

## 伍、討論

從我們的實驗來看，我們藉由 *Him* 基因表現在果蠅胚胎的時間及位置，推測 *Him* 基因在中胚層或果蠅心臟的發育過程中扮演相當的角色，也從幾個層面來探討著 *Him* 基因在中胚層的表現是受到與果蠅心臟發育相關的調控因子 *Pannier*、*Tinman*、*Twist*、以及 *Dmef2* 直接或間接的調控，利用遺傳的方式，使用果蠅心臟不同的分子標誌標定心臟細胞，分析 *Him* 基因在缺失及加強表現的情況下，與野生型果蠅株比較對果蠅心臟細胞發育的影響。

### 1、藉由親源相似種果蠅序列比對便於找尋 *cis*-regulatory

目前許多研究均顯示出於基因的編碼區域 (coding region) 尤其是重要的功能區域在演化上呈現保守性，而就基因非編碼區域 (non-coding region) 亦即上游的五端或三端或是 intron 中存在著在演化過程中保守的區域，此為 Conserved non-coding sequences (CNCs) 此保守區域往往形成一個個 cluster，其上有許多基因重要的調控位點，Bergman 等人於 2002 年嘗試比對五種果蠅的八種基因基因組序列的相似性，得到藉由比對 *Drosophila melanogaster* 及 *Drosophila pseudoobscura* 的基因組序列得到 CNCs 有助於找尋基因的 *cis*-regulator (Bergman et al., 2002)，由於此兩種果蠅的基因組序列已經大致定序，藉由 VISTA Browser 及 VISTA track 這兩個工具找

尋 *Him* 基因的 CNCs，將其 CNCs 下載下來透過 Gene palette 軟體並經由自建的 heart cis-regulator 資料，可快速正確找尋 *Him* 基因的在中胚層的 cis-regulator，在此序列報導基因 eGFP 的轉殖基因果蠅亦證明了預測的準確性。

## 2、*Su(H)* 是否調控著 *Him* 在中胚層的表現？

試著比較 *Him* 4.0 kb 片段和 *Him* 2.2 kb，此兩株品系為 Rebeiz 於 2002 年所發表的轉植株，當時他們檢視了 eye disc 的 eGFP 表現，發現 *Him* 2.2 kb 相對於 *Him* 4.0 kb 的 adepithelial cells 的 eGFP 表現有減少的趨勢，此兩段的差別在於 *Him* 4.0 kb 的前端多了四個 *Su(H)* bind site clusters 的區域，可見在這個地方 *Him* 的表現是受到 *Su(H)* 的調控，但以我們的結果來看，此兩段 enhancer 在中胚層的部分表現卻並無差別存在，是否 *Him* 基因在中胚層的表現無受 *Su(H)* 的影響，或是在 eGFP 的 reporter 無法有效的區分是否受到 *Su(H)* 的調控，若要區別必須藉由其他實驗來釐清 *Su(H)* 對於 *Him* 在中胚層表現的角色，就目前所知 *Su(H)* 的確在中胚層發育及心臟細胞的不對稱分裂中的 *Notch* signal pathway 中扮演 activator 及 repressor 的角色 (Han et al., 2002; Tapanes-Castillo and Baylies, 2004)。

## 3、*Tinman*、*Pannier*、*Dmef2* 及 *Twist* 調控 *Him* 基因在中胚層的表現

### ***Tinman***

在 *Him* 基因的基因組的 CNCs 及 *Tinman* 的 binding site 的序列搜尋的資料顯示在 *Him* 5' 上游有三個 *Tinman* 的 binding site 呈現演化的保守性，在包含這三個點的 enhancer 轉殖株也發現到均在中胚層表現 eGFP 活性，在 domain negative form 的 *Tinman* 的遺傳背景下，無論是 eGFP 的轉殖株的表現，或是 *Him* 基因的原位雜合的表現，在果蠅心臟部分的表現均受到相當程度的抑制，這些顯示出 *Tinman* 直接的調控 *Him* 基因於中胚層及果蠅心臟的表現。

### ***Pannier***

在 *Him* 基因的基因組的 CNCs 及 *Pannier* 的 binding site 的序列搜尋的資料顯示在 *Him* 3' 上游有兩個 *Pannier* 的 binding site 若比較 *Him* en-1 及 *Him* en 1-2 此兩個轉殖株，發現其中層及果蠅心臟部分的表現並無差異，這兩個片段的差別在於少了最前端的 *Pannier* 部分，這表示前端的 *Pannier* 對於 *Him* 基因的表現來說並非重要，而在 *Pannier* domain negative form 觀察 *Him* 基因的表現來看，*Pannier* 的功能缺失對於 *Him* 基因的表現是減少的，所以歸納所述，*Pannier* 可能間接或直接的調控 *Him* 在中胚層的表現。

在中胚層加強表現 *Tinman* 及 *Pannier* 亦顯示出此兩個基因對於 *Him* 的表現有促進的效果。

### ***Twist***

*Twist* 為中胚層發育重要的調節基因，在 *Him* 基因的基因組的 CNCs 及 *Twist* 的 binding site 的序列搜尋的資料顯示在 *Him* 5' 上游有七個 *Twist* 的 binding site，比對 *Him en-1* 及 *Him en-2* 轉殖株的 eGFP 在中胚層的表現，*Him en-1* 在早期中胚層的表現非常微弱，*Him en-2* 不會有此情形，晚期的心臟細胞兩者均有表現，而 *Him en-2* 擁有五個 *Twist* binding site，*Him en-1* 有兩個 *Twist* binding site，*Twist* 調控著 *Him* 在中胚層早期的表現。

### ***Dmef2***

*Dmef2* 為晚期調控心肌細胞及肌肉系統重要的調控因子，缺少 *Dmef2* 不會產生 muscle myosin (Gunthorpe et al., 1999; Lin and Storti, 1997; Taylor et al., 1995)，在 *Him* 基因的基因組的 CNCs 及 *Dmef2* 的 binding site 的序列搜尋的資料顯示在 *Him* 5' 上游有兩個 *Dmef2* 的 binding site，比對 *Him en-1* 及 *Him en-2* 的轉殖株，*Him en-1* 在晚期的部分 myocardial cells 的表現有減弱的趨勢，而 *Him en-2* 則無此種情形，顯示 *Him en-2* 上面的 *Dmef2* 有著維持 *Him* 基因在晚期的 myocardial cells 表現的功能，而 *Him en-1* 其上的 *Dmef2* 亦有著相同的功能，因為 *Him en-1* 在 myocardial cells 部分不會因為少了一個 *Dmef2* 而完全沒有表現，只是減弱表現，在 *Dmef2* 突變的遺傳背景下，似乎 *Him en-1* 的 eGFP 在肌肉系統部分有受到相當的抑制，但果蠅心臟部分只受到部

分抑制，所以 *Him* 在中胚層（肌肉系統）部分的表現受到 *Dmef2* 調控，而心臟部分並非完全受到 *Dmef2* 調控，需要其他的轉錄因子來參與，這可能是 *Tinman* 及 *Pannier*。

#### 4、*Him* 基因在中胚層的功能

從 *Him* 基因缺失，及異位表現過量的 *Him* 基因產物的心臟分子標誌抗體結果來看，因為 *Him* 基因表現量的減少，而導致心肌細胞(myocardial cells)、圍心細胞(pericardial cells)均有增多的現象，但其增多並非侷限於果蠅心臟的特定區域且與肌肉系統呈現擠壓的情況，而 *Him* 基因的過度表現，心肌細胞(myocardial cells)、圍心細胞(pericardial cells)減少，並且肌肉系統缺失產生。

從上述現在來看 *Him* 基因的功能傾向於抑制的功能性，而已知 *Him* 基因的表現會受到 *Su(H)* 的調控，而 *Su(H)* 所調控的基因往往在調控 *Notch* signal pathway 的路徑上亦即控制著細胞的不對稱分裂(Lai, 2004)，就 *Him* 的蛋白質結構來看，其 C 端的末四個氨基酸為 WRPW，這一個 motif 會抓一個 corepressor：*Groucho* 並與一些 bHLH 及 repressor 共同作用，但其本身並無 bHLH domain，所以可能並不直接作用於基因上而是可能為一中介的角色於 *Groucho* 跟 DNA-binding repressor(Chen and Courey, 2000)，若以此方向去思考，*Him* 基因在中胚層的角色可以分為幾個層面的可能。

## ***Him* 基因可能參與著 *Twist* 分化中胚層的角色**

就 *Him* 基因的表現位置來看，stage 9 時表現在整個中胚層，到了晚期才逐漸侷限在背部中胚層到最後才侷限於心臟，從我們 enhancer 的結果來看，*Him* 是可能受到 *Twist* 直接的調控在早期中胚層的表現，而 *Twist* 已知是促進中胚層分化的主要因子之一，在中胚層分化的過程中，*Twist* 會呈現模組化的條紋區域 (strip) 每一節有所謂的高度表現的 *Twist* 區及低度表現的 *Twist* 區，高度表現的 *Twist* 區將來會分化為 body wall muscle fate，低度表現的 *Twist* 區域分化為 gut muscle and fat body fate，有文獻指出 *Su(H)*-mediated *Notch* signaling 參與抑制 *Twist* 的表現進而造成不同的細胞命運，而此過程並不是直接的，而是透過 *Su(H)* 所啟動的下游 repressor 如：*Enhancer of split complex [E(spl)C]*、HLH gene *extra machrochaetae (emc)*，那麼 *Him* 是否也是另一個經由 *Su(H)* 啟動參與在中胚層的分化 (Tapanes-Castillo and Baylies, 2004)，雖然就 enhancer 的研究來看 *Su(H)* 在中胚層不調控著 *Him*，但其還待更多遺傳的分析來輔助釐清。

## ***Him* 參與著 *Notch* signal pathway 分化果蠅心臟細胞的形成**

*Notch* 對於果蠅心臟細胞的行程過程中主要進行兩個作用：lateral inhibition、及 asymmetric cell division，。Lateral inhibition 主要的機制在於相鄰兩細胞間，*Notch* 及他的 ligand 相互間的作用，發生在

一群細胞各自有潛能分化為特殊的細胞命運，若有一細胞在缺乏 *Notch* 的活性下，配合其他心臟發育的訊號：如 *Tinman*、*Dpp*、*Wingless*，就容易分化為特殊的心臟細胞原，相反的在 *Notch* 過度的活化下，即會抑制心臟細胞走向特殊的細胞命運，不管是否有其他的心臟發育的訊號，所以在 *Him* 的遺傳分析中，單就心臟細胞的數目，*Him* 也扮演一個抑制的角色在心臟細胞的數目的功能，是否與 lateral inhibition 作用有關(Zaffran and Frasch, 2002)。

另外心臟細胞的組成是透過不對稱的細胞分裂，來決定產生相同的細胞命運的子細胞，或是不同細胞命運的細胞，也就是說心肌細胞 (myocardial cells) 及圍心細胞(pericardial cells)的細胞種類形成，常常是經由一個 founder 經由不對稱的細胞分裂分化為兩個細胞一個具 myocardial cell founder 及，pericardial cell founder，此作用的分子機轉為 *Numb* 在細胞內抑制 *Notch* 造成 *Notch* 分佈的不平均，在細胞分裂的過程即分裂為不同的細胞命運的兩個細胞(Su et al., 1999)，例如在 *numb* 的突變底下，*odd-positive-pericardial cells* 會變多，是因為 *svp-myocardial cells* 轉變導致(Ward and Skeath, 2000)，若就我們使用的分子標誌來看，其增加或減少的位置或細胞形式並無固定的情況，也就是說 *Dmef2* 標示的 myocardial cells 及 *Tinman* 所標示的 myocardial cells 及 pericardial cells 在 *Him* 功能缺失下均是增

多，*Him* 基因的過度表現均是減少，且無在特定位置上增多，這就和已知的如：*pointedP2* 的突變株 *svp* 的 myocardial cells 的細胞命運轉變為 pericardial cells，即 *svp* 的 pericardial cells 增多，myocardial cells 變少，的情形完全不一致(Alvarez et al., 2003)，這也可能是因為所用的分子標誌不足以分辨所導致，所以使用更多的細胞標誌也許是個釐清的方式。