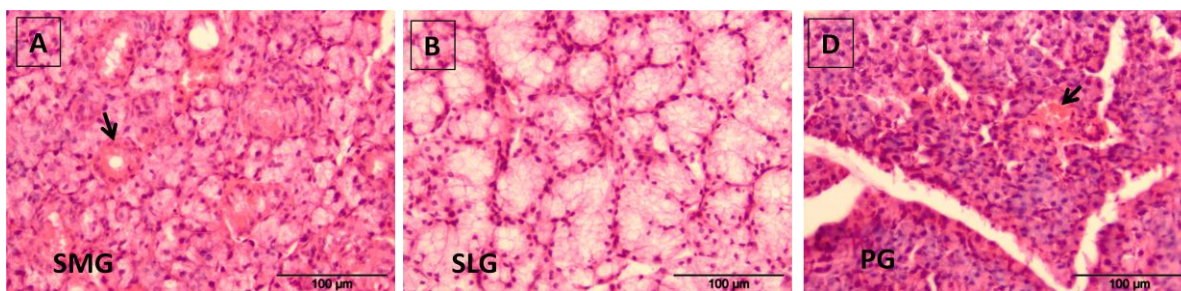


1.Irudia. Saguaren SMGaren egitura eskematikoa. Alde batetik azino mukitsuak eta azino serosoak zelula mioepitelialez* inguratutik daude. Listuaren bidea azinoetatik diametro txikiko hodi interkalarretara doa. Ondoren handiagoak diren GCT (granular convoluted tubules) hodietara doa handiagoak direnak eta ohiko bikorrak dituztenak. Listua GCTetatik pasa ostean hodi ildaskatuetera garraiatzen da, ohin-aldeko mintz tolesdurak dituztenak. Azkenik hodi biltzailetera garraiatzen da. Hodi honek argirik handiena du eta epitelio sasigeruzatuaz osaturik dago (www.pathologyoutlines.com orrialdetik moldatua).

Listu-guruina (1.Irudia) azinoz eta jariapen hodietaz osaturik dago. Azinoak serosoak edo mukitsuak izan daitezke, horrela deituak bere jariakinaren arabera, urtsua edo likatsua, hurrenez hurren. Muki zelulek muzina jariatzen dute, karbohidrato kateak dituzten glikoproteina luzeak. Orokorrean, muzinek karga negatiboa dute listuaren likatasunean lagunduz. Azino serosoko zelulek proteinak jariatzen dituzte, adibidez amilasa. Gainera, zenbait azinori seromukitsu deritze, muzinak zein proteinak jariatzen dituztelako. Listua azinoetan ekoiztu eta hodietan zehar honen konposaketa aldatu egiten da. Azinoetan listua hodi interkalarretatik hodi ildaskatueta garraiatzen da. Gizakietan ez bezala, karraskarien SMGetan beste hodi bat agertzen da, interkalarren eta ildaskatuen artean, hodi bikordun bihurtuak (GCTak). Hodi hauek dimorfismo sexualaren menpe daude, arretan ugariagoak izaten direlarik, emeetan baino (Osamu Amano *et al.*, 2012).

Izar itxurako zelula mioepitelialek azinoak eta hodi interkalarrak inguratzen dituzte. Zelula hauen uzkurketak, sistema sinpatikoa eta parasinpatikoaren estimuluen menpe dago eta listua azinoetatik kanporatzea eta hodietatik garraiatzea eragiten du.

Saguen listu-guruin parotida (2.Irudia.D) gehien bat serosoa da, horregatik H/E tindaketarekin basofiloa agertzen da. Aldiz, SLGaren (2.Irudia.B) edukiera mukosoa da gehien bat, beraz, hematoxilinarekin ahulago tindatzen da. SMGa (2.Irudia.A) listu-guruin mistoa da, zelula seroso eta mukitsu osatuta.



2. Irudia. Listu-guruinaren histologia. (A) Balaieko listu-guruina edo SMG, H/Erekin tindatuta, mistoa da (gezia GCTa seinalatzen du) (B) Mihipelo listu gurina edo SLG H/Erekin tindatuta, mukitsu da. (D) Listu-guruin parotida edo PGa, H/E rekin andipenetan (gezia hodi ildaskatuak)

Sagu ar eta emeen hiru listu-guruin handien aktibitatearen artean diferentziak daude. Adibidez, aminotranferasa aktibitatea antzekoa da ar eta emeen parotidan zein mihipeko listu-guruinetan, barailpeko listu-guruinetan berriz aktibitatea 10 bider altuagoa da arretan emeetan baino (Hosoi K *et al.*, 1978). Nahiz eta helduetan listu-guruinek antzekotasun morfologikoa izan ezberdintasunak daude beraien funtzionamenduan.

Maiz zenbait gaitzek, gaixotasunek edo buruko eta lepoko minbizien kontrako erradioterapiak, listu-guruinaren funtzioa kaltetu dezakete. Asaldatze hauek Xerostomia (“aho lehorraren sindromea”) izeneko disfuntzioa eragiten dute, pazienteetzat deserosoa izanik eta negatiboki eragiten du beraien bizi-kalitatean (Bouma *et al.*, 2003; Vissink *et al.*, 2010). Beraz, listu-guruinen garapena ezagutzeko eta erregeneraziorako estrategiak diseinatzeko interes handia dago. Horretarako, listu-guruinetako ama zelulen biologiaren ezagupena (Lombaert *et al.*, 2008), inerbazioa (Knox *et al.*, 2013) eta listu-guruinaren morfogenesia zuzentzen duten zelulen arteko seinalizazio bideak (Rebustini IT and Hoffman MP, 2009; Dang *et al.*, 2009; Jaskoll *et al.*, 2004a; Jaskoll *et al.*, 2004b; Patel *et al.*, 2011) sakonki ikertzea beharrezkoa da.

1.2 LISTU-GURUINEN GARAPENA

Hiru listu-guruin bikote nagusiak aho epiteliotik sortzen dira. Aho ektodermoaren eta sabel gaineko endodermoaren artean agertzen dira. Hala ere, ez dakigu zein den listu-guruinak sortzen diren toki zehatza, estomodeoa eta jatorrizko faringearen kabitatea banatzen diren puntutik hurbil egongo da (Dudek R and Fix JD, 1998). Epitelio honen enbrioi jatorriaren datuetan eztabaida dago.

Hasiera batean listu-guruin parotidak ektodermo jatorria zutela iradoki zen, barailpekoa eta mihipekoak berriz endodermo jatorria (Avery J, 2002). Baina, listu-guruinaren aitzindariak hepatoktemizatuta zegoen gibel baten areko zeluletan eta hepatozitoetan diferentziatu ahal zirela jakin zenean (Hisatomi Y *et al.*, 2004) jatorri endodermikoaren hipotesia indartu zen. Ordea, nahiz eta mikroinguru egoki batean listu-guruinen zelula aitzindariak zelula hauetan desberdintzeko ahalmena dutela argi egon, froga hau ez da nahikoa *in vivo* listu-guruinak endodermotik eratortzen direla esateko.

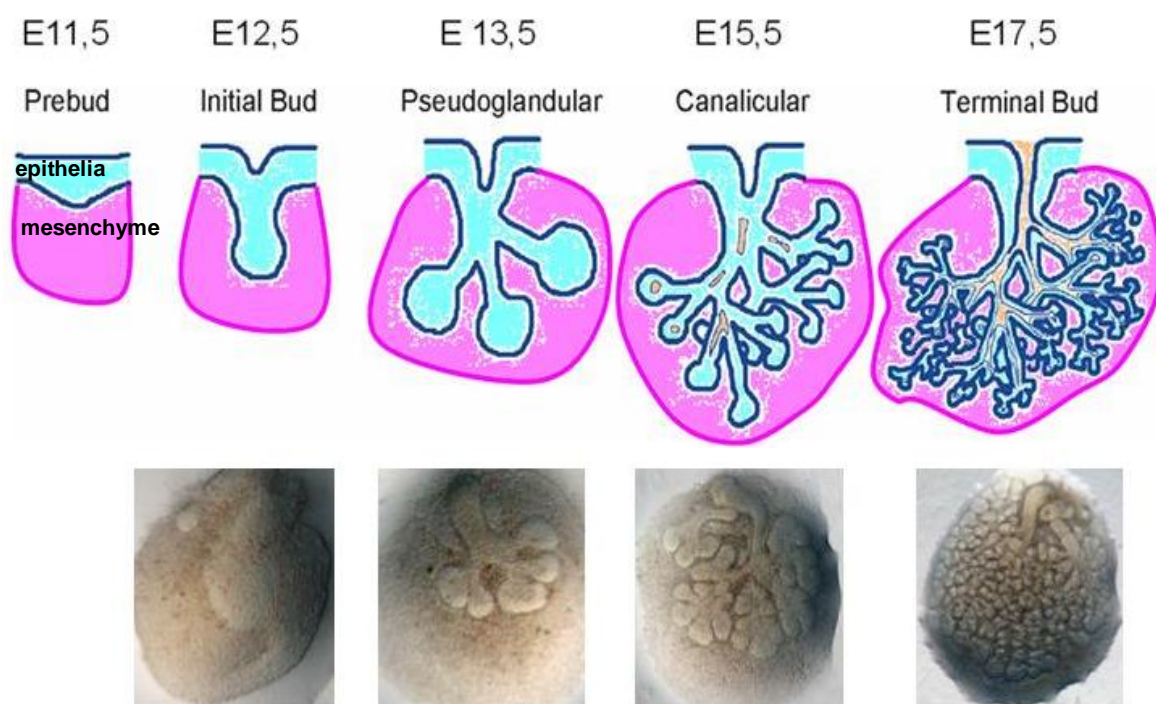
Genetikako leinu jarraipena teknikari esker eta leinu-ezpezifiko Cre gidariak erabiltzen, Cre-rekonbinasak DNAn delektzioak eragiten ditu, gene espezifikoen sekuentziak gehitzen. Sekuentzia hauen produktuak koloretsuak dira horrela gidariekin listu-guruineko zenbait zelulen jatorria ezagutzeari lortu da. Wnt1-cre leinu jarraipenarekin ikusi den bezala (Jaskoll T *et al.*, 2002) mesenkimak eta nerbioek gandar neuralean dute jatorri. Azkenaldian egindako leinu jarraipen esperimentuak, Sox17-2A-iCre/R26R saga erabiliz, non endodermoko zelulak markatuak dauden, hiru listu-guruin nagusien epiteliok endodermoko jatorria ez dutela erakutsi da, ektodermoko leinua sustatuz (Jaskoll T., 2003).

Gainera, animalia ereduen eta giza mutazioek eragindako displasia ektodermikoak (jatorri ektodermikoko ehunak bereziki erasaten dituen garapeneko sindrome bat), listu gurin nagusiak ektodermoan dauden zelula multipotenteengandik abiatuta sortzen direla erakutsi du. Dena den, datu guzti hauek ez dira argudiatze erabakigarriak, listu-guruinen ektodermoko jatorria positiboki berretsi behar da (Patel NV and Hoffman MP, 2014).

Enbrioian, lehenengo barailpeko listu-guruina garatzen da, jarraian mihipekoa eta azkenik parotida. Ugaztunen listu-guruinak enbrio garapenean sortzen dira, adarkatze morfogenesia deituriko prozesuaren bitartez. Prozesu hau ezinbestekoa da beste organo batzuen garapenerako ere, esaterako, birikiak, giltzurruna eta ugatz guruinentzako (Tucker AS, 2007).

Listu-guruinaren garapenaren hasiera, zelulen proliferazio eta barneratze koordinatu batekin hasten da. Borobil itxurazko epiteliua, kimua izenekoa, hazi egiten da eta inguratzen duen mesenkima bultzatzen doa. Aldi berean zelulak mugitzen, hiltzen eta elkar erlazionatzen dira. Epitelioko zelulak, mesenkima, neurona eta endotelioko zelulekin harremanetan jartzen dira. Osteon desberdintzapena ematen da zelula mota ezberdinak sortuz.

Sagu SMGren garapenaren hasiera (3. Irudia), hastapen garaian, mihi alboko epitelioaren loditze bezala ikusten da, hau enbrioiaren garapeneko 11,5 (E11,5) egunean gertatzen da. Gero, E12,5 egunean epitelioa inbagnetu egiten da eta kimu epitelioa sortzen da, hodi printzipal primitibo baten bidez aho azalari lotuta dagoena. Garai sasiguruindarraean, E13,5an, epitelio hau adarkatzen doa gutxi gorabehera 3-5 kimu sortuz PSGren axoiez inguratuta. Garapenean dauden hiru kimu hauek saguaren listu-guruin helduaren lobuluei dagozkie. E15,5ean, hodi gehienek, zeintzuk zelula multzo batez osatuta daudenak, barruko argiak sortzen dituzte zelulen polarizazioa dela eta, garai honi kanalikularra deritza. 17,5 egunetako listu-guruinen adarkatzetan jariatzen diren argiak azaltzen doaz eta kimuak azino jariatzaile bihurtzen dira. Garai honi kimu terminala deitzen zaio. Karraskarien listu-guruinaren garapena jaio ostean jarraitzen da, eta azinoen eta jariatzen diren desberdintzapena ez da ematen heldutasun sexualerarte (Gresik, 1994; Tucker, 2007).



3. Irudia. SMG garapen garaiak. Listu-guruinaren morfogenesiak epitelio-mesenkimal arteko zelulen elkarrekintzak behar ditu. Hasieran epitelioa mesenkimarantz barneratzen da eta hasierako kimua sortzen da. Gero garai sasiguruindarraean kimu hau adarkatzen doa azinoak azkar ugarituz. Aldi berean epitelioa polarizatzen hasten da, hodiaren argia emanez garai kanalikularrean. Azkenik, garai terminalean zelula epitelialak desberdintzen hasiko dira eta hodiak sortzen dira.

1.3 SMG ORGANOGENESIAREN SEINALIZAZIO BIDEAK

Gaur egun, listu-guruina ehun ingeniari-tza ikerkuntzaren foku garrantzitsu bat da (Ogawa *et al.* 2013; Liu & Wang, 2014). Organo desberdinen morfogenesia eta birsorkuntzaren arteko antzekotasunak kontuan hartuta, listu-guruinaren erregeneraziorako garapena gidatzen duten seinale molekularrek duten potentziala aztertzea merezi du.

Seinalizazio sarearen interakzio konplexuak ulertzen hasteko lehenik eta behin seinalizazio bideak banaka aztertu behar dira. Hauen artean SMG garapenerako garrantzitsu eta beharrezkoak direnak zehaztu. Sagu Knock-out, transgenikoak, mutanteak, siRNA transfekzioa, eta funtzioa blokeatzeko antigorputzak bezalako teknikek, SMG garapenean parte hartzen duten eta morfogenesirako ezinbestekoak diren seinalizazio bideen ezagutza eman dute.

Seinalizazio bideen artean, **Fibroblast growth factor (FGF)** seinalizazioa ikasienetarikoa eta ezinbestekoa zaigun bidea da. FGF familiak 23 kide ditu, bakoitza bere funtzioarekin, besteak beste; zelulen proliferazioa, epitelioaren adarkatze, eta ehun desberdintzapena (Szebenyi G *et al.*, 1999). Lotugaia hartzaile egoki batekin lotzen denean, honen dimerizazioa ematen da. Ondorioz hartzaileen barneko tiro-sina-kinasa aktibitateaz autofosforilazioa gertatzen da. Honela zelula barneko eragile molekular ezberdinen aktibitatea pizten da, esaterako, Ras bidea, Src tiro-sin kinasen familia, PI3K/AKT, PLC- γ /PKC eta STAT3 bidea. Zelulen premien arabera FGF bideak efektu pleiotropikoa du. SMG morfogenesian, *Fgfr2-IIIB(-/-)*, *Fgf10(-/-)* saguek eta *Fgf8* baldintzazko knockout saguek, SMGaren aplasia daukate, listu-guruinetan bide honen garrantzia erakutsiz (Jaskoll T and Melnick M, 2000).

Sonic Hedgehog (Shh) beste seinalizazio bide garrantzitsu bat da. Seinalizazio molekularren familia honek zelulen biziraupena, proliferazioa, desberdintzapena eta enbrioi patroien sorreran parte hartzen du (McMahon AP, 2003). Hh lotugaiarekiko zelulen erantzuna bi mintz-zeharreko proteinenaz kontrolatuta dago, Patched (Ptc) eta Smoothened (Smo), Hh-ren erregulatzaile positiboa eta negatiboa, hurrenez hurren. Hh Ptc-ra lotzean Smo askatzen dute, G proteina bat, zelula barneko molekularren aktibazio

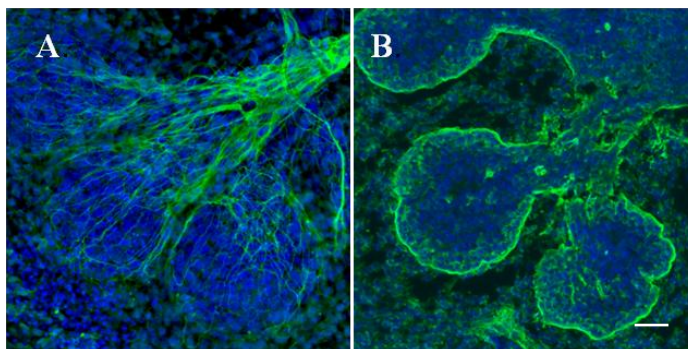
kateatua edo turrusta sotzen duena. Turrusta honek gene espezifiko batzuk erregulatzen ditu Gli familiako transkripzio-faktoreen aktibazioaren bitartez. Ptc eta Smo SMGaren epitelioan kokaturik egoteak, Shh seinalizazioak modu juxtakrino batean proliferazioan eta desberdintzapenean ekintza duela iradokitzen du. Gainera Hh-ren *ex vivo* aktibazioak, SMGaren adarkatze morfogenesisian eragin positiboa du, eta kalteturik ikusten da Hh inhibitzen bada *in vivo* eta *ex vivo* (Jaskoll *et al.*, 2004b). Sagu Shh $-/-$ SMGak garapeneko atzerapena aurkezten du.

Ectodisplasin (Eda) seinalizazio bidea listu-guruinaren morfogenesisirako ezinbestekoa dela ikusi da. Saguetan zein gizakietan Eda genearen mutazioak ektodermo jatorrizko ehunen gabezia edota hipoplasiarekin erlazionaturik daude, guruin exokrino guztietan listu-guruinak barne (Jaskoll *et al.*, 2003). Eda eta bere mintz hartzaile (Edar) TNF superfamiliako kideak dira. TNF superfamilia mitogenesisia eta apoptosiaren arteko oreka mantentzen garrantzitsua da. Edardl (downless) sagu mutanteak listu-guruinaren displazia du. Gainera, listu-guruinaren garapenean Eda seinalizazio bidea Wnt bidearen azpitik dago eta Hh bidearen gainetik (Haara *et al.*, 2011).

Seinalizazio bideetaz aparte, **zelulaz kanpoko matrizeak (ECMak)** funtzio garrantzitsua du listu-guruinaren garapenean. Adibidez, laminina-111 (4.Irudia B) eta bere hartzailea $\alpha\beta 1$ integrina ezinbestekoak dira *ex vivo* hasitako listu-guruinen garapenean (Kadoya *et al.*, 1995). Integrina $\alpha 3$ genearen mutazioak punta-zelulen polarizazioan akatsak sortzen ditu, eta bere galerak laminina α .rako knockout saguek duten fenotipo antzerakoa sortze dute. Zelulen mugikortasuna eta zelula-matrize interakzioek kimu epitelioaren ertzetan, adarkatze morfogenesiko prozesu ezberdinetan parte hartzen dute. Gainera, metalloproteinasak (MMPs) ECMan sortutako eraldaketak produktu bioaktiboak sortzen dituzte eta zelulen kanpoko mintz basalean gordeta dauden hazkuntza faktoreen askapenarekin erlazionaturik daude (Catalan MA *et al.*, 2009). Hala ere, MMPetarako sagu knockout gehienek fenotipo ahulak dituzte konpentsazioengatik edo gainezarpen funtzioengatik.

Beste aldetik, listu-guruinak oso inerbatutak daude, bai **nerbio sistema sinpatikoaz zein parasinpatikoaz**. Nerbio parasinpatikoek (4.IrudiA) azetilkolina askatzen dute, epitelioan dauden hertzaile muskarinikoek aktibatzen dituzte. Ondorioz fluidoan jarria eragiten dute. Nerbio sinpatikoak listu jariapena kontrolatzen du α eta β adrenohartzaileen bidez, listua urtsua edo likatsua estimulatuz, hurrenez hurren.

Azkeneko ikerkuntzak SMG garapenean inerbazioak dauden funtzioa aztertzen fokatu dira. Gongoil parasinpatikoaren (PSG) kentzeak epitelioko progenitore zelulen keratina5 (CK5) markatzailearen murrizketa sortzen duela jakin da (Knox SM *et al.*, 2010). Gainera, listu-guruin garapenean PSGaren inerbazioa hodiaren sorkuntza edo tubulogenesiaren sorrera erregulatzen duela iradoki da (Patel I. Nedvetsky *et al.* 2014).



4. Irudia. Inerbazio parasinpatikoa eta ECMko laminina. Listu-guruinaren zelula epitelialak eta mesenkimalak (urdinez) (A) inerbazio parasinpatikoaren markaketa β III tubulinarekin (berdez). (B) Laminina (berdez) ECMko osagaia, epitelioaren kimuak inguratzen, lamininak eta PSGren axoiek SMGaren garapenean parte hartzen dute.

1.4 NOTCH SEINALIZAZIO BIDEA

1.4.1. NOTCH HARTZAILEAK

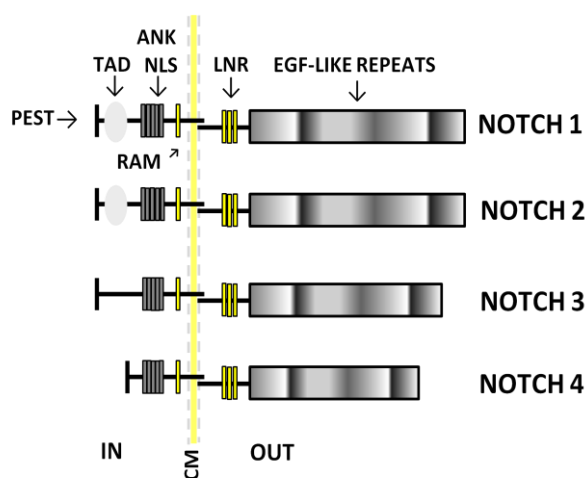
Notch genea 1914. urtean identifikatu zen. Geneari izena *Drosophila* mutante baten hegoen fenotipoagatik datorkio, honen hegoek koska bat zutelako, notch ingelesez (Mohr O, 1919). NOTCH generako *Drosophila* mutanteek (Hartenstein *et al.*, 1992; Lammel and Saumweber, 2000) ez dute listu-guruinik garatzen (Fleming *et al.*, 1997; Hukriede *et al.*, 1997). Geroztik, NOTCH proteinen homologoak identifikatuak izan dira ugaztunetan ez ezik beste organismo askotan ere (Fleming *et al.*, 1998). NOTCH proteinen ortologoak oso kontserbatuak daude nematodoetatik gizakietaraino.

Ugaztunen NOTCH hartzaillearen familia lau kidez osatuta dago, NOTCH1etik NOTCH4ra. NOTCH hartzailleak mintz zeharreko-bakarreko proteinak dira eta bi azpiunitate ez-kobalenteki lotzen direnean heterodimeroak osatzen dituzte. Hasiera batean NOTCH proteinak luzeera osoan itzultzen dira. Gero proteinak Trans-Golgitik garraiatzen dira, jariatze bidea hartuz. Bide honetan zehar NOTCH proteinak zatiketa bat jasaten du S1 deritzon puntuan. Honela, bi azpiunitateetan banatzen da: lehenengo monomeroa, zelula-kanpoko domeinua eta bigarren monomeroa mintz-zeharreko zatia eta zelula-barneko domeinua (Fiuza and Arias, 2007; Hansson *et al.*, 2004).

NOTCH hartzailleak 300kDeko mintz-zeharka bakarreko proteinak dira (5.Irudia). Hartzaillearen zelula-kanpoko domeinua EGF-bezalako (Epidermal growth factor) errepikapen aldakorrak dituzte eta hiru LNR errepikapen (5: Irudia, oriz). NOTCH1 eta 2ak, 36 EGF-bezalako errepikapenak dituzte, NOTCH3k 34 eta NOTCH4k 29. EGF-bezalako domeinuak eta LNRak ezinbestekoak dira lotugaien loturarentzat eta jarraian datorren hartzaillearen aktibazioarentzat. Domeinu huen azpian domeinu hidrofobiko bat dago, heterodimerizazioan parte hartzen duena. Mintzaren aldamenean, LNRak eta zati hidrofobikoak elkarrekin NRR.ak osatzen dituzte (Negative Regulatory Region). NRRak lotugai gabeko hartzaillearen aktibazioak saihesteko funtzioa du (Sanchez-Irizarry *et al.*, 2004).

NOTCH hartzaillearen barneko domeinuak, NICD deritzonak (Notch Intracellular Domain), zazpi ankirina errepikapen ditu (ANK domeinu), RAM domeinua, bi sekuentzia nuklear (NLS, Nuclear Localization Signal) ANK domeinuak zeharkatzen eta azkenik PEST domeinua (Proline-Glutamate-Serine-Threonine errepikapenak). Ankirina errepikapenak hartzaillearen zatirik kontserbatuenetako bat da, izan ere, ankirina hauek seinalearen transdukziorako nahitaezkoak dira. RAM domeinuak, espeziearen arabera, CBF1(C Promoter Factor Binding 1) / RBP-JK / Suppressor of Hairless / Lag-1 transkripzio kofaktore luturaren lehenengo lekua dauka (Chillakuri *et al.*, 2012). Domeinu guzti hauez gaian, NOTCH1 eta NOTCH2en transkripzioa aktibatzeke domeinuak (TAD) dituzte.

NOTCH proteinek ez dute berezko aktibitate entzimatikorik, baina interakzio molekularren bidez seinaleak transmititzen dituzte. Karboxi-muturretik Ankirinen errepikapenak arte dagoen proteina zatia, beste proteinen interakzioekin eta transkripzio faktoreen transkribapenarekin erlazionaturik daude. Beste aldetik, PEST domeinua NICD subunitatearen degradazioarekin erlazionaturik dago. Zati honen mutazioak T zelulen leukemiarekin erlazionaturik daude, NICDaren degradazioa eta erregulazioaren garrantzia agerian jarritz (Chillakuri *et al.*, 2012).



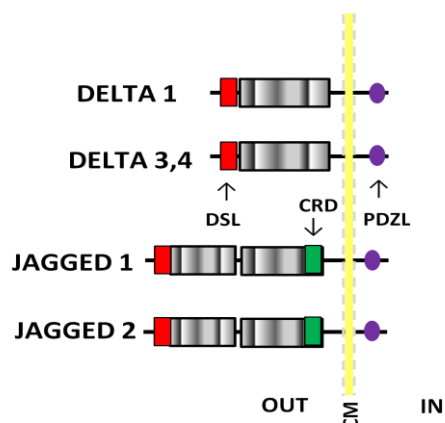
5. Irudia. NOTCH hartzailen egitura. Lau NOTCH hartzailen zelulen kanpoko zatia EGF-bezalako errepikapen aldakorrez osaturik dago. Jarraian LNR errepikapenak daude, mintz (CM) aldameneko zati hidrofobikoa baino lehen. Mintz zeharreko zatiaren ostean, zelularen barnean, RAM domeinua dago, jarraian zazpi Ankirina errepikapen (ANK), bi nukleorako seinale (NLS) eta azkenik PEST domeinua dago, Karboxi-muturra baino lehen. Domeinu guzti hauez gaian, NOTCH1 eta NOTCH2k transkribapena aktibatzen duten domeinuak (TAD) dituzte.

Animali guztietan aztertutako NOTCH hartzailen mutazioek, garapeneko anormaltasunak sortzen dituztela ikusi da, hortaz, gizakietan patologia sortzea ez da gauza harrigarria. Adibidez, garuneko arteriopatia autosomiko dominantea kortikal-beheko infartua eta leukoentzefalopatia, CADASIL deritzona, gurasoetatik semeetara pasatzen den gaixotasuna da. Dakigunez, gaixotasun hau NOTCH3 hartzailak zelulakanpoko zatian agertzen diren mutazio puntualarekin erlazionatuta dago (A. Joutel *et al.*, 1996). Hau gutxi balitz ere, Allegrile sindromea, gizakien JAGGED1 lotugaik kodetzen duen genearen mutazioak emandako proteina trunkatuen ondorioz gertatzen da (L. Li *et al.*, 1997, S. Artavanis-Tsakonas, 1997). Hala ere, oraindik ez dago argi kasu bakoitzean proteinetan gertatutako mutazioak funtzioaren areagotze edo galera eragiten duen.

1.4.2. NOTCH LOTUGAIK:

NOTCH lotugaiak, hartzaileak bezala, mintz-zaharreko proteinak dira. NOTCHen lotugaiak, hartzaileak dauden ondoko zelulen mintzetan egon ohi dira. Ugaztunetan, *Drosophilaren* Delta lotugaiaren hiru lotugai homologo daude, Delta-like, DLL1, DLL3 and DLL4 (Katsube and Sakamoto, 2005; Blanpain *et al.*, 2006). DLL2 izena ez zen erabili NOTCH familiakoa ez den beste Delta2 batekin ez nahasteko. Beste aldetik, *Drosophilaren* Serrate-ren lotugai homologoak diren, JAGGED1 eta JAGGED2 daude.

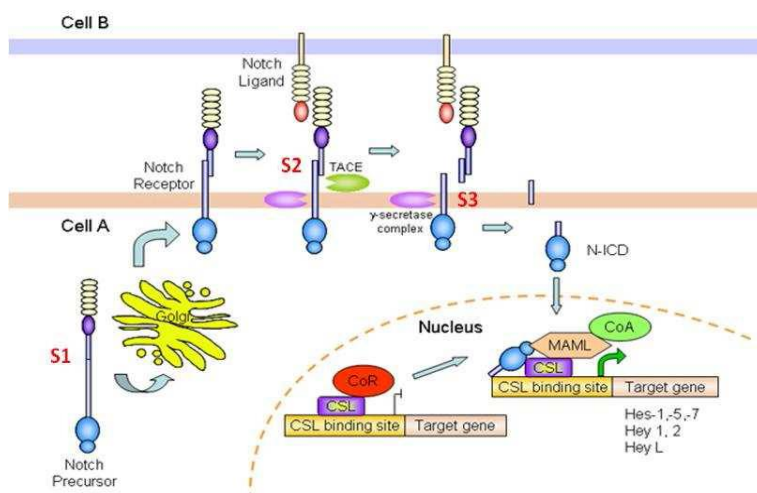
DSL domeinua (6. Irudia, gorriz) lotugai guztietan dago amino-muturra baino lehen. Bere funtzioa ez dago argi, baina garrantzitsua da Alagille Sindromearen eragilea delako. DSL azpian, DLL1ean, DOS domeinua aurkitu dezakegu (Delta and OSM-11-like), EGF-errepikapenez osaturik dago eta NOTCH hartzailearen EGF-bezalako errepikapen 11 eta 12ari lotzen da. DLL3 eta DLL4 ez daukate DOS domeinua. Lotugaien domeinu biak, DSL eta DOS, hartzailearen loturarekin erlazionaturik daude. EGF-bezalako errepikapenen ostean, JAGGED lotugaietan, cisteinetan aberatsa den domeinua agertzen da (CRD). Zelularen mintzaren alboan, domeinu honek DELTA eta JAGGED lotugaiak desberdintzen ditu (6. Irudia, berdez). Lotugaiaren zelula barneko zatian PDZL domeinua dago, beste proteinek elkartzeko eta lotugaien multidimerizazioan laguntzen duena (6. Irudia, morez) (Chillakuri *et al.*, 2012).



6. Irudia. NOTCH lotugaien egitura. NOTCH lotugaien amino-muturrean, zelula kanpoko gunerantz, zelularen mintzetik (CM) urrutien, DSL domeinua (Delta / Serrate / Lag-2) dago, jarraian DOS domeinua (Delta and OSM-11-like), gero EGF-bezalako errepikapenak eta azkenik cisteinetan aberatsa den zatia (CRD). Zelulen barneko zatian PDZL domeinua dago karboxi-muturrerantz.

1.4.3. SEINALEAREN TRANSDUKZIOA:

NOTCH seinalizazio bide-kanonikoa hartzaileen eta lotugaien arteko loturarekin hasten da, lotura honen ostean zatiketa proteolitiko batzuk ematen dira zelula kanpoko metaloproteasen eta mintzeko gamma-sekretasen bidez (7. Irudia). ADAM endopeptidasa 17, TACE izenekoa (tumor necrosis factor alpha-converting enzyme), hurrengo zatiketaren arduraduna da (hartzaileen lehenengo zatiketa S1 puntuan ematen da mintzean ainguratu aurretik ematen zen) eta NOTCHen S2 lekuan egiten du. S2a zelula kanpoko azpiunitatearen mitz aldameneko zati mehe batean kokatuta dago, honela lotugaia, NOTCH hartzailearen EGF-bezalako zelula kanpoko zatiari atxikituta geratzen da eta hartzailea libre geratzen da mintz-zeharreko eta zelula barneko (NICD) zatiekin.



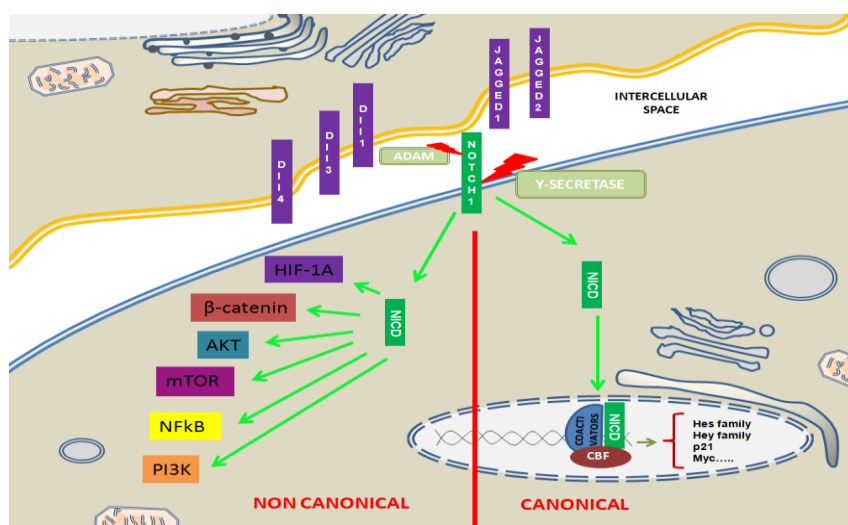
7.Irudia. NOTCH hartzailearen zatiketa puntuak. Lehenengo mozketan S1ean ematen da mintzera atxikitu aurretik, gero S2an mozten da TACE entzimaren eskutik eta azkenik γ -sekretasak S3an mozten du NICD subunitatea askatuz. Barruko domeinu aktibo honek nukleorako bidea hartzen du (Wu *et al.*, 2007).

Bigarren zatiketaren produktua, aldi berean hirugarren mozketaren substratua izango dena, zelula barneko azpiunitatean S3 deritzon puntuan moztuko du. Kasu honetan mozketan γ -sekretasa konplexuak egiten du, lau proteinaz osaturik dagoena: presenilina (proteasa ekintzaren arduraduna), nicastrina, Pen-2 eta Aph-1. Hirugarren zatiketa honek zelula barneko NICD azpiunitatea mintzetik askatzen du nukleorako bidea hartuz (Mumm & Kopan 2000).

Behin nukleoan, NICDa CSL/RBP-Jk/CBF-1 transkripzio faktorera lotzen da. Faktore hau berez, transkripzioaren errepresore bat da NICD ez dagoenean. CSL/RBP-Jk/CBF-1 NOTCH seinalizazioaren itu geneen promotoreen DNA sekuentzia espezifiko batera lotzen da (GTGGGAA).

NICD-CSL/RBP-Jk/CBF-1 konplexuak aktibatzen dituen geneak HES eta HEY dira. Proteina hauek basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transkripzio faktoreak dira. HES familia zazpi kidez osatuta dago, baina bakarrik HES1, HES5 eta HES7 dira NOTCHen ituak. HEY familian hiru gene identifikatu dira (HEY 1, 2, L) eta hirurak NOTCH hartzailearen bidez induzitu ahal dira.

NOTCH seinalizazio bidea CSL proteinatik independentea izan ahal da. NICD beste proteina batzuekin elkar eragin dezake, seinalizazioa positiboki (Deltex, Mastermind) edo negatiboki (Numb) erregulatuz (Fraise *et al.*, 1996).



8. Irudia. NOTCH seinalizazioaren transdukzioa. Seinalizazio bide-kanoniko eta ez-kanonikoaren irudikapena.

Azken aldiko ikerkuntzek hiru motatako NOTCH seinalizazio bide ez-kanoniko deskribatzen dituzte: γ -sekretasa erregulatzen duen NOTCH seinalizazio bidea, lotugaiaren loturarekiko independentea dena; NICDren aktibitatea CSL/RBP-Jk/CBF-1 -rekiko independentea eta γ -sekretasa konplexuaren mozketaren gabezia mintzari loturiko NOTCH seinalizazioa, kasu batzuetan lotugaiaren elkarrekintzarekiko independentea dena. NOTCH seinalizazio bide ez-kanonikoan erlazioa duten hainbat seinalizazio bide daude, NICD beste molekula batzuekin duen elkarrekintzez eragina, NFkB, PI3K, AKT, mTOR, HIF-1a, eta β -catenina, adibidez (8. Irudia) (Ayaz F, Osborne BA, 2014, Rejendran Sanalkumar *et al.*, 2010).

1.5 NOTCH ETA GARAPENA

Ornodun eta ornogabeen sistemen analisi fenotipikoen bidez, NOTCH seinalizazio bidearen funtzio nagusia zelulen garapen patua kontrolatzea zela iradoki zen. Prozesu hau alboan dauden zelulen artean ematen da. Aldameneko espezifikazio gertaerak (“lateral specification events”) (Greenwald I, 1998) askotan zelula talde aitzindarien leinuen segregazioan eta ehun ezberdinen mugen definizioan parte hartzen du.

Garapena gertatzen den bitartean, alboan dauden zelulen arteko desberdintzapena NOTCH seinalizazio eta bere lotugaiek anplifikaturiko kanpoko faktoreengatik gertatzen da. Azken finean, gertakizun biokimikoak dira zelulen leinua gidatzen dutenak. NOTCH bitarteko komunikazioa, aldameneko zelulen hartzaile eta lotugaiei arteko adierazpen ezberdinen arabera ematen da, honela oreka bat lortzean leinu zelular espezifiko bat erabakiko da (Spyros Artavanis-Tsakonas *et al.*1999).

Zelulen justaposizioak, lotugai eta hartzaile kantitate ezberdinak adierazten duenean, zelula bat proportzio batean alboko zelularekiko lotugai gehiago espresatzen badu “seinalizazio” moduan jarri dela esan nahi du (Heitzler P. and Simpson P., 1991). Beraz, antzekoak diruditen bi zelulen artean, biak DELTA eta NOTCHekin, zelula batek bestek baino lotugai gehiago adierazten badu seinalizazio funtzioa martxan jartzen lagunduko du.

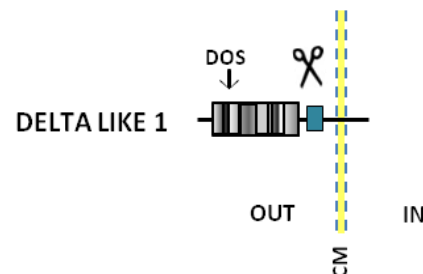
Modu honetan NOTCH seinalizazio bideak funtzezkoa da zeregin zelular anitzetan; garapen enbrionarioan bezala (Iso T. *et al.*, 2003), ama zelulen mantentze-lanean (Yamamoto N *et al.*, 2003; Chiba S, 2006), ehun helduen homeostasian (Schwanbeck *et al.*, 2008), eta zori-espezifikoko desberdintzapenean (Apelqvist *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2006). Garapenean eta homeostasian parte hartzeaz gain, NOTCH seinalizazioaren osagaien desregulazioa zuzenean inplikatuak daude gizakien gaitzekin (Talora *et al.*, 2008). Hauek garapeneko sindromeak dute barne (Gridley T 2003; Louvi *et al.*, 2006), eta arearen (Mysliwiec & Boucher 2009) eta beste minbizi batzuen (Pierfelice TJ *et al.*, 2009; Rose SL, 2009) sorreran, progresio eta mantentzearekin erlazonaturik daude. T-zelulen leuzemia zorrotzan (Weng & Aster, 2004) eta koloneko minbizian (Van ES *et al.*, 2005) NOTCH seinalizazioa bidea tratamendu berezi bezala erabiltzen hasi da.

1.6 DLK1 ETA DLK2 PROTEINAK

DLK1 (Delta-like1, era berean pG2, Pref1, FA-1, SCP-1 eta ZOG izenekoa) mitz-zeharreko eta jariatutako proteina da. DLK1 EGF-antzeko diren proteinen familia barnean dago, NOTCH errezeptorak eta lotugaiak bezala. Gizakietan, 14q32 kromosoman dago kokatuta (Gubina *et al.*, 1999). DLK1 proteina helduak gizakietan 383 aminoazido ditu eta sekuentziak 85%eko berdintasuna du sagu eta arratoi proteina homologoeekin.

Aminoazidoen sekuentziak, cDNAren sekuentziatik atera dena, DLK1ek zelula-barneko zati mehe bat, mintz-zeharreko beste zati bat eta zelula-kanpoko zatia duela iradokitzen du (9. Irudia). Zelula-kanpoko zatia sei EGF-bezalako errepikapenez osaturik dago eta amino-muturrean peptido seinalea du (Laborda *et al.*, 1993). Bi EGF-bezalako errepikapenek, espezifikoki EGF1 eta EGF2a, DOS domeinua osatzen dute (Delta and OSM-11-like proteins), eta hartzaileen loturaren arduraduna da (Felix *et al.*, 2012). Zelula kanpoko zatian karboxi-muturrean ondoan, TACE proteasa ezagutzen duen zati bat dago. DLK1 puntu honetan moztzen bada zelula-kanpoko EGF-bezala daroan errepikapen zatia askatzen da zelularen kanpoko mediora.

9. Irudia. DLK1 proteinaren irudikapena. DLK1 proteina zelula-kanpoko zatiaz, sei EGF-bezalako errepikapen dituena, mitz-zeharreko zatiaz (CM), eta zelula barneko zatiaz osaturik dago. EGF-bezalako errepikapen 1 eta 2ak, DOS domeinua osatzen dute. TACE proteasak ezagutzen duen mozketa puntua urdinez margoturik azaltzen da.

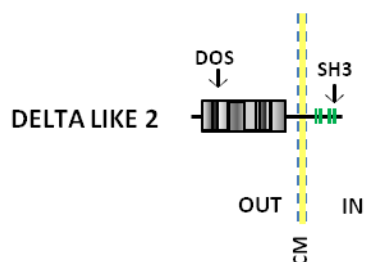


DLK1en mRNAren moztitsasketak proteinaren bariante polimorfikoak ematen ditu; luzera osoko DLK1az aparte, moztitsasketak proteinaren hiru bertsio motzago egiten ditu, DLK1B, 1C and 1D (Smas *et al.*, 1994, Lee *et al.*, 1995, Smas *et al.*, 1997). DLK1en proteina bariante ohikoenak DLK1A, mRNAren sekuentzia osoa dutenak, eta DLK1C, seigarren EGF-bezalako hiru hirugarren cisteinatik mitz-zeharreko zatiaren hasierarainoko zatia falta zaiona dira (TACE zatia falta zaionari). Hortaz, DLK1ek mitz-zeharreko proteina bezala edota jariatzen den proteina bezala funtzionatu dezake, beti mRNAren moztitsasketaren eta TACE proteasaren aktibitatearen arabera (Wang and Sul 2006), ahalmen honek DLK1i bere funtzioa modu ezberdinetan egitea baimentzen dio.

2007an, birtualki DLK1en ezaugarri berdinak eta NOTCHen DLL1 lotugaiaren ezaugarri antzekoak zituen proteina bat ezagutarazi zen (Nueda *et al.*, 2007b, Nueda *et al.*, 2008). Proteina hau DLK2 deitu eta jakina EGF-bezalako familian sailkatu zen.

Proteina honen genea 6p21.1 kromosoman kokaturik dago gizakietan. Sei exoiz osaturik dago, DLK1 proteinak baino exoi bat gehiago. Lehenengo exoiak ez du ezer kodifikatzen eta seigarrena luzeena da. DLK1 eta DLK2ren arteko antzekotasunekdirela eta bata bestearen duplikazioaz sortu zirela pentsatzen da (Nueda *et al.*, 2007a).

10. Irudia. DLK2 proteinaren irudikapena. DLK2k mitz-kanpoko zatian sei EGF-bezalako errepikapen ditu, mintz-zeharreko zati bat, eta zelula barneko zati bat. EGF-bezalako 1 eta 2a DOS domeinua bezala ezagutzen da. Zelula barneko zatiak bi SH3 domeinuko (berdez) proteinen loturarako lekuak ditu.

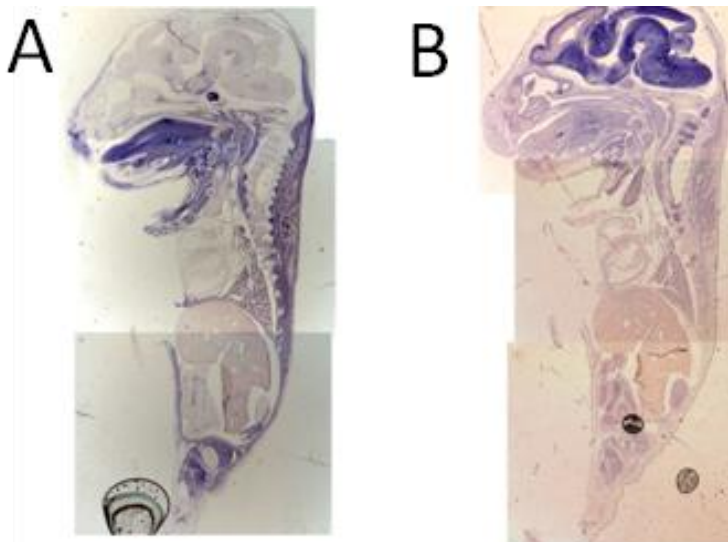


DLK2rentzako sekuentziaren analisiak, cDNAtik aterata, mitz-proteina honek sei EGF-bezalako errepikapenak dituela esaten digu. DLK1 bezala, mintz-zeharreko zati bat eta zelula-barneko zati motz bat, DLK1en zelula-barneko zatiarekiko homologia gutxi duena. DLK2ak TACE proteasarako mozketak sekuentzia izan ez arren, DLK1 eta DLK2ren arteko ezberdintasunik handiena zelula-barneko zatian dago. DLK2k barnealdeko zatian lau SH3 domeinu atxikitze leku potentzialak ditu, DLK1ean ez daudenak (Pawson and Nash, 2003). Honek DLK2ren barneko zatiak SH3 domeinuak dituzten proteinekin elkartu daitezkeela esan nahi du. Proteina hauek zelularen barneko seinalizazioan parte hartzen dute kasu askotan, funtsezko ondorioak izan ditzaketanak.

Bestalde, gizakietan, DLK1 eta DLK2k zelulaz kanpoko zatian kaltzioa lotzeko domeinu berezi bat dute. DLK2k kaltzioa lotzeko bi leku berezi ditu, 5. eta 6. EGFetan kokaturik, eta DLK1ek bakararra du 5. EGFan. Gainera, DLK1 eta DLK2 glikosilaziorako konsentzu-sekuentziak dituzte, DLK1ean ugariagoak direnak.

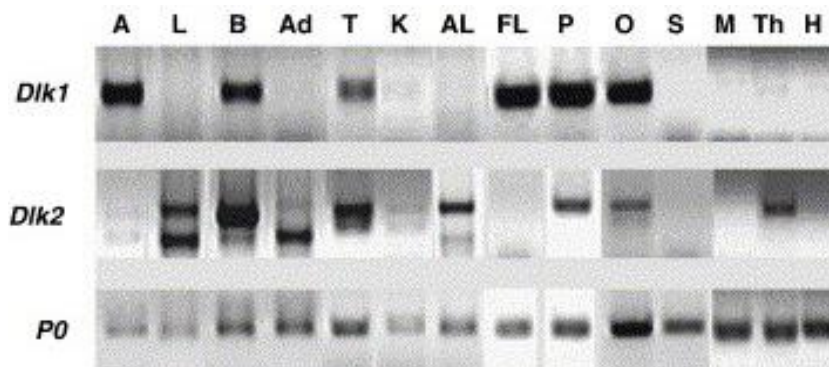
1.6.1. *Dlk1* ETA *Dlk2*REN EXPRESIOA

Saguen enbrioietan *Dlk1* genea garapenean 8,5. egunetik detektatu ahal da (Smas *et al.*, 1994), gero garapenean zehar eta ehun helduetan aurkitzen da. Saguaen garapenean, E12,5ean, *Dlk1* maila altuetan adierazita dago enbrioaren hainbat tokitan. *Dlk1* guruin pituitarioaren garapenean zehar, arean, guruin adrenalean, mesodermotik jatorritako ehunetan, eta adarkatze morfogenesisia duten organoetan; birikietan eta listu-guruinetan aurki izan da. E16.5ean, *Dlk1*en adierazpenak beherantza egiten du ehun gehienetan, hala ere, ehun batzuek mantentzen dute, hala nola, pituitarioa, guruin adrenalak eta muskulu eskeletiko (Yevtodienco and Schemidt, 2006). *Dlk2*ri buruz gutxiago dago, baina E16,5ean (11. Irudia) mRNAren markaketa teknikari esker, garunean ere adierazten dela dakigu.



11. Irudia. *Dlk1* eta *Dlk2* adierazpen patroia E16.5 sagu enbrioietan. (A) *Dlk1* (B) *Dlk2* mRNA markaketa *in situ* hibridazio teknika bidez.

Sagu helduetan (12. Irudia) *Dlk1* maila handietan adierazten da karenan, guruin adrenaletan, garunean, barrabiletan, obarioetan, eta maila baxuagoan, giltzurrunetan, muskuluetan, timo eta bihotzean. Aldiz, ehun guzti hauek *DLK2* adierazten dute, guruin adrenalak, barea, muskulua eta bihotza izan ezik. Laburbilduz, bi gene hauek maila ezberdinetan adierazten dira plazentan, guruin adrenaletan, garunean, barrabiletan, obarioetan, giltzurrunetan eta timoan.



12. Irudia. *Dlk1* eta *Dlk2*ren gene adierazpena sagu helduen ehunetan. *Dlk1* and *Dlk2* adierazpena RT-PCR analisiaren bidez: A: Adrenal Gland, L: Lung, B: Brain, Ad: Adipose tissue, T: Testis, K: Kidney, AL: Adult Liver, FL: Fetal Liver, P: Placenta, O: Ovaries, S: Spleen, M: Muscle, Th: Timo, H: Heart (Nueda *et al.* 2007a).

1.6.2. DLK1 ETA DLK2REN FUNTZIOA ETA AKZIO MEKANISMOA

Dlk1 inpronta genetikoa duten gene taldeko kide bat da, eta bakarrik aitengandik jasotako kromosometan adierazten da (Schmidt *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2000). Inpronta duten geneek eginkizun garrantzitsuak dituzte fetuaren hazkuntza eta garapenean (Murphy & Jirtle, 2003; Rand & Cedar, 2003; Wilkins & Haig, 2003). *Dlk1* ez duten saguek, jaiotzean eta bizitzako lehenengo egunetan hazkuntzaren atzerapena dute (Moon *et al.*, 2002; Raghunandan *et al.*, 2008). Gainera, genetikoki eraldatutako saguak, *Dlk1* genearen dosi bikoitza adieraztu dutenek (inpronta kondizioaren galera simulatzen duena) ez dute bizirik irauten nahiz eta beste kopia bat edukitzeak enbrioi hazkuntzarako abantaila bat zela pentsatu (da Rocha *et al.*, 2009).

*Dlk1*en rola *Dlk2*rena baino ikertuagoa izan da. *Dlk1*en funtzioa pleiotropikoa da. Ebidentzia gehiagoren ostean *Dlk1*ek desberdintzapen prozesuetan parte hartzen duela iradoki da, esaterako, zelula neuroendokrinoen desberdintzapenean (Floridon, 2000), hepatozito eta biliarbehazun zelula epitelialen desberdintzapenean (Tanimizu *et al.*, 2003), neurogenesian (Sacri R Ferrón *et al.*, 2012), hematopoiesian (Moore *et al.*, 1997, Mirshekar-Syahkal B *et al.*, 2013), osteogenesian (Abdallah *et al.*, 2004), muskulu desberdintzapenean (Andersen *et al.*, 2013), kartilagoaren desberdintzapenean (Chen *et al.*, 2011) eta adipogenesian (Smas & Sul, 1993). Pituitarioko GH3 zeluletan *Dlk1*ek hazkuntza hormonaren jariatzea inhibitzen duela ere aurkitu da (Ansell *et al.*, 2007). Azkenaldiko ikerkuntzetan lortutako datuetan DLK1 zelula hazkuntzaren erregulazioarekin eta minbiziarekin erlazionaturik egon daitezkeela iradoki da (Kim *et al.*, 2009, Yanai *et al.*, 2010).

Momentuz inork ez du deskribatu *Dlk1* entzako hartzaile bakarra. Halaber, DLK1 lotzen duten zenbait bikote identifikatu dira. Lehenengo ebidentziek, legamia-bi-hibrido sistema erabiliz, *Dlk1* NOTCH1en EGF-bezalako 12/13 errepikapenei lotu egiten zela frogatu zen (Nueda *et al.*, 2007b). DLK1ek NOTCH hartzailen lotzean, NOTCH seinalizazio basala inhibitzen zuen, Hes1 ituaren adierazpena gutxituz, eta ondorioz adipogenesiaren inhibizioa ematen zen (Sanchez-Solana *et al.*, 2011). Berriki, DLK1en animali ereduak erabiliz, funtzioa galera edo irabaztea eragiten duenak, DLK1ek NOTCH hartzaileen inhibizioaren bitartez angiogenesisia inhibitzen dela proposatu da (Rodriguez *et al.*, 2012).

DLK1ek eta fribonektinaren karboxi-mutur zatiak interakzioa egitean anti-adipogeniko efektua sortzen duela ere iradoki da, integrinek eragindako MEK/ERK seinalizazioa aktibazioaren bidez (Wang Y *et al.*, 2010). Bestalde, mintzera atxikitutako DLK1ek, IGfA (insulin-like growth factor) eta IGFBP1ek (IGF binding protein 1) elkarrekin sortzen duten konplexura lotzen da eta IGF hartzailearen seinalizazioa sustatzen du (Nueda *et al.*, 2008). DLK1 dagoenean MAPK (Mitogen activated protein kinase) eta MEK/ERK seinalizazioak aktibatzen dira eta adipogenesiaren inhibizioa eragiten dute (Kim KA *et al.*, 2007). Gainera, DLK1en efektua, kondrozitoen desberdintzapena inhibitzean, PI3K/AKT seinalizazioarekin erlazionatu da (Chen L *et al.*, 2011).

Beste autore batzuek NF- κ B bidearen aktibazioa adierazi dute DLK1 inhibizioaren azpi mekanismo bezala MSCen desberdintzapenean (Abdallah BM *et al.*, 2007). DLK1en adierazpena edo FA1en adizioak NF- κ B bidea aktibatzen du hBMSCetan (human bone stem cells), zitokina eta inmunitatearekin erlazionaturiko faktoreen produkzioa handituz, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL20 eta COX-2 bezala. Faktore hauen funtzioa osteoblastoen eta adipozitoen desberdintzapena inhibitzea dela ezaguna da (Chang J *et al.*, 2013). DLK1erako sagu transgenikoan antzeko mekanismo bat identifikatu egin da, DLK1ek eragindako hezur birxurgapenerako. Beste lan batzuetan DLK1 eta hantura erantzunaren arteko elkarrekintza deskribatu da, DLK1 eta gantz ehun (Chacon MR *et al.*, 2013) eta muskulo eskeletikoko miotubuek (Abdallah BM *et al.*, 2007) jariaturiko hantura zitonkinekin erlazionatuz.

2. HELBURUAK

Listu-guruinaren funtzioa gaixotasun eta baldintza askorengatik kalteturik ikus daiteke, lepoko eta buruko minbizien aurkako erradioterapiaren ostean pairatutako efektuengatik esaterako. Listu-guruinen funtzioaren oztopatzeak Xerostomia (“aho idorraren sindromea”) eritasuna sor dezakete. Eritasun hau, jasaileen egonezina sortzen dute, haien bizi kalitatea murrizten (Bouma *et al.*, 2003; Vissink *et al.*, 2010). Beraz, azkeneko urteetan ikerkuntza taldeak esfortzu handia egiten ari dira birsorkuntza estrategiak garatzeko. Horretarako ezinbestekoa zaigu listu-guruinaren ezaguera sakona, ama zeluletan (Lombaert *et al.*, 2008), listu-guruinaren inerbazioan (Knox *et al.*, 2013), edo listu-guruinaren morfogenesia gidatzen duten seinalizazioetan ikertzea beharrezkoa izan da besteak beste (Jaskoll *et al.*, 2004a; 2004b; Dang *et al.*, 2009; Rebustini and Hoffman, 2009; Patel *et al.*, 2011).

Horrengatik, gure helburu nagusia listu-guruinaren morfogenesian DLK1 proteinen funtzioa aztertzea izan zen. NOTCH familiaren lotugai ez-kanonikoak, DLK proteinak, NOTCH hartzailearekin lotura balute, saguen listu-guruinaren garapenean funtzio garrantzitsua izan lezakete.

Hau ikasteko, hurrengo objektiboak jarraitu ditugu:

- 1- DLK1 eta DLK2ren adierazpen patroia aztertu listu-guruinen garapenean zehar.
- 2- Gizakien listu guruinen lerro zelularrean, DLK1ren funtzioa ikertu, NOTCH seinalizazioarekin harremana aztertuz.
- 3- Garapenean dauden saguetako listu-guruinetan eta isolatutako epitelioetan NOTCH seinalizazioaren inhibizioaren ondorioa ikasi.
- 4- Saguen garapeneko eta helduen listu guruinetan DLK1en gabeziaren efektua aztertu, *Dlk1*(-/-) sagua karakterizatuz *Dlk1* (+/+) saguarekin alderatuta.

3. MATERIAL ETA METODOAK

3.1 SAGU ARRAZAK

Proiektu honen esperimentuak egiteko bi sagu arraza erabili ziren:

- Sagu albino-swiss anisogenikoa, OF1 arraza (Oncis France strain 1) IFA CREDOTik ekarrita.
- 129XI/SVJ eta C57Bl/6 arrazen arteko gurutzaketa, *Dlk1*(+/+) eta *Dlk1*(-/-) egiteko. Castilla La Manchako Unibertsitateko Medikuntza fakultatea (UCLM) adeitasunez emandako saguak.

Sagu *Dlk1*(-/-) (knock-out sagua ,KO) SVJ129ren embrioien ama zelulen (ES) egile baten elektroporazioaren bidez egin zen. Egile hau, neomizinarako erresistentzia ematen duen kasete bat darama, 3,8kbp alelo endogenoa ordezkatzeko duena; *Dlk1*en promotorea eta lehengo hiru exoien aurkako sekuentziekin. Animalia kimerikoak elkarrekin gurutzatu ziren *Dlk1*(-/-) sagua sortzeko. Genotipatzeko analisia southern blotaren bidez edo PCR amplifikazioaren bidez egin zen, hasle hauek erabiliz: 5´dlk, CCAAATTGTCTATAGTCTCCCTC; 5 Neo,CATCTGCACGAGACTAGTG; and 3´ SCR (screen), CTGTATGAAGAGGACCAAGG (from *Dlk1* intron 3).

Fenotipoaren analisia C57Bl/6rekin hiru gurutzaketa ostean egin zen. Gero animalia hauek, heterozigotoak, haien artean gurutzatu ziren homozigotoak, heterozigotoak eta *Dlk1*(+/+) (wild-type,WT) saguak sortzeko. Esperimentu guztientzat, adin berberako wild-type kumeak hazi egin ziren eta kontrol moduan erabili ziren (Ramadevi R *et al*, 2008).

Sagu arraza biak, Swiss and *Dlk1*(+/+) eta *Dlk1* (-/-), Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) abeltegian hazi dira, garbiketa maila estandarretan, *ad libitum* elikadurarekin eta 8 am-8 pm argi ziklo epeekin.

3.2 SAGUEN GENOTIPATZEA

Dlk1(+/+) eta *Dlk1*(-/-) genotipatzea, polimerasa erreakzioa kateatu (PCR) konbentzionalarekin egin zen, jarraian azaltzen dugun bezala.

DNA genomikoa sagu *Dlk1*(+/+) eta *Dlk1*(-/-)eko buztanaren zati batetik lortu zen. Buztan zati hauek gau osoan zehar salting-out bufferrarekin 55°Ctan 30 µl Proteinasa K.rekin (Roche, 03 115 836 001, 10 mg/ml) jarri ziren, digestioa egiteko.

Material eta Metodoak

SALTING- OUT INDARGETZAILERA: 40 mM Tris-HCl pH 8.0 0.5% SDS
2 mM EDTA 200 mM NaCl

Hurrengo egunean, NaCl 6Meko 250 µl gehitu ziren, laginak irabiatuz gora eta behera eta 10 minutuz izotzean inkubatu ziren. Gero zentrifugatu ziren 16000xg 4°Ctan. Gain-jalkinen 500 µl eppendorf berri batean jarri ziren 95%ko etanol mililitro hotz batekin eta berriro zentrifugatu ziren, pausu honekin DNA prezipitatu da. Jarraian pelleta edo jalkina 70%ko etanolarekin garbitu ziren eta berriro zentrifugatu. Azkenik, jalkinak lehortu ziren eta miliQ urarekin berriro disolbatu ziren, 20 ng/µl kontzentrazioa.

Bat DNA garbirik zegoenean, genotipatzeko PCR konbentzionala egin zen. Horretarako, MyTaq™ Red Mix (BioLine, BIO.25043) erabili zen, errektibo honek polimerasa entzima eta nukleotidoak darama bere barnean. Erreakzioa egiteko jarraian datozen kantitateak gehitu genituen: 5 µl MyTaq

0.8 µl Primers

0.8 µl cDNA

3.4 µl DEPC water

PCRa iCycler MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System (BioRad) ekipoa egin zen baldintza hauekin: desnaturalizazioa 95 ° C 30 segundo, suberaketa 55 ° C 30 segundoz eta luzapena 72 ° C 1 minutu, 35 zikloetan errepikatuta Neo genearentzat; eta 40 ziklotan errepikatuta *Dlk1* genearentzat.

Dlk1(-/-) sagua igertzeko hurrengo hasleak erabili ziren:

Neo Forward: 5' TTGAACAAGATGGATTGCACGCAGG3'

Neo Reverse: 5' GGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCT3'

Sagu *Dlk1*(+/+) ezagutarazteko hurrengo hasleak erabili ziren

m*Dlk1* 5' TGTGACCCCGAATATGGATTCTGCGAGG 3'

m*Dlk1* 5' CATGGTTCCTTGCAGACTCCATTGACACACAGC 3'

PCRaren produktu amplifikatuak gel baten elektroforesaren bidez ikustarazi egiten dira. %2ko agarosa TAE indargetzailerean disolbatzen da gel bat sortzeko eta GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, 41003) produktuarekin nukleotidoak ikusi ahal ditugu. Laginak Run One Electrophoresis Cell (EmbiTech) ekipoa aztertu ziren 100 mAko tentsioan.

Gel bakoitzaren lehengo lerroak beti pisuaren markatzaile (100-bp DNA Ladder Plus, BioChain, BIO 33029) bat daramate. Gelaren bandak ikusteko UV argiaren azpian jartzen dira (High Performance Ultraviolet Transilluminator, UVP) eta argazki bat egiten da.

3.3 BARAILPEKO LISTU-GURUINAREN HAZKUNDE ORGANOTIPIKOA

Hamahiru egunetako swiss saguen enbrioak (E13, baginako tapoia= egun 0) umetokitik atera ziren eta mikrokirurgiaz mikroskopio baten bidez barailpeko listu-guruinak (SMG) isolatu ziren. SMGak Millicells (Millipore, PICMORG50) nitrozelulosako filtroetan hazi ziren, DMEM-F12 medioarekin, bitamina C (180 µg/ml) eta transferrina (5mg/ml) gehituz.

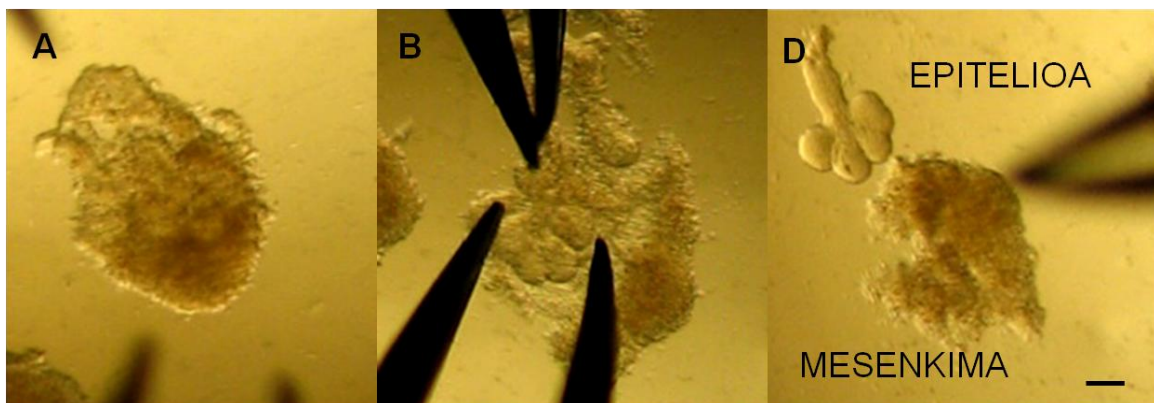
Hazkunde organotipiko hauetan tratamendu diferenteak jarri ziren. Alde batetik DAPT gamma-secretasa, proteasaren, inhibitzailea (N-[N-(3, 5-difluorophenacetyl-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester, Calbiochem) 20 µMean, beste aldetik gizakien DLK1 proteina errekonbinante solublea, sDLK1 (R&D Systems) 2.5 µg/ml kontzentrazioan, eta azkenik Carbacoylcholine chloride (CCH) 10nMean (TOCRIS bioscience) tratamendua erabili genuen, azetilkolinaren analogo bat dena, SMGaren aktibitate kolinergikoaren ordekoa (Knox *et al.*, 2013).

Tratamenduak jarri ostean, hazkuntza hasi eta 0, 24 eta 48 orduara argazkiak atera genituen. "Spooner ratio" portzentajea kalkulatu genion esplante bakoitzari (Jaskoll *et al.* 2004a). "Spooner ratio" hau, listu gurin bakoitzaren epitelio kimuen kopurua 0, 24, 48 orduetan listu-guruin kontrolarekiko (100% balorea ematen diogunari) normalizatua. Esperimentu bakoitza gutxienez hiru aldiz errepikatu zen.

3.4 EPITELIO-MESENKIMA DISEKZIOA ETA HAZKUNDEA

Mesenkimatik askaturiko epitelioen isolamendua eta hazkunde teknika (Morita and Nogawa, 1999) artikuluan deskribatzen den bezala egin zen, baina aldaketa batzuekin.

Hamahiru egunetako swiss saguen enbrioiak atera ziren eta barailpeko listu-guruinak (SMG) isolatu ziren. Jarraian SMG hauek Dispasa (Gibco,17105-041) entzimarekin inkubatu ziren 14min 37 °Ctara. Gero guruinak bi aldiz 10% BSA/DMEM-F12an garbitzen ziren dispasa kentzeko. Epitelioak gutxi gora behera bost kimuekin (13.Irudia B) mesenkimatik askatu ziren fórceps batzuen bidez 10% BSA/DEMEM-F12 medioan.



13. Irudia. Epitelioa mesenkimatik askatzeko teknika. (A) E13ko SMGak bost epitelio kimuekin eta mesenkima loturik (B) Dispasa tratamendua ostean, mesenkimak forceps batzuekin askatzen da (D) Mesenkimateik askatutako epitelio isolatuak lortzeko. Eskala-barra: 150 μ m.

Epitelio isolatuak (13.Irudia D) Whatman Nuclepore Track-etch polikarbonatoko eragazkietan (13 mm, 0.1 μ m pore size; VWR, Buffalo Grove, IL) jarri ziren. Filtroak 200 μ l DMEM-F12 medioaren gainean jarri ziren, eta medioa plastikozko 50 mm plaka (MatTek, Ashland, MA) batzuetan. Medioa 100 U/ml penizilina, 100 μ g/ml estreptomizina, 150 μ g/ml bitamin C and 50 μ g/ml transferrinarekin suplementatuta dago. Epitelioak ez laututzeko eta berariazko tridimentsionaltasuna ez galtzeko, laminin-1 (1 mg/ml; Trevigen, Gaithersburg, MD) medioan disolbatuta 1:1, 15 μ lko tanta bat jartzen da filtroaren gainean, eta epitelioak bere barnean.

Hazkundeetan Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10) gehitu zen 800 ng/ml kontzentrazioan (R&D Systems, Minneapolis, MN), beti Heparan Sulfatoarekin (HS) 100 ng/ml (Sigma-Aldrich, MO) kontzentrazioan. FGF10/HS gure kontrola zen, eta bakarrik aztertu egiten zen edo beste tratamendu batzuen konbinazioan; SU5402 5 μ M, LY2905 eta UO126 10 μ M (Calbiochem, EMD, Biosciences) edo sDLK1 (R&D Systems) 2.5 μ g/ml kontzentrazioan.

Iragazki bakoitzean bost epitelio isolatuak jarri ziren eta 37°C tenperaturan, 5% CO₂ eta 95% hezetasunean hazi ziren. Argazkiak 2, 24 eta 48 hazkunde orduetan atera ziren. Esperimentua gutxienez hiru aldiz errepikatu zen.

3.5 TINDAKETA

3.5.1 HEMATOXILINA-EOSINA

Listu-guruin helduak tindatzeko hematosilina-eosina erabili zen. Aldez aurretik, guruinak gau osoan zehar fixatu ziren para-formaldehido %4an, jarraian deshidratatu (SHANDON CITADEL 1000) eta parafinan murgildu ziren (SHANDON HISTO CENTER 2). Behin lagina parafina barruan zegoenean, sekzioak egin genituen (5 μ m lodieran) mikrotomoarekin (SHANDON FINESSE 325) eta gau osoan zehar 65°Ctan utzi genituen. Tindatu aurretik desparafinatu behar izan ziren, zitrosolarekin 10 minutuz eta etanolekin berridratatu ziren %100, %96, %70 5 minutu bakoitzean. Orduan laginak tindatzeko prest zeuden, hematosilina 30 segundoz, gero urarekin garbitzen zen minutu bat, eosinarekin 30 segundoz eta berriro deshidratatu etanol %70, %96, %100an eta bukatzeko zitrosolarekin. Laginak estalki batekin muntatzeko, DPX Mounting for histology (Sigma, 44581) erabili zen. Argazkiak OLYMPUS optical microscope BX50FO atera ziren, Cella softwarekin.

3.5.2 INMUNOFLUORESZENTZIA

E12, 14, 17, 19 drogen presentzian edo absentzian hazitako SMGak, ordu batzuetan zehar fixatzen ziren %4 paraformaldeidoan (ehunaren tamainaren arabera), gero sakarosarekin babestu eta O.C.T. Compound (Tissue-Teck®, Sakura) barruan sartzen ziren izotz lehorrean izotzu baino lehen. Kriostatoarekin (LEICA CM3050S) ebakitzean laginak 10 µm lodieran mozten ziren. OCTa PBSarekin garbitu ostean, ehunak blokeatu eta gau osoan zehar inkubatzen ziren antigorputzekin.

Untxiko DLK1 eta DLK2 aurka doazen antigorputzak deskribatzen den bezala lortu ziren, Hermida *et al.*, 2008 and Rivero *et al.*, de 2012. Bi antigorputz hauek laginen DLK proteinen zelula barruko epitopoak ezagutzen dituzte, eta 1:1000 diluzioan erabili ziren. DLK1 proteinak listu-guruin helduaren zelula mioepitelialetako markatzailea dela baieztatzeko immunofloreszentzia bikoitza egin genuen, hau da, saguaren α -sma aurkako (smooth muskle actin) (A2547, Sigma, 1:250 diluzioan) antigorputza DLK1en markaketa egiten zen aldi berean jarri zen. Markaketa ikustarazteko bi bigarren antigorputz erabili ziren, Alexa Fluor 488 (berde) ahuntz untxi-aurkako IgG (A11008, Invitrogene) eta Alexa Fluor 594 (gorria) ahuntz sagu-aurkako IgG (A11005, Invitrogene).

NOTCH hartzailearen forma aktiboa ikusteko, untxiko NOTCH 1 intracellular domain (N1ICD) aukako antigorputza (ab8925, Abcam 1:250 diluzioarekin) erabili genuen eta ikustarazteko bigarren antigorputz bat Alexa Fluor 488 ahuntz untxi-aurkako IgG (A11008, Invitrogene). Argazkiak Zeiss Axioskop epifluorezentziako mikroskopio batekin atera ziren, Nikon NIS-Elements softwerarekin dabilena.

E13ko SMGak hazkunde organotipikoetan drogen presentzian edo absentzian hazitak, untxiko antigorputz ezberdinetarako markatu ziren, Ki67 aurkako antigorputzarako (ab15580, Abcam, 1:500 diluzioan) proliferatzen diren zelulak ikusteko, fosfo histona H3 aurkako antigorputza (H3P, 06-570, Millipore 1:500 diluzioan) mitosian dauden zelulak markatzeko, eta Caspasa3 aurkako antigorputza (9661, Cell Signalling 1:200 diluzioan) apoptosian dauden zelulak detektatzeko.

Ama zelulak edo progenitoreak ikusi ahal izateko zitokeratina 5 aurkako (CK5, ab53121, Abcam 1:400 diluzioan) edo saguko zitokeratina 14 aurkako (CK14, specific marker of myoepithelial cells, ab49747, Abcam 1:200 diluzioan) antigorputzak erabili ziren. Untxiko lehenengo anti gorputz guzti hauek, Alexa Fluor 488 ahuntz untxi-aurkako IgG (A11008, Invitrogene) antigorputzarekin ikustarazi ziren eta sauguenak 594 ahuntz sagu-aurkako IgG (A11005, Invitrogene) antigorputzarekin. Markaketa guzti hauen argazkiak ateratzeko Olympus FV500 Fluoview mikroskopia konfokala erabili zen Nikon DS-Qi1Mc softwarea erabiltzen duena.

48 orduz hazitako E13 SMG batzuei flotazio immunofluorezentzia egin genien, ingelesez "whole-mount" deritzona, OCTan sartzea behar ez duena. SMGak hazkunderatetik ateratzean, jarraian eta moztu barik, untxiko β III tubulina aurkako antigorputzarekin markatu ziren (ab18207, Abcam 1:500 diluzioan), PSGren axoiak eta neuronon gorputzak ikusi ahal izateko. Alexa Fluor 488 ahuntz untxi-aurkako IgG antigorputzak (A11029, Invitrogene) antigorputzarekin berdez ikustarazi ziren. Zelulen nukleoak ehunari kontrastea emateko DAPIrekin (urdinez) tindatu ziren. Argazkiak ateratzeko Olympus FV500 Fluoview mikroskopia konfokala erabili zen eta handipen askotako argazkiak atera ziren xyz planoetan, sekzio guztia ateratzeko (40 μ m gutxi gorabehera), eta gero 3D argazki bakarrean pilatu ziren.

DLK1 eta DLK2 proteinen kantitatea handitzeko behin behineko transfekzioak egindako HSG zelulak bi egunez mantendu ziren. Jarraian untxiko Hes1 aurkako (ab71559, Abcam 1:200 diluzioan) antigorputzarekin markaketa egin zen, lehen deskribatu dugun moduan. Bigarren antigorputza Alexa Fluor 594 ahuntz untxi-aurkako IgG (A11012, Invitrogene) izan zen, eta DAPIa erabili genuen nukleoak koloreztatzeko. Argazkiak Zeiss Axioskop epifluoreszentziako mikroskopia batekin atera ziren, Nikon NIS-Elements softwerarekin dabilena. Inmunomarkaketaren dentsitatearen kuantifikazio erlatiboa egiteko Image J software erabili zen, beti zelulen azalerarekiko normalizazioa egiten eta esperimntua hiru aldiz egin eta kuantifikatu zen.

3.6 TRANSMISIOZKO ELECTROI MIKROSKOPIA (TEM)

TEMerako laginak % 2glutaraldeidoan kakodilato indargetzailerean 0.1 M (pH 7.4) fixatzen dira gau osoan zehar. Laginak garbitzeko kakodilato /sakarosa indargetzaileretik bi aldiz pasatu ziren eta gero post.finkapen bat osmio tetrosidoan %1. Ostein laginak berriro garbitzen ziren eta etanoletan %30 tik %100ra deshidratatzen ziren. Gero propileno oxidotik pasatzen ziren eta azkenik Epon Polarbed erretxina barruan murgildu ziren.

Lagina erretxina barruan zegoenean sekzio ultrafinak egin ziren (70 nm) eta kobrezko 150 lauki-sare batzuen gainean jartzen ziren, post tindaketa bat egiteko uranilo azetatoarekin eta berun zitratoarekin. Lagin hauek Philips EM208S transmisio elektroniko mikroskopioan begiratu ziren eta argazki digitalak Olympus SIS Morada digital kamerarekin atera ziren.

3.7 ZELULEN HAZKUNDEA

Proiektu honetarako HSG gizakien listu-guruin hodian adenokartzinoma lerro zelularra erabili da (Shirasuna K, 1981). Zelulak 25 pasearekin hazi egin ziren DMEM-F12 (Gibco) medioan, 10% fetu behi serumarekin (Biochrom) eta 10 µg/ml penizilina/estreptomizinarekin (Sigma).

3.8 LUZIFERASA ENTSEGUA

NOTCH hartzailearen transkripzio aktibitatea neurtzeko luciferasa entsegua erabili zen HSG zeluletan. Zelulak pGLucWT plasmidoarekin transfektatu ziren, plasmido honek luciferasa genea adierazten du promotore espezifiko baten kontrolpean, promotore hau CSL/ RBP-Jk/CBF-1 loturarako lau kopia ditu (Baladrón *et al.*, 2005). CSL/ RBP-Jk/CBF-1 N1ICDrekin lotzen da, NOTCH hartzailearen forma aktiboa.

Gure datuak normalizatzeko, zelulak pRLTK (renilla expresion plasmid, Promega, Madison, WI, USA) plasmidoekin ere transfektatu ziren. Kontrol positibo moduan HSG zelulak pGLucWT eta pN1ICD-2500 (N1ICD proteina aktiboa espresatzen duena) plasmidoekin aldi berean transfektatu ziren, edo pGLucWT plasmidoa eta pLNCX2-myc (hutsik dagoen bektorea).

Transfekzioaren efizientzia neurtzeko pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, California) erabili genuen, plasmido hau proteina fluoreszente berdea kodifikatzen du. Behin-behineko transfekzioak 50% zelulen konfluentzian egin ziren eta 0.75-1 µg plasmido ezberdinekin Superfect agentea erabiliz (Qiagen INC., Hilden, Germany) ekoizlearen gomendioak jarraituz.

DLK1ek edo DLK2k NOTCH aktibazioan daukaten efektua aztertzeko HSG zelulak transfektatu ziren aldi berean pGlucWT plasmidoarekin eta HDLK1S eta/edo HDLK2S adierazpen plasmidoekin. Gainera, zelulak DAPT 10 µM ere tratatu ziren. HDLK1S plasmidoa gizakiaren DLK1en cDNA osoa darama, HDLK1-AG1 (Lee *et al.*, 1995) plasmidotik aterata. HDLK1-AG1 plasmidoa *HindIII-NotI* erretrikzio entzimarekin moztu zen eta lorturiko cDNA pLNCX2 adierazpen bektorean klonatu zen (Clontech, Palo Alto, CA, USA). HDLK2S plasmidoa gizakien *DLK2* cDNA osoa darama (MGC Full-Length clone IMAGE ID 54954558). *HDLK2* cDNA MGC klonarena *HindIII-NotI* erretrikzio entzimarekin ebaki zen eta jarraian pLNCX plasmidoan klonatu zen *HindIII-NotI* erretrikzio lekuetan.

Transfektaturiko HSG zelulak 37°C eta 5% CO₂ medio osoan hazi ziren. 24-48 transfekzio ordu ostean zelulak lisatu ziren eta Luciferase Kit (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega, Madison, WI, USA) erabiltzeko prozesua jarraitu zen. Kit honek luciferasa entzimaren substratua dauka, entzima honen kopia gehiago dituen lisatuak proportzionalki produktu koloreztatu baten seinale gehiago emango dute, aldiz kontrola renilla daramana ez du seinalerik emango, substratua katalizatzeke ahalera ez daukalako, honela transfekzioaren zarata kentzen da. Esperimentua behintzat hiru aldiz errepikatu zen.

Beste esperimentu batean, azpikonfluentzian zeuden giza HSG zelulei behin-behineko transfekzioak egin genizkien Trans LT1 (Mirus) agentearekin. DLK1S, DLK2S eta PCLNX2 (hutsik dagan bektorea, kontrol moduan) plasmidoak transfektatu ziren. HSG zelulak bi egunez mantendu ziren hazkunderan DLK1 eta DLK2ren proteinen mailak handitzeko eta gero itu geneen erregulazioak aztertzeko.

3.9 POLIMERASAREN ERREAKZIO KATEATU KUANTITATIBOA

Teknika honek ehun espezifiko batek edo zelula talde batek ekoizten duten mRNA kantitatea neurtzea du helburu. Enbrioi listu-guruinen edo epitelio errudimentuen RNA Ambion miniKiT (Cat nº.AM1931) kitarekin atera zen. Ehuna handiagoa zenean berriz, erauzketa RNeasy kit Qiagen (Cat nº.74104) kitarekin egiten zen. RNA ateratzeko kit biek oinarri berbera daukate, fenola eta guanidinazko tiocianatoa erabiltzen dute zelulak apurtzeko eta RNAsak inhibitzeko. Gero, silizez egindako zutabez osatutako sistema bat erabiltzen dute, non RNAk zutabeen hormetan atxikitutak geratzen diren. Jarraian zutabeak garbitzen dira eta azkenik likido berezi batekin RNA eluitzen da. RNAren kantitatea eta kalitatea (260/280 ratioa 2 inguru) neurtzen dira (Synergy HT, Bioteq). RNA -80°Ctan gordetzen da.

Polimerasaren erreakzio kateatuak RNA erabiltzen du molde moduan eta tanskriptasa rebertsoa erabiltzen du cDNA (complementary DNA) egiteko (entzimaren eraginkortasua %100 dela suposatzen da).

Erreakzio hau egiteko iScripts™ cDNA Synthesis kit (BioRad) erabili genuen, beti bezala, ekoizlearen gomendioak jarraitzen. cDNA ekoizteko honako erreaktinoak jartzen genituen elkarrekin: RNAko 1 µg, 5x iScripts Reaction Mix (Bio-Rad, 170-8890) 4 µl eta iScripts Reverse Transcriptase 1 µl, eta DEPC ur kantitate bat, erreakziorako bolumen totala 20 µl eduki arte. Erreakzioaren pausuak hauek ziren, hasiera 25°C 5 minutuz, sintesia 32°C 30 minutuz, eta azkenik elongazioa 85°C 5 minutuz. cDNA -20°Ctan gorde zen.

Polimesararen erreakzio kateatu kuantitatiboa (qPCRa) iCycler MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System (BioRad) ekipoa egin zen. Erreakzioa emateko elkarrekin jartzen genituen, 5 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life technologies, 4367659), entzima eta nukleotido fluoreszenteak daramana, 6,25 µM (Isogen) kontzentrazioan dauden hasleen 0.5 µl bakoitzeko eta azkenik 2ng/µl kontzentrazioko cDNAren 5 µl uran disolbaturik. Gene bakoitza hirunaka aztertzen da, 96 putzuetako plaketan eta plastikozko estalki itsasgarri batekin. Erreakziorako pausuak: hasteko

entzimaren berotze pausua 95°C 10 minutuz, jarraian 45 ziklo 95°C 30 segundo DNAREN desnaturalizazioarako, 51-61°C 30 segundo hasle bakoitzaren arabera eta 75°C hasleak itsasteko eta elongazioa egiteko. Azkenik, temperaturaren aldapa bat egiten du 65°C eta 95°C bitartean 60 ziklotan eta 0, 5°C handitzen doa ziklo bakoitzean. qPCRaren produktuak 4°Ctan gordetzen dira.

Makinak emandako datuak, Ct baloreak deritzonak, gene erreferentzia baten baloreekin normalizatzen dira, Δ Ct baloreak emanez. Jarraian baldintza ezberdinak alderatzen dira, $\Delta\Delta$ Ct eskuratuz, eta logaritmikoetara eraldatzen dira; lortzen den azken baloreari "Fold change" deritzogu, hots, gene interesgarri bat kontrolarekiko zenbat aldiz aldatzen den (Schmittgen TD & Livak KJ, 2008). Konparaturiko kondizioak estatistikoki esanguratsutzat ematen dira 95%ko konfidantze-tartearekin.

Erabilitako hasleak hauek izan ziren:

Ck14 Forward: 5'ACCGCCAGATCCGCACCAAG3'

Ck14 Reverse: 5'TCCTAAGCCTGAGCAGCATGTAGC3'

Ck5 Forward: 5' TCCTGTTGAACGCCGCTGAC3'

Ck5 Reverse: 5'CGGAAGGACACACTGGACTGG3'

Aqp5 Forward: 5'TCTACTTCTACTTGCTTTTCCCCTCCTC3'

Aqp5 Reverse: 5' CGATGGTCTTCTCCGCTCCTC3'

Fgf10 Forward: 5' TCTTCCTCCTCCTCGTCCTTCTCCTCCTTCC3'

Fgf10 Reverse: 5' CCGCTGACCTTGCCGTTCTTCTCAATCG3'

Dlk2 Forward: 5'GGCCAGTGTGTATGACGG3',

Dlk2 Reverse: 5'CGGCATGTGAAGTTGAGGG3'

Gapdh Forward: 5'ACGGCACAGTCAAGGCCGAG3',

Gapdh Reverse: 5'CACCCTTCAAGTGGGCCCG3'

3.10 WESTERN BLOTA

E13 enbrioien SMGak isolatu eta 48 orduz hazi ziren sDLK1 2.5 µg/ml presentzian edo absentsian, kontrol moduan. Laginak jaso ziren PBSan garbitu eta zentrifugatu ziren. Laginen proteinak ateratzeko RIPA indargetzailera erabili zen (80 mM Tris-HCl [pH 8], 150 mM NaCl, %0.5 sodium deoxycholate, %1 Nonidet P-40 [NP-40], %0.1 SDS). RIPAekin nahastean izotzean mantendu zen lagina 15 minutuz eta gero zentrifugatu. Gain-jalkineko proteinak bizinkoniko azidoaren teknikarekin kuantifikatu ziren. Western-blota egiteko proteina hauen 40 mg jarri ziren SDS-polyacrylamide gelaren lerro bakoitzean, elektroforesia egin, eta gero Nitrocellulose Transfer Membrane (WHATMAN) mintzetan electroblota egin genuen.

Proteinak ikusteko antigorputz espezifikoekin markaketa bat egin genuen. Lehengoz mintzak blokeatu ziren %5ko lehorturiko esne ez gantzatuarekin, Tween 20 %0.1an PBSan ordu betez. Gero mintzak garbitu ziren %10 TBS (145 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.4]) bufferarekin eta 4°C antigorputzekin inkubatu ziren gau osoan zehar. Aztertu nahi genuen proteina ikusteko untxiko N1ICD aurkako antigorputza (ab 8925, Abcam, 1:500 dilution) erabili genuen eta kontrol edo erreferentzia moduan saguaren α-tubulin aurkako antigorputz monoklonala (T5168 Sigma- Aldrich, 1:4.000). Antigeno-antigorputzen konplexuen detekzioa, bigarren antigorputz batekin egin zen, untxiaren kontra doan ahuntzeko IgG-H&L poliklonala (HRP daramana) (ab6721, Abcam 1:3.000 dilution) edo saguaren kontra doan ahuntzaren IgG-H&L poliklonala (HRP daramana) (ab97046, Abcam 1:3.000 dilution). Markaturiko bandak kimioluminizentziaz (ECL) (GE Healthcare) ikustarazi ziren, ekoizlearen gomendioak jarraituz.

3.11 LISTUAREN NEURKETA

Dlk1(-/-) eta *Dlk1(+/+)* ar eta eme saguak %1 isoflurano arnastearekin anesthesiatu ziren eta listuaren jariatzea estimatu zen pilocarpina (0.05 mg/100 g gorputz pisua) peritoneo barruko injekzio batekin. Polikarpinak SMGaren inerbazio parasinpatikoa kitzikatzen du, aktibitate β adrenergikoa daukan agonista muskarinikoa delako.

Jariaturiko listua saguen aho barrunbean sarturiko paperezko zatiak xurgatzen zituen. Bi minuturo paper zati hau ahotik atera eta pisatzen zen, paper lehorreko edo aurreko paper bustiaren pisu diferentzia kalkulatu zen. 20 minutu zehar gehitzen zen listua, saguaren pisuarekiko, grafiko batean irudikatu genuen.

3.12 TRATAMENDU ESTATISTIKOA

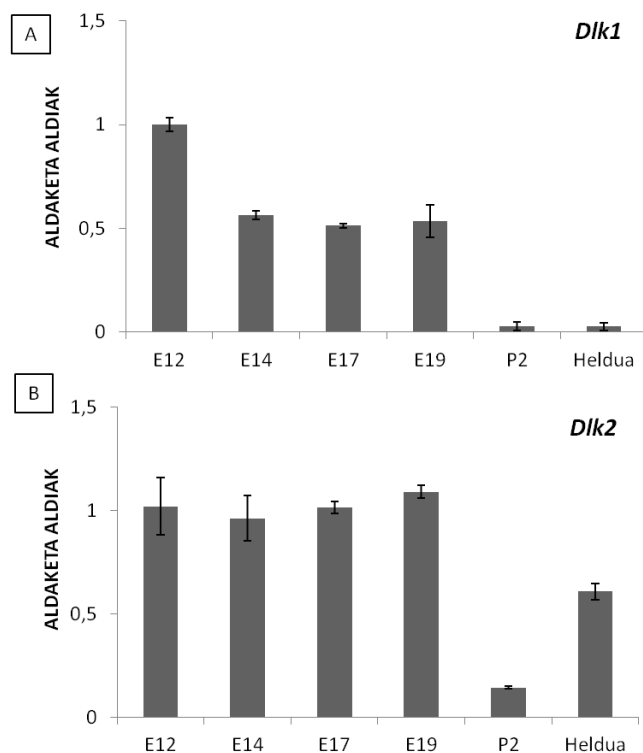
Esperimentu guztien datuak elkartu ziren eta kontrolarekiko normalizatu ziren. Tratamendu estatistikoa baino lehen, datu guztien distribuzioa normaltasun test batetik pasatu ziren. Datuak ez parametrikoki zirenean, hau da, distribuzio normal bat jarraitzen ez zutenean, taldeen arteko diferentzia estatistikoak zeuden ala ez ikusteko, Kruskal-Wallis testa erabili genuen. Aldiz, distribuzio parametrikoez, ANOVA post-hoc testarekin erabiltzen genuen. Esanguratasuna $p < 0.05$ ezarri zen. Datuak "IBM SPSS statistic 19 software" programarekin aztertu ziren. Grafikoen zutabeek \pm SEM erakusten dute.

4. EMAITZAK

4.1 DLK1, DLK2 ETA N1ICD PRESENTZIA SAGUKO LISTU-GURUIN GARAPENEAN

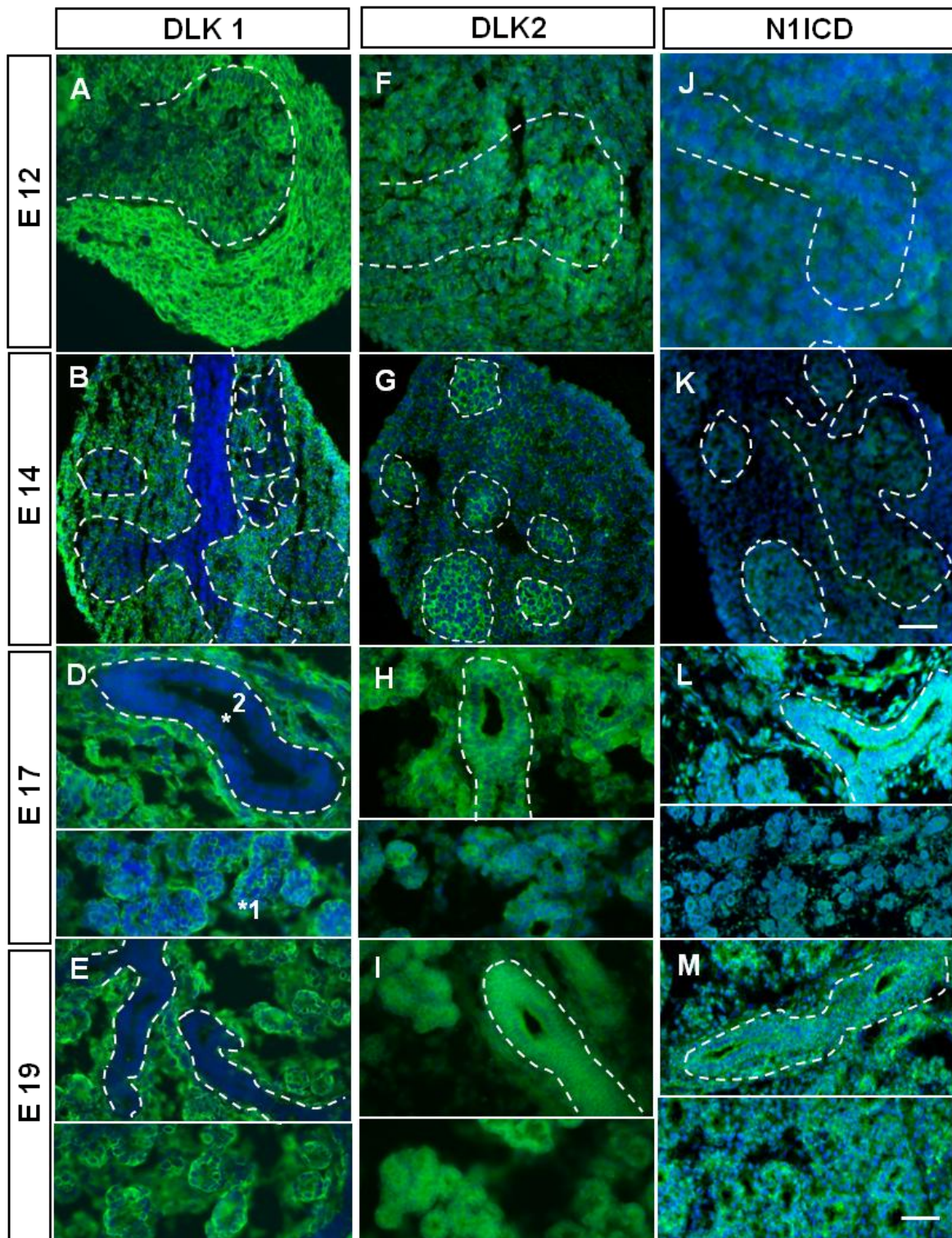
Garapeneko SMGan DLK1 eta DLK2ren rola aztertzen hasteko, lehenik, *Dlk1* eta *Dlk2*ren adierazpen mailak konparatu genituen SMGaren garapeneko garai ezberdinen eta SMG helduren artean (14.Irudia).

Esperimentu honen bitartez *Dlk1* eta *Dlk2*, garapeneko E12an (12 egunetako enbrioietan), goiz adierazten direla ikusi genuen. E12an listu-guruinaren morfogenesia hasten da eta jarraian progenitore zelulen hedapena ematen da. E14tik aurrera, E17 eta E19an *Dlk1*en adierazpen maila jaisten doa. P2an eta sagu helduaren SMGan berriz, *Dlk1* oso gutxi adierazten da. *Dlk2* maila berdinean adierazten da E12, E14, E17 eta E19 garaietan. Bestalde, P2an, SMGaren desberdintzapena ematen denean, *Dlk2*ren mailak beherantz egiten du, SMG helduetakoena baino maila baxuagoetara iritsiz.



14 Irudia. *Dlk1* eta *Dlk2*ren adierazpen mailak listu-guruinaren garapenean zehar eta listu-guruin helduan. (A) qPCRaren bidez lortutako *Dlk1*en adierazpen maila, E12ko SMGarekiko normalizatuak. (B) qPCRaren bidez lortutako *Dlk2*en adierazpen maila, E12ko SMGarekiko normalizatuak.

Jarraitzeko, gerapeneko listu-guruinaren epitelio eta mesenkimako DLK1 eta DLK2 eta N1ICDren distribuzioa konparatu genituen. Horretarako 12 eta 19 egun arteko enbrioien SMGren sekzioak erabili genituen (E12-E19) (15.Irudia.A-I). DLK1 eta DLK2ren adierazpena konparatzean oso patroiz ezberdina azaldu zuten.



15.irudia. DLK1, DLK2 eta N1ICDren adierazpen patroia listu-guruinaren garapenean zehar. E12 egunetako sagu enbrioien SMGak kimu garaian daude eta positiboak dira DLK1 (A), DLK2 (F) eta N1ICD1entzat (J-M). E14ko SMGak, sasiguruindar eta kanalikular garai artekoak, DLK1 eta DLK2rentzako adierazpen ezberdina (B, mesenkiman ageri da gehienbat) (G, epitelioan ageri da gehienbat); (J,K) N1ICD1ren adierazpena E12-14 garapen egunetan; (A, B, F, G, J, K) Eskala barra: 150µm. Kimu terminaleko garaian, E17tik E19ra, patroia hau mantentzen da. Azinoetako eta hodietako epitelioa negatiboa izanik DLK1entzat (D, E), baina positiboa DLK2 (H, I) eta N1ICD1 entzat (L, M) Eskala-barra: 50µm.

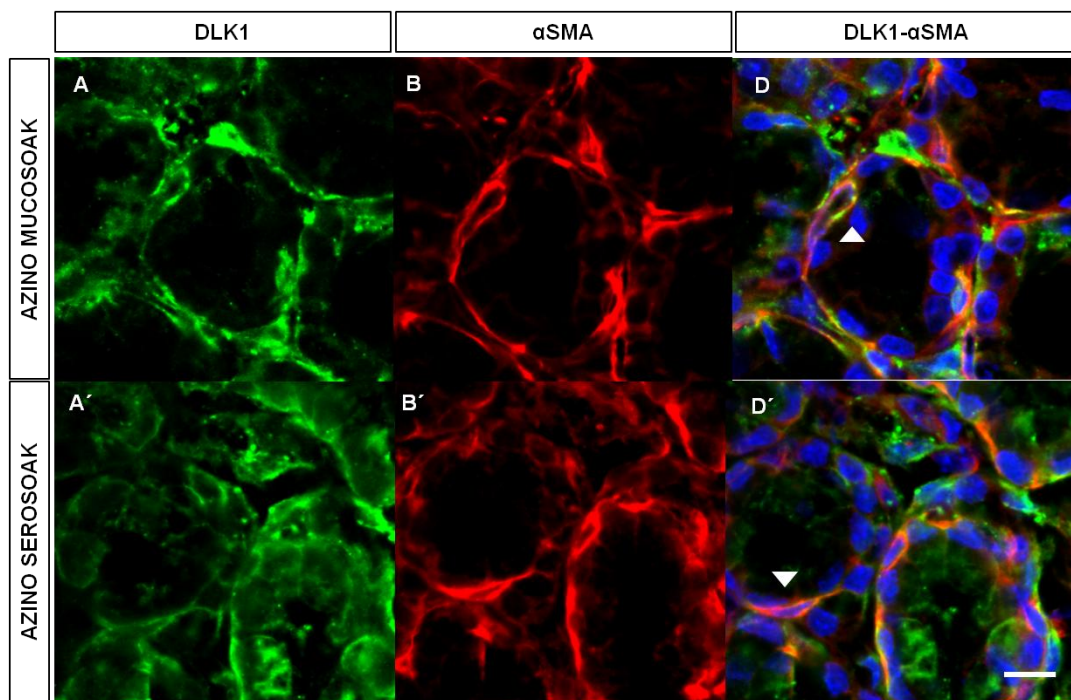
SMGak kimu garaian (E12) oso gogor markatzen dira DLK1entzako, bereziki mesenkima aldean antzematen delarik. Kimu ertzetako zelula epitelialak ere markatu ziren DLK1entzako, era ahulagoan bazen ere. DLK2 aldiz, lausotuago markaturik ageri zen epitelioan zein mesenkiman.

Alde batetik, garai sasiguruindarrean (E14), DLK1en adierazpena altua zen ezberdindu gabeko mesenkimako zeluletan eta kimuen ertzetako zelula epitelialetan. Hodietako zelula epitelialetan ordea adierazpena negatiboa zen. Beste aldetik, DLK2ren adierazpen garrantzitsua ageri zen epitelioan, mesenkiman oso seinale ahula ikusi zen bitartean.

E17an (garai kanalikularrean), DLK1en adierazpena mesenkiman, azinoen ertzetako zeluletan eta zelula mioepitelialetan ageri zen., aldiz, Hodien argiak aldiz, guztiz negatiboak ziren DLK1entzat.

DLK1en markaketa zelula mioepitelialetan egiaztatzeko, markaketa bikoitza egin genuen DLK1en aurka eta gihar leuneko aktinaren (α SMA) aurka, zelula mioepitelialak bereziki markatzen dituen proteina. Inmunomarkaketarekin DLK1 eta α SMAren arteko kolokalizazioa aurkitu genuen azino serosoak eta mukosoak inguratzen dituzten zeluletan, eta zelula mioepitelial bezala identifikatu genituen α SMArekin markatutako izar itxurako zelulak (16.Irudia). DLK2ren seinalea E17ko SMGko hodietako zeluletan kantitate handian ageri zen, azinoetako zeluletan gutxiago markatu zen bitartean.

Kimu terminalaren garaian (E19), DLK1 mesenkiman markatzen zen eta oso argi ageri zen azinoak inguratzen dituzten zeluletan. Azinoen barruko zeluletan berriz, ahulago ageri zen. DLK2ri dagokionez, azinoetako eta hodietako zeluletan azaldu zen, E17an erakusten den patroi antzekoa jarraituz.



16.Irudia. E17 SMGetako DLK1 eta α SMAren immunomarkaketa. (A, A') DLK1en adierazpena (berdez) azino seroso eta mukosoentzat positiboa da. (B, B') α SMA markaketa (gorriz) eta (D, D') bi markatzaileentzako elkartutako irudiek kolokalizazio seinalea aurkezten dute (geziak), zelula mioepitelialean DLK1en markaketa islatuz. Eskala-barra: 20 μ m.

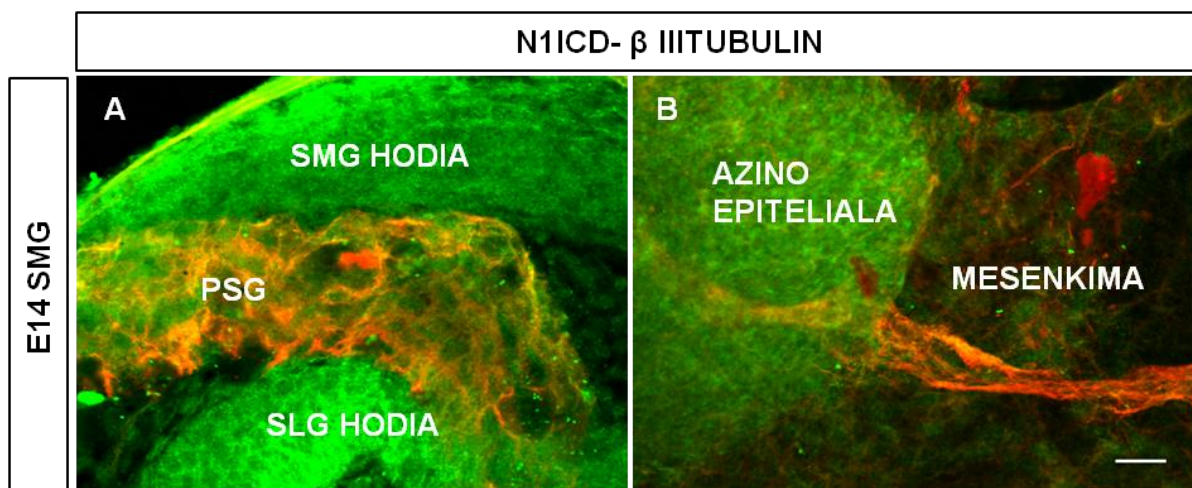
Laburbilduz, DLK1 eta DLK2k guztiz kontrako adierazpen patroia azaltzen dute garapeneko listu-guruin garai ezberdinetan zehar: DLK1 epitelioan oso gutxi espresatzen zen bitartean, DLK2k oso adierazpen altua zeukan ehun horretan. Aldi berean, listu-guruinetako mesenkimak DLK1en adierazpen positiboa erakutsi zuen, DLK2ren adierazpena txikiagoa zen bitartean. DLK1 eta DLK2ren alderantzizko adierazpen korrelazio hau beste zelula mota batzuetan ere ikusi da (Nueda *et al.* 2007b). Dena den, garrantzitsua da esatea DLK1 eta DLK2rentzako erabili ditugun antigorputz hauek zelula barneko epitopoak ezagutzen dituztela. Ezaguna da DLK1ek luzera osoko proteinean zatiketa bat jasan dezakeela eta ondorioz aldaera solubagarri batean aurki daitekeela (Wang, Y. *et al.*, 2006; Mei, B. *et al.*, 2002). Oraindik ez dakigu DLK2k ere prozesu proteolitiko hau jasan dezakeen.

DLK1 eta DLK2ren adierazpen patroiak NOTCH seinalizazio bidearen aktibazioarekin konparatu genituen, NOTCH1en barneko domeinu (N1ICD) zatiaren aurkako immunomarkaketaren bidez. N1ICD, NOTCH1en hartzaile aktibatua da, hartzailearen mozketaren bidez sortzen den barneko azpiunitatea eta transkripzioan parte hartzeko garrantzitsua den zatia da.

Ondorioz, NOTCH1 hartzaile aktiboak dituzten zelulek N1ICD maila altuagoak erakusten dituzte immunomarkaketarekin. E17tik E19rako SMGetan N1ICDren markaketa maila handia detektatu zen hodietako eta azinoetako zelulen nukleoetan zein zitoplasmetan (15.Irudia.L-M). SMGetan aztertutako garapeneko beste garaietan, N1ICDren markaketek antzeko intentsitateak aurkeztu zituzten, mesenkimako eta epitelioko zeluletan.

PSGko neuronetan NOTCH seinale bidea aktibatua dagoen behatzeko, markaketa bikoitza egin genuen β III tubulina eta N1ICD proteinen aurka. Markaketa honen emaitza gangoil parasinpatikoan bi proteina hauen kolokalizazioa izan zen, nahiz eta N1ICDren markaketa PSGaren alboan zegoen jariapen-hodiarena baino ahulagoa izan (17. Irudia).

Emitza hauek kontuan izanda, NOTCH1en seinalizazio bidea aktibatuta dagoela esan dezakegu bai SMGaren azinoetako bai hodietako epitelioan eta baita PSGan ere. Ondorioz, seinalizazio honek funtzio garrantzitsua izan dezake SMGaren garapenaren erregulazioan.

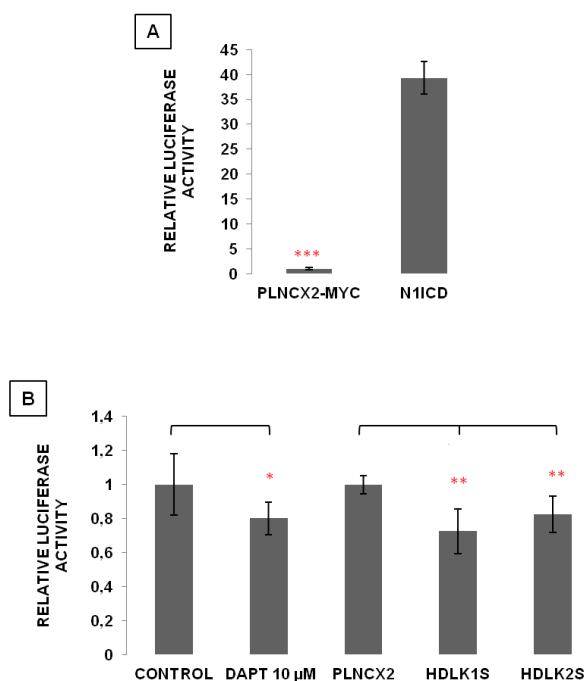


17. Irudia. NOTCH seinale bidea PSGan. E14 SMGen konfokaleko immunofluoreszentzia irudiak, elkartutako markaketa aurkezten, N1ICD berdez eta β -III tubulin (PSG neuronen markatzailea) gorriz. Bai PSGa (A) bai azinoak inerbatzen dituzten axoiak (B) ori-laranjaz ageri dira, bi markatzaile hauen kolokalizazioa frogatuz. SMGaren eta SLGaren hodi nagusiak ere N1ICDrentzat markatzen dira. Eskala-barra: 20 μ m.

4.2 DLK1ek eta DLK2k NOTCH1 SEINALIZAZIO BIDEA INHIBITZEN DUTE LISTU-GURUIN EPITELIOKO JATORRIZKO HSG ZELULETAN

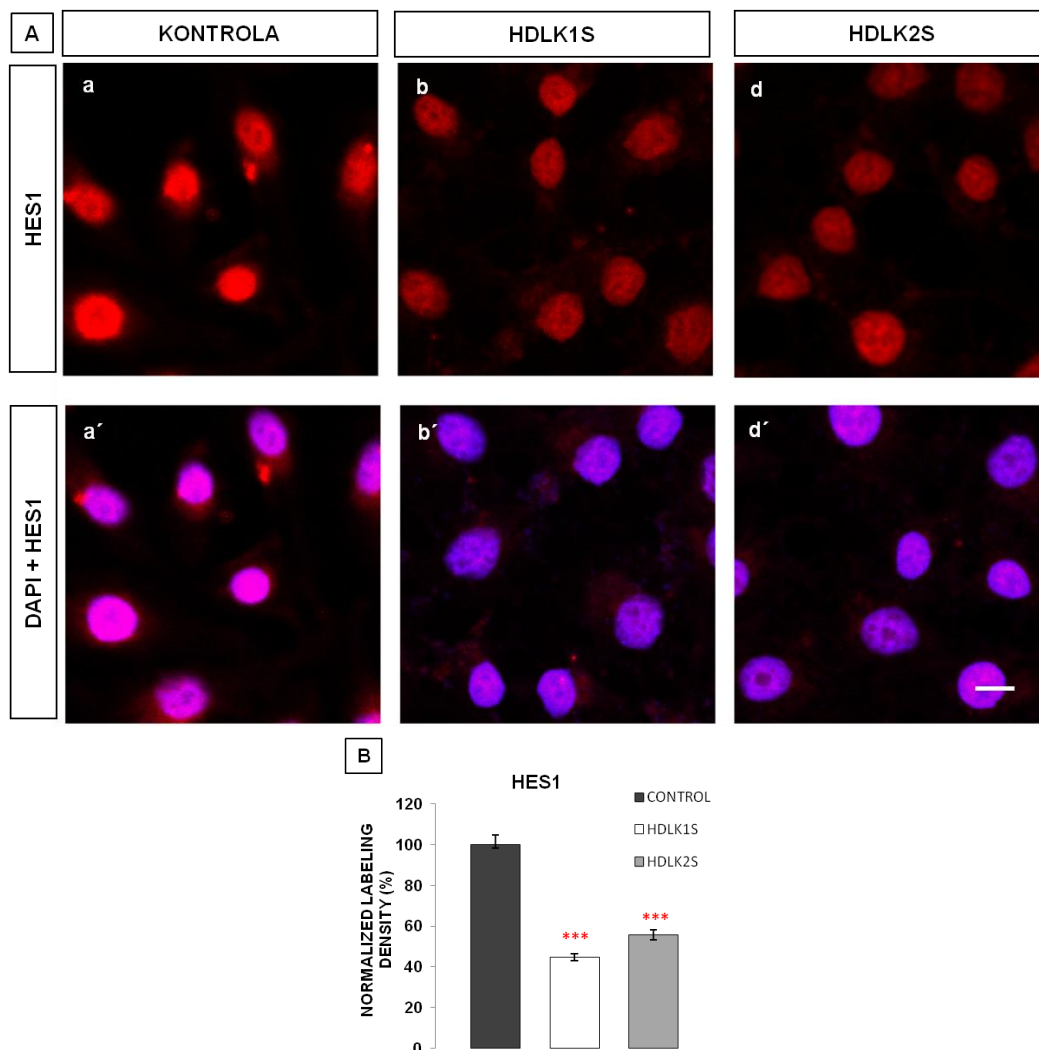
Preadipozitoetan eta zelula mesenkimaletan, DLK1ek eta DLK2k NOTCH seinalizazio bidearen lotugai inhibitzaile moduan jarduten dute (Sánchez-Solana *et al.*, 2011, Nueda *et al.*, 2007a). DLK1 eta DLK2k SMGan NOTCH seinalizazio bidea erregulatzeko ahalmenik ba al zuten aztertzeko, gizakien listu-guruinetako lerro zelular epiteliala (HSG) erabili genuen. HSGei luziferasa entsegua egin genien, NOTCH seinalizazioaren aktibitate transkripzionala neurtzen duen teknika, alegia.

DLK1 eta DLK2k NOTCH hartzailearen transkripzio aktibazioarekin zerikusia duten aztertzeko, listu-guruineko HSG lerro zelularra, pGLucWT/pRLT eta HDLK1S edo HDLK2S adierazpen plasmidoekin transfektatu genituen aldi berean. HDLK1S edo HDLK2S plasmidoekin transfektatzean luziferasa aktibitatearen jaitsiera esanguratsua ikusi genuen (18.Irudia.B), DLK1 eta DLK2 HSG zelulen NOTCH1en lotugai ez-kanoniko inhibitzaileak direla iradokiz, beste zelula mota batzuentzat deskribatu den bezala (Baladrón *et al.*, 2005; Nueda *et al.*, 2007b; Sánchez-Solana *et al.*, 2011). HSG zelulek luziferasa aktibitatearen jaitsiera bat aurkeztu zuten 10 μ M DAPTrekin trataturik izatean, transfektatuak izan ez ziren zelulen antzeko luziferasa aktibitate maila erakutsiz.



18.Irudia. DLK1 eta DLK2k, NOTCH1 hartzaile endogenoan erangindako seinalizazioa inhibitzen dute. (A, B) Luziferasa/NOTCH aktibitatearen neurketa. (A) HSG zelulak pGLucWT/pRLT plasmidoarekin transfektatu ziren eta N1ICD adierazpen plasmidoarekin, kontrol positibo moduan. (B) HSG zelulak pLPCX2 (kontrol moduan), HDLK1, HDLK2 adierazpen plasmidoen transfekzioen edo 10 μ M DAPTrekin tratamenduentzat luziferasa aktibitatea. Hiru esperimentu independenteen bataz-bestekoa \pm errorea. Bariantzaren analisia (ANOVA) post hoc Tukey testarekin * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Emitza hauek berresteko, HSG zelulak gizakien DLK1S eta DLK2S adierazpen plasmidoekin behin-behinez transfektatu ziren. 24 orduren buruan HES1, seinalizazioaren gene ituaren, aurkako immunomarkaketaz NOTCH seinalizazio bidearen inhibizioa aztertu zen. Nukleoko HES1en seinalearen jaitsiera esanguratsua ikusi zen, HDLK1S eta HDLK2Sen transfekzioen seinale bidean funtzio inhibitzailea berretsiz (19. Irudia)



19.Irudia. DLK1 eta DLK2k NOTCH seinalizarioaren HES1 gene ituaren adierazpena murrizten du HSG zeluletan. (A) HES1en aurkako immunomarkaketa, HSG zeluletan, gizakien DLK1 edo DLK2 adierazpen plasmidoen behin-behineko tranfekzio ostean. (a) HSG zelulen kontrola (hutsik zegoen bektorearekin transfektatuta). HES1en kokapena nuklearra da gehien bat. (b, d, b', d') HSG zelulak behinik-behin transfektatuak (HDLK1S edo HDLK2S plasmidoekin) eta bi egunen ostean HES1entzat. Nukleoko DAPIrekin immunomarkatuak. Eskala barra: 50 μ m. (B) HSG zelulak HDLK1S edo HDLK2S plasmidoekin transfektatu ostean eta hutsik dagoen plasmidoarekin transfektatutako zelulekin konparatu ostean, HES1en nukleoko floreszentziaren batz besteko kuantifikazioaren grafikoa. Hiru esperimendu independenteen batz-bestekoa \pm errorea. Bariantzaren analisia (ANOVA) post hoc Tukey testarekin***p \leq 0.001.

4.3 NOTCH SEINALIZAZIOAREN INHIBIZIOA SMG.EN ADARKATZE MORFOGENESIA ETA INERBAZIOA MURRIZTEN DITU

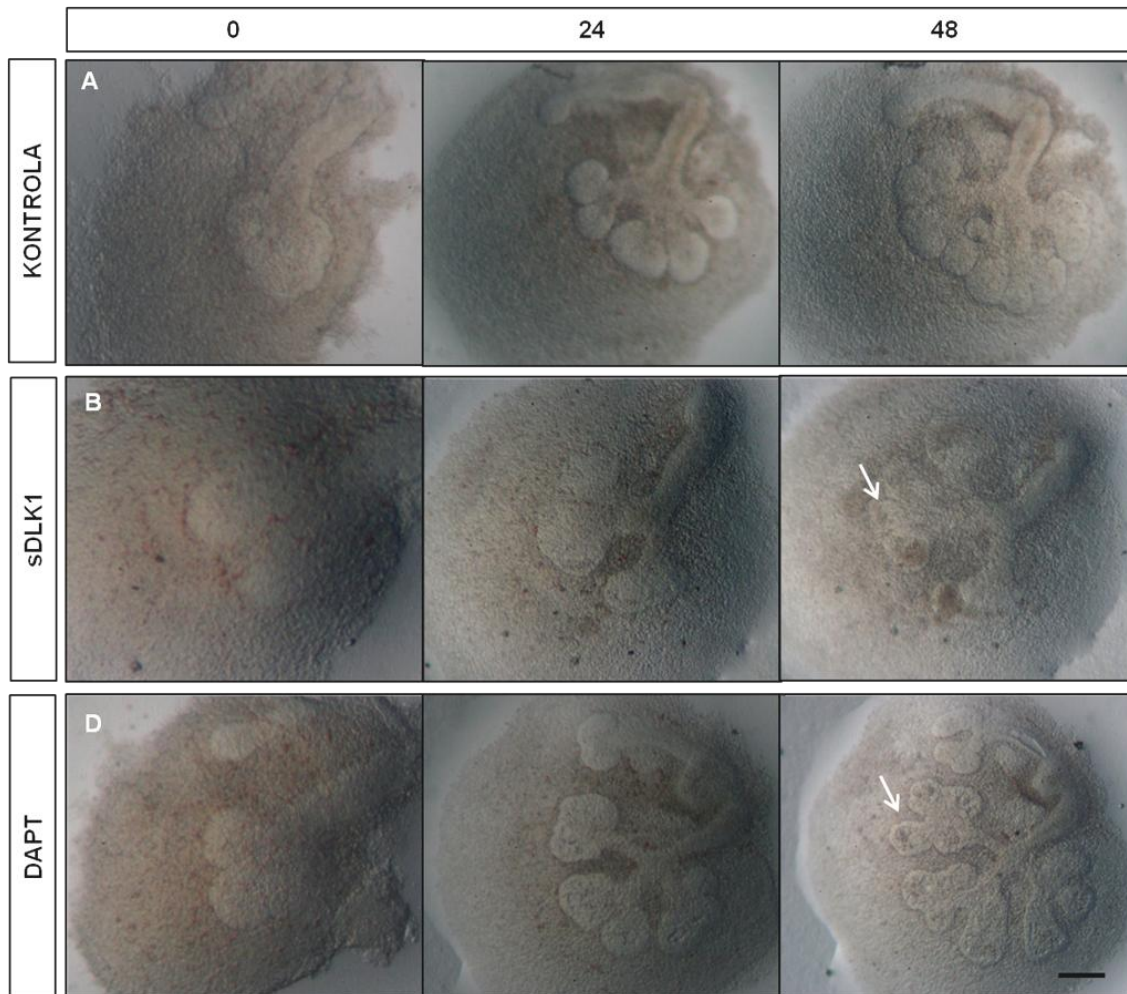
Aurrez aurkeztutako ikerkuntzek, gamma-sekretasaren inhibitzaileekin (DAPT, adibidez) NOTCH seinalizazioaren indargabetzeak, HSG zelulen desberdintzapen markatzaileak inhibitzen zituztela erakutsi zuten (Dang *et al.*, 2009). Lan honek, listu-guruineko hazkuntzarako eta desberdintzapenerako NOTCH seinalizazioak izan zezakeen garrantzia iradoki zuen.

NOTCH seinalizazio bidearen oztopatzeak SMGaren garapenean eta adarkatze morfogenesian ondorioak izan zitzaizkeen. Aztertzeak, E13ko SMGak 2.5µg/ml sDLK1 edo 20µM DAPTren presentzian edo absentsian hazi ziren bi egunez (48 ordu) (20.Irudia).

Hasteko, sDLK1ek SMGetako hazkundeetan NOTCH seinalizazioa inhibitzeko gaitasuna zuela egiaztatzeak, N1ICDren aurkako immunofluoreszentzia eta immunoblota egin genuen. sDLK1en presentzian N1ICDren seinalea immunofluoreszentzian eta western-bloteko bandan gutxitzen zela ikusi genuen (21.Irudia.K). Beraz, HSG zelulekin ikusitako emaitzen antzera, sDLK1en presentzian hazitako SMGak NOTCH1 seinalizazioa inhibitzen zuten (21.Irudia.A,B).

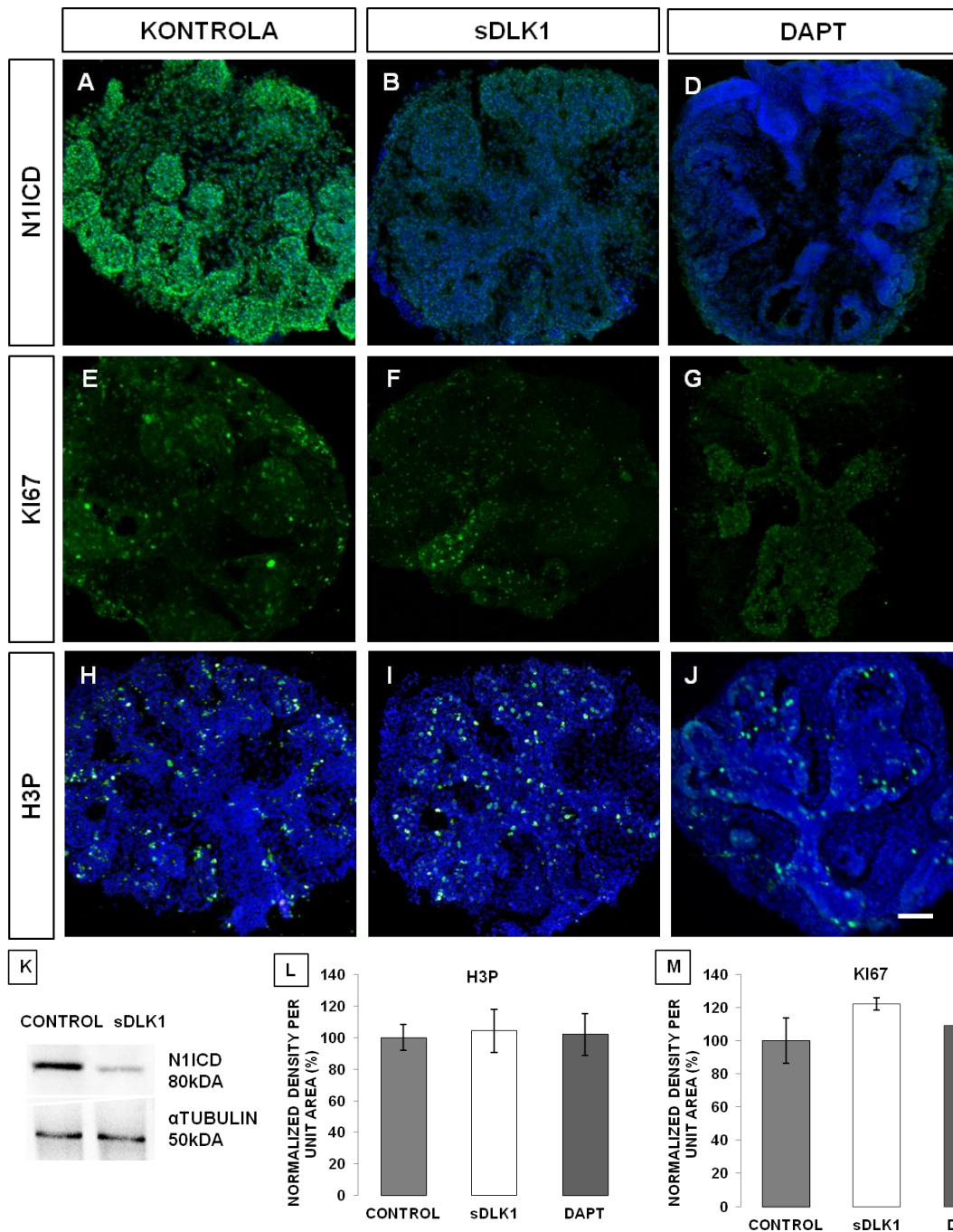
Gure hurrengo helburua NOTCH1ren aktibitatea gutxitzeak SMGaren garapenean eta morfogenesian ondoriak eduki zitzaizkeen aztertzea izan zen. Horretarako, hazitako listu-guruin bakoitzari denboran zehar sortutako azinoak zenbatu genizkion eta horrela "spooner ratio" deituriko portzentaiak kalkulatu genituen 0, 24 eta 48 orduetarako.

sDLK1ekin eta DAPTekin, NOTCH seinalizazioa inhibitzean, SMGen adarkatze morfogenesian murrizketa bat ikusi genuen kontrolarekiko konparatuz (26. Irudia.B,D). Adarkatze efektua nabarmenagoa zen 48 hazkunde orduren ostean. Garapeneko azinoek morfologia ezohikoa ageri zuten. Gainera, azinoen barruko aldeek zati ilunak zituzten mikroskopioaz begiratzean (20.Irudia. geziak). NOTCH inhibituta zeukaten SMGen azinoak zabalagoak ziren, epitelioaren arrakalen sorrera kaltetuta egongo balitz bezala, adarkatzea murriztuta zegoelaren seinalea izanik.



20. Irudia. SMGetan NOTCH seinalizazioaren inhibizioak, adarkatze morfogenesia murrizten eta morfologia ezohizkoa sortzen du. (A) E13 SMG kontrola 0 orduetan, morfologia naturala eta normala adierazpide, kimu bakarra adarkatuz doa, kimuen kopurua handituz esponentzialki *in vitro* 24 eta 48 orduetan. (B) 2.5 µg/ml sDLK1ekin hazitako SMGak adarkatze murriztua dute eta kimuak zabalagoak dira (geziak) 48 hazkunde orduren ostean. (D) 20 µM DAPTrekin hazitako SMGek sDLK1ekin hazitakoek ezohizko morfologia antzekoa dute. Geziek zabaldu diren azinoak seinalatzen dituzte. Eskala-barra: 150µm.

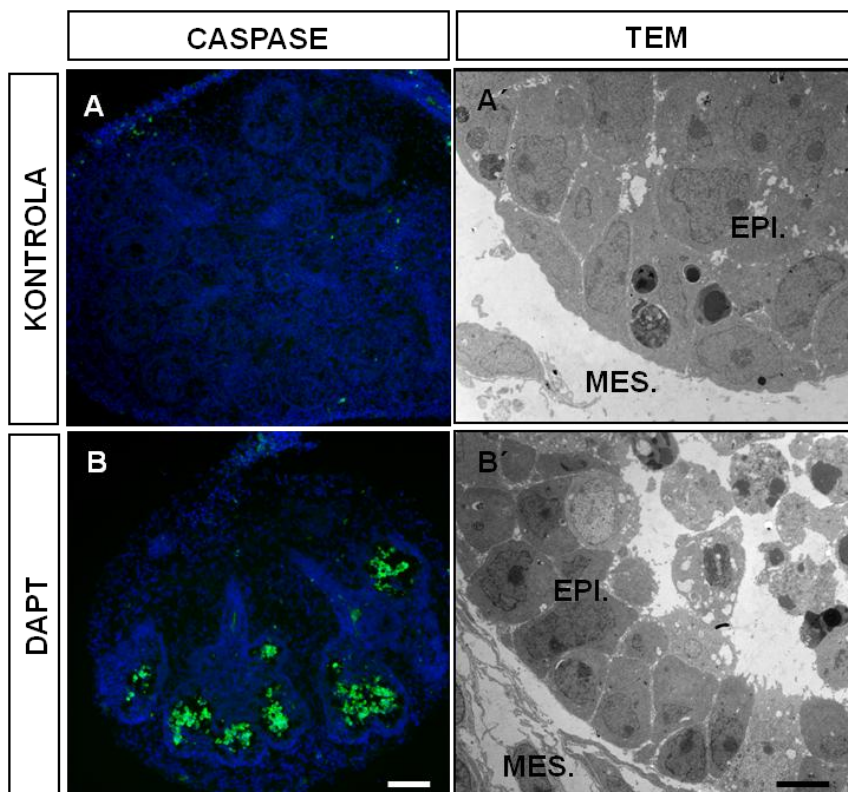
Adarkatze morfogenesiaren murrizketaren zergatia aztertzeko, zelulen proliferazioa analizatu genuen. sDLK1en eta DAPTren presentzian 48 orduz hazitako SMGetan eta SMG kontroletan. Funtzio hau neurtzeko ziklo zelularreko Ki67 markatzailea eta mitosi faseko Histona3-fosfato (H3P) markatzaileak erabili genituen. Interesgarria iruditu zitzaigun, bai sDLK1ekin bai DAPTrekin hazitako SMGek kontrol SMGek aurkeztutako proliferazio tasa berdina azaldu zutela (21.Irudia.F,G,I,J). Neurtutako markatzaileek ez zuten diferentzia esanguratsurik aurkeztu, ez Ki67⁺ ezta H3P⁺k ere. sDLK1 zein DAPTrekin inhibituriko NOTCH seinale bideak, proliferazioan ez zuela efekturik iradoki zuen.



21.Irudia.DLK1ek eragindako NOTCH seinalizazioaren inhibizioak ez du eraginik SMGetako zelulen proliferazioan. (A) 48 orduz hazitako E13ko SMGa kontrolen N1ICDren aurka markaketa (nukleoak DAPIrekin kontrastazeko) NOTCH1en aktibitatea ebaluatzeko. (B, D) 2.5 μ g/ml sDLK1ekin eta 20 μ M DAPTekin 48 orduz trataturiko E13ko SMGek, N1ICDren aurkako markaketak seinale gutxiago aurkeztu zuten. (E) ki67ren aurka markatutako 48 orduz hazitako E13ko SMGa kontrolak. (F, G) 48 orduz sDLK1ekin eta DAPTekin trataturiko E13ko SMGak, zelula Ki67+ kontrolarekiko antzerako emaitzak erakutsi zituzten. (H) H3P aurka markatutako 48 orduz hazitako E13ko SMG kontrolak. sDLK1ekin (I) eta DAPTekin (J) trataturiko E13ko SMGak, SMG kontrolak zuen zelula H3P+ kantitate berdina aurkeztu zuten. Eskala-barra: 150 μ m. (L, M) Ki67+ and H3P+ren markaketa dentsitate erlatiboa area unitateko irudikatzen dituzten grafikoak. SMG kontrolek eta sDLK1ekin eta DAPTekin trataturiko SMGek ez dute diferentzia esanguratsurik aurkeztu ANOVArekin aztertuta. Hiru esperimentu independenteen batzbestekoa \pm errorea. (K) N1ICDren markaketarako banda murrizketa bat erakutsi zuen sDLK1ekin 48 orduz trataturiko E13ko SMGari dagokion Western blot entseguak.

NOTCH seinalizazioak garapenean zehar epitelioko ama/progenitore zelulen mantetze lanetan eta biziraupen funtzioetan duen garrantzia dela eta (Banplain *et al.*, 2006), murriztutako adarkatze morfogenesia, NOTCH seinalizazioak sorturiko epitelioko zelulen apoptosiarekin erlazionaturik egon zitezela pentsatu genuen.

Hortaz, DAPTekin hazitako E13ko SMGetan apoptosi bitartez hildako zelulak ikusteko “cleaved Caspase 3” aktiboaren aurkako immunomarkaketa egin genuen. DAPTekin zelula caspase3⁺ areagotzen ziren ustezko azinoen argietan (22.Irudia, A,B). Zelula apoptotikoen taldeak azinoen barruko zelula progenitore epitelialekin bat etortzen ziren. Gainera, apoptosiak azinoen ertzetako epitelioan zelulen kokapenaren antolakuntzan akatsak eragiten zituen, mikroskopia elektronikoarekin ikusitakoaren arabera (22.Irudia, A',B').

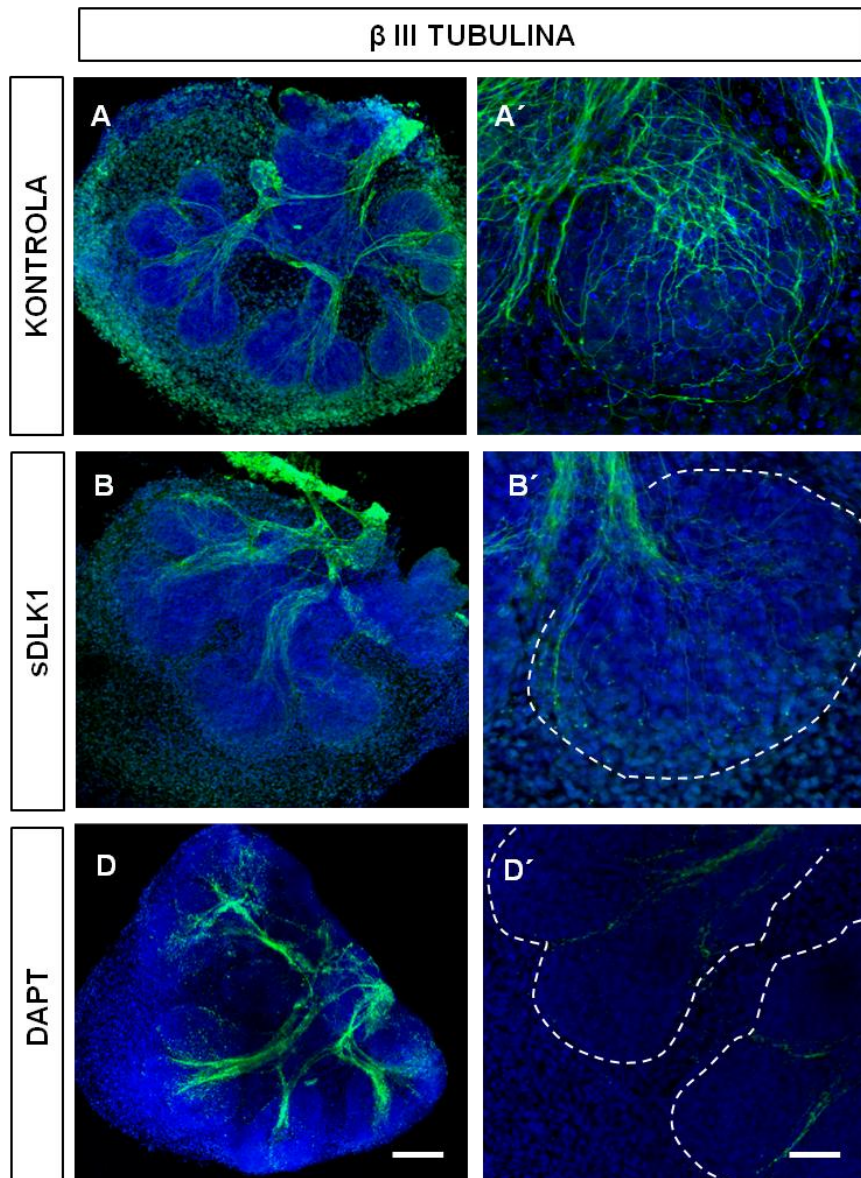


22.Irudia. NOTCH seinalizazioaren inhibizioak hazkunderan dauden SMGeen azinoen barruko zelula epitelialetan apoptosia eragiten du. Caspasa 3ren aurkako immunomarkaketa (berdez), E13ko SMGa 48 orduz hazita (A, Kontrola) DAPTren absentsia eta (B) 20 μM DAPTren presentzian. Zelula caspasa3⁺ azinoen barruan pilaturik zeudela nabaritu zen. Eskala barra: 150 μm. TEMaz egindako mikrografiak, E13ko SMG kontrol baten azinoa (A') eta DAPTekin trataturiko batena (B') 48 orduz, azinoen barruko zelula epitelialek apoptosiaren morfologia ezaugarria erakutsi zuten. Epitelio normala (EPI) eta inguratzen duen mesenkima (MES). Eskala-barra: 5 μm.

Azkenengo ikerkuntzen arabera, inerbazio parasinpatikoa garapenean dauden listu-guruinen adarkatze morfogenesirako ezinbesteko faktorea da. Hortaz, SMGetako gongoil parasinpatikoaren presentzia, listu-guruinetako zelula epitelialak inguratzen dituzten neuronen axoien inerbazio kolinergikoekin batera, SMGren organogenesia era zuzenean emateko parte hartzen duten bi faktore oso garrantzitsu dira (Knox *et al.*, 2010). Gainera, garapenean dauden gongoilen nerbio periferikoak NOTCH seinalizazioarekiko oso sentzibleak dira (Taylor *et al.*, 2007). Beraz, sDLK1 eta DAPT, NOTCH seinalizazioaren inibitzaileak, PSGen neuronen garapenean eta inerbazioan efektu negatibo bat izan zezaketela, eta ondorioz SMGetako morfogenesisian efektua eduki ahal zutela izan zen gure hipotesia.

sDLK1 edo DAPT tratamenduen ostean epitelio-nerbio arteko elkarrekintzak ondo kontserbaturik zeudela ikusteko, PSGetako neuronen soma eta axoietan β III-tubulina proteinaren aurkako markaketa egin genuen. Proteina hau zelula hauen zitoeskeletoan dago.

Baldintza normaletan, disekzioetan PSGa SMGari elkaturik agertzen da, eta honen axoiak guruinetako epitelioa guztiz inguratzen dute (23. Irudia A,A') hasierako kimuen barrutik eta ertzen ingurutik hedatuz. Axoien sortak normalean, hodian inguruetan egoten dira, adarkatze patroiekin hazten direlarik. Hala ere, E13ko SMGak sDLK1ekin (23. Irudia B,B') edo DAPTrekin (23. Irudia D,D') 48 orduz hazi genituenean, inerbazioak patroia ezohikoa aurkeztu zuen: axoi β III tubulina positiboak PSGen alboan eta hodi proximaletako epitelioan agertu ziren kontzentratuak, handik haratago hazi ezinik. Gainera axoiak inoiz ez ziren kimuen ertzetara heltzen.



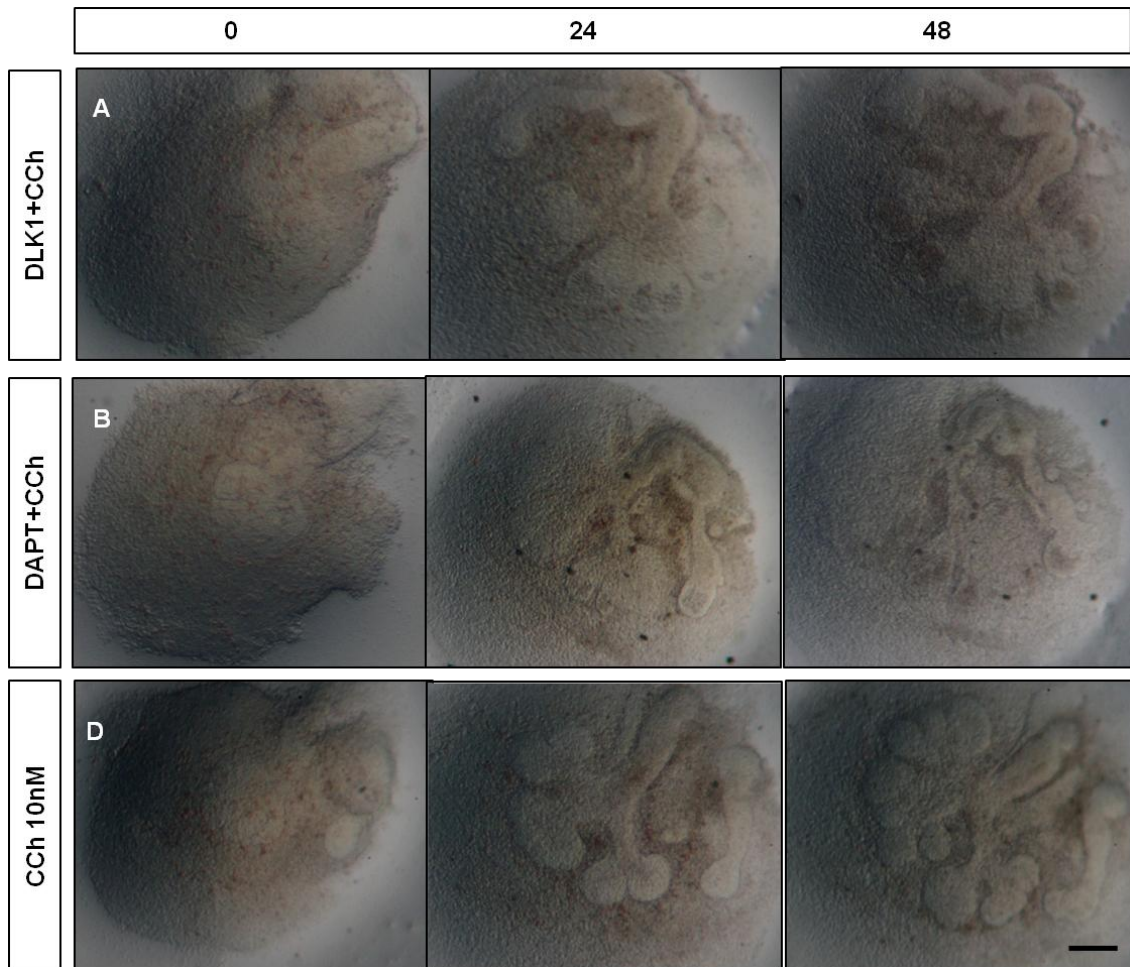
23. Irudia. NOTCH seinalazioa inhibitzean listu-guruinen inerbazioa murrizten da. (A) E13ko SMGa 48 orduz hazitako kontrolak, inerbazioa erakusten duen “whole-mount” baten argazkia (berdez: β III Tubulinaren aurkako immunomarkaketa). (A') A argazkiko kimu bat handipen gehiagotan eta argazki planoetan luzatuta. (B)sDLK1ekin 48 orduz hazitako SMGaren inerbazioa. (B')B argazkitik handipen gehiagoko kimua, axoien dentsitatea murriztua erakutsiz. (D) 48 orduko DAPT tratamenduaren osteko inerbazioa. (D') axoiak ez dira azinoen mugetara heltzen. (A-D) Eskala-barra: 150μm; (A'-D'): Eskala-barra: 50 μm.

4.4 AKTIBAZIO KOLINERGIKOAK EZ DU SMG.AREN ADARKATZE MORFOGENESI NORMALA BERRESKURATZEN, BAINA PSG.AREN INERBAZIOA AREAGOTZEN DU, sDLK1 EDO DAPT.REKIN HAZITAKO SMG.ETAN

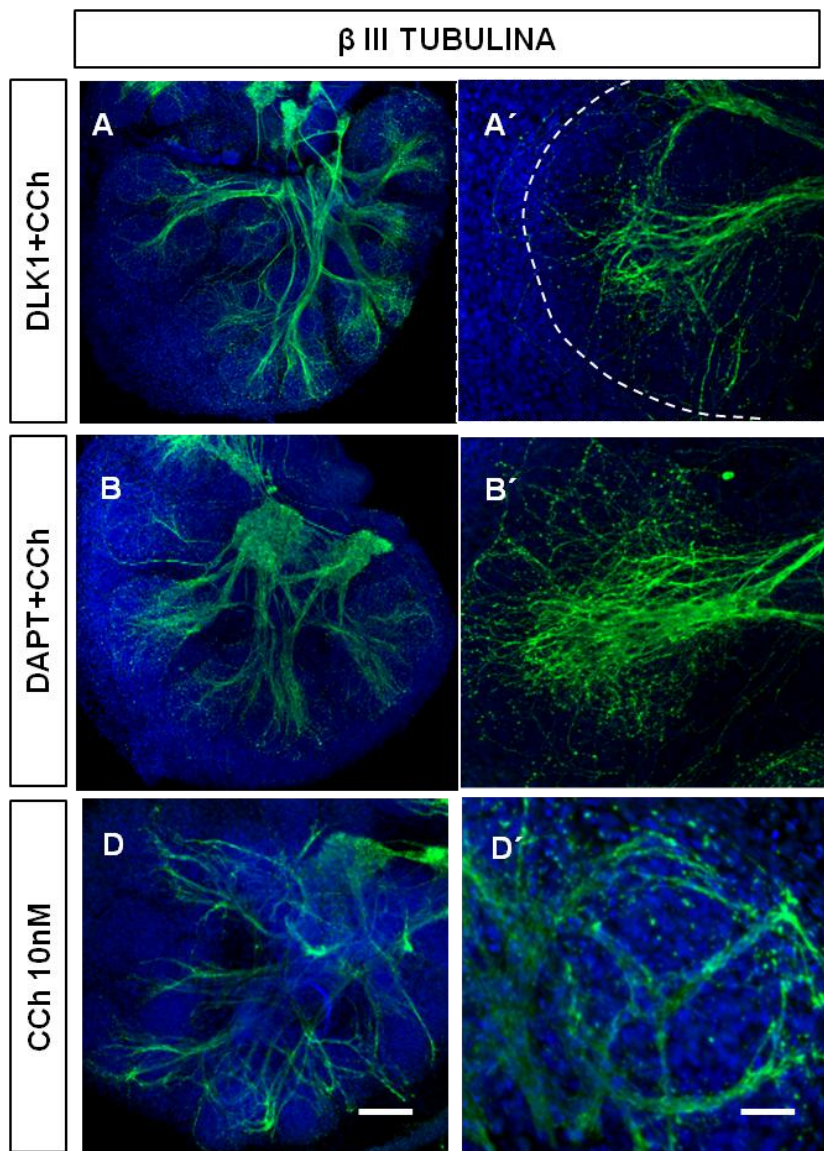
SMGak elkarturik duen PSGa fisikoki kentzen denean, epitelioko adarkatze morfogenesiaren murrizketa sendoa gertatzen da (Knox *et al.*, 2010). Morfogenesi kaltetu hau zelula progenitore zitokeratina 5+en gutxitzearekin erlazionaturik zegoen. Gainera Carbakolarekin (CCh), azetil kolinarekin analogoa, medioan jarriz efektu hau lehengoratu egiten zen, honela PSGtik galdutako nerbio zuntzen funtzioa ordezkatuz.

Gure esperimentuetan, SMGak sDLK1 edo DAPTren tratamenduaren ostean inerbazioko dentsitate axonalean murrizketa dramatikoak pairatzen zuten. Beraz, SMGetako morfogenesisian NOTCH seinalizazioaren bidezko inhibizio tratamenduek egindako efektua seinale kolinerjikoaren galerarekin erlazionaturik egon zitekeela pentsatu genuen.

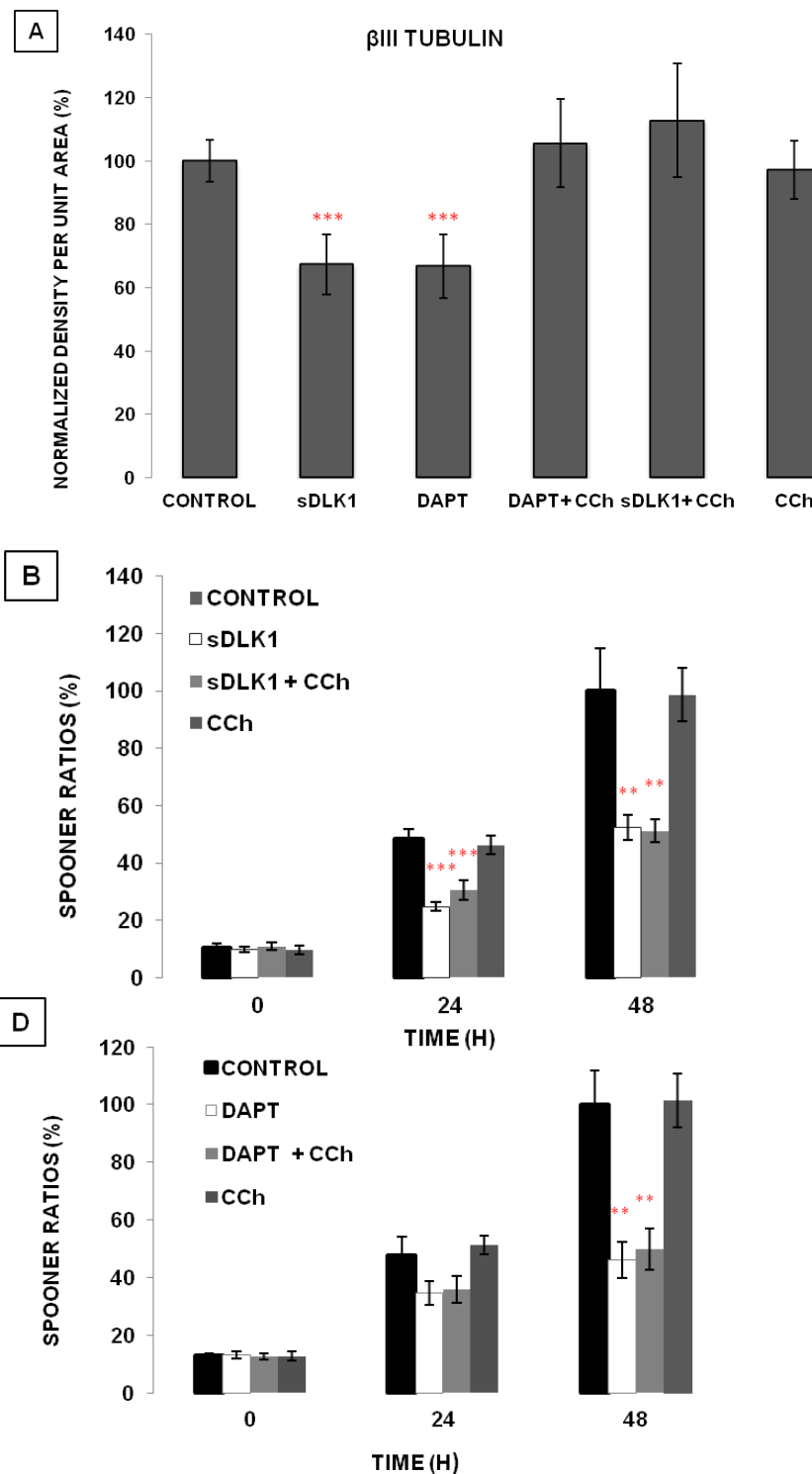
Hau kontuan hartuta, SMGak 10 nM CChrekin bakarrik eta sDLK1 edo DAPTren prezentzian 48 orduz hazi genituen. Ostean, morfogenesisia (24.Irudia.A,B,D) eta inerbazioa (25.Irudia.B,D) neurtu genituen. Esperimentu honekin CChak adarkatze morfogenesisia ezin zuela berreskuratu ikusi genuen. sDLK1+CCh edo DAPT+CCh tratamenduekin, berriz, inerbazioa berreskuratzen zela ikusi zen. β III Tubulina kuantifikatzean, sDLK1+CCh eta DAPT+CChren inerbazioak tratatu gabeko SMGen edo soilik CChrekin hazita zeuden SMGen inerbazio maila berbera erakutsi zuten (26.Irudia.A). Dentsitate axonala, β III tubulinarekin "whole-mount" immunomarkaketarekin analizatuta, handiagoa zen sDLK1ekin edo DAPTekin aldi berean CChrekin trataturik zeuden SMGetan. Berriz, sDLK1ekin edo DAPTekin bakarrik trataturik zeuden SMGek, SMG kontrolarekiko alderatura, β III tubulina markaketaren murrizketa estatistikoki esanguratsua aurkezten zuten. Nahiz eta CChren tratamenduak inerbazioa hobetu, adarkatze morfogenesisia ez zen aldatu, CChrekin tratatutako SMGen itxura (24.Irudia.A,B), sDLK1ekin edo DAPTekin soilik hazitako SMGren itxura berdintsua izan zen.



24.Irudia. Gehitutako CChak ez du listu-guruinen adarkatze morfogenesi normala berreskuratzen. (A) sDLK1ekin eta aldi berean CChrekin 48 orduz hazitako SMGen morfologia. Itxura ezohikoa, NOTCH seinalizazioa inhibituta duten SMG batena. (B) DAPTrekin eta CChrekin hazitako SMGa, ezohiko morfologia batekin. (D) 10 nM CChrekin hazitako SMG kontrola. (A-D) Eskala-barra: 150 μ m



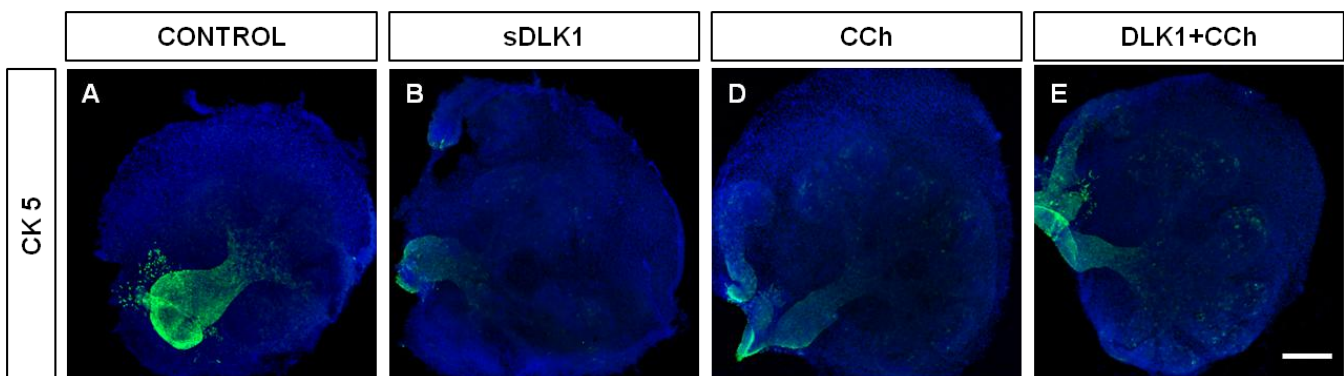
25. Irudia. CChak garepenean dauden kimuen dentsitate axonala areagotzen du. (A) sDLK1 eta CChrekin 48 orduz trataturiko SMGen inerbazioa. (A') Handipen handiagoko argazkia CChren tratamenduaren ostean berreskuratutako dentsitate axonala erakutsiz. (B) DAPT eta CChrekin 48 orduz hazitako SMGaren inerbazioa. (B') B argazkia handipen handiagotan dentsitatea berreskuratuarekin. (D) CCh 10 nMrekin 48 orduz tratautako SMGak eta β III tubulinarekin markatutako inerbazioa, SMG kontrolaren bezalakoa. (D') handipen gehiagotan. (A-D) Escala-barra: 150 μ m. (A'-D'). Escala-barra: 50 μ m.



26.Irudia. SMGen adarkatze morfogenesiaren kuantifikazioa NOTCH seinalizazioaren inhibitzaile tratamenduaren ostean. (A)Tratamendu bakoitzeko kimu terminalen inerbazioaren kuantifikazioa (β III tubulin markaketaren dentsitatea). Batz-bestekoa \pm errorea (n=4). ANOVA, post hoc Tukey testarekin; ***p \leq 0.001. (B) sDLK1 eta (D)DAPT, CChrekin edo CCh barik. Azinoetako kimu terminalak zenbatu genituen eta "spooner ratio"ak kalkulatu genituen listu-guruin bakoitzerako, 48 orduko SMG kontrolarekiko normalizaturik. Hiru esperimentu independenteen, 10 SMGetako batz-bestekoa \pm errorea. Kruskal-Wallis test; **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001.

Aktibazio kolinergikoa SMGetako zelula progenitore zitokeratina 5⁺en areagotzearekin erlazionatua izanenez (Knox *et al.*, 2010), gure buruari galdetu genion ea CCh tratamenduak, zelula zitokeratina 5⁺ak ugaltzakeen bai sDLK1ekin hazitako SMGtan zein SMG kontroletan.

Hipotesi hau argitzeko, 48 orduz hazitako E13ko SMGei “whole-mount” immunomarkaketa egin genien zitokeratina 5aren aurka (27.Irudia). SMG kontroletan zelula progenitore CK5+ak hodietan ageri ziren gehien bat, PSGa kokaturik dagoen lekuan, hain zuzen ere. Beste CK5+ populazio txikiago batzuk azinoetako epitelioan agertu ziren. Ordea, sDLK1ekin 48 orduz hazitako CK5+en zelulen murrizketa bat pairatu zuten hodietako eta azinoetako populazioetan. Hala ere, 10 nM CChren tratamenduarekin progenitoreen populazioa ia osorik berreskuratzea lortu zen (27.Irudia). Beraz, sDLK1ekin eta CChren hazitako SMGek progenitore CK5+en zelulen kopurua mantendu zuten, listu-guruinaren adarkatze morfogenesisia berreskuratu gabe edozein kasutan ere.



27.Irudia. *In vitro* NOTCH seinalizazioaren inhibizioak DLK1ekin zelula progenitoreen kopurua murrizten du, efektu hau itzuli egiten delarik CChrekin. (A) 48 orduko E13ko SMGa “whole-mount” markaketarekin zelula CK5+en aurka (berdez) kontrol moduan, gehienak hodietan eta batzuk kimuetan. Nukleoak DAPIrekin kontrastatu ziren. DLK1en presentzian (B) eta CChren presentzian(D) 48 orduz hazitako E13ko SMGa. DLK1ekin eta CCh 48 orduz hazitako E13ko SMGa. “Whole-mount” markaketa CK5+ zelulen aurka (E). Eskala-barra:150 µm.

4.5 AKTIBAZIO KOLINERGIKOAK SMG.AREN ADARKATZE MORFOGENESIA SUSTATZEN DU sDLK1 EDO DAPT.A KENDU OSTEAN

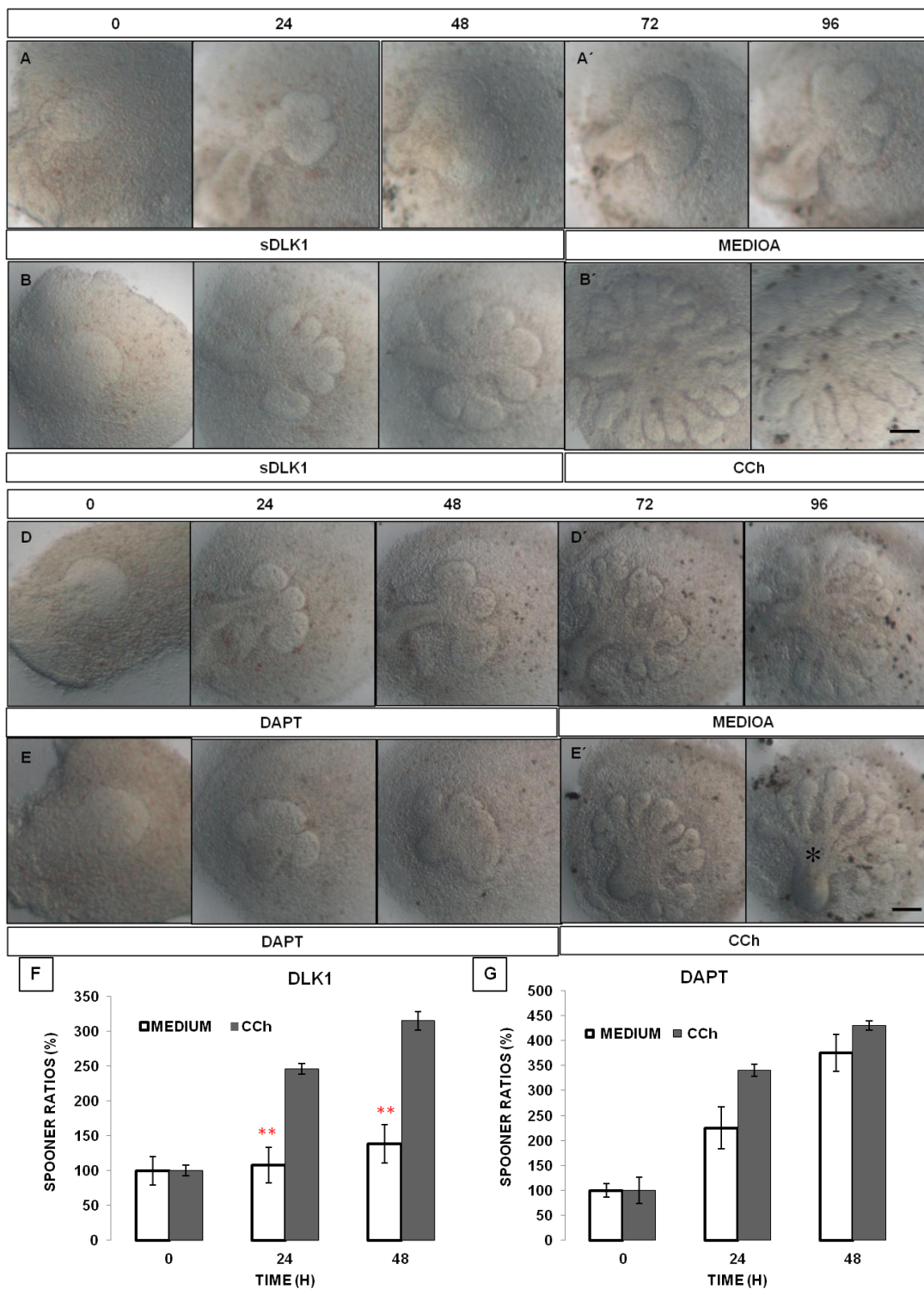
CChren aktibazio kolinerjikoak listu gurinaren inerbazioa eta zelula progenitoreen multzoak berreskuratu zituen sDLK1en 48 orduko tratamenduaren ostean, baina ez zen nahikorik izan SMGaren adarkatze morfogenesia berreskuratzeko.

Lehenago esandakoaren arabera, SMGak DAPTren presentzian daudenean, zelula epitelialen azpipopulazio batek apoptosia jasaten du. Beraz, CCh bidezko inerbazioa eta zelula progenitoreen kopurua mantentzea ez dirudi nahikoa denik SMGaren adarkatze morfogenesi normala berreskuratzeko. Gainera, azinoen barruko zelula epitelialak hazi bezain pronto hiltzen badira, nekez parte hartuko dute listu-guruinaren hazkuntzan.

Zelula batek desberdintzeko kompromisu-terminala hartzen badu eta azkenik prozesua ezin badu egin, azkar deuseztatzen da apoptosiaren bitartez; ondorioz, zelula epitelialen galera honek, listu-guruin adarkatzearen berreskuratze prosezuan eragingo luke.

Gogoeta hori aintzat hartuta, aktibazio kolinerjikoak listu-guruineko morfogenesi normala berreskuratu ote zezaketen ebaluatu nahi izan genuen epitelioko zelulen apoptosia eragiten zuen agentea kendu bezain pronto (NOTCH seinalizazioaren inhibitzaileak, sDLK1 edo DAPT).

Hau aztertzeko, E13ko SMGak 96 orduz hazi genituen. Hasieran, SMGak 48 orduz NOTCH inhibitzailearen tratamenduarekin egon ziren, sDLK1 eta DAPTekin. Jarraian, SMGak bere onera etortzeko medioan bakarrik (kontrol moduan) edo CChrekin batera jarri genituen. Listu-guruinetako adarkatze morfogenesia berreskuratu zen CCh tratamenduarekin sDLK1 edo DAPTa mediotik kendu genuenean (28.Irudia.B,E). 96 hazkunde orduren ostean, CChko eraginpean zeuden SMGek adarkatzeko "spooner ratio" hobeak aurkeztu zituzten medioan bakarrik zeuden SMGekin alderatuz (28.Irudia.A,D). Berreskuratze prozesu hau indartsuagoa izan zen sDLK1ekin egon ziren SMGetan. Gainera azino batzuek sustrai itxura erakutsi zuten, interesgarria iruditu zitzaiguna (25.Irudia.B').



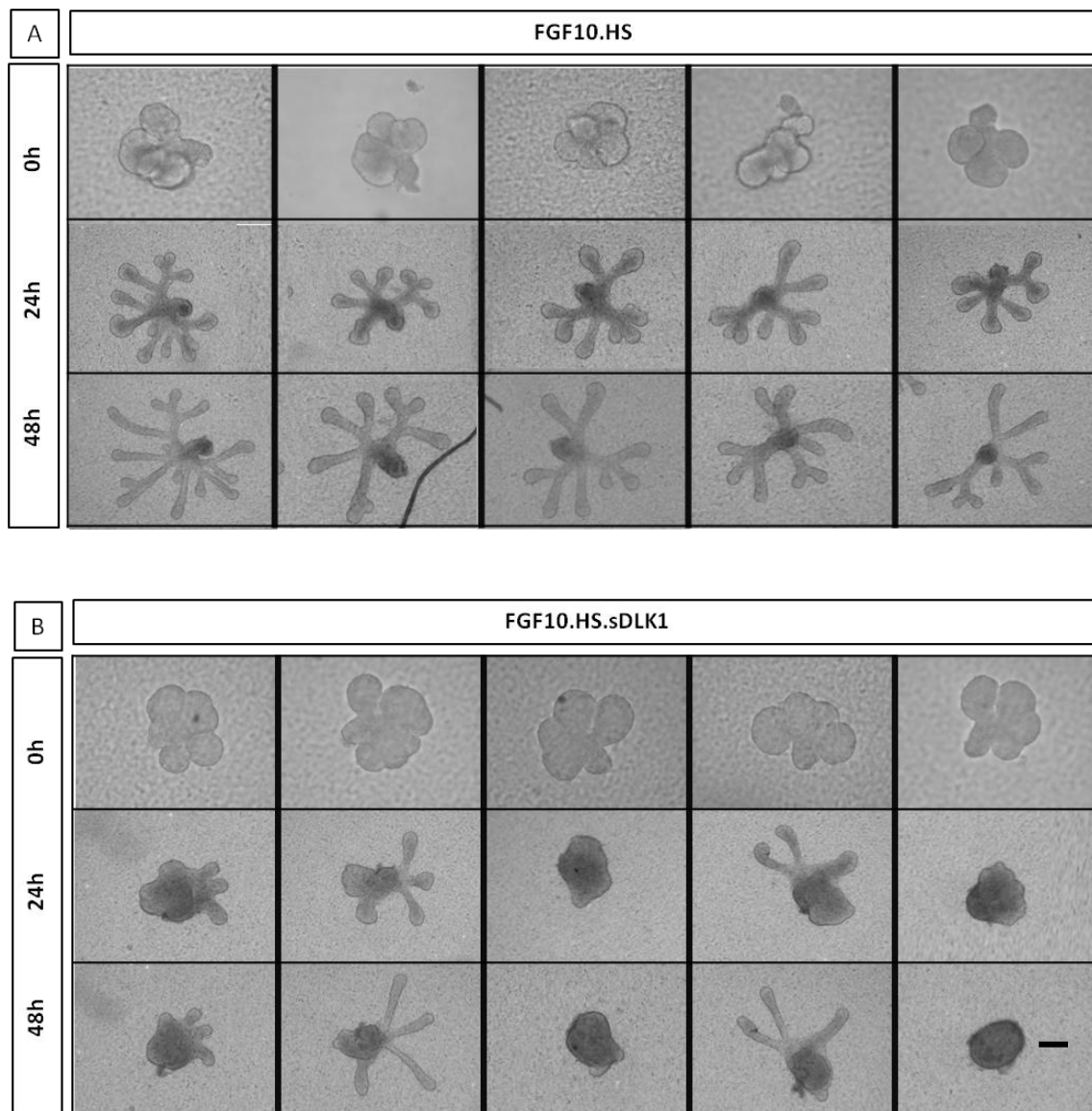
28.Irudia. Karbakolak (CCh) 48 orduz sDLK1ekin edo DAPTrekin *in vitro* hazitako E13ko SMGen adarkatze morfogenesia berpizten du. 2.5 µg/ml sDLK1 edo 20 µM DAPTrekin 48 orduz trataturiko E13ko SMGak banandu egin ziren. Batzuk medioan hazi ziren eta beste batzuk 10 nM CChrekin beste 48 orduz. sDLK1ekin 48 orduz hazitako SMGak (A,B) eta beste 48 orduz medioan hazitako SMGak, kontrol moduan (A') eta CCharekin (B'). DAPTrekin 48 orduz hazitako SMGak (D,E) eta beste 48 orduz medioan, kontrol moduan (D') eta CCharekin (E'). Azinoek 96 hazkunde orduetan sustrai antza azaldu zuten (*). Eskala- barra: 150 µm. SMGen adarkatze morfogenesiaren kuantifikazioa sDLK1 (F) eta DAPT(G) tratamendu inhibitzaileen ostean. "Spooner ratioak" kontrol bakoitzarekiko normalizatu ziren, hiru esperimendu independenteen batzuekiko ±errorea (n=7).Kruskal-Wallis test; **p≤0.01.

4.6 NOTCH SEINALIZAZIOAREN INHIBIZIOAK *IN VITRO* HAZITAKO LISTU-GURUINETATIK ISOLATUTAKO EPITELIOEN ADARKATZEA KALTETZEN DU

Lehen egiaztatu genuen bezala, NOTCH seinalizazioaren inhibizioak listu-guruineko garapena eta adarkatze morfogenesia kaltetzen zuen. Halaber, ez dakigu adarkatzeren inhibizioa PSGaren inerbazio kaltetuaren ondorioa den edota NOTCH seinale bidearen inhibizioak epitelioan sortutako efektuarena den.

Galdera honi erantzuna emateko, SMGetatik askatutako epitelioak 48 orduz *in vitro* hazi genituen. E13ko SMGen epitelioak inguratzen dituzten mesenkimatik isolatu ziren. Lamininan sartu ziren eta 48 orduz uzi ziren hazten, DEMEM F12 medioan, fibroblastoen hazkuntza faktore 10 (FGF10) eta heparan sulfatoarekin (HS) kontrol moduan eta FGF10.HS eta 2.5 µg/ml sDLK1ekin, NOTCH seinalizazioaren inhibizioa aztertzeko. Epitelioentzat FGF10 ezinbestekoa da hazteko eta HSa beharrezkoa da FGF10ak epitelioan duen hartzailera heltzeko (Patel VN *et al*, 2008, Makarenkova *et al.*, 2008).

Hasierako kontrol epitelioek (29.Irudia.A) 4-5 kimu zituzten, eta 24 hazkuntza orduren ostean kimuak luzatu eta hauen kopurua batazbeste 7ra handitu zen. 48 hazkuntza ordutan kimuen kopurua berdina lortu zen baina estuagoak eta luzeagoak ziren. Berriz, epitelioak 2.5 µg/ml sDLK1ekin hazi genituenean (29.Irudia.B) epitelioen itxura guztiz ezberdina zen. Epitelioen erdiak baino gehiagok zituzten kimuen kantitatea 3 kimuetara murriztu zen, eta besteek kimu guztiak galdu zituzten borobil itxura hartuz bai 24 hazkunde ordutan eta baita 48 ordutan ere. Beraz, NOTCH seinalizazioaren inhibizioak epitelioan bertan efektua duela esan dezakegu, eta adarkatze morfogenesia kaltetzen duela ondorioztatu dezakegu.



29.Irudia. SMGetatik ateratako epitelioen *in vitro* hazkuntzetan sDLK1ek kimuen sorkuntza deuseztatzen du. (A) Epitelio kontrola (n=5) FGF10.HSrekin hazita 48 orduz. (B) 2.5 µg/ml sDLK1ekin hazitako epitelioek (n=5), kimuen zenbakia murriztua erakusten dute eta *in vitro* hazitako epitelioen morfologia normal galtzen dute. Eskala-Barra: 100 µm.

4.7 *Dlk1* KNOCK-OUT SAGUA

Knockout (KO) saguak gene baten inaktibazioaren *in vivo* ondoriak aztertzeko tresna oso baliagarriak dira. Gure kasuan, genea *Dlk1* da, eta sagua egiteko *Neo* genearen kasetea *Dlk1*en txertatu zen. Horrexegatik, genotipatzerakoan *Dlk1* (-/-) saguan *Neo* genea detektatzen dugu, *Dlk1*(+/+) saguan berriz, jatorrizko *Dlk1* (30. Irudia). Beraz, *Dlk1* genea WT sagu ar eta emeetan detektatzen da, eta espero genuenez *Dlk1* (-/-) saguetan ez zen detektatu.

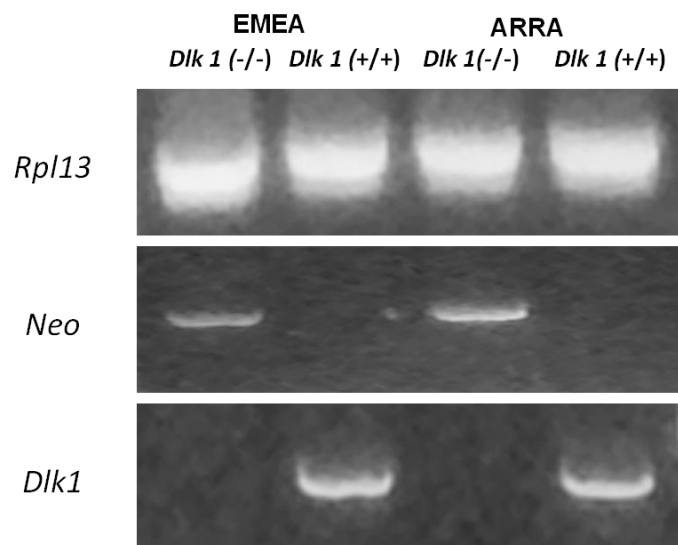
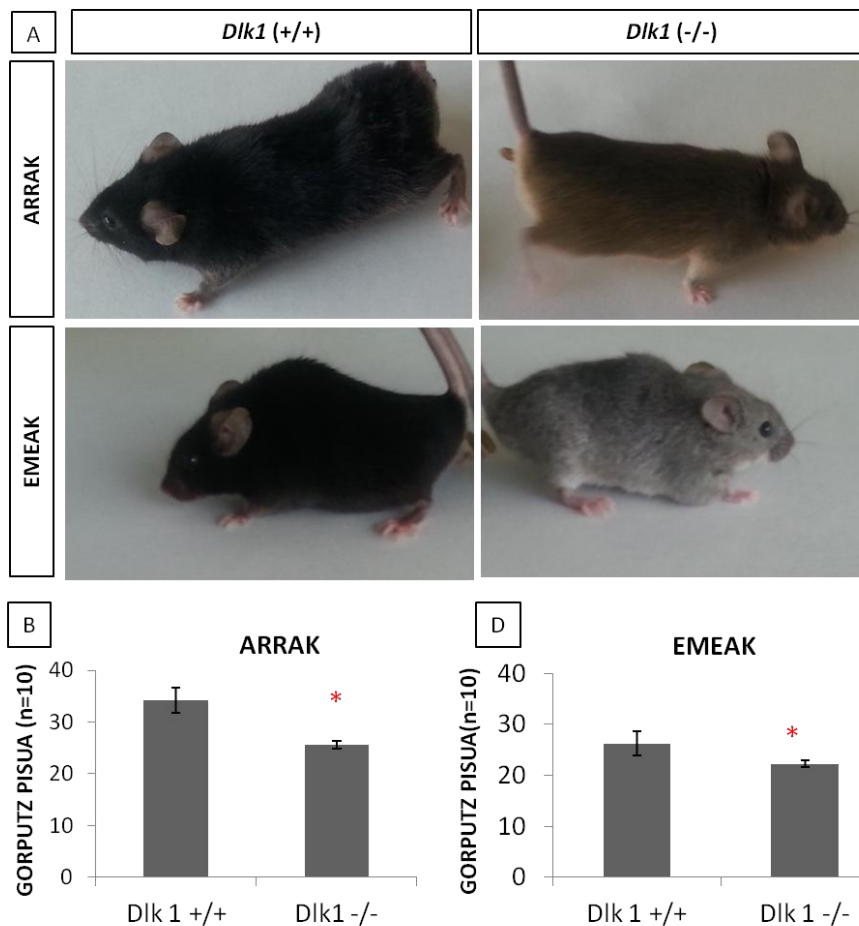


Figure 30. Saguen genotipatzea. *Dlk1* (+/+) eta *Dlk1* (-/-) sagu eme eta arren buztanetatik ateratako DNA anplifikatu egin zen *Rpl13*, *Neo* eta *Dlk1* geneentzako eta gel batean ikustarazi ziren. WT saguak *Dlk1* espresatzen du, *Dlk1*(-/-) saguak aldiz, *Neo* genea.

*Dlk1*en gabezia duten saguen lehenengo fenotipo analisiak, animalia hauek hazkuntza atzerapena, hezur asaldurak eta gizentzeko joera zutela esan ziguten (Moon *et al.*, 2002). Gainera, sagu hauek biziko lehenengo asteetan gutxi pisatzen zuten. Osteon, badirudi BALB/CJ azpi-genotipoarekin egindako saguek WTekin alderatuta pisu normala berreskuratzen zutela (Moon *et al.*, 2002), aldiz 129/SvJ edo C57BL/6 azpi-genotipoekin egindako saguak txikiagoak ziren bizitza osoan zehar (Cheung *et al.*, 2013; Raghunandan *et al.*, 2008).

Datu hauek egiaztatzeko bi arrazen gorputz tamaina eta pisua alderatu genituen. Lehenago esandakoaren harira, KO saguak (arra 25,6g±sd, emea 22g±sd) WT saguak (arra 34g±sd eta emea 26g±sd) baino txikiagoak eta arinagoak. Eme eta arren artean ere diferentziak ikusi genituen, arren artean diferentzia hau esanguratsuagoa izanik (Fig 31).

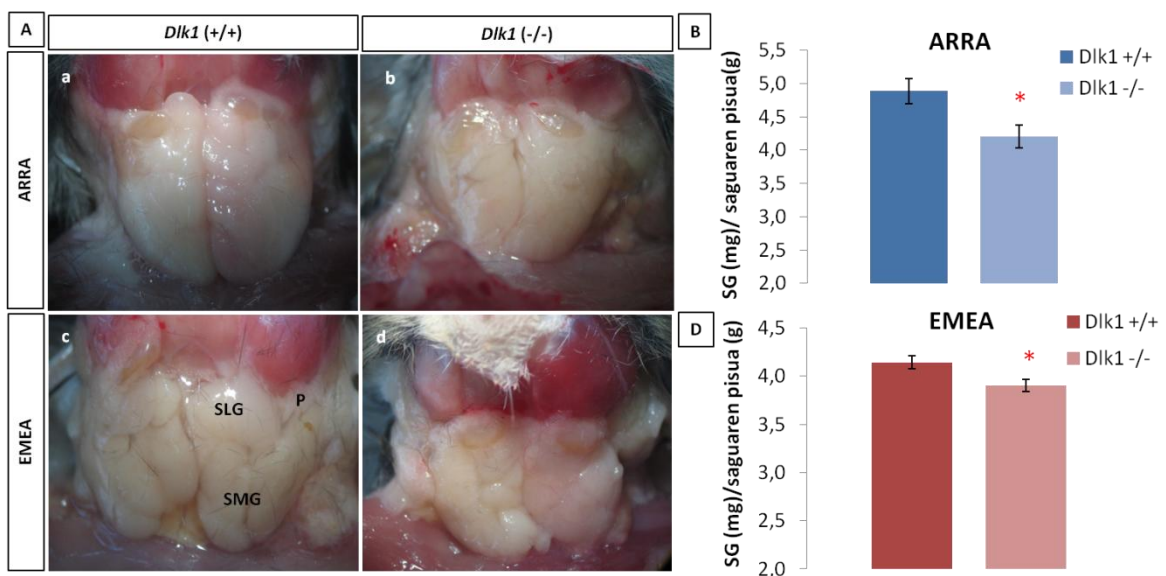


31.Irudia. *Dlk1 (-/-)* saguak *Dlk1 (+/+)* saguak baino txikiagoak eta arinagoak ziren. (A) Sagu bakoitzaren irudia tamaina alderatzeko. *DLK1(-/-)* Arra eta emea eskuinean *DLK1 (+/+)*ak baino txikiagoak dira. Azpian saguen gorputzen pisuen grafikoa (B) arrentzat eta (D) emeentzat, n=10 sagu. Student test; ***p ≤0.001, *p≤0.05.

4.8.1 *Dlk1* KNOCK-OUT. EN LISTU-GURUINEN FENOTIPOA

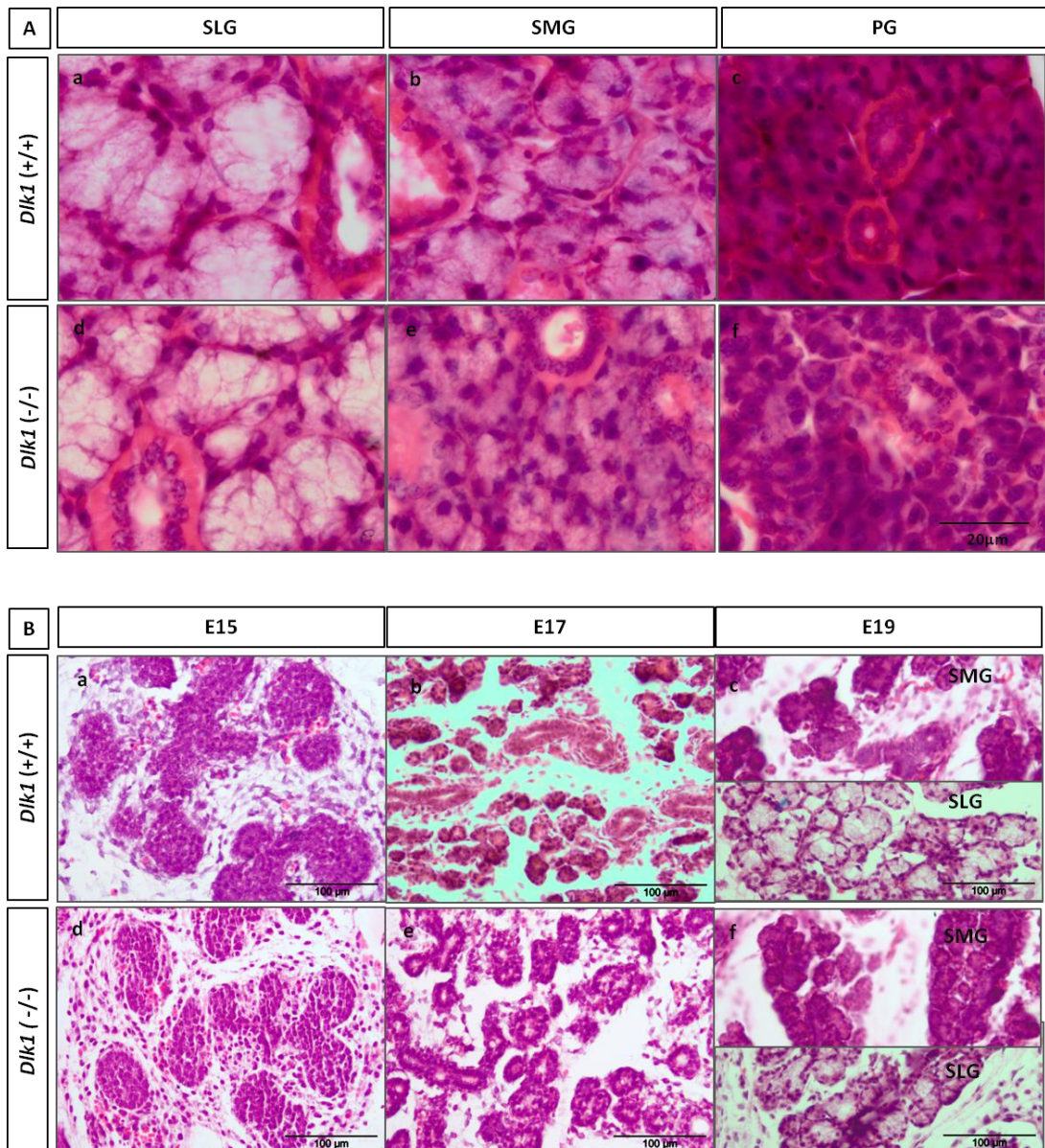
DLK1 SMGaren garapenean zehar adierazten da eta listu-guruineko adarkatze morfogenesisian du bere funtzioa. Beraz *Dlk1* (-/-)aren listu-guruinak behatzea erabaki genuen, eta sagu WTarekin konparatzea. Horretarako, *Dlk1* (-/-) eta (+/+) sagu ar eta emeen barailpeko (SMG), mihipeko (SLG) eta parotidako (PG) listu-guruinen anatomia aztertu eta morfologia behatu genituen. Listu-guruinak perfunditu eta azaleratu ostean, argazkiak atera genituen (32. Irudia.A), jarraian listu-guruinak elkarrekin atera eta pisatu genituen. *Dlk1* (-/-) listu-guruinak *Dlk1* (+/+) saguenak baino txikiagoak ziren.

Sagu *Dlk1* (-/-) eta *Dlk1* (+/+)etatik disezcionatutako listu-guruinak pisatu genituen, n=6 ar eta emeak, eta grafika batean aurkeztu genituen listu-guruinen (SG) pisuak saguen gorputzaren pisuarekiko (32.Irudia.B,C). Knock-out saguen listu-guruinak txikiagoak eta arinagoak ziren, bai ar eta emeentzat, wild-type saguen listu-guruinekin alderatuz. Gainera, emeen guruinak arrenak baino arinagoak ziren. Gure iritziz, sexuen arteko tamaina diferentzia hau, karraskarietan bereizgarria den listu-guruinetako dimorfismo sexualari egotzi dakioko (Atkinson *et al.*, 1959; Gresik E, 1980).



32.Irudia. *Dlk1*(-/-) saguen listu-guruinak *Dlk1*(+/+) saguenak baino txikiagoak dira. A) *Dlk1*(-/-) eta *Dlk1*(+/+) saguenak arren listu-guruinak (a,b) eta emeenak (d,e), SLG: mihipekoa, SMG: barailpeko, P: parotida. *Dlk1*(-/-) eta *Dlk1*(+/+) sagu (B) ar eta (D) eme n listu-guruin (SG) guztien pisua(n=6). Unpaired t test ***p ≤0.001.

Dlk1(*-/-*) saguen listu-guruinak txikiagoak zirenez, sagu helduaren listu-guruinak SMG, SLG eta PG (33.Irudia.A) eta garapenean zehar zeuden listu-guruinak (33.Irudia.B) histologikoki behatzea erabaki genuen. Ehun mailean malformaziorik zegoen Ikusi nahi izan genuen.

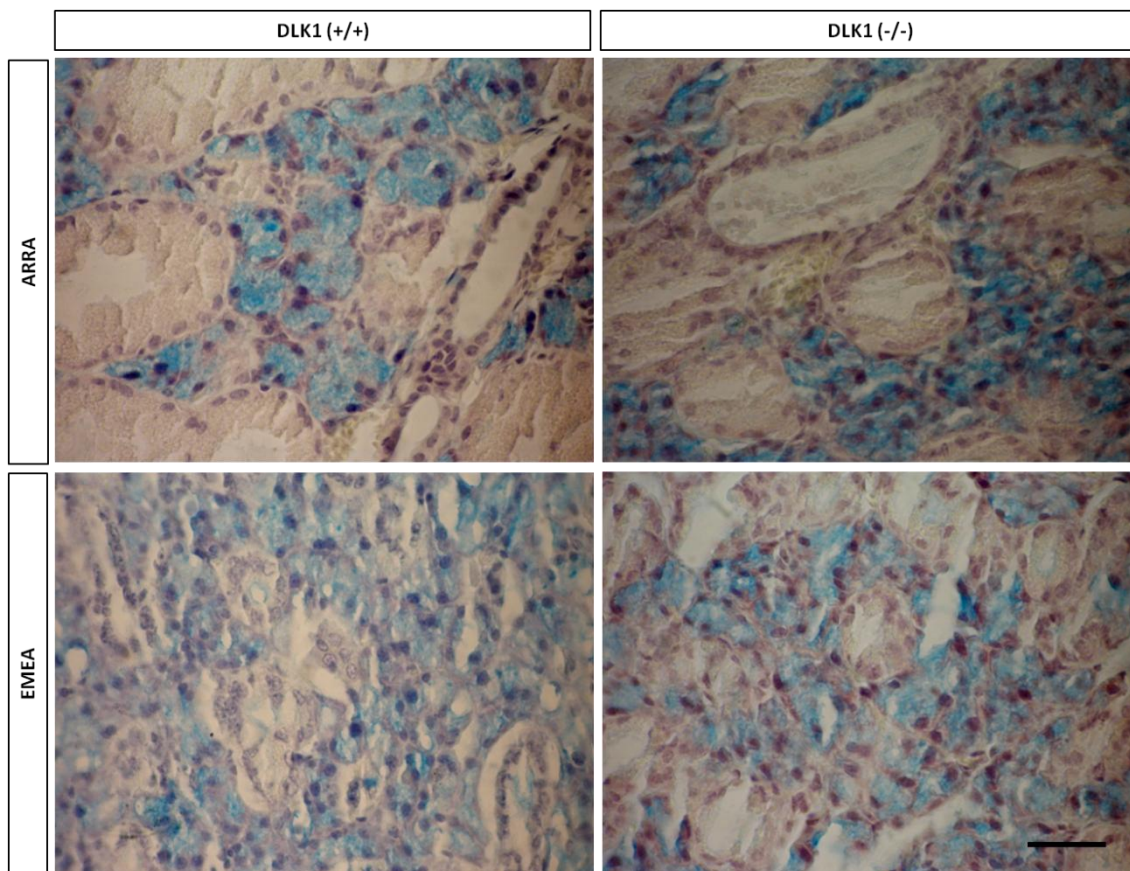


33.Irudia. *Dlk1*(+/+) eta *Dlk1*(-/-) saguen listu-guruinen histologia. (A) Sagu helduen listu-guruin SLG, SMG eta Parotidaren H/E tindaketa. Eskala-Barra: 20 μ m. (B) E15etik E17rako SMGen H/E tindaketa , eta E19ko SMGa eta SLGa. Eskala-Barra: 100 μ m.

Dlk1 (+/+) eta (-/-) sagu helduen SMG, SLG eta PGak antzeko histologia ageri zuten (33.Irudia.A). Sagu bietan, SLGen azinoko zelula epitelialek piramide itxura zuten, zitoplasma argia, basofilikoa eta nukleoak ohin-aldean zituzten. Hodi interkalarrak motzak eta estuak ziren, epitelio zapal eta kubikoz osaturiko nukleoekin zelularen alde apikalean. SMGa, listu seromukitsua jariatzen duena, ezaguna da hodi bikordun bihurtuengatik (GCT). Hodi hauek hodi interkalarren eta hodi ildaskatuen artean daude. SMGetako azinoek piramide itxurako zelula epitelialak zituzten, zelula hauek zitoplasma argia eta basofiloa zuten, eta nukleoak zelularen erdian kokaturik zituztela. Azkenik, PGa, ia guztiz seroso zen bai *Dlk1*(+/+) eta *Dlk1*(-/-)rentzat. Azinoak oso txikiak ziren, piramide itxurazko zelula epitelialek zitoplasma oso basofiloa zuten eta nukleo handiak eta borobilakurkezen zituzten zelularen ohin-aldean. Hodi interkalarrak motzak eta estuak ziren eta zelula epitelial zapal eta kubikoz osaturik zeuden, nukleo handiekin. Zehaztasunez behatutako histologiak ez zuen *Dlk1* (+/+) eta (-/-) saguren listu-guruinen arteko diferentziarik iradoki.

*Dlk1*en adierazpena gehien bat listu-guruinaren garapenean ematen denez, ea guruinaren organogenesiko garai ezberdinetan histologiako diferentziarik egon zitezkeen pentsatu genuen. Beraz, *Dlk1* (+/+) eta (-/-) saguen listu-guruinen E15 (garai kanalikularra), E17 (garai kimu terminala) eta E19 (desberdintzapen garai) sekzioak tindatu genituen H/Erekin. SMG eta SLGaren azino eta hodietan desberdintzapen progresiboa ikus daiteke garapenean aurrera egiten duen elean (33.Irudia.B). E15eko listu-guruinek morfologia kanalikular garaiko itxura tipikoa ageri zuten, epitelioa eosinarekin tindaturik (larrosaz) eta mesenkima gutxiago kondentsaturiko zelula argiagoeekin. E17an *Dlk1* (+/+) eta (-/-)en SMGek antzeko itxura zuten, eta hodiak zeharka ikusten hasi ginen. E19an SMGa serosoagoa eta SLG mukosoagoa ikus daitezke (larrosa argiagotz tindatua zelulen zitoplasmak mukiz beterik daudelako). Ez zegoen diferentzia esanguratsurik *Dlk1* (+/+) eta (-/-) guruin artean. Hala eta guztiz ere, berriro, ezin izan genuen histologikoki diferentziarik aurkitu *Dlk1* (+/+) eta (-/-) saguen artean.

Histologia mailan diferentziarik ez zegoenez, parafinako laginak alcian urdinarekin tindatzea erabaki genuen, guruinetako muzinak ikusi ahal izateko (34. Irudia).

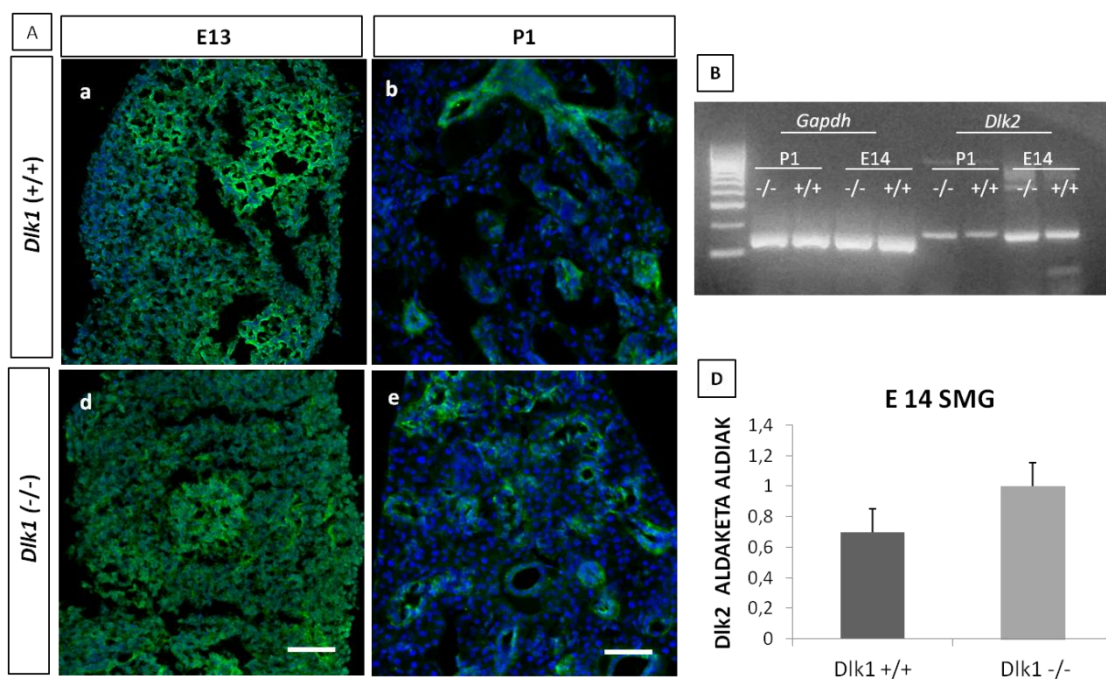


34.Irudia. *Dlk1* (-/-) eta *Dlk1* (+/+) ar eta emeen artean urdinez tindatutako muzinak antzeko kopuruan daude. SMG sekzioak alcian urdinarekin tindaturik. Eskala-barra: 20 μ m.

Halere, *Dlk1* (-/-) eta *Dlk1* (+/+) laginen artean urdinez tindaturiko muzinak antzeko kantitatea zegoela zirudien. Bestalde ar eta emeen artean aldaketak zaudela zirudien, emetan muzin gehiago zeudelaren antzaz, haatik arren GCTak emeenak baino sekzio handiagoa zuten eta begi-bistaz muzin kantitate txikiagoa zegoela zirudien.

Emaitza hauen ostean, *Dlk1* (-/-) saguen listu-guruinen fenotipo gogor baten gabezia konpentsazio genetiko batengatik izan zitekeela pentsatu genuen. DLK2, egitura eta funtzionaltasunaren aldetik, DLK1en homologoa dela azaldu dugu jada eta gainera listu-guruinaren garapean ageri da. Arrazoi honengatik, DLK2 konpentsazio efekturen bat egiten egon liteke. Beraz, DLK2ren adierazpen mailak aztertu genituen *Dlk1* knock-out saguetan.

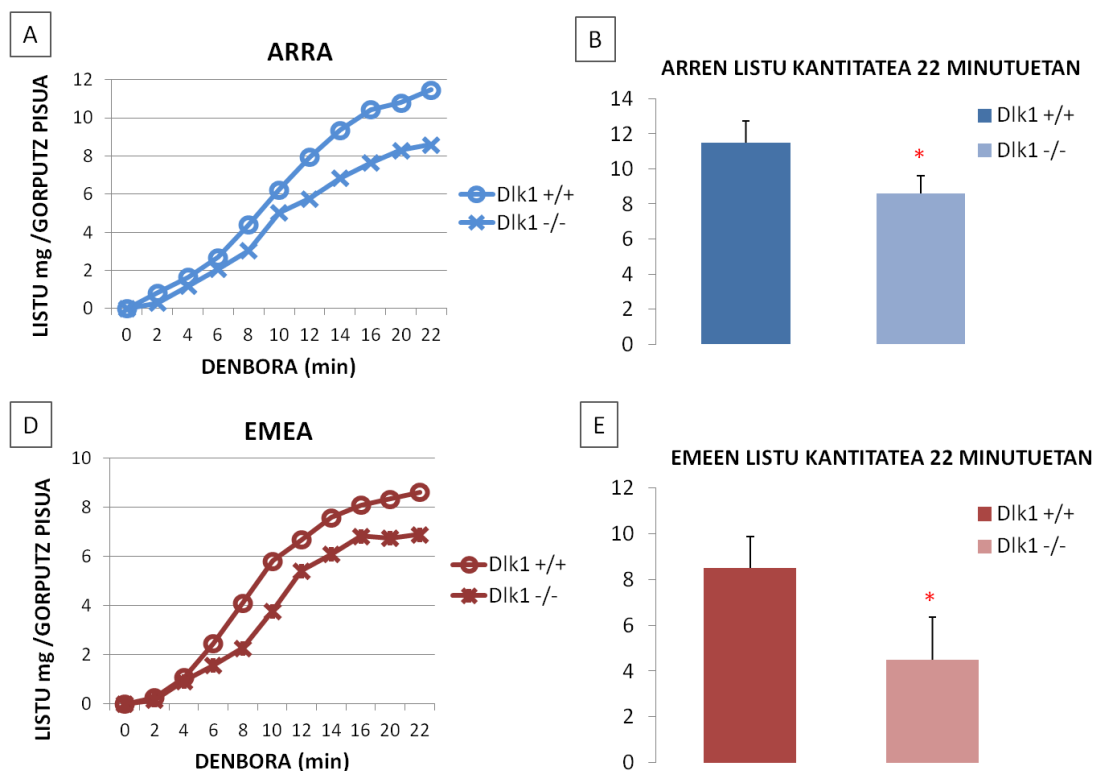
Horretarako, E14 eta P1 SMGetan RT-PCR eta qPCRak egin genituen *Dlk2*ren mRNA adierazpen mailak ikusteko. Proteina aztertzeko, immunofloreszentzia egin genuen DLK2ren aurkako antigorputzarekin, E13 eta P1 SMG laginetan. Hala ere, ez genuen diferentziarik ikusi *Dlk1* (+/+) eta (-/-) saguen artean (Fig 35). Ondorioz, *Dlk2*ren adierazpena ez denez aldatzen, esan dezakegu ez dela konpentsaziorik ematen *Dlk1* (-/-)en listu-guruinetan.



35.Irudia. DLK2ren mailak ez du konpentsaziorik jasaten *Dlk1*en gabezia *Dlk1* (-/-) saguen listu-guruinetan. (A) (a,d) E13ko SMGak DLK2ren aurka tindaturik, positiboak dira kimuetako zelula epitelial eta mesenkimaletan, (b, e) P1 SMGak DLK2 positibo da hodietako eta azinoetako zelula epitelialetan. (a,d) Eskala-barra: 150 μ m. (b,e) Eskala-barra: 50 μ m. (B) RT-PCRrez amplifikatutako produktuak ez dute diferentziarik aurkezten. (D) qPCR *Dlk2* mRNA adierazpen mailak *Dlk1* (+/+) eta *Dlk1* (-/-) E14 SMGetan. Diferentziak ez dira estatistikoki esanguratsuak.

4.8.2 SMG.AREN ANALISI FUNTZIONALA

Sagu *Dlk1* (-/-)en listu-guruinak txikiagoak izanik eta egitura histologikoan aldaketak ikusi zirela kontuan izanda, analisi funtzional bat egitea erabaki genuen. Pilocarpina injekzioaren ostean eragindako estimulazioa ikusteko, *Dlk1* (+/+) eta (-/-) sagu ar eta emeetan, listu ekoizpen totala neurtu genuen. Sagu *Dlk1* (-/-), ar eta emeek, listu gutxiago ekoizten zuten (0-22 minutu artean) *Dlk1* (+/+)ekin alderatuta. Esaterako, WT sagu arrek, 12 mg listu ekoitz zitzazketen bere gorputz pisuarekiko (g), KO sagu arrak berriz, 8 mg listu bakarrik ekoiztu zuten gorputz pisuarekiko (36. Irudia. A,B). Sagu ar eta emeen artean beste diferentzia bat ere bazegoen, emeek listu gutxiago ekoiztu zuten, 8 mg/gorputz pisuko WTetan eta 5 mg/gorputz pisuko KOetan (36. Irudia.D,E). SaguWT ar eta emeen artean ere listu jariaketen diferentziak ikus ditzakegu, emeek arrek baino listu gutxiago ekoizten dute modu natural batean. Gure iritziz diferentzia hau berriro dimorfismo sexualari egotzi dakiok.



36.Irudia.Listuaren neurketa. (A) Listuaren jariora mg.etan saguaren pisuarekiko, *Dlk1* (-/-) eta (+/+) arretan, pilokarpinaren estimulazioaren ostean (B) listu kopuru totala *Dlk1* (-/-) eta (+/+) arretan, (D) Listuaren jariora mg.etan saguaren pisuarekiko, *Dlk1* (-/-) eta (+/+) emeetan, (E) listu kopuru totala *Dlk1* (-/-) eta (+/+) emeetan. T testa * p<0.05.

Sagu arretan, pilokarpinaren estimulazioaren ostean ekoiztutako listua 33.4% murrizten zen knock-out saguetan eta listu-guruinen pisua %35.2 txikiagoa zen animalia hauetan, WTarekin alderatuz. Emeetan, ekoiztutako listua %37.5 murrizten zen knock-out saguetan eta listu gurinen pisu aldaketa %25.5 ekoa zen.

Esperimentu funtzional honen ostean, sagu *Dlk1* (-/-)ek listu gutxiago ekoiztu izanaren zergatia jakin nahi genuen. SMGa listu gehien ekoizten duen listu-guruina da.

Listu-guruin honen funtzioa kalteturik egon zitekeen eta histologiaren behaketak ez zuenez azinoetan ezberdintasunik erakutsi, disfuntzio hau jariapen egiturengatik, bereziki azinoengatik eta hodiengatik (GCTak), izan zitekeela pentsatu genuen.

Honi erantzuna emateko TEM teknika egin genuen, lagina handipen gehiagorekin behatzea baimendu ziguna. SMGetan dimorfismo sexuala oso gogorra denez, toloudina urdinak erakutsi zigun bezala (37.Irudia), arrak eta emeak bananduta aztertzea erabaki genuen.

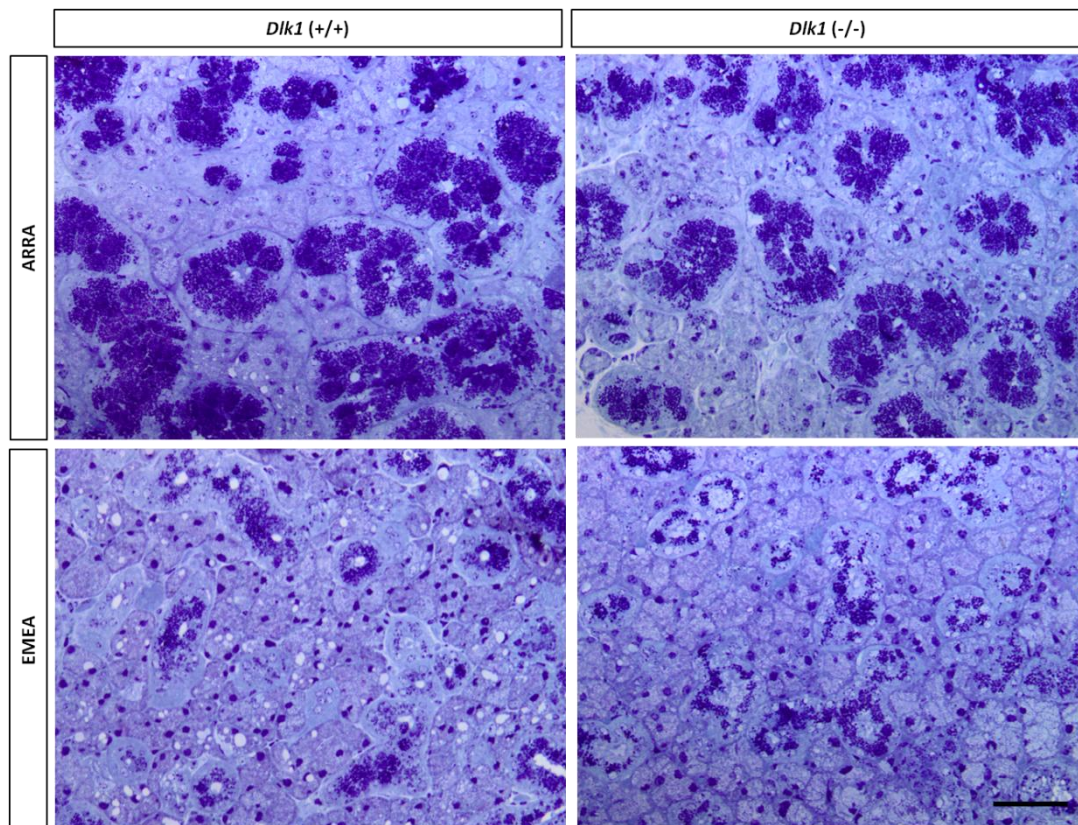
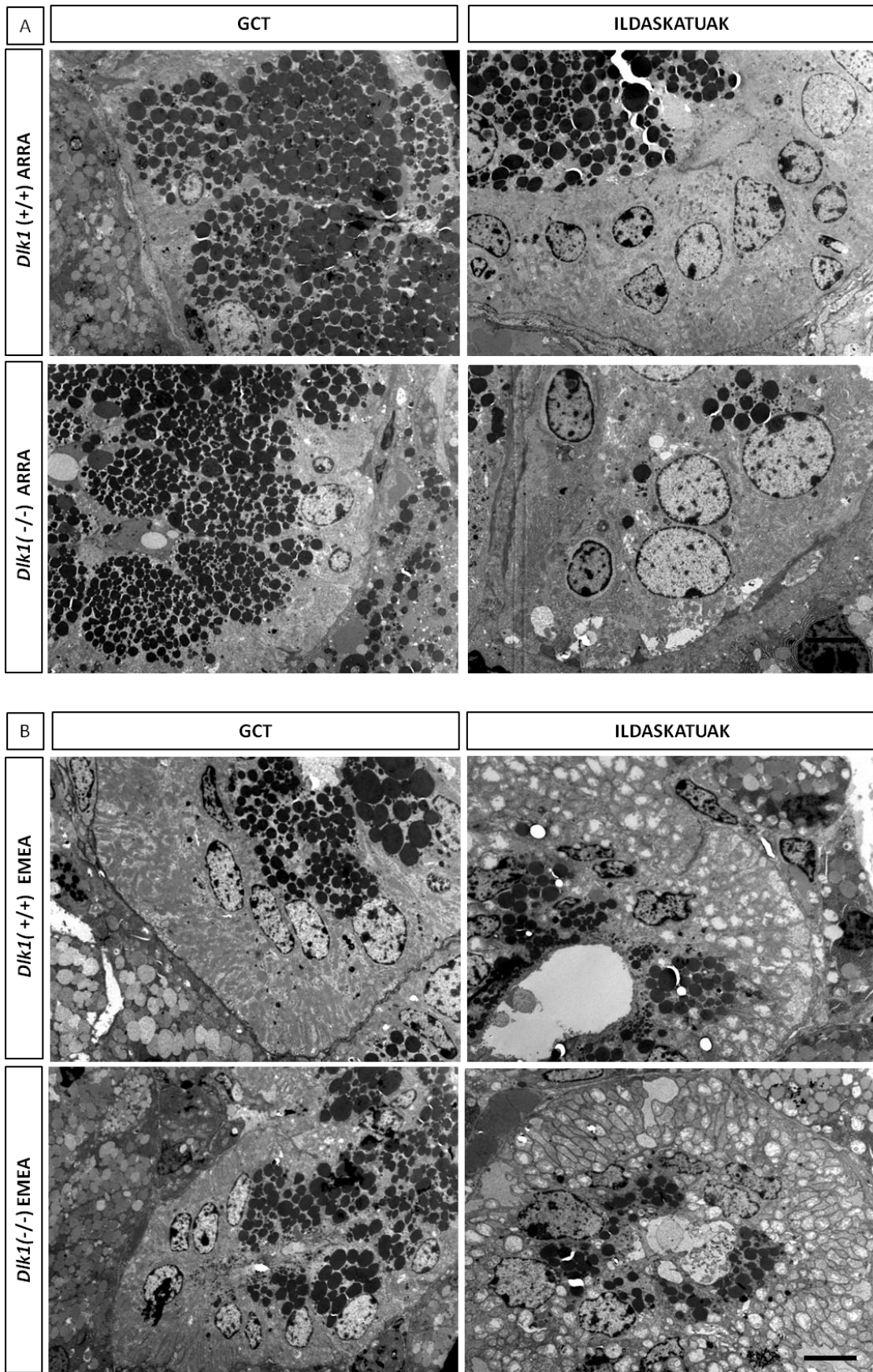


Figure 37. *Dlk1*(+/+) eta *Dlk1*(-/-) saguetan dimorfismo sexuala dago. TEM egin aurretik laginak behatzeko Toloudina urdin tindaketa egiten da. Diferentzia handienak GCTetan daude, arretan ugariagoak direlarik. Escala- barra: 50 μ m

36.Irudian ikusi genuenez, listuaren sekrezioa murriztuta dago emeetan arrekin alderatuta, GCT hodian funtzioarekin erlazionatu ahal duguna. Hortaz, GCT hodian, hauek inguratzen dituzten azinoetan edota hodi ildaskatuetan aldaketa morfologikorik bazeuden jakin nahi genuen. Aldaketa horrek *Dlk1* (-/-) saguak listu gutxiago ekoiztearen emaitza azal zezakeen.

Honi erantzuna emateko TEMa erabili genuen, lagina handipen gehiagotan behatzea baimendu ziguna. SMGAN dimorfismo sexuala oso gogorra denez arrak eta emeak banaduta aztertzea erabaki genuen. TEMeko argazkiei dagokienez dimorfismo sexuala GCT hodian somatzen zen, arretan handiagoak izanik eta jariapen bikor gehiagorekin (38.Irudia.A, geziak), emeekin konparatuz. Emeetan ere ikusi genuen, mitokondrio handiagoak zituztela hodi ildaskatuetako zelulen alde basalean (38.Irudia.B, geziak), arrekin alderatuta. Gainera, emeen hodi ildaskatuetako zelula epitelialen alde apikalean bikorrak zeuden, GCT hodian jarraipena direlako. Halere, ezin dugu *Dlk1* (-/-) eta (+/+) saguen SMGen hodian artean diferentzia esanguratsurik zegoenik esan.

Hortaz, jariaturiko listu kopuruaren diferentzia listu-guruinaren tamainaren diferentziari egotzi dakieke. Listu-guruinak gero eta handiagoak direnean listu gehiago jariatzeko ahalmena izan zezaketela pentsatu genuen. Beraz, *Dlk1* (-/-) saguaren SMGak *Dlk1* (+/+)arenak baino txikiagoak direnez, listu gutxiago ekoiztu zezaketela ondorioztatu genuen.



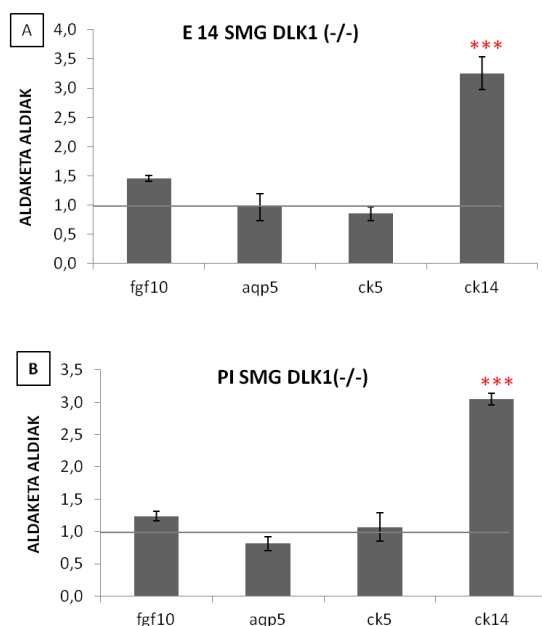
38. Irudia. GCT hodian eta hodi ildaskatuaren transmisiozko elektroik mikroskopioaren irudiak. (A) ar *Dlk1 (+/+)* eta *Dlk1 (-/-)* GCTak eta hodi ildaskatuak. (B) eme *Dlk1 (+/+)* eta *Dlk1 (-/-)* GCTak eta hodi ildaskatuak. Eskala-barra: 5 μ m.

4.8.3 LISTU-GURUINAREN MARKATZAILEAK

Dlk1 inpronta genomikoa duen genea, SMGaren garapenerako oso garrantzitsua da eta bere funtzioa zelularen etorkizuneko erabakiekin erlazionaturik dago, beraz, proteina honen gabeziak ama/progenitore zelulen populazioan eragina edukiko zuela pentsatu genuen. Horrexegatik, *Ck5* and *Ck14*en adierazpen mailak aztertzea erabaki genuen. Hauek listu-guruinetako ama/progenitore zelulen bi markatzaile dira. CK14 eta CK5ek listu-guruinaren zelula populazio ezberdinak markatzen dituzte: CK5 gehienbat listu-guruinaren hodian markatzailea da, eta CK14ren adierazpena hedatuagoa dago kimuen epitelioan eta hodian epitelioan garapenean zehar. Gainera E15eko, garai kanalikularrean adierazpen handipen bat dute (Lombaert and Hoffman, 2010).

Listu-guruinen histologiak aldaketarik aurkeztu ez zuenez, *Dlk1*en gabeziak listu-guruin garapenean konpentsazioren bat eduki zezakeen beste seinalizazio bide batzuen eraginez, esaterako *Fgf10*. Hau listu-guruinaren garapena kontrolatzen duen senalizazio bide garrantzitsu bat da.

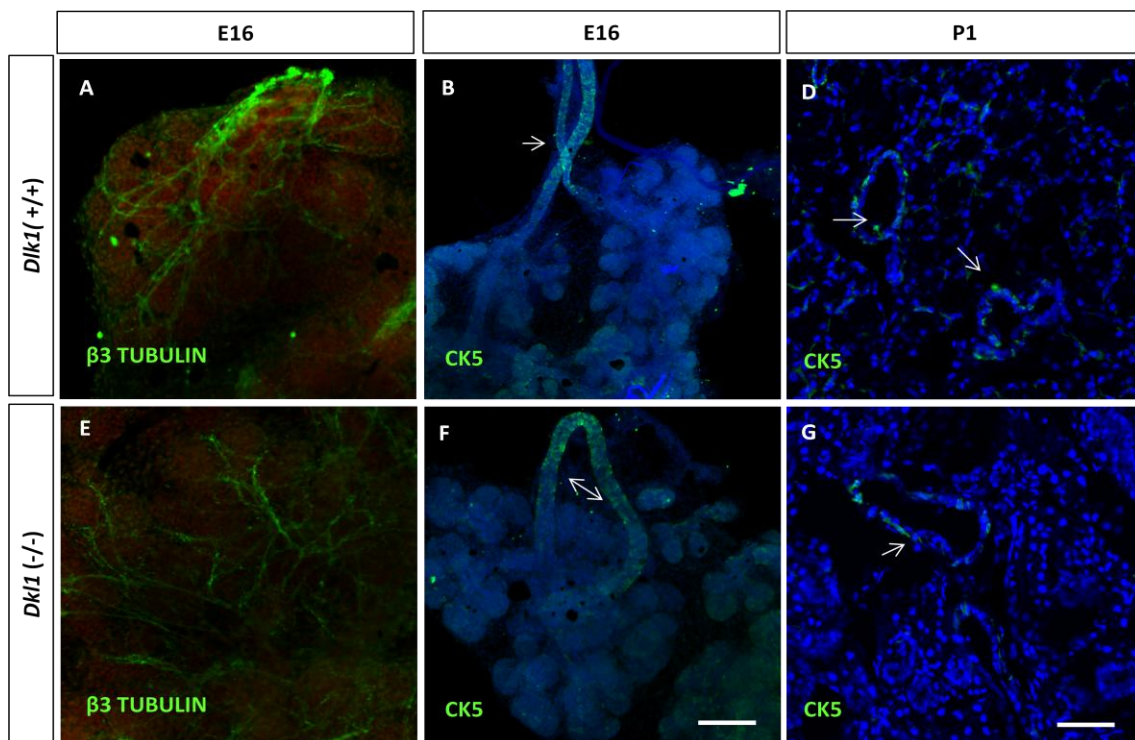
Bestalde, nahiz eta histologiak aldaketarik ez aurkeztu WT eta KOren artean, agian desberdintzapen markatzaile molekular mailen artean ezberdintasunak egon zitezkeen. Hau aztertzeko, *Aqp5* desberdintzapen markatzailea behatzea erabaki genuen.



39. Irudia. *Ck14* progenitore/ama zelula markatzailearen adierazpena areagotuta dago *Dlk1*(-/-) saguetan vs. *Dlk1* (+/+). qPCR geneen adierazpenaren analisisa (A) E14ko eta (B) P1eko SMGetan. *Fgf10*, *Aqp5* eta *Ck5*rako ez dago aldaketarik, baina *Ck14* hiru aldiz areagotuta dago bi garaietan. Datuak WTarekiko normalizatuta. Unpaired t Test;***p≤0.001.

Markatzaile hauek aztertzeko qPCR teknika erabili genuen. E14ko eta P1eko sagu *Dlk1* (-/-) eta *Dlk1* (+/+) SMGak erabili genituen. qPCRaren gene mailen analisiak *Fgf10*, *Aqp5* eta *Ck5*en adierazpen mailek aldaketarik ez zutela ezagutarazi ziguten. Haatik, *Ck14*en adierazpen maila hiru aldiz areagotuta zegoen *Dlk1* (-/-) saguetan *Dlk1* (+/+)ekin alderaturik (39.Irudia).

Emaitzak hauek berrezteko, SMGak *Ck5* eta *Ck14*en antigorputzekin tindatu genituen. Inerbazioa faktore oso garrantzitsua da ez bakarrik guruin helduaren fisiologia eta sekrezioa erregulatzeko, listu-guruinaren organogenesia erregulatzeko ere (Knox *et al.*, 2013; Knosp *et al.*, 2012). Enbrioiaren garapenean, adarkatze morfogenesiaren garaian, hazten dauden PSGen axoien eta adarkatzea egiten ari diren zelula epitelialen artean elkarrekintza bat ematen da. NOTCH inhibitzean, sDLK1ekin, SMGaren adarkatzea blokeatzen genuen PSGaren inerbazio galerarekin eta zelula epitelial CK5+en kopuruaren murrizketa eraginez. SMGak β III Tubulinarako ere tindatu genituen, *Dlk1* (+/+) eta (-/-) saguetan PSGa ikusteko.



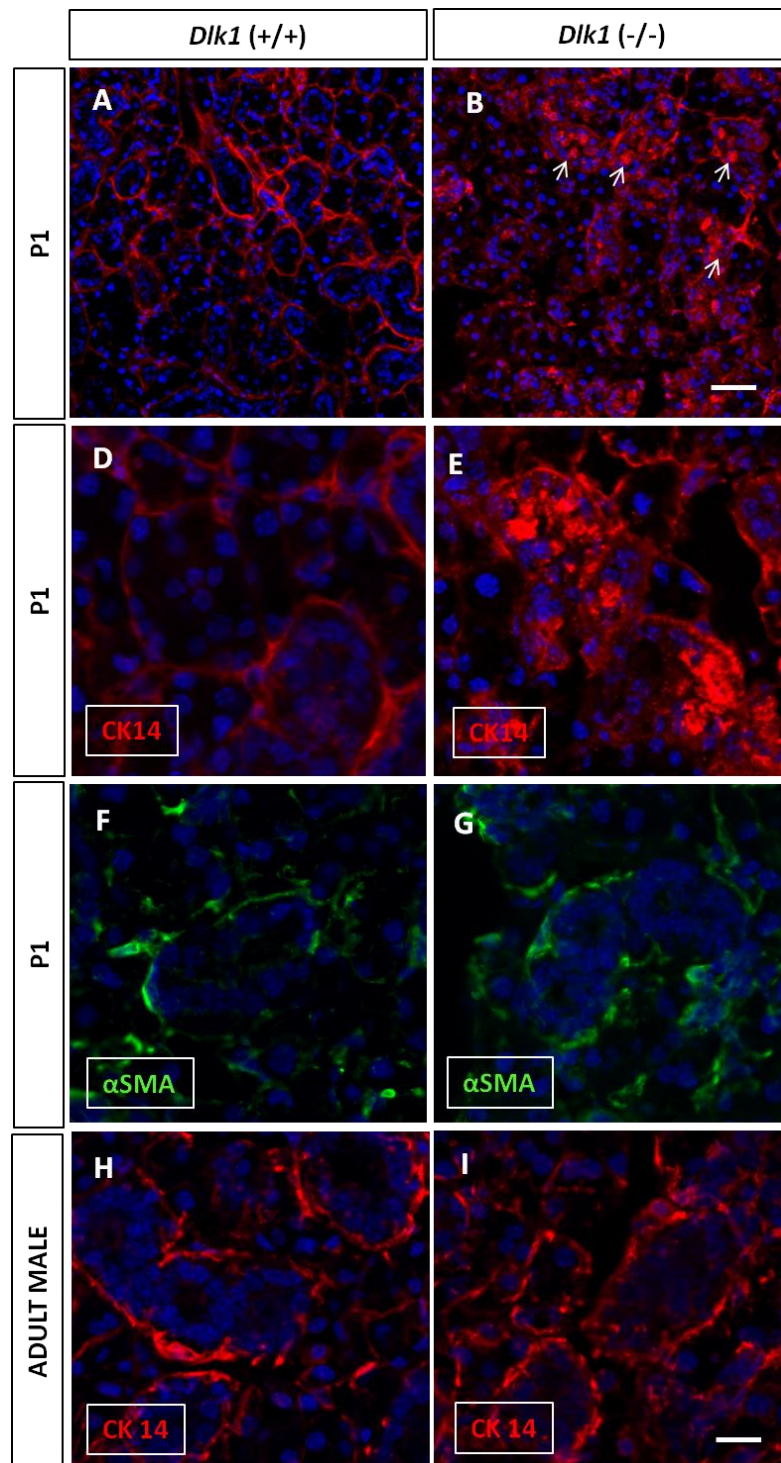
40.Irudia. PSGaren tindaketa eta CK5ren populazioa *Dlk1*(-/-) vs. *Dlk1*(+/+) saguetan. (A,E) inerbazioaren tindaketa, berdez, *Dlk1*(-/-) eta SMGen inerbazioa ez du aldaketarik erakusten. (B,F) zelula progenitore markatzailearen, CK5 tindaketa E16ko SMGetan, bai *Dlk1* (-/-) zein *Dlk1* (+/+) SMGetan. Zelula hauek hodi printzipalean kokaturik daude gehien bat. Zelula gutxi agertzen dira markaturik epitelio kimuetan. (D,G) zelula progenitoreen markatzailearen, CK5 tindaketa P1ko SMGetan, hodiedetako zelula epitelialetan kokaturik. (A,E,D,G) Eskala-barra: 50 μ m. (B,F) Eskala-barra: 150 μ m.

E16ko *Dlk1* (+/+) eta (-/-) saguen SMGak ehun osorako immunomarkatuak izan ziren β III Tubulina PSGko axoien markatzeilearekin. Tindaketa honekin axoiak garapeneko une honetako azinoetatik ondo hedaturik zeudela, hau da, inerbazioan malformaziorik ez zegoela ikusi genuen (4.Irudia.A,E). Gainera, CK5en aurkako antigorputza erabili genuen zelula progenitore epitelialak ikusi ahal izateko, bai E16 (40.Irudia.B, E) eta P1ean (40.Irudia.C, F). Zelula hauek normalean hodietan kokatzen dira, E16 eta P1ean ikusten genuen bezala.

Hala ere, ez genuen ezberdintasunik ikusi, ez PSGaren inerbazioan ezta CK5+ zeluletan (qPCRan ikusi genuenez) *Dlk1* (+/+) eta (-/-)en SMGak konparatu genituenean. Beraz, *Dlk1*en gabeziak ez du efekturik SMGaren garapeneko ezaugarri hauetan, genetikoki eraldatu diren saguetan.

qPCRaren emaitzen arabera, *Ck14*ren mRNAren adierazpen maila hiru aldiz areagotuta zegoen *Dlk1*(-/-)en SMGetan, bai E14 eta P1ean (39.Irudia.C). Emaitza honek CK14 proteina aztertzeraren eraman gintuen, eta *Dlk1* (+/+) eta (-/-) saguen P1eko SMGak immunomarkatu genituen. Espero genuen bezala, *Dlk1* (-/-)en SMGak CK14ren markaketa hedatuagoa erakutsi zigun (41.Irudia B,E).

WTaren P1eko SMG kontroletan, CK14ren markaketak sare-moduko itxuraren ezaugarriak dauzka. Zelula mioepitelialen zitoplasma luzea eta fina da, azino borobilak eta hodiak inguratuz aurkitzen direlarik. Aitzitik, adin bereko *Dlk1*(-/-)en SMGetan, zelula mioepitelialek ematen duten patroiaz aparte, beste CK14 zelula positiboak antzeman genituen hodian eta azinoren barruan, haietatik batzuk nahiko markaturik.



41. Irudia. CK14 epitelioko progenitore zelulen markatzailea *Dlk1*(-/-) vs. *Dlk1* (+/+) saguetan. Gorriz progenitore/ama zelulen CK14 markatzailearen tindaketa P1eko SMGetan, (A) *Dlk1* (+/+) saguetan eta (B) *Dlk1* (-/-) saguetan. Zelula hauek hodietako eta kimuetako zelula epitelialeak markatzen dituzte. (D,E) progenitore zelulen CK14 markatzailearen tindaketa sagu helduen SMGetan, hodietako zelula epitelialetako alde basalean kokaturik *Dlk1* (-/-) saguetan, WTetan berriz zelula mioepitelialetan bakarrik. (F,G) Berdez P1eko SMGak α SMA markatzaileerako tindaketa, espezifiki zelula mioepitelialeak markatzen dituena. Ez da diferentziarik ikusten zelula mioepitelialetan. (H,I) Emeen listu-guruin helduetan CK14 immunomarkaketak ohiko sare-moduko patroia erakusten du, zelula mioepitelialeak markatzen ditu hodi eta azinoak inguratuz. Ez daude desberdintasunik *Dlk1* (-/-) eta *Dlk1* (+/+) listu-guruin helduen artean. (A,B) Eskala-barra: 50 μ m. (D,E F,G,H,I) Eskala-barra: 20 μ m.

CK14, zelula epitelial progenitoreen markatzailea izateaz gain, hodiak eta azinoak inguratzen dituzten zelula mioepitelialak ere markatzen ditu (Grandi *et al.*, 2000). CK14 proteinaren eta genearen adierazpena areagotzeak zelula progenitoreekin erlasionaturik zelgoela edo zelula mioepitelialen hedapenarekin lotura zuen jakiteko, P1eko SMGen sekzioetan gihar lehunaren aktinaren (α SMA) aurkako immunomarkaketa bat egin zen. CK14ren markaketa ez bezala, α SMA listu-guruinetako zelula mioepitelialen berariazko markatzailea da. Markaketa honekin α SMA hodietako eta azinoetako ertzetan kokaturik zegoela, sare moduko patroia bereizgarria sortzen sortzen zegoela ikusi genuen. Patroi hau ezaguna egiten zitzaigun, *Dlk1*(+/+) saguaren P1eko SMGetan CK14 markatzailearekin agertzen zenaren antzekoa baitzen. Aitzitik, kasu honetan hodian eta azinoen barruan zelula α SMA positiborik ez genuen aurkitu, ez *Dlk1* (+/+) ezta *Dlk1* (-/-) listu-guruinen laginetan (41.Irudia.F,G). Emaitza honek, *Dlk1*(-/-) P1eko SMGetan aurkitutako CK14 populazio positiboak zelula mioepitelialekin erlasionaturik ez zegoela iradoki zigun. Hortaz, CK14+ zelula progenitoreak *Dlk1*(-/-) saguen SMGan hedatuago daudela ondorizatu genuen.

Beste aldetik, zelula progenitore hauen hedapenak iraun eta listu-guruin helduan mantentzea lortuko balu jakin nahi izan genuen. Helburu honekin, *Dlk1* (+/+) eta *Dlk1* (-/-) sagu helduen SMGei CK14ren markaketa egin genien. Halaber, ez genuen CK14ren populazio hedapenik aurkitu listu-guruin hauetan (41.Irudia.H,I). CK14 immunomarkaketa *Dlk1*(+/+) eta *Dlk1*(-/-) sagu helduen listu-guruinetan zelula mioepitelialetan soilik kokaturik zegoen. *Dlk1* (-/-) P1eko SMGetan aurkitu genituen ez bezala, listu-guruin helduetan ez genuen hodian eta azinoen barruko zelula CK14 positiborik topatu.

Laburbilduz, emaitza hauek zelula epitelial progenitore CK14+ en populazioa hedaturik dagoela berresten du *Dlk1* (-/-) saguen SMGetan. Halere, efektu hau badirudi iragankorra dela eta enbrioaren garapenera eta garai goiztiarretara mugatuta dagoela. Beraz, zelula CK14+ hauek ez dira listu-guruin helduan hedaturik topatzen.

5. EZTABAIDA

5.1 DLK1 ETA DLK2 SMG.AREN GARAPENEAN AGERI DIRA

DLK1 (Delta-like1, edo pG2, Pref1, FA-1, SCP-1 eta ZOG) mintz-zeharreko zein jariaturiko proteina izan daiteke, egoeraren arabera. DLK1 EGF-bezalako familia barnean dago, NOTCH hartzaileak eta lotugaiak bezala. Gizakietan, 14q32 kromosomako bandan dago kokaturik (Gubina *et al.*, 1999) birtualki DLK1en ezaugarri berdinak eta NOTCHen DLL1 lotugaiaren ezaugarri antzekoak zituen proteina bat ezagutarazi zuten (Nueda *et al.*, 2007b, Nueda *et al.*, 2008). Proteina honi DLK2 jarri zioten izena eta jakina EGF-bezalako familian sartu zen. Gizakietan, *Dlk2* 6p21.1 kromosoman kokaturik dago. RNA mezulari heldua, sei exoiz osaturik dago, DLK1ena baino exoi bat gehiago. Lehenengo exoiak ez du ezer kodifikatzen eta seigarrena luzeena da. DLK1 eta DLK2ren arteko antzekotasunak oso handiak dira, beraz, gene baten duplikazioz sortu zirela iradokitzen du (Nueda *et al.*, 2007a).

Saguetan *Dlk1*, garapenean dagoen gibelean, karena, guruin adrenaletan, garunean, barrabiletan, obulutegietan, eta maila baxuagoetan, giltzurrun, muskulu, timo eta bihotzean ageri da. Gainera, ehun guzti hauek *Dlk2* adierazten dute, guruin adrenal, area, muskulua eta bihotzak izan ezik. Laburbilduz, bi gene hauek maila ezberdinetan adierazten dira karenan, guruin adrenalean, garunean, barrabiletan, obulutegietan, giltzurrunean eta timoan (Nueda *et al.*, 2007a).

Lan honetan, DLK1 eta DLK2 listu-guruinaren hastapen garaitik garai morfogenetiko terminalerarte adierazten direla frogatu dugu.

DLK1 eta DLK2ren adierazpena aztertzean, proteina hauek listu-guruinaren garapenean zehar osagarritzko patroia zutela konturatu ginen. DLK1 zelula mesenkimal eta mioepitelialetan maila altuan adierazten zen. Aldiz, azinoetako zelula epitelialetan oso DLK1 gutxi zegoen, eta hodietan ezer ere ez. Bestalde, DLK2 epitelioan adierazten zen gehien bat, bereziki hodietan. Nahiz eta DLK1 garapeneko ehunetan ikertua egon, SMGan, hain zuzen ere E16.5ko (garai kanalikular-terminala) adinean baino ez da behatu (Yevtodiyyenko and Schmidt, 2006). Gainera, DLK2ri buruz ez dago ikerlanik SMGan.

Beste aldetik, DLK1 eta DLK2ren kontrako patroari buruz aipamen gehiago daude. Izan ere, beste mota zelular batzuetan ere ikusi da DLK1 eta DLK2ren arteko kontrako korrelazioa. Esatebaterako, enbrioien edo sagu helduen ehunetan DLK2ren adierazpena hedatuagoa agertzen da DLK1ena baino. Beste ikerkuntza batzuk deskribatu dute guruin adrenal helduak *Dlk1*en maila altuak adierazten dituela, *Dlk2* adierazten ez den bitartean (Laborda *et al.*, 1993). Gainera, *Dlk1* maila altuetan adierazten da enbrioien gibeletan, eta gibel helduan berriz ez da ageri, *Dlk2*k berriz kontrakoa egiten du. Sagu enbrioietan, bizitzako E16 egunaren ostean, *Dlk1*en adierazpenak beherakada bat egiten du, *Dlk2*renak gorantz egiten duen bitartean. Bi gene hauen adierazpenaren osagarritasuna erregulazio koordinatu baten menpean daudelaren ebidentzia da, ehun batzuetan behintzat (Nueda *et al.*, 2007b). Listu-guruinean gauza bera gertatzen da, *Dlk1*ek garapenean zehar beherantz egiten du enbrioia jaio arte eta aldi berean *Dlk2*k sagu helduan gora egiten du. Hala eta guztiz ere, SMGko DLK1 eta DLK2ren arteko kontrako adierazpen patroia honen funtzioa ez dakigu zein den, beraz, ikerkuntza gehiago behar ditugu hau argitzeko.

5.2 DLK1 ETA DLK2 NOTCH SEINALE BIDEAREN INHIBITZAILEAK DIRA

Gaur egun, ez du inork deskribatu *Dlk1*entzako hartzaile bakar bat. Halaber, ikertzaileek lanak kostata, DLK1 lotzen duten zenbait bikotekide identifikatu dituzte. Ondorioz, bikotekideak aztertuz proteina hauen akzio mekanismoa eta funtzioa ezagutu ditzakegu. Lotugai guzti hauek kontuan izan behar ditugu gure Konock-out saguaren fenotipoaren analisia aztertzean, DLK1en efektu pleiotropikoa azalduko baitu.

Bikotekideen artean, DLK1ek eta fribonektinaren karboxi mutur zatiarekin interakzioa egiten duela deskribatu da, honela efektu anti-adipogenikoa sortzen duela iradoki da, integrinek eragindako MEK/ERK seinalizazioaren aktibazioaren bitartez (Wang Y *et al.*, 2010). Beste aldetik, mintzera atxikitutako DLK1ek IGF (insulin-like growth factor) eta IGFBP1ek (IGF binding protein 1) elkarrekin sortzen duten konplexura lotzen dela ere esan da, honela, IGF hartzailearen seinalizazioa sustatuz (Nueda *et al.*, 2008).

DLK1 medioan dagoenean, mintzetik aske, MAPK (Mitogen activated protein kinase) eta MEK/ERK seinalizazio bideak aktibatzen direla eta adipogenesiaren inhibizioa eragin dezaketela esan zen (Kim KA *et al.*, 2007). Gainera, DLK1en efektua kondrozitoen desberdintzapena inhibitzean PI3K/AKT seinalizazioarekin erlazionatu da (Chen L *et al.*, 2011).

Beste autore batzuek NF- κ B bidearen aktibazioa adierazi dute DLK1en inhibizioaren azpi mekanismo bezala MSCen desberdintzapenean (Abdallah BM *et al.*, 2007). DLK1en adierazpena NF- κ B bidea aktibatzen du hBMSCetan (human bone stem cells), zitokina eta inmunitatearekin erlazionaturiko faktoreen produkzioa handituz, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL20 eta COX-2, esaterako. Faktore honen funtzioa osteoblastoen eta adipozitoen desberdintzapena inhibitzeagatik ezaguna da (Chang J *et al.*, 2013). DLK1erako sagu transgenikoetan antzeko mekanismo bat identifikatu da, DLK1ek eragindako hezur birxurgapenerako. DLK1 eta hantura erantzunaren arteko elkarrekintza beste lan batzuetan deskribatu da, erlazio bat aurkitu da DLK1 eta gantz ehun (Chacon MR *et al.*, 2013) eta muskulo eskeletikoko miotuboei (Abdallah BM *et al.*, 2007) jariaturiko hantura zitonkinen artean.

DLK1ek bikotekide guzti hauekin elkarri eragin arren, lehenengo ebidentziak, legami-bi-hibrido sistema erabiliz, DLK1 NOTCH1 hartzaillearen EGF-bezalako 12/13 errepikapenei lotzen zela frogatu zuen (Nueda *et al.*, 2007b). DLK1 NOTCH hartzailera atxikitzean, NOTCH1en seinalizazio basala inhibitzen zuen, HES1 gene ituaren adierazpena gutxituz, eta ondorioz adipogenesiaren inhibizioa lortuz (Sanchez-Solana *et al.*, 2011). Berriki, DLK1en eredu animaliak erabiliz, funtzioa galtzea edo irabaztea eragiten dutenak, DLK1ek NOTCH hartzailen inhibizioaren bitartez angiogenesisia inhibitzen zuela esan zen (Rodriguez *et al.*, 2012).

DLK1 eta DLK2 listu gurunaren garapenean agertzen direnez, eta ikerkuntzak proteina hauek NOTCH hartzaillearekin elkareragiten dutela esaten zutenenez, gizakien listu-guruineko HSG lerro zelularra erabili genuen, eta luziferasa entsegu baten bidez, DLK1ek NOTCH1 hartzailen zuten funtzioa ikertu genuen.

Esperimentu honekin DLK1 eta DLK2 HSG zeluletan NOTCH1en hartzailearen lotugai ez-kanonikoak zirela egiaztatu genuen, beste sistema batzuetan lehenago adierazi izan zen bezala (Nueda *et al.*, 2007b; Sanchez Solana *et al.*, 2011). NOTCH familiako bi lotugai ez-kanoniko hauek, hartzailearen aktibazioa inhibitzen zutela berretsi genuen.

Hala ere, ezin dugu egiaztatu DLK1ek NOTCH hartzailearen bitartez bakarrik egiten duela bere funtzioa. Izan ere, beste sistema batzuetan esan den bezala, fibronektina bezalako proteinek, IGFa edo NF-kB, DLK1ekin elkarri eragin diezaiokete. Beraz, berdin gerta liteke listu-guruinean ere, baina hau frogatzeko ikerkuntza gehiago beharko litzateke.

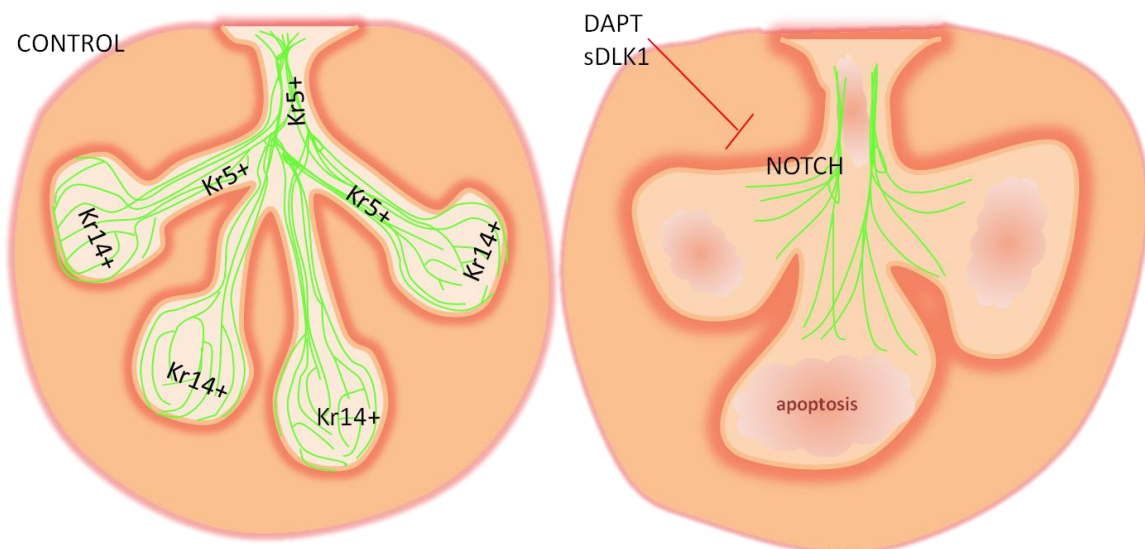
Era berean, NOTCH seinalizazio bidean lotugaiek eragindako inhibizioak, efektua daukate enbrioiaren garapenean (Iso *et al.*, 2003), ama zelulen mantentze lanetan (Yamamoto *et al.*, 2003; Chiba, 2006), ehun helduen homeostasian (Schwanbeck *et al.*, 2008), eta etorkizun-espezifikoaren desberdintzapenean (Apelqvist *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2006). Gainera, DLK1ek zelulak egoera proliferatiboan mantentzen dituela jakina da, eta progenitore/ama zelulen sorkuntzaren erregulatzailerik negatibo bat dela, adipogenesis, angiogenesis, neurogenesis edo hematopoiesian bezalako prozesuetan (Al Haj Zen and Maddedu, 2012; Ferron *et al.*, 2012; Mirshekar-Syahkal *et al.*, 2012). Testuinguru honetan, sDLK1en erabilerak SMGeen hazkunde organotipikoetan, listu-guruinaren garapeneko hasieran, hazkuntzan edota adarkatze morfogenesisian efekturik izan zuen jakin nahi genuen.

5.3 NOTCH SEINALIZAZIOAREN INHIBIZIOAK GARAPENeko SMG. EN ADARKATZE MORFOGENESIA ETA PSG.AREN INERBAZIOA KALTETZEN DITU

NOTCH seinalizazioaren rola SMGaren garapenean ez da guztiz ulertzen oraindik. Gure esperimentuetan sDLK1 proteina bakarrik erabili dugu, DLK1en zelulaz kanpoko proteina domeinua askatua, aktiboa dela deskribatu baita. DLK2ren kasuan ordea, oraindik ez da deskribatu mintzetatik askatutako formarik dagoen. Gure buruari galdetzen diogu ea DLK2k SMGaren garapenean eraginik izango duen. Ikertzeak mereziko luke.

Lan honetan argi erakusten dugu sDLK1en gehikuntzak SMGeen hazkuntza organotipikoetan, SMGaren hazkuntzan eta adarkatze morfogenesisian efektu negatiboa duela.

sDLK1, lotugai natural inihibitzaile honen efektua, eta NOTCH seinalizazioaren inihibitzaile farmakologikoak, DAPT, sortutako efektuak oso antzekoak ziren. sDLK1ekin hazitako SMGetan N1ICDren proteina markaketak beherantz egiten zuenez DLK1ek SMGetan NOTCH seinalizazio bideak inhibitzen zuela frogatuz. Inhibizioa SMGaren morfogenesisian eta adarkatze itxuran islatzen zen. SMGen hazkuntza organotipikoak, NOTCH inihibitzaileekin hazten zirenean, azino gutxiago sortzen zituzten eta azino hauek zabalagoak ziren. Gainera azino zabal hauen barruko gune ilun batzuk, zelula apoptotikoz beterik zeuden, kaspasa markaketa eta TEM teknikari esker ikusi gnuenez (irudian azaltzen den moduan).



Gainera, NOTCH seinalizazioaren inhibizioak adarkatzean sortutako kalteak inerbazioaren murrizketarekin zerikusia zuela ikusi genuen. PSGaren axoiak ez ziren epitelio kimuetara heltzen, ezta hauek inguratzen ere, *in vitro*ko SMG kontrolekin alderatuz (berdez irudikatuta aurreko marrazkian).

Badakigu inerbazio parasinpatikoa listu-guruinaren hazkundearekin batera ematen dela. Enbrioi garapen goiztiarreko garaietan, gangliogenesisia eta inerbazio parasinpatikoa SMGaren epitelioaren hazkuntzarekin batera ematen da (Coughlin,

1975; Knox *et al.*, 2010, Knox *et al.*, 2013). Bestalde, SMGaren epitelioaren morfogenesiak PSGaren inerbazioa behar du, Azetilkolina eta hartzaile muskarinikoaren aktibitatea epitelioan (Knox *et al.*, 2010). Badira urteak NOTCHek neuronan adarkatzen efektu sakonak zituela aztertu zela (Berezovska *et al.*, 1999; Sestan *et al.*, 1999; Redmond *et al.*, 2000), baina, orain dela gutxi egin diren esperimentuek, neurona berrietarako dendriten *in vivo* adarkatzea, NOTCH hartzailearen funtzioaren galera edo gehikuntza dosi-menpean ematen dela iradoki dute (Breunig *et al.*, 2007).

Hau gutxi balitz, NOTCH1 hipokanpoko zelula ama edo progenitoreen biziraupenerako beharrezkoa da, eta neurogenesi zein gangliogenesiaren erregulazioan oso garrantzitsua da, bai nerbio-sistema periferikoan bai zentrolean (Taylor *et al.*, 2007, Ables *et al.*, 2010, 2011). NOTCH seinalizazioa gainera beharrezkoa da Schwann zelulen sorkuntzarako sagu enbrioaren garapenean zehar (Woodhoo *et al.*, 2009), PSGaren neuronan axoien hedadurarekin erlazionaturik egon daitekeena. Hala ere, ez dakigu zehazki zein mekanismo erabiltzen duten sDLK1 eta DAPTK SMGaren inerbazioa murrizteko.

Gure emaitzek, NOTCH seinalizazioaren inhibizioak listu-guruinaren adarkatze morfogenesia eta PSGaren hazkundera biziki kaltetzen duela erakutsi dute. Egoera hau, SMG epitelioko zelula progenitore CK5-en murrizketan islatzen da. Erlazio bat baitago inerbazio eta zelula CK5-en artean. SMGaren garapenean inerbazio parasinpatikoak zelula CK5-en populazioa mantentzen du (Knox *et al.*, 2010), aurretik argitaratutako emaitzek diotenaren arabera.

Are gehiago gure esperimentuek NOTCH seinalizazioaren inhibizioak epitelioan beran ere efektuak dituela ezagutarazi dute. SMGtik isolatutako epitelioko sDLK1ekin 48 orduz hazi ostean kontrolaren itxura bereizgarria galtzen baitu (3D lamininan F10.HSekin hazitako epitelioko). Beraz, NOTCH seinalizazioaren inhibizioak adarkatze morfogenesian efektua dauka, garapenean dauden PSGen axoien dentsitatea murriztu eta epitelioaren osotasuna kaltetu egiten dituelako.

5.4 AKTIBAZIO KOLINERGIKOAK NOTCH INHIBITUTA DUTEN SMG. EN MORFOGENESIA BERRESKURATZEN DU

Gure emaitzen arabera, listu-guruinaren garapen normala sDLK1ek NOTCH hartzailean eragindako akzioaren arabera ematen da. Gainera, DLK1 eta DAPTk PSGko axoien hazkuntzetan eragindako inhibizioa nolabait berreskuratu daiteke CChren estimulazio kolinerjikoarekin. Alabaina, adarkatze morfogenesia ezin izan zen hobetu SMGak aldi berean CChrekin eta sDLK1 edo DAPTrekin hazten zirenean.

Esperimentu honek, SMGaren garapenean NOTCH seinalizazioa inhibitua dagoenean, inerbazioaz aparte beste faktore batzuk parte hartzen dutela erakutsi zigun. Esaterako, NOTCH inhibitzean epitelioan bertan eragindako efektua.

sDLK1 edo DAPT bitarteko NOTCH seinalizazioaren inhibizioak adarkatze morfogenesian sortutako kalteek, zelulen proliferazioan eraginik ez zutenez eta azinoak zabalagoak zirenez, epitelioaren arrakalen sorreran eragina zuela izan zen gure hipotesia. Izan ere, epitelio arrakalen sorrera zelula hauen proliferaziotik era independentean gertatzen da (Nakanishi *et al.*, 1987). Hala ere, ez dakigu zehazki zeren menpe dagoen arrakalen sorrera hau.

Beste azalpen bat NOTCH inhibitzeak eta zelula epitelialen apoptosiaren arteko lotura izango litzateke. Progenitore/ama zelulen CK5+ eta CK14+ak apoptosian agertu bezain laster, zelula hauek desberdintzatu barik, listu-guruina heldutasunera heltzea ekidin egon dezake. CChrekin, inerbazioa berreskuratutako baldintzengan ere berdina gertatzen zen.

Guztira, gure datuek DLK1ek NOTCH seinalizazioaren inhibizio bitartez epitelioaren adarkatze morfogenesia eta PSGko neuronon hazkuntza erregulatzen duela iradokitzen dute. Gainera, DLK1 SMGaren zelula epitelial progenitoreen erregulatzailer negatiboa izan liteke.

5.5 *Dlk1* (-/-) SAGUAREN LISTU-GURUINAK TXIKIAGOAK DIRA ETA CK14 PROGENITOREEN MARKATZAILEA AREAGOTUA DAUKATE

Dlk1 inpronta genetikoa daukan gene bat da, da aitengandik jasotako kromosometan bakarrik espresatzen da (Schmidt *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2000). Inpronta duten geneek funtzio garrantzitsuak dituzte enbrioi hazkunderaren kontrolean eta garapenean (Murphy & Jirtle, 2003; Rand & Cedar, 2003; Wilkins & Haig, 2003) eta *Dlk1* ez da salbuespen bat.

DLK1en dosi bikoitza espresatzeko genetikoki eraldaturiko sagu enbrioiek, DLK1en inpronta galtzea esan nahi duena, jaio bezain pronto ehiltzen dira, nahiz eta bigarren kopia hau enbrioi hazkunderako abantaila bat izango zela pentsa baliteke ere (da Rocha *et al.*, 2009).

*Dlk1*en gabezia duten saguek, lan honetan erabilitakoak, gorputz pisu arinagoa dute (Moon *et al.*, 2002; Raghunandan *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2013). Gure lanean, animalia hauek WTekin alderatuz txikiagoak eta arinagoak direla berretsi dugu. Gainera, pisu murrizketa hau bereziki nabarmena zen listu-guruinaren kasuan. Listu-guruinaren pisua murrizketa esanguratsua bitzen gorputz osoko pisuarekiko errefentziatzen zenean ere.

Azalpen ezberdinak eman diezaizkiokegu efektu espezifiko honi. *Dlk1* listu-guruinaren garapenean zehar espresatzen da. DLK1 GH/IGF-1en ardatz somatotrofoaren erregulatzailea da (Abdallah *et al.*, 2007), eta garrantzitsua da hazkuntzan dauden animalien gorputz tamaina erregulatzeko (Olney *et al.*, 2003; Ohlsson *et al.*, 2000). Pituitarioan DLK1 GH jariatzen duten zelula bereberetan espresatzen da, beraz, GHren ekoizpenean funtzioa inhibitzailea duela proposatu da (Ansell *et al.*, 2007). Hortaz, sagu *Dlk1* (-/-)etan, GHren mRNA maila altuetan espresatzen zela aztertu zen (Puertas-Avenidaño *et al.*, 2011). Halaber, saguek GH maila altuetan ekoitziko balute, sagu hauen listu-guruin fenotipoa txikiagoa izan beharrean handiagoa izango litzateke, azalpen albo batera baztertuz.

Beste aldetik, omatotrofoko zeluletarako kondizionalak *Dlk1*(-/-) saguak, ez zuten hazkuntzaren aldaketa fenotiporik aurkeztu (Appelbe *et al.*, 2013). Beraz, zentzudunagoa izango litzatekeen azalpena, DLK1ek IGF-1i lotzen diren proteinak ere erregulatzen dituela izango liteke (Nueda *et al.*, 2008), hazkuntzaren sustapen edo errepresio efektua kontestuaren arabarera aldatuz. Era berean, garrantzitsua da kontuan hartzea IGF-1 listu-guruinaren garapenaren zehar espresatzen dela (Jaskoll & Melnick, 1999), eta honen desregulazioak listu-guruinak tamaina txikiagoa edukitzea eragingo lukeela. Are gehiago, sagu hauek beste hormona endokrinoen mailak areagotuak dituztela erakutsi da, leptina bezala (Puertas-Avenidaño *et al.*, 2011), metabolismo sistemikoaren aldaketetan isladatu ahal dena. Aipatu beharra dago, listu-guruinen garapena akzio endokrinoekiko sensibleak direla, gehienbat hormona sexualekiko (Kontinnen *et al.*, 2010), eta oreka endokrino-metaboliko orokorrean edozein aldaketak listu-guruinaren tamainan eragina izango luke.

Bestalde, listuaren ekoizpena sagu KOetan murriztua dago. Gure ustez WTarekiko aurkeztutako diferentzia hau listu-guruinaren tamainagatik gertatzen da. Adin bereko saguak aukeratu genituen, 8 hilabetekoak, lan honetan dihardugun ikerlariok listu-guruinaren itxura eta funtzionaltasunaren aldaketak adinarekin ematen direla baitakigu, aho lehorra bezala (Choi *et al.*, 2013). Halaber, Xerostomia jasaten duten pazienteen moduan, (aho lehorren sindromea) parotida bolumenaren ~%40a galtzen dute (Teshima *et al.*, 2010) ondorioz listu-guruinaren funtzioa murriztuz eta listu gutxiago ekoiztuz. Beraz, gure hipotesia, sagu *Dlk1* (-/-)ek *Dlk1* (+/+)ekin alderatuz listu-guruin txikiagoak dituztenez ezin izango luketela hainbeste listu ekoiztu izan zen.

Bestetik, sagu *Dlk1* (-/-)en listu-guruinen morfologia behatu genuen; garapeneko garai ezberdinetako listu-guruinak eta sagu helduren SLG, SMG eta PGak H/Erekin tindatu genituen. Histologiak ez zuen diferentzia handirik erakutsi eta hodiak behatu genituen. Hodiak listuaren konposaketa aldatzen dute bere sekzioetatik garraiatzen den heinean, listua soluzio hipotoniko bihurtuz (Catalán *et al.*, 2009). Karraskiaretan GCTak eta hodi ildaskatuak sekzio handiena dituzten hodiak dira. Nahiz eta handiepen askotan TEMarekin ikusi, ez genituen diferentziarik nabaritu. Osteon, listu-guruinak alcian urdinarekin tindatu genituen ere, muzinen kantitatea ikusteko, baina *Dlk1* (+/+) eta

Dlk1 (-/-)en muzinen kantitatea oso antzekoa zen. Ondorioz, *Dlk2k* listu-guruinean *Dlk1*en gabezia konpentsatzen egon ahal izango zitekeela pentsatu genuen, gure emaitzek ordea ez zuten *Dlk2*ren adierazpen mailak areagotuta zeudenik erakutsi, ezta proteina mailan, beraz, mekanismo hau ez konpentsazio genetiko moduan zela ona pentsatu genuen.

Datu guzti hauek kontuan hartuta, listuaren ekoizpenean ikusitako diferentzia *Dlk1* (+/+) eta *Dlk1* (-/-)en artean, listu-guruinen tamainari egotzen diogu. Gure datuek listu-guruinaren tamaina listu ekoizpenarekin erlazionaturik dagoela iradoki dute. Hortaz, *Dlk1* (-/-) saguaren listu-guruin txikiagoek listu gutxiago ekoiztuko dute (Teshima *et al.*, 2010). Listu-guruinaren tamaina/gorputz pisuarekiko, indize ona da arrek emeek baino listu gehiago jariatzen dutela azaltzeko. Beste autore batzuk ere deskribatu dute gizakietan sexuarekin erlazionaturiko listu jario tasa ezberdinak, listu-guruinaren tamainarekin erlazionatuta daudela (Inoue H *et al.*, 2006).

Hala eta guztiz ere, aldaketarik ikusi ez genituenez, maila molekularrean aldaketak egon zitezkeela pentsatu genuen eta beste markatzaile ezberdinen adierazpen mailak aztertu genituen. Ez genuen ezberdintasunik aurkitu *Aqp5* edo *Fgf10* desberdintzapen markatzeileen artean. Aldiz, *Ck14* ama/progenitore zelulen markatzailearen adierazpena areagotuta zegoen *Dlk1* (-/-) saguen P1eko SMGetan. Markatzaile hau, tindaketaz ikusi dugunez, hodiedan eta azinoetako zenbait zelula epitelialetan adierazten dela nabaritu dugu.

SMG osasuntsuetan DLK1 garapeneko E12 egunean hasten da espresatzen eta adierazpen -maila areagotzen dihoa progenitoreen hedapenarekin bat eginez. Garapen garai hauetan zehar progenitore zelulak, CK14+ zelulak, hedatu egiten dira eta epitelio arrakalen sorreraren prozesua hasten da azinoak sortuz, adarkatze morfogenesia deritzona. E18an listu-guruinek desberdintzapen prozesua hasten dute, hemen DLK1en maila murriztu egiten delarik SMG helduan oso maila baxuan espresatu arte. Aldi berean, *Aqp5* desberdintzapen markatzailearen mailak gradualki areagotzen dira SMGak heldutasuna lortu arte.

DLK1en eta CK14 progenitoreen erlazioa kontuan izanda, SMG hazkunde organotipikoetan DLK1en maila altuak organoaren morfogenesia kaltetzen zuen eta progenitoreak hiltzen zihoazten. DLK1ek zelulak proliferazio egoeretan mantentzen zituen, adartzeko eta arrakalak sortzeko ahalmena ekidinez. Aitzitik, DLK1 SMGan ez dagoenean, *Dlk1(-/-)* saguetan, gure hipotesia zelula progenitoreen populazioa ezin dela ondo erregulatu eta ondorioz CK14+ populazioa areagotuta agertzen dela da. Beste azalpen bat, progenitore zelulen desberdintzapenean pairatutako erroreek, listu-guruinaren tamainan negatiboki eragingo luketela da, listuaren ekoizpenean murrizketa bat sortuz, *Dlk1(-/-)* saguetan ikusten dugun bezala. baina hipotesi hau ez dago oraindik frogatuta.

Beste ikerkuntza batzuetatik DLK1 ama zelulen berrikuntzarako erregulatzailer garrantzitsua dela dakigu. Bere adierazpen mailen aldaketak adipogenesi, angiogenesi, neurogenesi eta hematopoiesiarekin (Al Haj Zen and Maddedu, 2012; Ferron *et al.*, 2011; Mirshekar-Syahkal *et al.*, 2013) erelazionaturik daude. Gure ikerketan *Dlk1*en gabeziak SMGaren CK14+ progenitore zelulen populazioa areagotzera darama, DLK1 amatasun orekarako garrantzitsua dela berriro nabarmenduz.

6. ONDORIOAK

Tesi honetan lortutako emaitzak kontuan hartuta, hurrengo ondorioak atera genituen:

- I. DLK1 eta DLK2 listu-guruinaren garapenaren zehar espresatzen ziren eta osagarritzko adierazpen patroia zutenez proteina hauek listu-guruinaren morfogenesisian funtzio garrantzitsua eduki dezaketela iradokitzen gaitu.
- II. DLK1 eta DLK2 lotugai ez-kanonikoak NOTCH seinalizazio bidearen inhibitzaileak dira. NOTCH seinalizazioaren inhibizioa, sDLK1 edo DAPTrekin, SMGen adarkatze morfogenesiarako erabakigarria zen; inerbazioaren hazkuntzan, epitelioaren adarkatzean eta kimuen barruko zelula progenitore epitelialen biziraupenean efektua zeukalako.
- III. Aktibazio kolinergikoak, CChren adizioarekin, NOTCH inhibizioak kaltetutako SMGen adarkatze morfogenesisia berreskuratu zezakeen.
- IV. *Dlk1* (-/-) saguen listu-guruinetan progenitore/ama zelula epitelialen areagotzea garapenean gerta litekeen zelulen desberdintzapen hutsegitearekin erlazionaturik egon liteke. Gertaera honek efektu negatiboa izango luke listu-guruinaren tamainan eta ondorioz listuaren jariakian murrizketa bat gertztuko litzateke.

Laburbilduz, lan honek NOTCH seinalizazioko lotugai ez-kanonikoen, DLK1 eta DLK2en, garrantzia deskribatzen du saguen listu-guruin morfogenesisian eta inerbazioaren garapenean. Gainera, DLK1en adierazpen mailak guruinaren garapenean balantze fina behar du ama izateko ahalmena erregulatzeko, hau da, ama zelula izateko bidea sustatzeko edo ostapatzeko oreka kontrolatzeko.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abdallah B.M., Jensen C.H., Gutierrez G., Leslie R.G., Jensen T.G. & Kassem M. (2004) Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **19**, 841-852.
- Abdallah B.M., Ding M., Jensen C.H., Ditzel N., Flyvbjerg A., Jensen T.G., Dagnaes-Hansen F., Gasser J.A. & Kassem M. (2007) Dlk1/FA1 is a novel endocrine regulator of bone and fat mass and its serum level is modulated by growth hormone. *Endocrinology*, **148**, 3111-3121.
- Ables J.L., Decarolis N.A., Johnson M.A., Rivera P.D., Gao Z., Cooper D.C., Radtke F., Hsieh J. & Eisch A.J. (2010) Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **30**, 10484-10492.
- Ables J.L., Breunig J.J., Eisch A.J. & Rakic P. (2011) Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nature reviews.Neuroscience*, **12**, 269-283.
- Al Haj Zen A. & Madeddu P. (2012) DLK1: a novel negative regulator of angiogenesis? *Cardiovascular research*, **93**, 213-214.
- Andersen D.C., Laborda J., Baladron V., Kassem M., Sheikh S.P. & Jensen C.H. (2013) Dual role of delta-like 1 homolog (DLK1) in skeletal muscle development and adult muscle regeneration. *Development (Cambridge, England)*, **140**, 3743-3753.
- Ansell P.J., Zhou Y., Schjeide B.M., Kerner A., Zhao J., Zhang X. & Klibanski A. (2007) Regulation of growth hormone expression by Delta-like protein 1 (Dlk1). *Molecular and cellular endocrinology*, **271**, 55-63.
- Apelqvist A., Li H., Sommer L., Beatus P., Anderson D.J., Honjo T., Hrabe de Angelis M., Lendahl U. & Edlund H. (1999) Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*, **400**, 877-881.
- Appelbe O.K., Yevtodiyenko A., Muniz-Talavera H. & Schmidt J.V. (2013) Conditional deletions refine the embryonic requirement for Dlk1. *Mechanisms of development*, **130**, 143-159.
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D. & Lake R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y.)*, **284**, 770-776.
- Atkinson W.B., Wilson F. & Coates S. (1959) The nature of the sexual dimorphism of the submandibular gland of the mouse. *Endocrinology*, **65**, 114-117.
- Avery J. (2002) Oral development and histology. *New York: Thieme*, .
- Ayaz F. & Osborne B.A. (2014) Non-canonical notch signaling in cancer and immunity. *Frontiers in oncology*, **4**, 345.
- Baladron V., Ruiz-Hidalgo M.J., Nueda M.L., Diaz-Guerra M.J., Garcia-Ramirez J.J., Bonvini E., Gubina E. & Laborda J. (2005) dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Experimental cell research*, **303**, 343-359.

Bibliografia

- Berezovska O., McLean P., Knowles R., Frosh M., Lu F.M., Lux S.E. & Hyman B.T. (1999) Notch1 inhibits neurite outgrowth in postmitotic primary neurons. *Neuroscience*, **93**, 433-439.
- Blanpain C., Lowry W.E., Pasolli H.A. & Fuchs E. (2006) Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes & development*, **20**, 3022-3035.
- Bouma I., Pijpe J. & Vissink A. (2003) Sjogren' syndrome: a progressive disease. *Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde*, **110**, 316-320.
- Breunig J.J., Arellano J.I., Macklis J.D. & Rakic P. (2007) Everything that glitters isn't gold: a critical review of postnatal neural precursor analyses. *Cell stem cell*, **1**, 612-627.
- Catalan M.A., Nakamoto T. & Melvin J.E. (2009) The salivary gland fluid secretion mechanism. *The journal of medical investigation : JMI*, **56 Suppl**, 192-196.
- Chacon M.R., Miranda M., Jensen C.H., Fernandez-Real J.M., Vilarrasa N., Gutierrez C., Naf S., Gomez J.M. & Vendrell J. (2008) Human serum levels of fetal antigen 1 (FA1/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro. *International journal of obesity (2005)*, **32**, 1122-1129.
- Chang J., Liu F., Lee M., Wu B., Ting K., Zara J.N., Soo C., Al Hezaimi K., Zou W., Chen X., Mooney D.J. & Wang C.Y. (2013) NF-kappaB inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting beta-catenin degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 9469-9474.
- Chen L., Qanie D., Jafari A., Taipaleenmaki H., Jensen C.H., Saamanen A.M., Sanz M.L., Laborda J., Abdallah B.M. & Kassem M. (2011) Delta-like 1/fetal antigen-1 (Dlk1/FA1) is a novel regulator of chondrogenic cell differentiation via inhibition of the Akt kinase-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 32140-32149.
- Cheung L.Y., Rizzoti K., Lovell-Badge R. & Le Tissier P.R. (2013) Pituitary phenotypes of mice lacking the notch signalling ligand delta-like 1 homologue. *Journal of neuroendocrinology*, **25**, 391-401.
- Chiba S. (2006) Notch signaling in stem cell systems. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **24**, 2437-2447.
- Chillakuri C.R., Sheppard D., Lea S.M. & Handford P.A. (2012) Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies. *Seminars in cell & developmental biology*, **23**, 421-428.
- Choi J.S., Park I.S., Kim S.K., Lim J.Y. & Kim Y.M. (2013) Analysis of age-related changes in the functional morphologies of salivary glands in mice. *Archives of Oral Biology*, **58**, 1635-1642.
- Coughlin M.D. (1975) Target organ stimulation of parasympathetic nerve growth in the developing mouse submandibular gland. *Developmental biology*, **43**, 140-158.
- da Rocha S.T., Charalambous M., Lin S.P., Gutteridge I., Ito Y., Gray D., Dean W. & Ferguson-Smith A.C. (2009) Gene dosage effects of the imprinted delta-like homologue 1 (dlk1/pref1) in development: implications for the evolution of imprinting. *PLoS genetics*, **5**, e1000392.

- Dang H., Lin A.L., Zhang B., Zhang H.M., Katz M.S. & Yeh C.K. (2009) Role for Notch signaling in salivary acinar cell growth and differentiation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **238**, 724-731.
- Dudek R. & Fix J. (1998) Embryology. *Baltimore: Williams and Wilkins*, .
- Falix F.A., Aronson D.C., Lamers W.H., Hiralall J.K. & Seppen J. (2012) DLK1, a serum marker for hepatoblastoma in young infants. *Pediatric blood & cancer*, **59**, 743-745.
- Ferron S.R., Charalambous M., Radford E., McEwen K., Wildner H., Hind E., Morante-Redolat J.M., Laborda J., Guillemot F., Bauer S.R., Farinas I. & Ferguson-Smith A.C. (2011) Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis. *Nature*, **475**, 381-385.
- Fiuza U.M. & Arias A.M. (2007) Cell and molecular biology of Notch. *The Journal of endocrinology*, **194**, 459-474.
- Fleming R.J. (1998) Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in cell & developmental biology*, **9**, 599-607.
- Fleming R.J., Gu Y. & Hukriede N.A. (1997) Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the Drosophila wing imaginal disc. *Development (Cambridge, England)*, **124**, 2973-2981.
- Floridon C., Jensen C.H., Thorsen P., Nielsen O., Sunde L., Westergaard J.G., Thomsen S.G. & Teisner B. (2000) Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation; research in biological diversity*, **66**, 49-59.
- Frise E., Knoblich J.A., Younger-Shepherd S., Jan L.Y. & Jan Y.N. (1996) The Drosophila Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 11925-11932.
- Grandi D., Campanini N., Becchi G. & Lazzaretti M. (2000) On the myoepithelium of human salivary glands. An immunocytochemical study. *European journal of morphology*, **38**, 249-255.
- Greenwald I. (1998) LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes & development*, **12**, 1751-1762.
- Gresik E.W. (1994) The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. *Microscopy research and technique*, **27**, 1-24.
- Gresik E.W. (1980) Postnatal developmental changes in submandibular glands of rats and mice. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, **28**, 860-870.
- Gridley T. (2003) Notch signaling and inherited disease syndromes. *Human molecular genetics*, **12 Spec No 1**, R9-13.

Bibliografia

- Gubina E., Ruiz-Hidalgo M.J., Baladron V. & Laborda J. (1999) Assignment of DLK1 to human chromosome band 14q32 by in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics*, **84**, 206-207.
- Haara O., Fujimori S., Schmidt-Ullrich R., Hartmann C., Thesleff I. & Mikkola M.L. (2011) Ectodysplasin and Wnt pathways are required for salivary gland branching morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, **138**, 2681-2691.
- Hansson E.M., Lendahl U. & Chapman G. (2004) Notch signaling in development and disease. *Seminars in cancer biology*, **14**, 320-328.
- Hartenstein A.Y., Rugendorff A., Tepass U. & Hartenstein V. (1992) The function of the neurogenic genes during epithelial development in the Drosophila embryo. *Development (Cambridge, England)*, **116**, 1203-1220.
- Heitzler P. & Simpson P. (1991) The choice of cell fate in the epidermis of Drosophila. *Cell*, **64**, 1083-1092.
- Hermida C., Garces C., de Oya M., Cano B., Martinez-Costa O.H., Rivero S., Garcia-Ramirez J.J., Laborda J. & Aragon J.J. (2008) The serum levels of the EGF-like homeotic protein dlk1 correlate with different metabolic parameters in two hormonally different children populations in Spain. *Clinical endocrinology*, **69**, 216-224.
- Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T. & Endo F. (2004) Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **39**, 667-675.
- Hosoi K., Kobayashi S. & Ueha T. (1978) Sex difference in L-glutamine D-fructose-6-phosphate aminotransferase activity of mouse submandibular gland. *Biochimica et biophysica acta*, **543**, 283-292.
- Hukriede N.A., Gu Y. & Fleming R.J. (1997) A dominant-negative form of Serrate acts as a general antagonist of Notch activation. *Development (Cambridge, England)*, **124**, 3427-3437.
- Inoue H., Ono K., Masuda W., Morimoto Y., Tanaka T., Yokota M. & Inenaga K. (2006) Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes. *Archives of Oral Biology*, **51**, 1055-1060.
- Iso T., Hamamori Y. & Kedes L. (2003) Notch signaling in vascular development. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **23**, 543-553.
- Jaskoll T. & Melnick M. (1999) Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF-alpha/EGF, IGF, TGF-beta, TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF-beta2, TGF-beta3, and EGF-r null mutations. *The Anatomical Record*, **256**, 252-268.
- Jaskoll T., Zhou Y.M., Chai Y., Makarenkova H.P., Collinson J.M., West J.D., Hajihosseini M.K., Lee J. & Melnick M. (2002) Embryonic submandibular gland morphogenesis: stage-specific protein localization of FGFs, BMPs, Pax6 and Pax9 in normal mice and abnormal SMG phenotypes in FgfR2-IIIc(+/-Delta), BMP7(-/-) and Pax6(-/-) mice. *Cells, tissues, organs*, **170**, 83-98.

- Jaskoll T., Zhou Y.M., Trump G. & Melnick M. (2003) Ectodysplasin receptor-mediated signaling is essential for embryonic submandibular salivary gland development. *The anatomical record.Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, **271**, 322-331.
- Jaskoll T., Witcher D., Toreno L., Bringas P., Moon A.M. & Melnick M. (2004a) FGF8 dose-dependent regulation of embryonic submandibular salivary gland morphogenesis. *Developmental biology*, **268**, 457-469.
- Jaskoll T., Leo T., Witcher D., Ormestad M., Astorga J., Bringas P., Jr, Carlsson P. & Melnick M. (2004b) Sonic hedgehog signaling plays an essential role during embryonic salivary gland epithelial branching morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **229**, 722-732.
- Joutel A., Corpechot C., Ducros A., Vahedi K., Chabriat H., Mouton P., Alamowitch S., Domenga V., Cecillion M., Marechal E., Maciazek J., Vayssiere C., Cruaud C., Cabanis E.A., Ruchoux M.M., Weissenbach J., Bach J.F., Bousser M.G. & Tournier-Lasserre E. (1996) Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*, **383**, 707-710.
- Kadoya Y., Nomizu M., Sorokin L.M., Yamashina S. & Yamada Y. (1998) Laminin alpha1 chain G domain peptide, RKRLQVQLSIRT, inhibits epithelial branching morphogenesis of cultured embryonic mouse submandibular gland. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **212**, 394-402.
- Katsube K. & Sakamoto K. (2005) Notch in vertebrates--molecular aspects of the signal. *The International journal of developmental biology*, **49**, 369-374.
- Kim K.A., Kim J.H., Wang Y. & Sul H.S. (2007) Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation. *Molecular and cellular biology*, **27**, 2294-2308.
- Kim Y., Lin Q., Zelterman D. & Yun Z. (2009) Hypoxia-regulated delta-like 1 homologue enhances cancer cell stemness and tumorigenicity. *Cancer research*, **69**, 9271-9280.
- Knosp W.M., Knox S.M. & Hoffman M.P. (2012) Salivary gland organogenesis. *Wiley interdisciplinary reviews.Developmental biology*, **1**, 69-82.
- Knox S.M., Lombaert I.M., Reed X., Vitale-Cross L., Gutkind J.S. & Hoffman M.P. (2010) Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, **329**, 1645-1647.
- Knox S.M., Lombaert I.M., Haddox C.L., Abrams S.R., Cotrim A., Wilson A.J. & Hoffman M.P. (2013) Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. *Nature communications*, **4**, 1494.
- Konttinen Y.T., Stegaev V., Mackiewicz Z., Porola P., Hanninen A. & Szodoray P. (2010) Salivary glands - "an unisex organ"? *Oral diseases*, **16**, 577-585.
- Laborda J., Sausville E.A., Hoffman T. & Notario V. (1993) Dlk, a Putative Mammalian Homeotic Gene Differentially Expressed in Small Cell Lung Carcinoma and Neuroendocrine Tumor Cell Line. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 3817-3820.

Bibliografia

- Lammel U. & Saumweber H. (2000) X-linked loci of *Drosophila melanogaster* causing defects in the morphology of the embryonic salivary glands. *Development genes and evolution*, **210**, 525-535.
- Lee Y.L., Helman L., Hoffman T. & Laborda J. (1995) dlk, pG2 and Pref-1 mRNAs encode similar proteins belonging to the EGF-like superfamily. Identification of polymorphic variants of this RNA. *Biochimica et biophysica acta*, **1261**, 223-232.
- Li L., Krantz I.D., Deng Y., Genin A., Banta A.B., Collins C.C., Qi M., Trask B.J., Kuo W.L., Cochran J., Costa T., Pierpont M.E., Rand E.B., Piccoli D.A., Hood L. & Spinner N.B. (1997) Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nature genetics*, **16**, 243-251.
- Liu F. & Wang S. (2014) Molecular cues for development and regeneration of salivary glands. *Histology and histopathology*, **29**, 305-312.
- Lombaert I.M., Brunsting J.F., Wierenga P.K., Faber H., Stokman M.A., Kok T., Visser W.H., Kampinga H.H., de Haan G. & Coppes R.P. (2008) Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS one*, **3**, e2063.
- Lombaert I.M. & Hoffman M.P. (2010) Epithelial stem/progenitor cells in the embryonic mouse submandibular gland. *Frontiers of oral biology*, **14**, 90-106.
- Louvi A., Arboleda-Velasquez J.F. & Artavanis-Tsakonas S. (2006) CADASIL: a critical look at a Notch disease. *Developmental neuroscience*, **28**, 5-12.
- Makarenkova H.P., Hoffman M.P., Beenken A., Eliseenkova A.V., Meech R., Tsau C., Patel V.N., Lang R.A. & Mohammadi M. (2009) Differential interactions of FGFs with heparan sulfate control gradient formation and branching morphogenesis. *Science signaling*, **2**, ra55.
- McMahon A.P., Ingham P.W. & Tabin C.J. (2003) Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Current topics in developmental biology*, **53**, 1-114.
- Mei B., Zhao L., Chen L. & Sul H.S. (2002) Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *The Biochemical journal*, **364**, 137-144.
- Mirshekar-Syahkal B., Haak E., Kimber G.M., van Leusden K., Harvey K., O'Rourke J., Laborda J., Bauer S.R., de Bruijn M.F., Ferguson-Smith A.C., Dzierzak E. & Ottersbach K. (2013) Dlk1 is a negative regulator of emerging hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica*, **98**, 163-171.
- Mohr O.L. (1919) Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics*, **4**, 275-282.
- Moon Y.S., Smas C.M., Lee K., Villena J.A., Kim K.H., Yun E.J. & Sul H.S. (2002) Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Molecular and cellular biology*, **22**, 5585-5592.
- Moore K.A., Pytowski B., Witte L., Hicklin D. & Lemischka I.R. (1997) Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 4011-4016.
- Morita K. & Nogawa H. (1999) EGF-dependent lobule formation and FGF7-dependent stalk elongation in branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in vitro. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **215**, 148-154.
- Mumm J.S. & Kopan R. (2000) Notch signaling: from the outside in. *Developmental biology*, **228**, 151-165.
- Murphy S.K. & Jirtle R.L. (2003) Imprinting evolution and the price of silence. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **25**, 577-588.
- Mysliwiec P. & Boucher M.J. (2009) Targeting Notch signaling in pancreatic cancer patients--rationale for new therapy. *Advances in medical sciences*, **54**, 136-142.
- Nakanishi Y., Morita T. & Nogawa H. (1987) Cell proliferation is not required for the initiation of early cleft formation in mouse embryonic submandibular epithelium in vitro. *Development (Cambridge, England)*, **99**, 429-437.
- Nedvetsky P.I., Emmerson E., Finley J.K., Ettinger A., Cruz-Pacheco N., Prochazka J., Haddock C.L., Northrup E., Hodges C., Mostov K.E., Hoffman M.P. & Knox S.M. (2014) Parasympathetic innervation regulates tubulogenesis in the developing salivary gland. *Developmental cell*, **30**, 449-462.
- Nueda ML, Baladron V, Garcia-Ramirez JJ, Sanchez-Solana B, Ruvira MD, Rivero S, Ballesteros MA, Monsalve EM, Diaz-Guerra MJ, Ruiz-Hidalgo MJ, Laborda J (2007a) The novel gene EGFL9/Dlk2, highly homologous to Dlk1, functions as a modulator of adipogenesis. *J Mol Biol* 367:1270-1280
- Nueda M.L., Baladron V., Sanchez-Solana B., Ballesteros M.A. & Laborda J. (2007b) The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells. *Journal of Molecular Biology*, **367**, 1281-1293.
- Nueda M.L., Garcia-Ramirez J.J., Laborda J. & Baladron V. (2008) dlk1 specifically interacts with insulin-like growth factor binding protein 1 to modulate adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Journal of Molecular Biology*, **379**, 428-442.
- Ogawa M., Oshima M., Imamura A., Sekine Y., Ishida K., Yamashita K., Nakajima K., Hirayama M., Tachikawa T. & Tsuji T. (2013) Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nature communications*, **4**, 2498.
- Ohlsson C., Jansson J.O. & Isaksson O. (2000) Effects of growth hormone and insulinlike growth factor-I on body growth and adult bone metabolism. *Current opinion in rheumatology*, **12**, 346-348.
- Olney R.C. (2003) Regulation of bone mass by growth hormone. *Medical and pediatric oncology*, **41**, 228-234.
- Osamu Amano, Kenichi Mizobe, Yasuhiko Bando, Koji Sakiyama (2012) Anatomy and Histology of Rodent and Human Major Salivary Glands. **45(5)**, 241–250.

Bibliografia

- Patel N., Sharpe P.T. & Miletich I. (2011) Coordination of epithelial branching and salivary gland lumen formation by Wnt and FGF signals. *Developmental biology*, **358**, 156-167.
- Patel V.N., Likar K.M., Zisman-Rozen S., Cowherd S.N., Lassiter K.S., Sher I., Yates E.A., Turnbull J.E., Ron D. & Hoffman M.P. (2008) Specific heparan sulfate structures modulate FGF10-mediated submandibular gland epithelial morphogenesis and differentiation. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 9308-9317.
- Patel V.N. & Hoffman M.P. (2014) Salivary gland development: a template for regeneration. *Seminars in cell & developmental biology*, **25-26**, 52-60.g
- Pawson T. & Nash P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science (New York, N.Y.)*, **300**, 445-452.
- Pierfelice T.J., Schreck K.C., Dang L., Asnagli L., Gaiano N. & Eberhart C.G. (2011) Notch3 activation promotes invasive glioma formation in a tissue site-specific manner. *Cancer research*, **71**, 1115-1125.
- Puertas-Avendano R.A., Gonzalez-Gomez M.J., Ruvira M.D., Ruiz-Hidalgo M.J., Morales-Delgado N., Laborda J., Diaz C. & Bello A.R. (2011) Role of the non-canonical notch ligand delta-like protein 1 in hormone-producing cells of the adult male mouse pituitary. *Journal of neuroendocrinology*, **23**, 849-859.
- Raghunandan R., Ruiz-Hidalgo M., Jia Y., Ettinger R., Rudikoff E., Riggins P., Farnsworth R., Tesfaye A., Laborda J. & Bauer S.R. (2008) Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes. *Stem cells and development*, **17**, 495-507.
- Rand E. & Cedar H. (2003) Regulation of imprinting: A multi-tiered process. *Journal of cellular biochemistry*, **88**, 400-407.
- Rebustini I.T. & Hoffman M.P. (2009) ECM and FGF-dependent assay of embryonic SMG epithelial morphogenesis: investigating growth factor/matrix regulation of gene expression during submandibular gland development. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **522**, 319-330.
- Redmond L., Oh S.R., Hicks C., Weinmaster G. & Ghosh A. (2000) Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nature neuroscience*, **3**, 30-40.
- Rivero S., Diaz-Guerra M.J., Monsalve E.M., Laborda J. & Garcia-Ramirez J.J. (2012) DLK2 is a transcriptional target of KLF4 in the early stages of adipogenesis. *Journal of Molecular Biology*, **417**, 36-50.
- Rodriguez P., Higuera M.A., Gonzalez-Rajal A., Alfranca A., Fierro-Fernandez M., Garcia-Fernandez R.A., Ruiz-Hidalgo M.J., Monsalve M., Rodriguez-Pascual F., Redondo J.M., de la Pompa J.L., Laborda J. & Lamas S. (2012) The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovascular research*, **93**, 232-241.
- Rose S.L. (2009) Notch signaling pathway in ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, **19**, 564-566.

- Ferron SR, Charalambous M, Radford E, McEwen K, Wildner H, Hind E, Morante-Redolat JM, Laborda J, Guillemot F, Bauer SR, Farinas I, Ferguson-Smith AC (2011) Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis. *Nature* 475:381-385
- Sanalkumar R., Indulekha C.L., Divya T.S., Divya M.S., Anto R.J., Vinod B., Vidyanand S., Jagatha B., Venugopal S. & James J. (2010) ATF2 maintains a subset of neural progenitors through CBF1/Notch independent Hes-1 expression and synergistically activates the expression of Hes-1 in Notch-dependent neural progenitors. *Journal of neurochemistry*, **113**, 807-818.
- Sanchez-Irizarry C., Carpenter A.C., Weng A.P., Pear W.S., Aster J.C. & Blacklow S.C. (2004) Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Molecular and cellular biology*, **24**, 9265-9273.
- Sanchez-Solana B., Nueda M.L., Ruvira M.D., Ruiz-Hidalgo M.J., Monsalve E.M., Rivero S., Garcia-Ramirez J.J., Diaz-Guerra M.J., Baladron V. & Laborda J. (2011) The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities. *Biochimica et biophysica acta*, **1813**, 1153-1164.
- Schmidt J.V., Matteson P.G., Jones B.K., Guan X.J. & Tilghman S.M. (2000) The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes & development*, **14**, 1997-2002.
- Schmittgen T.D. & Livak K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, **3**, 1101-1108.
- Schwanbeck R., Schroeder T., Henning K., Kohlhof H., Rieber N., Erfurth M.L. & Just U. (2008) Notch signaling in embryonic and adult myelopoiesis. *Cells, tissues, organs*, **188**, 91-102.
- Sestan N., Artavanis-Tsakonas S. & Rakic P. (1999) Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science (New York, N.Y.)*, **286**, 741-746.
- Shirasuna K., Sato M. & Miyazaki T. (1981) A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer*, **48**, 745-752.
- Smas C.M., Green D. & Sul H.S. (1994) Structural characterization and alternate splicing of the gene encoding the preadipocyte EGF-like protein pref-1. *Biochemistry*, **33**, 9257-9265.
- Smas C.M., Chen L. & Sul H.S. (1997a) Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation. *Molecular and cellular biology*, **17**, 977-988.
- Smas C.M. & Sul H.S. (1997b) Molecular mechanisms of adipocyte differentiation and inhibitory action of pref-1. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, **7**, 281-298.
- Szebenyi G. & Fallon J.F. (1999) Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *International review of cytology*, **185**, 45-106.
- Takada S., Tevendale M., Baker J., Georgiades P., Campbell E., Freeman T., Johnson M.H., Paulsen M. & Ferguson-Smith A.C. (2000) Delta-like and gtl2 are reciprocally expressed, differentially methylated linked imprinted genes on mouse chromosome 12. *Current biology : CB*, **10**, 1135-1138.

Bibliografia

- Talora C., Campese A.F., Bellavia D., Felli M.P., Vacca A., Gulino A. & Screpanti I. (2008) Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Biochimica et biophysica acta*, **1782**, 489-497.
- Tanimizu N., Nishikawa M., Saito H., Tsujimura T. & Miyajima A. (2003) Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *Journal of cell science*, **116**, 1775-1786.
- Taylor M.K., Yeager K. & Morrison S.J. (2007) Physiological Notch signaling promotes gliogenesis in the developing peripheral and central nervous systems. *Development (Cambridge, England)*, **134**, 2435-2447.
- Teshima K., Murakami R., Tomitaka E., Nomura T., Toya R., Hiraki A., Nakayama H., Hirai T., Shinohara M., Oya N. & Yamashita Y. (2010) Radiation-induced parotid gland changes in oral cancer patients: correlation between parotid volume and saliva production. *Japanese journal of clinical oncology*, **40**, 42-46.
- Tucker A.S. (2007) Salivary gland development. *Seminars in cell & developmental biology*, **18**, 237-244.
- van Es J.H. & Clevers H. (2005) Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. *Trends in molecular medicine*, **11**, 496-502.
- Vissink A., Kallenberg C.G. & Bootsma H. (2010) Treatment approaches in primary Sjogren syndrome. *Jama*, **304**, 2015-6; author reply 2016.
- Wang Y. & Sul H.S. (2006) Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (Pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation. **26**, 5421-5435.
- Wang Y., Zhao L., Smas C. & Sul H.S. (2010) Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation. *Molecular and cellular biology*, **30**, 3480-3492.
- Weng A.P. & Aster J.C. (2004) Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Current opinion in genetics & development*, **14**, 48-54.
- Wilkins J.F. & Haig D. (2003) What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nature reviews.Genetics*, **4**, 359-368.
- Woodhoo A., Alonso M.B., Droggiti A., Turmaine M., D'Antonio M., Parkinson D.B., Wilton D.K., Al-Shawi R., Simons P., Shen J., Guillemot F., Radtke F., Meijer D., Feltri M.L., Wrabetz L., Mirsky R. & Jessen K.R. (2009) Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nature neuroscience*, **12**, 839-847.
- Wu F., Stutzman A. & Mo Y.Y. (2007) Notch signaling and its role in breast cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **12**, 4370-4383.
- Yamamoto N., Tanigaki K., Han H., Hiai H. & Honjo T. (2003) Notch/RBP-J signaling regulates epidermis/hair fate determination of hair follicular stem cells. *Current biology : CB*, **13**, 333-338.

- Yanai H., Nakamura K., Hijioka S., Kamei A., Ikari T., Ishikawa Y., Shinozaki E., Mizunuma N., Hatake K. & Miyajima A. (2010) Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *Journal of Biochemistry*, **148**, 85-92.
- Yevtodiyyenko A. & Schmidt J.V. (2006) Dlk1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **235**, 1115-1123.
- Zhu X., Zhang J., Tollkuhn J., Ohsawa R., Bresnick E.H., Guillemot F., Kageyama R. & Rosenfeld M.G. (2006) Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. *Genes & development*, **20**, 2739-2753.