

**EGY ÚJ *DROSOPHILA* FORMIN SZÖVETSPECIFIKUS  
FUNKCIÓINAK GENETIKAI, SEJTBIOLÓGIAI, ÉS  
BIOKÉMIAI VIZSGÁLATA**

**Ph.D. értekezés**

**Készítette: Matusek Tamás**

**Témavezető: Dr. Mihály József**

**Magyar Tudományos Akadémia**

**Szegedi Biológiai Központ**

**Genetikai Intézet**

**Szeged, 2009.**

## TARTALOMJEGYZÉK

### **ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS** **5-27**

#### **A sejtvá** **5**

*A citoszkeletont alkotó szerkezeti elemek* 5-9

*Mikrotubulusok* 7

*Intermedier filamentumok (IF)* 6

*Mikrofilamentumok, az aktin citoszkeleton* 8

*Az aktinfilamentumok felépítése és szerveződése* 9-13

*Capping fehérjék* 12

*Depolimerizáló és filamentum hasító (severing) fehérjék* 12

*Aktinköteg rendező fehérjék (bundling)* 13

*Aktin nukleáló faktorok* 13-24

*Az Arp2/3 komplex* 14

*A Spire fehérje* 16

*Cordon-bleu* 17

*Forminok* 17

*A DAAM formin alcsalád* 24

### **CÉLKITŰZÉSEK** **28**

### **EREDMÉNYEK** **29-37**

*A dDAAM gén szerkezete* 29

*A dDAAM kifejeződése a Drosophila embrióban* 31

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>dDAAM</i> allélok létrehozása                                                                                                      | 32 |
| <i>A dDAAM</i> funkciójának vizsgálatához szükséges ellenanyag létrehozása                                                            | 34 |
| <i>A Drosophila dDAAM</i> génnek nincs esszenciális szerepe a szöveti polaritást (PCP) szabályozó nem-kanonikus Wnt jelátviteli útban | 36 |

## **A dDAAM SZEREPE A DROSOPHILA TRACHEARENDSZERBEN** **38-55**

### **BEVEZETÉS** **38-42**

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>A trachea primordium</i> sejtek specifikációja, lefűződése, az ágrendszer kialakulása | 38 |
| <i>A légcső üregének (lumen) kialakulása és a tracheakutikula szerkezete</i>             | 41 |

### **EREDMÉNYEK** **42-55**

|                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>A dDAAM<sup>Ex68</sup> funkcióvesztéssel null mutánsban sérül a tracheakutikula szerkezete</i>                                                                                              | 42 |
| <i>A dDAAM fehérje kolokalizálódik az apikális aktinkötegekkel az embrionális trachea sejtjeiben</i>                                                                                           | 44 |
| <i>A dDAAM funkciónyeréssel mutáns fenotípusa</i>                                                                                                                                              | 46 |
| <i>A csonkolt dDAAM fehérjék in vivo aktivitása, légcső fenotípusai</i>                                                                                                                        | 50 |
| <i>A RhoA, az Src42A és a Tec29 domináns genetikai interakciót mutatnak a dDAAM<sup>Ex1</sup>-gyel</i>                                                                                         | 51 |
| <i>Az Src42<sup>E1</sup> és a Tec29<sup>5610</sup> mutációk homozigóta formában a dDAAM<sup>Ex1</sup>-hez hasonló tracheakutikula fenotípust, és aktin citoszkeleton defektusokat mutatnak</i> | 52 |
| <i>A RhoA<sup>72F</sup>, az Src42<sup>E1</sup>, és a Tec29<sup>5610</sup> allélok hatása a C-DAAM túltermelés okozta tracheakutikula fenotípusra</i>                                           | 54 |

## **A dDAAM SZEREPE AZ EMBRIONÁLIS KÖZPONTI IDEGRENSZER NYÚLVÁNYAINAK KIALAKÍTÁSÁBAN**

**56-81**

### **BEVEZETÉS**

**56-63**

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| <i>A hasi idegköteg sejtjeinek specifikációja</i>             | 56 |
| <i>A Drosophila embrionális KIR nyúlványainak kialakulása</i> | 57 |
| <i>A növekedési kúp szerkezete</i>                            | 58 |
| <i>Az aktin sejtíváz szabályozása a növekedési kúpban</i>     | 60 |

### **EREDMÉNYEK**

**64-80**

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>A dDAAM funkcióvesztéssel mutációk nyúlványnövekedési defektusokat okoznak az embrionális KIR-ben</i>   | 64 |
| <i>A dDAAM lokalizációja a növekedési kúpokban</i>                                                         | 69 |
| <i>A dDAAM funkciója a központi idegrendszer sejtjeiben a növekedési kúpok filopódiumainak kialakítása</i> | 71 |
| <i>A dDAAM funkciónyeréssel mutánsok okozta KIR fenotípusok</i>                                            | 72 |
| <i>A dDAAM együttműködik az Ena és Chic fehérjékkel az embrionális központi idegrendszerben</i>            | 74 |
| <i>A DAAM gének idegrendszeri funkciója evolúciósan konzervált</i>                                         | 77 |

### **AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA**

**81-90**

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>A dDAAM nem része a PCP jelátviteli útnak Drosophila-ban</i>                                              | 81 |
| <i>A rovarok légcsőrendszerének stabilitásához szükség van egy speciális, magasabbrendű aktinstruktúrára</i> | 81 |
| <i>A dDAAM aktivitását a Rho/Src/Tec29 modulon keresztül fejti ki a tracheában</i>                           | 83 |



|                                                                                                        |                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <i>A dDAAM N-terminálisan csonkolt formája (C-DAAM) konstitutívan aktív a trachea sejtjeiben</i>       | 85                    |
| <i>A dDAAM megfelelő in vivo aktivitásához minimálisan a fehérje FH1 és FH2 doménjeire van szükség</i> | 86                    |
| <i>A dDAAM szerepe nélkülözhetetlen a KIR nyúlványainak növekedésében</i>                              | 87                    |
| <i>A DAAM-ok idegrendszeri funkciója evolúciósan konzervált</i>                                        | 90                    |
| <b><u>ÖSSZEFOGLALÁS</u></b>                                                                            | <b><u>91-96</u></b>   |
| <b><u>SUMMARY</u></b>                                                                                  | <b><u>97-102</u></b>  |
| <b><u>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u></b>                                                                     | <b><u>103-112</u></b> |
| <b><u>FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK</u></b>                                                                    | <b><u>113</u></b>     |
| <b><u>IRODALOMJEGYZÉK</u></b>                                                                          | <b><u>114-123</u></b> |

## ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

### *A sejt váz (citoszkeleton)*

A élő sejt vázát citoszkeletonnak nevezzük. A sejt váz általánosan jellemző az élő sejtekre, a prokariótáknak és eukariótáknak egyaránt van sejt váza. A „citoszkeleton” szó eredete egészen 1931-ig nyúlik vissza, ekkor vezette be Paul Wintrebert francia embriológus a „cytoskelette” fogalmát a sejtbiológiába. A citoszkeleton számos folyamatban fontos szerepet tölt be. Lehetővé teszi a sejt mozgásokat, a sejtalak fenntartását, az intracelluláris transzportfolyamatokat, az organelális transzportot, illetve a sejtosztódást. A sejt váz felépítését tekintve az eukarióta sejtben három fő szerkezeti elemet különíthetünk el: a mikrotubulusokat, az intermedier filamentumokat és a mikrofilamentumokat.

### *A citoszkeletont alkotó szerkezeti elemek*

#### *1. Mikrotubulusok*

A mikrotubulusok polimer molekulák, melyeket  $\alpha$ -, és  $\beta$ -tubulin alegységekből álló heterodimerek építenek fel. A heterodimerek a polimerizáció első lépésében protofilamentumokat hoznak létre, melyek azután egy cilindrikus csőszerű struktúrába rendeződnek, így hozva létre a mikrotubulust. Egy tipikus mikrotubulusban 13 protofilamentum van. A mikrotubulusok külső átmérője 24 nm, belső átmérője 15 nm. Hosszuk tág határok között változhat 200 nm-től egészen 25  $\mu$ m-ig. A dimerek beépülése a protofilamentumba fej-farok (head-to-tail) orientációban történik, a tubulin dimer  $\alpha$ -alegysége a következő dimer  $\beta$ -alegységével kapcsolódik össze. A protofilamentumok egymással

párhuzamosan paralel módon rendeződnek el, így a mikrotubulusok struktúrájukat tekintve polarizáltak. A (+) végen a  $\beta$ -alegységeket, míg a (-) végen az  $\alpha$ -alegységeket találjuk a felszínen.

A mikrotubulus (+) illetve (-) végén eltérő sebességgel épülnek be (polimerizáció), illetve szakadnak le (depolymerizáció) az  $\alpha/\beta$ -tubulin heterodimerek. A (+) végen gyorsabb polimerizáció/depolymerizáció sebessége, míg a (-) végen lassabb. A polimerizáció/depolymerizáció dinamikája erősen függ egyrészt a tubulin dimerek koncentrációjától, másrészt a (+) végen a szabad  $\beta$ -tubulin GTP-vagy GDP kötött állapotától. Kritikus tubulin koncentráció fölött elsődlegesen beépülés, míg alatta depolymerizáció történik. Amennyiben a (+) végen túlnyomórészt GDP-kötött  $\beta$ -tubulin alegységek találhatóak, akkor az depolymerizációhoz vezet, míg a GTP-kötött forma polimerizációt indukál. Az élő sejtben a mikrotubulusok stabilitását különböző mikrotubulus asszociált fehérjék (MAP: microtubule associated protein) biztosítják. A stabilizáló fehérjék általában rendelkeznek egy mikrotubulus-kötő doménnel, és egy savas projekciós doménnel, amely intermedier filamentumokhoz vagy membránokhoz kapcsolódhat, ily módon stabilizálják a kötegekbe rendeződött mikrotubulusokat. Ilyen fehérje például a Tau, mely specifikusan a neuronok axonjaiban segíti elő a mikrotubulus kötegek rögzítését egymástól megfelelő távolságban. A destabilizáló MAP-ok ezzel szemben vagy a tubulin alegységek közötti direkt hasítás révén, vagy a szabad heterodimerek kötése, és kitirálása révén depolymerizációt idéznek elő.

Az új mikrotubulusok összeszerelése, nukleálása az eukarióta sejtekben a mikrotubulus organizáló központokból (MTOC) történik. Az újonnan kialakult mikrotubulusban a (-) vég az MTOC felé, míg a (+) vég attól disztális irányba néz.

## 2. Intermedier filamentumok (IF)

Az intermedier filamentumok homo-, vagy heteropolimerek. A sejtben homogén, apoláris láncokat alkotnak, melyek átmérője 10 nm. A mikrotubulusokkal ellentétben stabil struktúrák, szerepük a sejtvázszerkezeti stabilitásának biztosítása. Rendkívül sokféle intermedier filamentum létezik, a humán genomban 67 IF gén található. A különböző IF típusok alegységeinek szerkezete a szekvenciabeli eltérések ellenére is nagyban hasonlít egymáshoz. Az N-, és a C-terminálisukon egy-egy globuláris fehérjedomén található, melyek egy központi,  $\alpha$ -helikális szerkezetű magot fognak közre. Szöveti előfordulásuk és szekvenciahomológiájuk alapján az IF-okat 6 fő csoportba sorolhatjuk.

Az I., és II. csoportba a savas, illetve bázikus keratinok tartoznak, melyek epitéliális sejtekben fordulnak elő. A keratin savas és bázikus keratin monomerekből felépülő heteropolimer lánc.

A III. csoportba négyféle fehérje tartozik. A vimentinek, melyek az összes IF fehérje közül a legszélesebb előfordulási gyakorisággal rendelkeznek. Megtalálhatóak fibroblasztokban, leukocitákban, és a véredények endotél sejtjeiben is. A desmin alkotta IF-ok az izmokra jellemzőek, a GFAP (glial fibrillar acidic protein) gliasejtekben és asztrocitákban fordul elő, míg a peripherin a perifériás idegrendszer neuronjaiban található meg.

A IV. csoportot a neurofilamentumok (NF) alkotják. Specifikusan a központi idegrendszer neuronjainak axonjaiban fordulnak elő, szerepük az axonok radiális irányú növekedésének, nyúlványátmérőjének szabályozása. Heteropolimerek, melyeket a kifejlett neuronokban háromféle polipeptid építhet fel (NF-L, NF-M, NF-H).

Az V. csoportot a laminok alkotják, melyek a többi, citoszolban található IF-mal szemben a sejtmagban találhatóak, és ott a nukleáris membrán belső felszínén hoznak létre egy fibrilláris hálózatot.

A VI. csoportba nestinek tartoznak, melyek 230kDa méretű homopolimerek. Főleg izomsejtekben, és embrionális neuronokban fordulnak elő.

### 3. Mikrofilamentumok, az aktin citoszkeleton

A mikrofilamentumok 7-9 nm átmérőjű helikális szerkezetű, polarizált polimer molekulák, melyeket aktin monomerek építenek fel. A mikrofilamentumok alkotta sejtváza flexibilis és plasztikus, elsődleges funkciója a dinamikus sejtmozgások kivitelezésében (izomösszehúzódások, sejtváándorlás, sejtnyúlványok kialakulása, axonális növekedés) van.

Az aktin a leggyakrabban előforduló fehérje az eukarióta sejtben. Az „*actin*” elnevezés Straub F. Brúnótól származik, aki Szent-Györgyi Albert laboratóriumában először izolálta azt nagy tisztaságban izomszövetből 1941-ben (Szent-Györgyi, A. 1945). A névadás eredete az, hogy a Szent-Györgyi laboratóriumában már korábban leírták a miozin egy jóval viszkózusabb formáját, melyet *aktivált* miozinnak neveztek el, és kiderült, hogy az aktiválásért felelős faktort sikerült Straubnak kitisztítania. Innen kapta aztán az új fehérje az „*actin*” nevet.

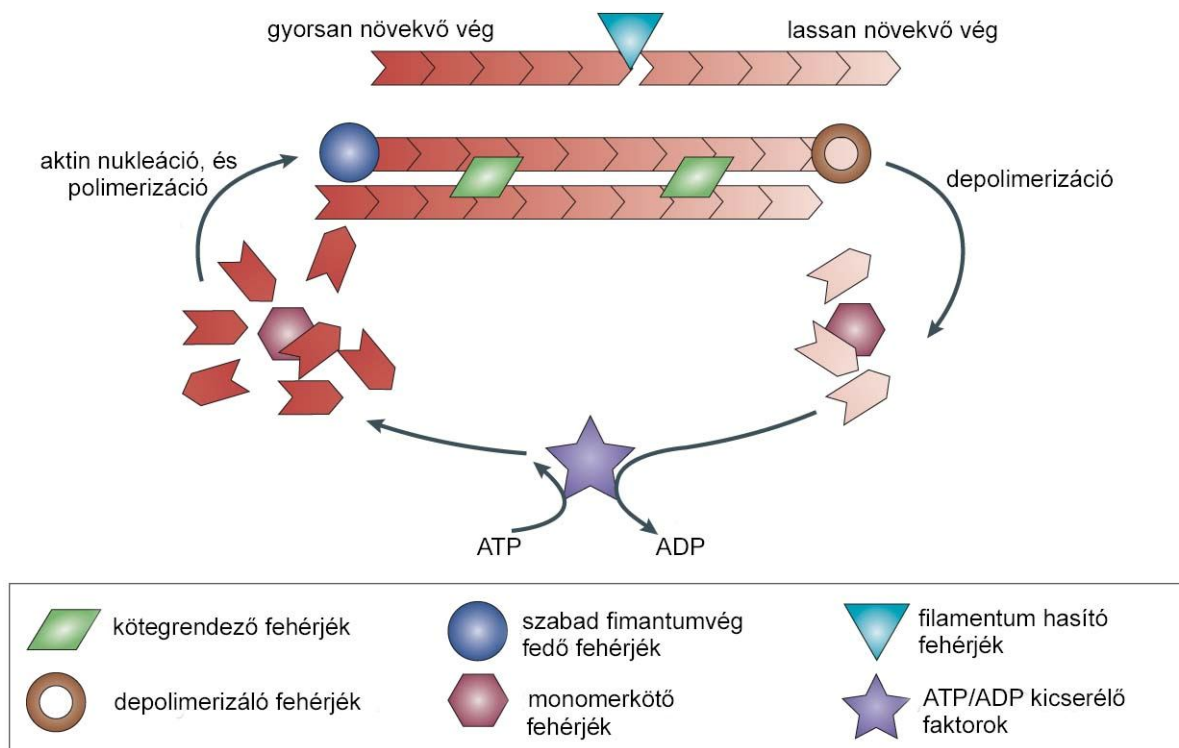
A sejtben az aktin két formája fordul elő. A monomer globuláris forma a G-aktin, míg a polimer forma az F-aktin, melyet G-aktin monomerek építenek fel. A G-aktin monomer molekulatömege ~42 kDa, a fehérje szekvenciája evolúciósan erősen konzervált. Az összes ismert aktin fehérje az egysejtűektől a gerincesekig legalább 80%-ban megegyezik egymással aminosav szekvencia szinten. Az aktin aszimmetrikus fehérje, mely négy aldomént tartalmaz. Az aszimmetria következménye, hogy az aktin monomerekből létrejövő filamentumok struktúrájukat tekintve polarizáltak. Az aktin fehérjedomének elhelyezkedése olyan, hogy egy hasadékot fognak közre a fehérje közepén, ahová ATP/ADP, illetve kétértékű kationok (legtöbbször  $Mg^{2+}$  ionok) kötődhetnek.

Magasabbrendűekben 3-féle aktintípus található. Az  $\alpha$ -aktin izoforma az izomsejtekben fordul elő nagy arányban, ahol az izomösszehúzódásokhoz szükséges strukturális alapot biztosítja. A  $\beta$ -, és a  $\gamma$ -aktinok elsődlegesen nem-izom típusú sejtekben találhatóak. A  $\beta$ -aktin a vándorló sejtekben a „leading edge”-ben (az a kitüntetett terület a sejtmembrán mentén, ahol a szubsztrátumon való mozgáshoz szükséges kitüremkedések, sejtnyúlványok kialakulnak) dúsul fel, de megtalálható a sejtmagban is. A  $\gamma$ -aktin jelenléte elengedhetetlen a belső fül sztereociliumaiban, a humán ACTG1  $\gamma$ -aktin gén mutációja domináns, hallásvesztéshez vezet (Zhu és mtsai. 2003).

### ***Az aktinfilamentumok felépítése és szerveződése***

Az F-aktin filamentumok bi-helikális struktúrák. Bennük két G-aktinból álló lánc tekeredik  $166^\circ$ -os szögben egymásra, a lánc csavarulata 37 nm-ként ismétlődik. A filamentumok nemcsak strukturális, hanem funkcionális értelemben is polaritással rendelkeznek. Végeiken eltérő dinamikával és sebességgel épülnek be (polimerizáció) illetve szakadnak le (depolimerizáció) a G-aktin monomerek. *In vitro* az ATP-kötött G-aktin oldatában a monomerek először 3-4 monomerből álló nukleációs magokat hoznak létre (lag fázis), melyeken utána meredeken gyorsuló ütemben megindul a további G-aktin monomerek beépülése mindkét végen (elongációs fázis). A beépülés során a filamentumban az ATP ADP-re hidrolizál, csak a végeken marad meg az ATP kötött forma. Végezetül beáll egy egyensúlyi állapot, amelyben a G-aktin monomerek folyamatos kicserélődése zajlik a filamentum két végén, de a filamentumok mennyisége és hossza nem változik (steady state fázis). A steady state fázisban mért G-aktin equilibrium koncentrációját kritikus koncentrációnak ( $C_c$ ) nevezzük. A filamentumon a polimerizációhoz illetve depolimerizációhoz szükséges kritikus

G-aktin koncentráció, illetve a végek növekedési dinamikája alapján megkülönböztetünk lassan, illetve gyorsan növekvő véget (1.ÁBRA) (Pollard 2007).

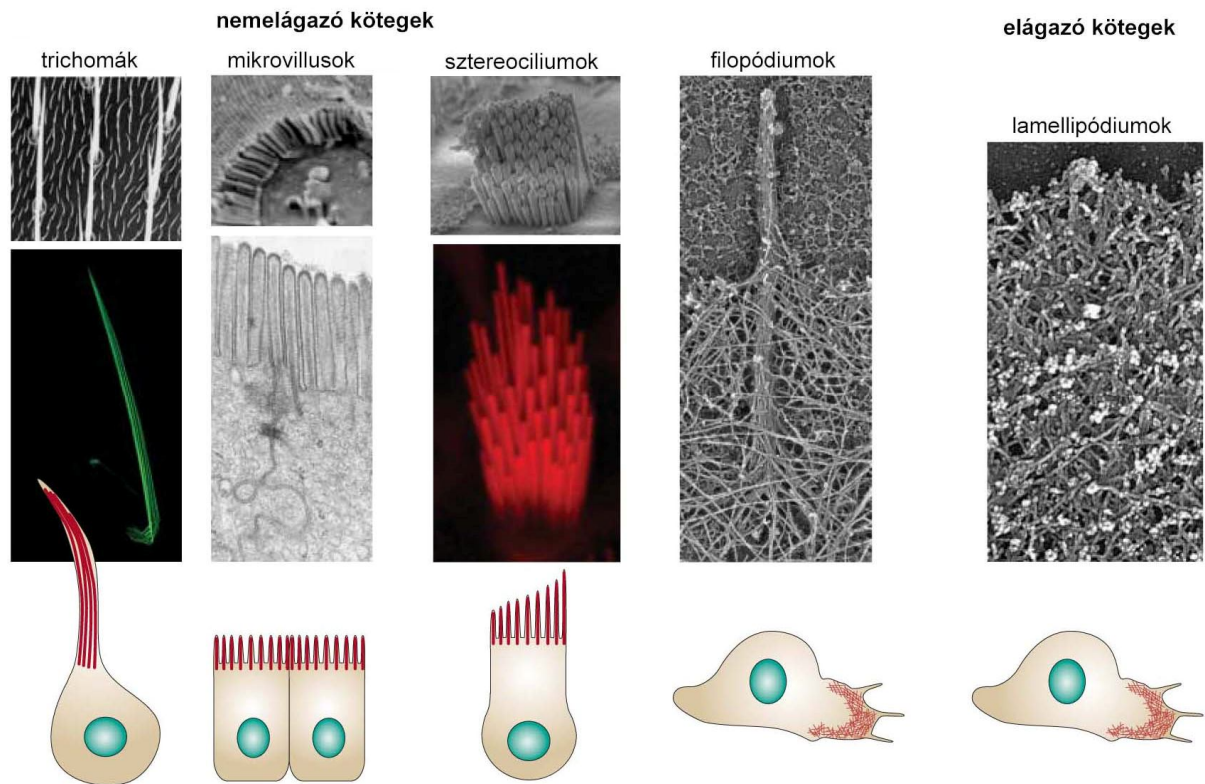


## 1.ÁBRA Az aktinfilamentumok dinamikája

A G-aktin monomerek tehát spontán módon is képesek filamentumokba rendeződni, de ezek létrejötte energetikai okoknál fogva az élő sejtben nem támogatott, mivel a nukleációs magok önmagukban rendkívül instabilak az élő sejtben (Pollard és mtsai. 2000). Ennek megfelelően a sejtnek szüksége van olyan fehérjékre, melyek képesek koordinálni az aktin nukleációt, a polimerizációt/depolymerizációt, valamint az egyéb, aktin citoszkeletonot érintő változásokat (1.ÁBRA).

Az eukarióta sejtekben alapvetően kétféle magasabbrendű aktinszerkezetet figyelhetünk meg. Léteznek nemelágazó, és elágazó aktinkötegek (2.ÁBRA). Elágazó,

hálózatos szerkezet jön létre például a lamellipódiumokban és sejtfordrozódásokban, míg például a filopódiumokra a nemelágazó láncú aktinkötegek jellemzőek (2.ÁBRA).



## 2. ÁBRA Az aktinkötegek típusai

Azt, hogy egy bizonyos helyen és időben milyen típusú aktinlánc és magasabbrendű filamentumszerkezet jön létre, különböző szabályozó funkcióval bíró fehérjecsaládok tagjai szabják meg. Ilyenek egyrészt a szabad filamentumvégeket lefedő (capping) fehérjék, melyek megakadályozzák, hogy az adott filamentum a szükségesnél tovább növekedjen vagy éppen idő előtt depolimerizálódjon. Másrészt ilyenek a depolimerizációt vagy a filamentum elhasítását (severing) elősegítő fehérjék, illetve harmadrészt az új aktinláncok iniciációját elősegítő nukleáló/polimerizációs faktorok. Szükség van továbbá olyan fehérjékre is, melyek képesek az aktinfilamentumokat hálózatos szerkezetbe, vagy kötegekbe rendezni (bundling) (1.ÁBRA).



### *Capping fehérjék*

A capping fehérjék szerepe a gyorsan illetve a lassan növekvő vég lefedése az aktin filamentumon. Kötődésük stabilizálja azokat a filamentumokat, amelyek növekedésére a továbbiakban nincs szükség, és ennél fogva elősegítik az aktinpolimerizáció pontos térbeli és időbeli szabályozását, az aktinhálózat újraszerveződését. Ilyen fehérjék a Gelsolin szupercsalád tagjai. A Gelsolinok mikromólos koncentrációban jelenlévő  $\text{Ca}^{2+}$  ionok hatására aktiválódnak, és képesek az aktinfilamentumokat elhasítani, majd a szabaddá vált gyorsan növekvő vége(ke)t lefedni. Foszfo-inozitoidok hatására felszabadulhatnak a védett filamentumokról, amelyeken ezt követően újra kezdődhet a polimerizáció (Yin és mtsai. 1980).

A lassan növekvő véget a Tropomodulin fehérje képes lefedni. Funkciójára a harántcsíkolt izmokban van szükség, ahol Tropomyozinhoz kapcsolódva még hatékonyabban képes védeni a lassan növekvő filamentumvégeket a szarkolemmában (Fowler 1990). A *tropomodulin Drosophila* homológja a *sanpodo* gén, melyről kimutatták, hogy az embrionális idegrendszer neurális progenitor sejtjeiben a Notch jelátvitel mediálta sejtors meghatározásban játszik fontos szerepet (Skeath és Doe 1998).

### *Depolimerizáló, és filamentum hasító (severing) fehérjék*

A sejtek motilitásához és az aktin citoskeleton dinamikus átrendeződéséhez szükség van az F-aktin irányított szétszerelésére is. A depolimerizáló fehérjék többnyire a lassan növekvő végen hatnak, ahol elősegítik a G-aktin monomerek disszociációját. A vágó (severing) fehérjék ezzel szemben az aktin filamentumon belül bontják meg a kapcsolatot a G-aktin monomerek között, és így hoznak létre minél több potenciális depolimerizációs

helyet. Ilyen faktorok például az ADF/Cofilin fehérjecsalád tagjai (Nishida és mtsai. 1984). A Cofilin fehérje egyrészt elősegíti a lassan növekvő végen az aktinfilamentumok depolimerizációját, másrészt képes hasítani is a filamentumokat. Aktivitásához defoszforiláció szükséges, a 3-as pozícióban lévő szerin aminosavon foszforilált Cofilin aktivitása gátolt (Agnew és mtsai. 1995).

#### *Aktin köteg rendező fehérjék (bundling)*

Nevükből adódóan a kötegrendező fehérjék funkciója az aktinfilamentumok egymás mellé rendezése, kötegelése. Legismertebbek közülük a Fascin és a Villin fehérjék. A Fascin nevét a latin *fasciculus* szó után kapta, miután először megfigyelték, hogy az F-aktin kötegekkel szoros kolokalizációt mutat és velük stabil kötegeket képez (DeRosier és Edds 1980). *Drosophila*-ban öt aktinköteg rendező aktivitással rendelkező fehérjét ismerünk. Ezek a Fascin homológ Singed, a Cheerio/Filamin, a Quail (Villin homológ), a Forked, és az  $\alpha$ -Actinin. Mutációik minden esetben aktin citoszkeleton defektusokat okoznak az érintett szövetekben. Például erős *singed* mutánsokban az oogenezis során a dajkasejtek magjai nem rögzülnek megfelelően a citoplazmában, hanem eltörik az oocita táplálásában fontos gyűrűsatornákat, ami nősténysterilitáshoz vezet (Cant és mtsai. 1994). A *quail* mutánsokban szintén nősténysterilitást figyeltek meg, ennek oka szintén a dajkasejtek aktincitoszkeletonjának alulrendezettsége (Mahajan-Miklos és Cooley 1994).

#### *Aktin nukleáló faktorok*

Metazoa sejtekben napjainkig négy fő összeszerelő faktort azonosítottak, melyek képesek aktinmonomerekből új aktinláncok képződését elindítani (nukleálni), illetve a

magasabbrendű aktinstruktúrák kialakítását is szabályozzák. Ezek az Arp2/3 komplex (Welch és mtsai. 1998; Welch és mtsai. 1997; Mullins és mtsai. 1998), a formin fehérjék (Sagot és mtsai. 2002; Pruyne és mtsai. 2002), a Spire (Quinlan és mtsai. 2005), illetve a Cordon-bleu (Ahuja és mtsai. 2007) aktin nukleáló faktorok. Az Arp2/3 komplex az elágazó láncú kötegek kialakításáért felelős és a hálózat elágazási pontjaiban az aktinfilamentumok lassan növekvő végéhez kötődik (Mullins és mtsai. 1998). A Spire illetve a formin fehérjecsald tagjai ezzel szemben a nemelágazó láncok kialakításáért felelnek, de míg a Spire a lassan növekvő véghez (Quinlan és mtsai. 2005), addig a forminok a gyorsan növekvő véghez kapcsolódnak (Sagot és mtsai. 2002; Pruyne és mtsai. 2002). A Cordon-bleu fehérje szintén a nemelágazó aktinfilamentumok kialakításáért felel, és a gyorsan növekvő véghez kapcsolódik (Ahuja és mtsai. 2007).

#### *Az Arp2/3 komplex*

Az Arp2/3 komplexet összesen hét polipeptid lánc alkotja (ARPC1-5, illetve Arp2 és Arp3) (Mullins és mtsai. 1997). Az Arp2 és Arp3 alegységek fehérjeszekvenciái közel 50%-os egyezést mutatnak az aktinnal (Arp: actin-related protein), szerkezetük pedig olyan, hogy együttesen egy, a lassan növekvő végen található aktin dimert mimikálnak (Welch és mtsai. 1997), így módon teszik lehetővé további aktinmonomerek kapcsolódását a gyorsan növekvő végen. Az Arp2/3 komplex önmagában nem képes aktinmonomerekből új láncok képződését elindítani, hanem egy már kész filamentum oldalához kapcsolódik, majd (sztérikus okoknál fogva) az anyafilamentummal 70°-os szöget bezárva megindul az új aktinlánc kialakulása (Mullins és mtsai. 1998). Az Arp2/3 aktivitása ilyen módon hálózatos, dendritfára emlékeztető aktinstruktúra kialakítását teszi lehetővé, ahol az Arp2/3 az elágazódási pontokban helyezkedik el. Ezzel összhangban immunhisztokémiai vizsgálatok kimutatták,

hogyan az Arp2/3 komplex mind lamellipódiumokban (Machesky és Insall 1998; Iwasa és Mullins 2007), mind membránfodrozódásokban megtalálható (Insall és mtsai. 2001). *Drosophila*-ban az alegységeket érintő funkcióvesztéssel mutációk homozigóta letalitáshoz vezetnek (Hudson és Cooley 2002).

Az Arp2/3 komplex ismert aktivátorai a WASP (Wiscott-Aldrich Syndrome Protein), az N-VASP, a Scar (suppressor of cAMP receptor)/WAVE, illetve a Cortactin fehérjék. Mindegyikükre jellemző, hogy tartalmazznak egy CA régióval nevezett fehérjerészletet, melynek egyik részén bázikus (kapcsoló régió-Connector region), a másikon savas aminosavak találhatók (savas régió-Acidic region). Az aktivátorok a CA régióval keresztül kapcsolódnak az Arp2/3 komplexhez. Az izolált CA régió túlermelése blokkolja az Arp2/3 komplex aktivitását (a lamellipódiumok képződését) oly módon, hogy az endogén aktivátorokkal versengve megakadályozza azok kapcsolódását a komplexhez (Hufner és mtsai. 2001; Machesky és Insall 1998). A CA régió azonban önmagában nem elégséges az Arp2/3 komplex aktiválásához *in vitro*, a sikeres aktiváláshoz szükség van a G-aktin monomerek (I. típusú aktivátorok esetében) vagy az F-aktin filamentum (II. típusú aktivátorok esetében) jelenlétére is. Az I. csoportba tartozó aktivátorok egy, vagy több monomer aktint kötő WH2 (WASP homology 2) domént tartalmazznak a CA régiótól N-terminális irányban. A jelenlegi modell szerint valószínűleg úgy működnek, hogy a CA régió kötődése az Arp2/3 komplexen egy konformációs változást okoz, és a G-aktin egyidejű jelenléte a WH2 doménen indítja el a nukleációt. A II. típusba tartozó aktivátorok F-aktin kötő doméneket tartalmazznak (FAB: F-actin binding), melynek jelenlétében a CA régióval összekapcsolódott Arp2/3 komplex szintén konformációs változást szenved, és képes kötődni az anyafilamentumon. A FAB domén szerepe valószínűleg a leányfilamentum, és így módon az elágazás stabilizálása (Pollard 2007).

## A Spire fehérje

A Spire-t először *Drosophila*-ban azonosították, mint az oocita polaritásának kialakításáért felelős faktort. Funkcióvesztéses mutációja nősténysterilitást okoz, a *spir*<sup>1</sup> homozigóta mutáns nőstények oocitáiban nem alakul ki a poláris plazma, és nem fűződnek le az ősvarsejtek sem. Az anyai *spir* géntermék hiánya az oocita anterior-poszterior és dorzális-ventrális polaritásának megszűnéséhez vezet, a *spir*<sup>1</sup> anyáktól származó *spir*<sup>1</sup> homozigóta mutáns embriók pedig abdominális szegmetációs hibákat mutatnak (Manseau és Schüpbach 1989). *In vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a Spire fehérje valószínűleg az aktinfilamentumok lassan növekvő végéhez kapcsolódik, de az Arp2/3 komplextől eltérően a Spire aktivitása nemelágazó aktinláncok képződéséhez vezet (Quinlan és mtsai. 2005). Szerkezetét tekintve tartalmaz négy WH2 fehérjedomént, melyek képesek közvetlenül kapcsolódni az aktinnal, menekíteni a *spir* funkcióvesztéses fenotípusát, és önmagukban elégségesek az aktin nukleálásához *in vitro*. A javasolt modell szerint a Spire a négy WH2 doménen platformot biztosít 4 aktin monomer számára, és azok bekötődésével egy nukleációs magot hoz létre, amely mimikálja az aktinfilamentum helikális szerkezetét. Későbbi vizsgálatok azonban kimutatták, hogy ez sztérikus okok miatt nem lehetséges. Emiatt a Spire a vártnál jóval lassabb dinamikával képes csak új aktinláncok képződését nukleálni *in vitro* (Renault és mtsai. 2008). A fehérje tartalmaz még egy KIND (kinase non-catalytic C-lobe domain) domént is, mely a forminok FH2 doménjével közvetlen fizikai kölcsönhatásba lépve meggátolja a *Drosophila cappuccino*, és a *formin1* (emlős *cappuccino* homológ) közvetítette aktin nukleációt (Bosch és mtsai. 2007; Quinlan és mtsai. 2007). Emellett a Spire képes összekapcsolni a mikrotubulusok alkotta citoszkeletont az aktin citoszkeletonnal (Rosales-Nieves és mtsai. 2006).

## *Cordon-bleu*

A Cordon-bleu fehérje kizárólag a gerincesekben fordul elő. A *cobl* a központi idegrendszerben fejeződik ki, funkcióvesztéses mutációja velőcső záródási rendellenességeket eredményez (Carroll és mtsai. 2003). C-terminálisán három WH2 domén található. Önmagában mindegyik WH2 domén képes különböző affinitással G-aktinhoz kötődni, de mindhárom szükséges a fehérje nukleáló aktivitáshoz *in vitro*. A Cobl működése a javasolt modell szerint úgy történik, hogy az első két WH2 doménon lineáris orientációban G-aktin monomerek kötődnek, majd a harmadik WH2 domén (mely egy 30 aminosavas linkerrel el van választva a másik két WH2 doméntől) „helyezi el” a következő G-aktin monomert laterálisan a másik kettő mellé. Ily módon egy aktin trimert tartalmazó nukleációs mag alakul ki (Ahuja és mtsai. 2007).

## *Forminok*

A formin fehérjecsalád névadó tagját, a Formin-1-et egérben azonosították. A formin elnevezés a gén mutációja által okozott „limb deformity” fenotípusból származik. A mutációra homozigóta egerekben vese-, és végtagfejlődési rendellenességeket figyeltek meg, melyek együttesen homozigóta letalitáshoz vezettek (Maas és mtsai. 1990). Későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a mutáns fenotípus valójában a *formin-1* génnel szomszédos *gremlin* gén funkciójának kieséséhez köthető, de a „formin” elnevezés megmaradt (Zuniga és mtsai. 2004).

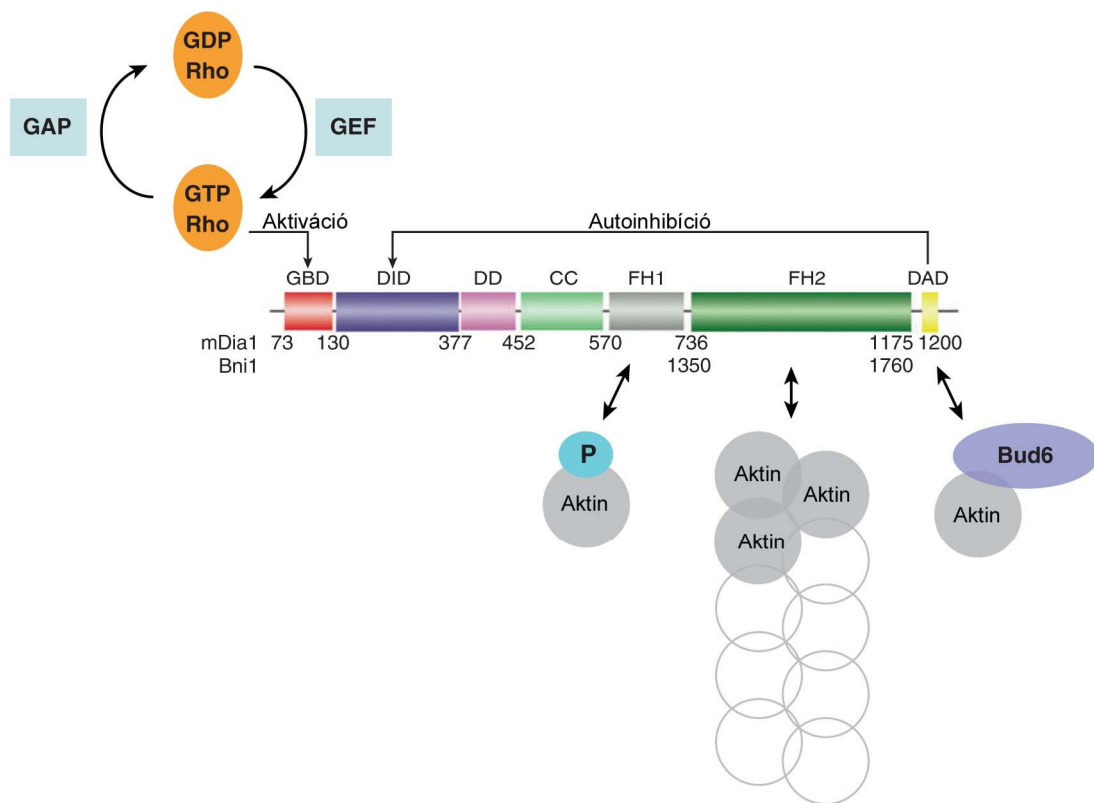
A forminok multidomén fehérjék, számos konzervált fehérjedomént tartalmaznak. A forminok között és az egyes formin alcsaládokon belül is a legjobban konzervált az FH2 (formin homology 2) domén. Ezen felül jellemző a forminokra még az FH1 (formin

homology 1) domén jelenléte, melynek szerepe a G-aktin kötött Profilin fehérje dokkolása az FH2 katalitikus doménhez megfelelő közelségben. A Profilinen kívül az FH1 doménhez kötődhetnek továbbá WW és SH3 doméneket tartalmazó kölcsönható partnerek, úgy mint az Src nem receptor tirozin kinázok családjába tartozó fehérjék (Uetz és mtsai. 1996; Chan és mtsai. 1996; Tominaga és mtsai. 2000; Kamei és mtsai. 1998).

Egy 26 metazoa faj 101 formin génjének FH2 doménjeit összehasonlító filogenetikai analízis alapján a forminokon belül hét nagy alcsaládot különíthetünk el (Higgs és Peterson 2005). Az alcsaládok a következők: DIA, FMN, FHOD, delfilin, INF, FRL, és a DAAM-ok. A forminok nem-metazoa organizmusokban, gombákban és növényekben is megtalálhatóak, de ezek besorolása az FH2 domének nagyfokú különbözősége miatt nem lehetséges a fenti kategóriákba. Ugyanakkor működési mechanizmusukat és doménszerkezetüket tekintve sok hasonlóság van az irodalomban legjobban jellemzett DRF (diaphanous related formins) csoportba tartozó formin fehérjék (DIA, az FRL, és DAAM alcsaládok) és bizonyos gomba forminok között (Bni1, Bnr1, SepA) (Goode és Eck 2007).

A DRF forminokban a C-terminális részen található a katalitikus aktivitásért felelős FH2 domén és a Profilin-aktin kötő FH1 domén. A DRF forminok dimerként működnek, a sejten belül kis GTP-ázok segítségével aktiválódhatnak (Watanabe és mtsai. 1999; Nakano és mtsai. 2002). Az aktiváció a DRF formin C-, és N-terminálisán található domének közötti autoinhibíciós kölcsönhatás feloldásával valósul meg. Alapállapotban egy intramolekuláris autoinhibíciós mechanizmus meggátolja, hogy az FH2 domén hozzáférhető legyen az aktin monomerek számára. Ezt a fehérje N-terminálisán lévő GBD (GTPase-binding domain), illetve az extrém C-terminálison található DAD (diaphanous autoregulatory domain) domének közvetlen fizikai kapcsolata biztosítja. Aktivált (GTP-kötött) kis GTP-ázok bekötődésével az autoinhibíciós domének közötti fizikai kapcsolat megszűnik, a formin aktív állapotba kerül (3. ÁBRA) (Alberts 2001; Li és Higgs 2005; Lammers és mtsai. 2005; Rose és mtsai. 2005). A

GBD, illetve DAD domén deficiens DRF forminok konstitutívan aktív formaként viselkednek számos tesztrendszerben (Block és mtsai. 2008; Tominaga és mtsai. 2000). Biokémiai és röntgenkristallográfiai vizsgálatok alapján az N-terminálison található GBD domén további aldoménekre bontható (DID, CC, DD) (3.ÁBRA) (T. Otomo, C. Otomo és mtsai. 2005). A DID (diaphanous inhibitory domain) domén az autoinhibíciós mechanizmus másik résztvevője, képes közvetlenül kapcsolódni az extrém C-terminálison található DAD doménnel (Nezami és mtsai. 2006).



### 3.ÁBRA A Diaphanous szerű forminok doménszerkezete és működése

Az ábra két DRF formin doménszerkezetét mutatja a doménhatárokat jelölő aminosavakat számmal is jelölve. A felső számsorozat az mDia1-hez tartozik, az alsó pedig a Bni1-hez. Rövidítések: Bud6, egy aktinkötő interaktor fehérje, CC, coiled-coil domén, DAD, diaphanous autoregulációs domén, DD dimerizációs domén, DID, diaphanous inhibíciós domén, FH1 és FH2, formin homológia 1 és 2 domének, GAP, G-protein aktiváló fehérje, GBD, GTP-áz kötő domén, GEF, guanin-nukleotid kicserélő faktor, P, Profilin fehérje. Az autoinhibíció a C-terminális DAD (sárga) és az N-terminális DID (kék) domének kölcsönhatásával jön létre. Egy GTP-kötött Rho fehérje (GTP Rho) GBD doménen (piros) történő kapcsolódásával az autoinhibíciós kapcsolat meggyengül, a formin aktív állapotba kerülhet. Ezek után az FH2 domén (sötétzöld) új aktin filamentumok kialakítását indíthatja el új nukleációs magokat létrehozva, majd a polimerizáció során a gyorsan növekvő véggel asszociált marad. Az FH1 domén (szürke) kölcsönhatása a Profilin fehérjével (P) jelentősen gyorsíthatja az elongációt. A formin aktivitását C-terminális faktorok is szabályozhatják, például a Bud6 fehérje DAD doménrel való interakciója elősegíti a G-aktin monomerek beépülését a filamentumba (Moseley és Goode 2005). Az eredeti ábra forrása: (Goode és Eck 2007)



A CC domén szerepe irodalmi adatok alapján a formin fehérje sejten belüli lokalizációjának szabályozása (Copeland és mtsai. 2007), míg a DD doménről kimutatták, hogy dimerizálódásra képes és fokozza a DID domén közvetítette autoinhibíció hatékonyságát (Li és Higgs 2005; Schulte és mtsai. 2007; Schulte és mtsai. 2008).

A DRF forminok működési mechanizmusát leginkább az élesztő forminok analízise segített felderíteni. A továbbiakban főként azokat a vizsgálatokat mutatom be, melyek ezen forminok genetikai és molekuláris biológiai boncolásával a legnagyobb mértékben járultak hozzá a DRF forminok működési mechanizmusának megértéséhez. A *S. cerevisiae* genomja 2 formin gént tartalmaz: *Bni1* (*bud neck involved*) és *Bnr1* (*Bni-related*). *Bni1Δ* deléciós mutánsokban rendellenességeket tapasztaltak a mitotikus orsó pozicionálásában, a sarjsejt polarizált növekedésében (Lee és mtsai. 1999; Ozaki-Kuroda és mtsai. 2001), *Bnr1* hiányában pedig a sarjadzás tengelye randomizálódik (Imamura és mtsai. 1997), a *Bni1Δ, Bnr1Δ* kettős mutáns letális fenotípust mutat (Buttery és mtsai. 2007; Ozaki-Kuroda és mtsai. 2001). A *Bni1* fehérjéről élesztő kettős hibrid kísérletekben kimutatták, hogy kölcsönhat a G-aktin kötő Profilin fehérjével, az aktinnal, a Bud6 (*Aip1*) fehérjével és a Rho családba tartozó Cdc42p és Rho1p kis GTP-ázok aktivált formájával (Imamura és mtsai. 1997; Kohno és mtsai. 1996; Evangelista és mtsai. 1997). Ezek a vizsgálatok voltak az elsők, amelyek azt feltételezték, hogy a forminok aktivátorai a Rho kis-GTP-ázok családjába tartozó fehérjék lehetnek, és hogy a *Bni1* fehérje közvetlenül szabályozza az aktin sejtvázszerkezetét a Profilinnal együttműködve. A modellt azután magasabbrendűekben, a p140mDia (*mDia1*) forminra emlős fibroblaszt sejt kultúrában is igazolták. A p140mDia a membránfodrozódásokban kolokalizálódik a profilinnal és a RhoA-val is, és ezen felül képes kötődni mind a Profilinhez, mind a RhoA GTP-kötött (aktivált) formájához. A három fehérje fibronectinnal bevont gyöngyök által indukált fagocitikus kompartmentumokhoz is együtt lokalizálódik, azonban ha a RhoA-t botulin C3 exoenzim toxinnal inaktíválják, akkor ez a viselkedés megszűnik. Ez a

kísérlet is arra utalt, hogy a DRF forminok aktivációjához Rho GTP-ázok szükségesek (Watanabe és mtsai. 1999). Mind a Bni1, az p140mDia, és a *S. pombe* Cdc12p formin esetében ismert azt is, hogy a Profilinnal való kölcsönhatás az FH1 domén prolin gazdag részén keresztül valósul meg (Imamura és mtsai. 1997; Krebs és mtsai. 2001; Chang és mtsai. 1997).

Később bizonyítást nyert, hogy a Bni1 FH2 doménje viszont önmagában szükséges és elégséges az aktinnukleációhoz és polimerizációhoz *in vitro*. A kísérletek során a fehérje FH1-FH2 doméneket tartalmazó darabját tisztították (Bni-mini, illetve Bni1pFH1FH2), és pyrene-G-aktin oldatával inkubálva tesztelték a nukleációs és polimerizációs képességét és, illetve *in vivo* aktivitását is. Vad típusú háttéren mindkét transzgén ektopikus kifejeződése új aktinkábelek kialakulását indukálta, a Bni1pFH1FH2 fragment túlermelése emellett osztódási hibákat okozott, és letalitáshoz vezetett. Az aktin spontán összeszerelődéshez képest mindkét előbb említett FH1-FH2 fragment gyorsította az aktin nukleációt és a polimerizációt is *in vitro*. Amennyiben a fehérjéből az FH2 domént kiejtették (Bni1-mini-ΔFH2), vagy pontmutációkkal inaktiválták (Bni1-mini-FH2#1), akkor az nem volt képes új aktinláncokat nukleálni a reakcióban. Ez közvetlenül utalt arra, hogy az aktin nukleációs aktivitásért az FH2 domén a felelős.

Az aktin nukleáció során a Bni1-mini nem interferált az Arp2/3 komplex közvetítette aktin nukleációval, cytochalasinD jelenlétében (mely az aktinfilamentumok gyorsan növekvő végéhez kötődve blokkolja a polimerizációt) pedig (illetve cythocalasinB és Bni1pFH1FH2 együttes inkubációja során is) nem volt képes gyorsítani az aktin polimerizációját amiből arra a következtetésre jutottak, hogy a fehérje a gyorsan növekvő véghez kapcsolódik. A továbbiakban elektronmikroszkópos megfigyelésekkel bizonyították, hogy az FH1-FH2 domén által létrehozott aktinfilamentumok valóban nemelágazó láncúak és az FH1-FH2 domén a filamentumok gyorsan növekvő végével asszociált. Amennyiben a G-aktin oldatában

előzetesen nukleációs magokat hoztak létre, és azután adták hozzá a Bni1pFH1FH2 fehérjét, akkor az aktinpolimerizáció sebessége a formin fehérje koncentrációjától függően 50%-kal lelassult. Ezen felül a Bni1pFH1FH2 jelenléte a gyorsan növekvő végen gátolta a szabad filamentumvég fedő (capping) Gelsolin fehérje által kiváltott polimerizáció inhibíciót. Ebből arra következtettek, hogy a Bni1 amellett, hogy képes elősegíteni új aktinláncok kialakulását, a gyorsan növekvő véghez való asszociáltsága védő és szabályozó funkciót is jelent (processive capping) (Evangelista és mtsai. 2002; Sagot és mtsai. 2002).

A későbbiekben számos egyéb faj forminjairól is belátták, hogy képesek új aktinláncok képződését elindítani (*S. pombe* Cdc12p, *Drosophila* Cappuccino és Diaphanous, *Dyctiostelium* dDia2, egér FRL, mDia1, mDia2, és mDia3) *in vitro*.

A további kutatások arra irányultak, hogy biokémiai és biofizikai módszerekkel feltérképezzék a DRF forminok aktivációs mechanizmusait, és működését az aktinfilamentumok gyorsan növekvő végén. A Bni1 FH2 doménról *in vitro* kimutatták, hogy oldatban dimerizálódik (kellően hosszú idő után tetramerek is létrejönnek) (Evangelista és mtsai. 2003). Analitikai ultracentrifugálással elvégzett szedimentációs kísérletek szintén arra utaltak, hogy a Bni1 FH2 domén dimerizálódásra képes. Emellett, ha *in vitro* a dimerizációért felelős aldóménben a konzervált triptofán aminosavakat elmutálták, a mutáns FH2 fehérjék ezek után nem voltak képesek új aktinláncokat nukleálni és polimerizálni, és elveszett a „processive capping” képességük is (Moseley és mtsai. 2004). Egy másik munka megmutatta, hogy az mDia1 formin N-terminálisának jelenléte domináns negatív módon befolyásolja a C-terminális aktint nukleáló képességét pyrene-aktin oldatában. Ebből a korábbi megfigyelésekkel összhangban arra következtettek, hogy az mDia1 normálisan egy intramolekuláris autoinhibíciós mechanizmus révén inaktív állapotban lehet jelen a sejtekben, melyet az aktivált RhoA kötődése oldhat fel. Érdekes módon azonban a RhoA aktivált és nem-aktivált formáinak jelenléte sem képes teljesen feloldani a domináns negatív gátlást és

visszaállítani az FH2 domén polimerizációs képességét. Ez arra engedett következtetni, hogy az mDial esetében az autoinhibíció feloldásához az élő sejtben több faktor is szükséges az aktivált kis GTP-ázokon kívül (Li és Higgs 2003).

Később az egér mDial különböző méretű N-, és C-terminális fragmentjeinek tisztítása, ultracentrifugálással való együtt üleptése (koszedimentáció) és kromatográfiás vizsgálata megmutatta, hogy a C-terminális (FH2 domént tartalmazó részek) és az N-terminális fragmentumok is önmagukban stabil dimereket alkotnak. Az N-terminális részen biokémiai úton részleges proteolitikus emésztésekkel azonosították az autoinhibíciós mechanizmus másik résztvevőjét, a DID domént, illetve térképeztek egy dimerizációra képes fehérjedomént a DID és FH1 domének között (DD) (Li és Higgs 2005). A DRF forminok doménszerkezetének röntgenkristallográfiai analízise még közelebb vezetett működési mechanizmusuk megértéséhez. A Bni1 FH2 doménjének strukturális analízise megmutatta, hogy az FH2 domének valóban kötött dimereket alkotnak, és azonosították a dimerizációért és aktinkötésért felelős konzervált aminosavakat a fehérjében (Xu és mtsai. 2004). Az FH2 dimer csak akkor volt képes nukleálni és polimerizálni az aktint, ha az FH2 domének homodimereket hoztak létre, a monomerek önmagukban működésképtelenek voltak, és gátolták a polimerizációt. A dimerizációért felelős triptofán aminosavak a „lasszó” aldoménre estek (melyet korábban már genetikai úton is térképeztek és bizonyították, hogy az FH2 domén dimerizációja valóban szükséges az aktin nukleálásához *in vitro* (Moseley és mtsai. 2004).

A későbbiekben a Bni1 FH2 doménjét aktinnal együtt is sikerült kristályosítani, és vizsgálni a szerkezetét. Ebben a munkában is leírták a fő aktinkötő és dimerizációért felelős aminosavakat, és az alábbi működési modellt állították fel. A modell szerint az FH2 dimer kezdetben két aktin molekulát köt. Ez a komplex szolgál a továbbiakban nukleációs magként a további G-aktin monomerek beépüléséhez, leküzdv ezzel a spontán módon kialakuló

nukleációs magok elé szabott energetikai gátat. A polimerizáció során azután a növekvő filamentumban az FH2 dimer folyamatosan három aktinmonomerrel van kapcsolatban. Az egyes hemidimerek egyenként két aktinmolekulát kötnek. A filamentum lassan növekvő vége felé eső FH2 hemidimer mindig zárt állapotban van, míg a gyorsan növekvő vég felé elhelyezkedő hemidimer egyik aktinkötő régiója mindig nyitott. A hemidimerek nyitott és zárt állapotok közötti váltása során az FH2 dimer mintegy végiglépked a beépülő G-aktin monomereken („stair stepping” modell), és folyamatosan asszociált marad a gyorsan növekvő véggel (processive capping) (Otomo, Tomchick és mtsai. 2005).

### ***A DAAM formin alcsalád***

A közelmúltban Habas és munkatársai jellemezték egy új formin altípust, amely a DAAM (dishevelled associated activator of morphogenesis) nevet kapta. A fehérjét egy élesztő kettős hibrid kísérletsorozatban találták meg, mikor az egér Dishevelled2 (mDvl2) PDZ doménjével kölcsönható partnereket kerestek. A hDaam1 tartalmaz FH1 és FH2 doméneket, illetve jellemző rá a GBD, azon belül is a DD, CC, DID domének jelenléte. Ez a fajta doménelrendeződés előrevetítette azt a lehetőséget, hogy a DAAM a már vizsgált DRF forminokhoz hasonló molekuláris mechanizmusokon keresztül, Rho kis GTP-ázok segítségével kerülhet aktív állapotba. Koimmunoprecipitációs kísérletekben a teljes hosszúságú humán Daam1 (hDaam1), illetve annak C-terminális darabja (C-Daam1) is kölcsönhatott az mDvl2 PDZ, illetve DEP doménjeivel, melyekre elsődlegesen a nem-kanonikus Wnt szignalizációban van szükség. Dorzális szöveti struktúrákat (mezoderma, bőr, idegrendszer) tartalmazó *Xenopus* animális pólus explantátumokon, ha az *xDaam1* (*Xenopus Daam1*) gént az *xDaam1*-re specifikus morpholino oligo injektálásával csendesítették, akkor karakterisztikus, a nem-kanonikus Wnt jelátviteli út elégtelen működésére jellemző

funkcióvesztéssel fenotípusokat kaptak. Az *xDaam1* morfolino okozta gasztrulációs defektusokat *hDaam1* RNS-sel (mely nem érzékeny az *xDaam1* morfolino oligóra) együttesen injektálva menekíteni tudták. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a Daam1 hiányában tapasztalt fenotípusok valóban ehhez a génhez köthetőek, illetve, hogy a Daam1 valóban szerepet tölthet be a nem-kanonikus Wnt jelátviteli útban. GST-pulldown kísérletekben a teljes hosszúságú hDaam1 forma, illetve az N-Daam1 N-terminális csonkolt forma is kötődött a Rho mindkét formájához (elsődlegesen az aktivált, GTP-kötött formához), míg a C-Daam1 nem. Ugyanakkor azt is kimutatták, hogy a Cdc42 illetve Rac kis GTP-ázok formáihoz ebben a kísérleti elrendezésben a hDaam1 nem kötődik. Habas és munkatársai bemutatták azt is, hogy HeLa sejtekben a nem-kanonikus Wnt jelátviteli út hatására a RhoA Dvl függő módon aktiválódik, és a RhoA aktivációjához hDaam1-re (minimálisan a C-terminálisra, azaz az aktivált forminra) van szükség. Ezek alapján azt a következtetést vonták le, hogy a hDaam1 molekuláris kapocsként működik a nem-kanonikus Wnt jelátviteli útban a Dvl és a RhoA között (Habas és mtsai. 2001). Ez az elképzelés azonban ellentmond a DRF forminok konvencionális szabályozási modelljének, hiszen ez a kis-GTP-áz aktivációját teszi függővé a formintól. A fehérje további vizsgálata során az irodalomban ellentmondásos kép alakult ki arról, hogy hogyan aktiválódhat a hDaam1. Higashi és munkatársainak eredményei azt sugallják, hogy aktivátorok hiányában a hDaam1 a DRF forminokhoz hasonlóan egy intramolekuláris autoinhibíciós mechanizmus révén inaktív állapotban van jelen a sejtben. Vérlemezke citoszolban a Daam1CT C-terminális csonkolt -konstitutívan aktív- hDaam1 forma jelenléte F-aktin feldúsulást idéz elő, míg a „lasszó” aldoménben mutáns, dimerizációra képtelen hDaam1CT-t tartalmazó gyöngyök felszínén nem alakulnak ki új aktinláncok. A hDaam1 a DRF forminokhoz hasonlóan valószínűleg az aktinfilamentumok gyorsan növekvő végével asszociált, mert vérlemezke citoszolba cytochalasinD drogot adva a Daam1CT-vel bevont gyöngyök felszínén nincs F-aktin felhalmozódás. Konstitutívan aktivált Rho formák

teljes mértékben menekítik a Daam1NT okozta aktin polimerizáció gátlást Daam1CT-vel (C-terminális csonkolt forma) bevont gyöngyökön, míg a GDP-kötött formák nem. Ez azt sugallja, hogy a hDaam1 formin aktív állapotához, az autoinhibíciós mechanizmus feloldásához az előzetesen aktivált Rho GTP-ázokra van szükség és nem pedig fordítva, ahogyan azt Habas és munkatársai leírták. Ezt támasztja alá az is, hogy nemaktivált vérlemezkékből az  $\alpha$ -hDaam1 ellenanyag csak kis hatékonysággal képes precipitálni a RhoA fehérjét, ellenben aktivált vérlemezkékből -ahol magas az aktivált, GTP-kötött RhoA szintje- nagy hatékonysággal. Ez arra utal, hogy a hDaam1 csak az aktivált RhoA-hoz kötődik *in vivo* is (Higashi és mtsai. 2008). További, független GST-pulldown kísérletekben a hDaam1 mind a RhoA, mind a Cdc42 kis-GTP-ázokhoz képes volt kötődni, a Rac1-hez pedig nem. Egyik közleményben sem tudtak azonban kimutatni hDaam1 függő kis-GTP-áz aktivációt sem a RhoA, sem a Cdc42 esetében, amely szintén ellentmond a Habas és munkatársai által leírt eredményeknek. Később röntgenkristallográfiai és biofizikai vizsgálatok során kiderült, hogy a hDaam1 FH2 domén *in vitro* dimerizálódik és gyorsítja a polimerizáció sebességét pyrene-aktin oldatában. A hDaam1 képes kötődni továbbá SH3 tartalmú fehérjék SH3 doménjeihez GST-pulldown kísérletekben. Kötődik egyrészt a nem-receptor típusú tirozin kinázok közül az Src családba tartozó Src42 és Btk (Bruton's tyrosine kinase) fehérjék SH3 doménjeihez, és ezen felül az Abl (Abelson) nem-receptor típusú tirozin kináz SH3 doménjéhez is.  $\alpha$ -Src ellenanyaggal való immunprecipitációt követően a hDaam1 kimutatható Western-blotton a precipitátumban, azaz a két fehérje *in vivo* is egy komplexben található. A hDaam1 és az Y527FSrc aktivált Src forma kolokalizálódik a podoszómák és a sejtkitüremkedések területén, illetve az Y527FSrc42 jelenéte a hDaam1 mellett megemeli a hDaam1 transzfekcióban megfigyelt ektopikus nyúlványok számát és azok hosszát. Src kinázokra (Src, Yes, Fyn) deficiens SYF sejtvonalban a hDaam1 transzfekciója nem indukál kitüremkedéseket, míg az Src-t stabilan kifejező SYF/Src sejtvonalban nagyszámú kitüremkedést figyeltek meg a

hDaam1 jelenlétében. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a hDaam1 képes együttműködni az Src nem receptor típusú tirozin kinázzal az aktin citoszkeleton szabályozásában, és az Src valószínűleg a hDaam1-hez képest alsóbb szinten helyezkedik el a gének hierarchiájában (Aspenström és mtsai. 2006).

Ezek a vizsgálatok túl ismert még a DAAM ortológok expressziós mintázata három gerinces fajban. Az egyetlen *Xenopus* ortológ (xDaam), és a két-két csirke, illetve egér ortológ kifejeződési mintázatának vizsgálata arra a figyelemre méltó következtetésre jutott, hogy ezek a gének a fejlődő embrionális központi idegrendszerben fejeződnek ki legerősebben (Nakaya és mtsai. 2004; Kida és mtsai. 2004). Ezek a megfigyelések felvetették annak a lehetőségét, hogy a DAAM alcsalád tagjai fontos szereppel bírnak az idegsejtek differenciálódásában. Azonban eddig sem ezt a lehetőséget, sem más egyéb potenciális DAAM funkciót nem vizsgáltak klasszikus mutáns analízis segítségével egyetlen modell organizmusban sem.



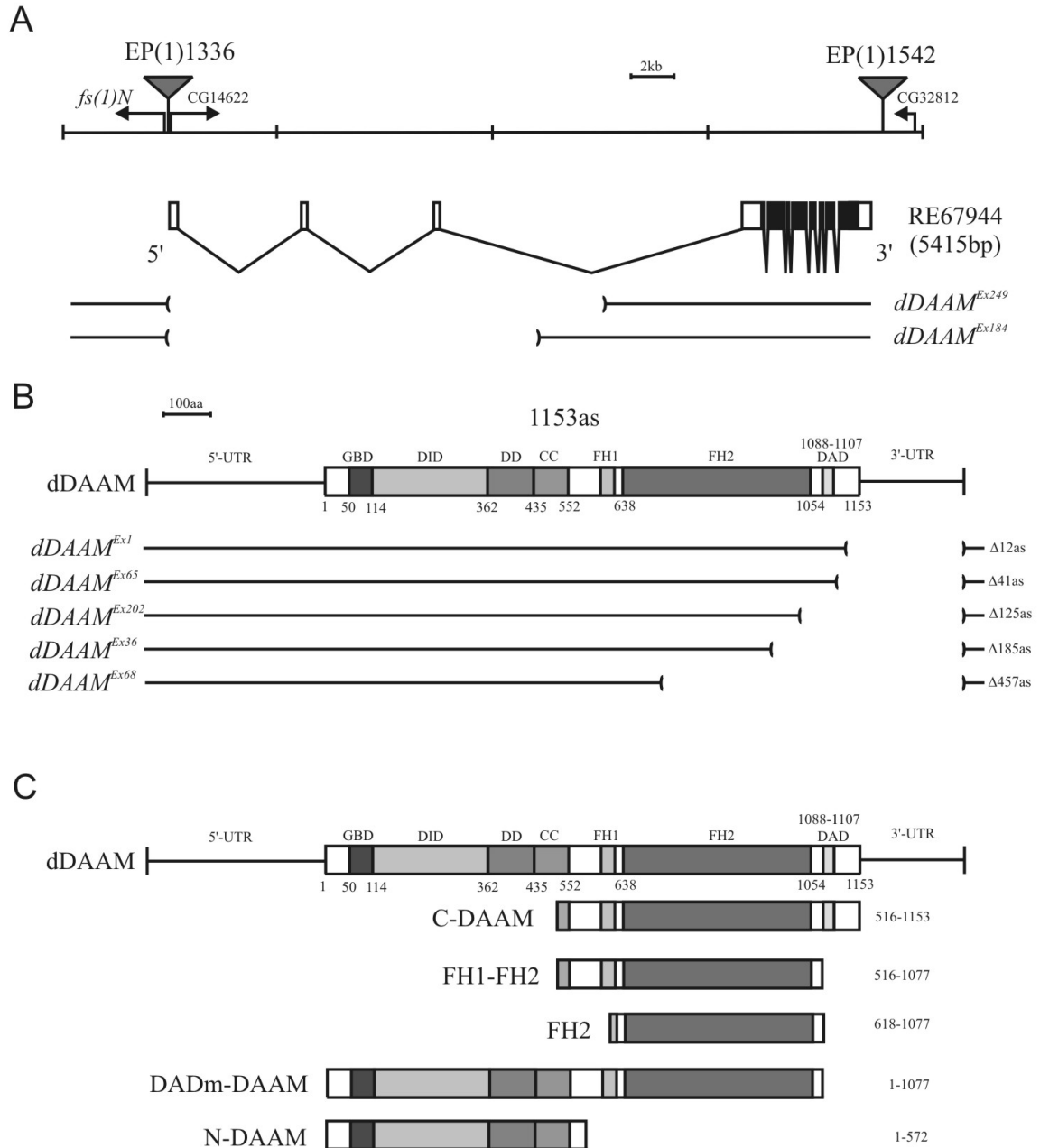
## CÉLKITŰZÉSEK

A formin fehérje család tagjai fontos szereppel bírnak az aktin sejtváz kialakításában és szabályozásában. Funkciójukat azonban korábban elsősorban *in vitro* rendszerekben és biokémiai módszerekkel vizsgálták, és a viszonylag nagy számú ismert formin gén közül többsejtű organizmusokban alig néhánynak vizsgálták az *in vivo* funkcióját genetikai módszerek segítségével is. Tekintve, hogy a nemrégiben leírt DAAM formin alcsaládot kapcsolatba hozták a laboratóriumunk egyik érdeklődési körébe tartozó PCP (planar cell polarity, a nem-kanonikus Wnt jelátviteli út *Drosophila* megfelelője) jelátviteli rendszerrel, elhatároztuk, hogy elvégezzük a *Drosophila* DAAM (dDAAM) ortológ funkcionális analízisét. Ellentétben a magasabbrendű fajokkal, a *Drosophila melanogaster* genomja mindössze egyetlen DAAM ortológot kódol, így modellorganizmusunk különösen alkalmasnak látszott a genetikai megközelítés használatára. Elsődleges célként azt tűztük ki, hogy a funkcióvesztéses *dDAAM* mutánsokat állítunk elő és segítségével megvizsgáljuk a *dDAAM* gén PCP jelátviteli útban betöltött szerepét. A gerinces ortológok kifejeződési mintáját ismerve, a *dDAAM* idegrendszeri funkcióját is vizsgálni kívántuk, és azokat az egyéb szövetspecifikus funkciókat is amelyekre a mutánsok fenotípus analízise hívhatja fel a figyelmünket. A *dDAAM* allélok fenotípusát genetikai, molekuláris biológiai és sejtbiológiai módszerekkel terveztük jellemezni. Fehérje lokalizációs kísérletek céljaira és potenciális együttműködő partnerek azonosítása érdekében pedig a dDAAM-ra specifikus ellenanyag elkészítését is célul tűztük ki. Ezeknek az eszközöknek a birtokában azt reméltük, hogy fontos információkat tudunk gyűjteni a dDAAM működéséről és jellemezni tudjuk az aktin sejtváz szabályozásában betöltött szerepét akár több szövet esetében is.

## EREDMÉNYEK

### A *dDAAM* gén szerkezete

A *dDAAM* fehérjét kódoló gén az X kromoszómán, az 1F2-3 citológiai pozícióban található (4.ÁBRA A). A génhez a CG14622 annotációs szám tartozik, munkánk kezdetén *dDAAM* mutánsok nem álltak rendelkezésre. A predikciók alapján a génről többféle transzkriptum is képződhet, kísérleteinkben a CG14622-RB izoformának megfelelő RE67944 jelű EST klónt használtuk (4.ÁBRA A). A CG14622-RB izoforma 8 exont tartalmaz, 5' UTR régiója 1168bp, 3' UTR régiója pedig 739 bp hosszú. Az RE67944 klón szekvenálása alapján a *dDAAM* 1153 aminosavat tartalmaz, a fehérje prediktált molekulatömege 130 kDa (4.ÁBRA). A *dDAAM* prediktált fehérjén belül homológia keresések alapján azonosítottuk a DRF forminokra is jellemző FH1 és FH2 doméneket, illetve a GBD és a DAD doméneket (4.ÁBRA B,C). A forminok DAAM alcsaládja nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutat. A *Drosophila* *dDAAM* és a humán *hDAAM1* ortológ között teljes fehérje szinten 37,9%-os az egyezés. A konzervált N-, és C-terminális régiók tekintetében a hasonlóság az összes DAAM fehérje között minimum 53%-os, az FH2 domének esetében pedig több, mint 90% (Higgs és Peterson 2005).

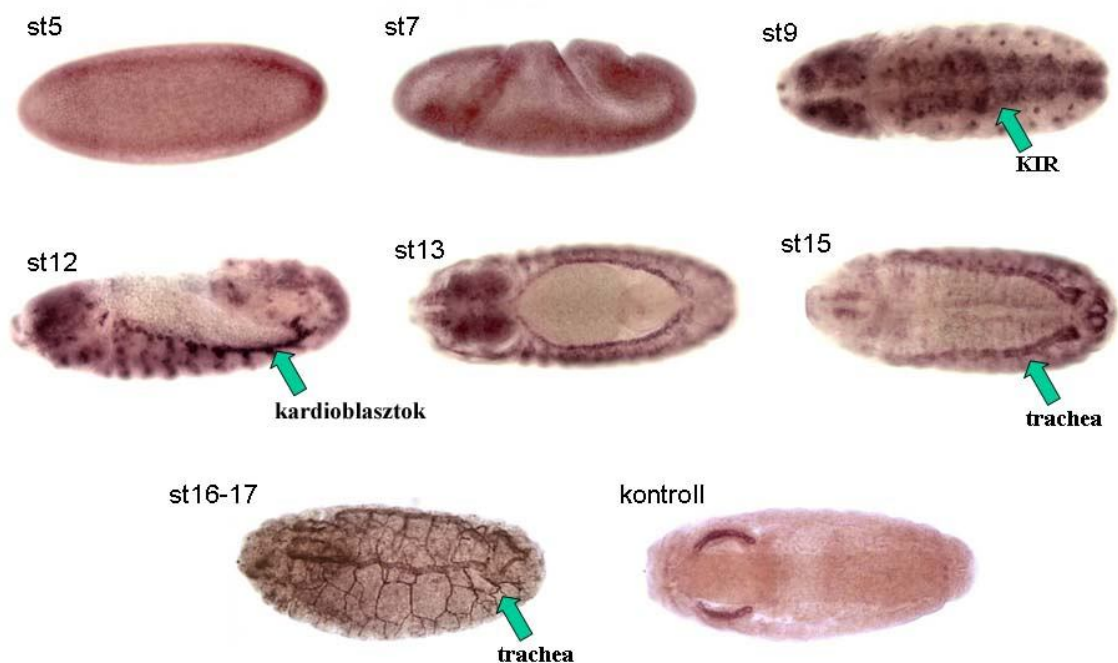


#### 4.ÁBRA A *dDAAM* lókuszt szerkezete, az új *dDAAM* allélek pozíciója, és a transzgenikus konstrukciók felépítése

(A) Az 1F2-3 citológiai pozícióban található az egyedüli *Drosophila* DAAM ortológ, mely a CG14622 annotációs számot kapta, és melyet *dDAAM*-nak neveztünk el. A funkcióvesztéses allélek előállítására használt két P elem, az EP(1)1336 és az EP(1)1542 pozícióit szürke háromszögek jelzik. A teljes hosszúságú RE67944 cDNS klón 12 exont tartalmaz, a transzlációs start a negyedik exonban található. A nagyméretű 5' deléciók pozíciója a régióban. (B) A teljes hosszúságú DAAM cDNS-e egy 1165 bp-os 5' UTR régiót és egy 731 bp hosszúságú 3' UTR régiót tartalmaz, és egy 1153 aminosavat tartalmazó fehérjét kódol. A fehérjében megtalálhatóak a DRF forminokra jellemző homológia domének (1. ÁBRA) (GBD, DID, DD, CC, FH1 és FH2, illetve DAD domének). A kisebb 3' deléciók pozíciója a prediktált fehérjében (C) A *dDAAM* aktivált formái: az FH2, a C-DAAM az FH1-FH2, a DADm-DAAM, illetve az N-terminálist tartalmazó potenciálisan domináns negatív hatású konstrukció (N-DAAM) szerkezete.

### ***A dDAAM kifejeződése a Drosophila embrióban***

A gerinces DAAM homológok fő expressziós doménjei a végtagok, illetve a fejlődő központi idegrendszer. Kíváncsiak voltunk, hogy a *Drosophila dDAAM* ortológ is kifejeződik-e a fejlődő embrionális központi idegrendszerben (KIR), illetve ezen felül vannak-e más, szövetspecifikus expressziós doménjei. A *dDAAM* kifejeződési mintájának meghatározására RNS *in situ* hibridizációt végeztünk különböző stádiumokban fixált vad típusú embriókon (5.ÁBRA).



#### **5.ÁBRA A *dDAAM* gén stádium és szövetspecifikus kifejeződési mintázata (mRNS *in situ* hibridizáció)**

A különböző specifikus expressziós doméneket zöld nyilak jelzik, a „sense” irányú kontroll RNS próba esetében (mely az ábrán a 15. embrionális stádiumot reprezentálja) csak aspecifikus nyálmirigy festődést kaptunk.

Az RNS *in situ* hibridizációs kísérleti eredmények kiértékelése során azt láttuk, hogy a *dDAAM* mRNS-e valóban jelen van a fejlődő embrionális KIR-ben a 9. embrionális stádiumtól kezdődően (5.ÁBRA). *dDAAM* génexpressziót mutattunk ki továbbá az

embrionális trachearendszer területén a 13. embrionális stádiumtól kezdve (5.ÁBRA), valamint a fejlődő szívcső kuboidális sejtjeiben (kardioblasztok) is a 12. embrionális stádiumban (5.ÁBRA). Korai 5. stádiumban lévő -zigótikus génexpressziót még nem mutató, transzkripcionálisan inaktív embriókban megfigyeltük, hogy a *dDAAM* gén mRNS-e ezekben is nagy mennyiségben feldúsul (5.ÁBRA). Ez a megfigyelés anyai hatás meglétére utalt.

### ***dDAAM* allélok létrehozása**

A *dDAAM* gén genetikai analíziséhez szükség volt *dDAAM* mutáns allélek előállítására. A *dDAAM* lókuszt közvetlen közelében mind az 5', mind a 3' oldalon rendelkezésre állt egy-egy P-elem inszerció, az *EP(1)1336*, illetve az *EP(1)1542* (4.ÁBRA A). Ezeket az inszerciókat újramobilizáltuk annak érdekében, hogy a *dDAAM* gén funkcióvesztéses alléljait állíthassuk elő. A P-elem kiugrasztások eredményként izoláltunk egy deléciósorozatot, mely a gén 5' és 3' végét is eltávolító deléciókat tartalmazott. A deléciókat Southern-blot és PCR technikák felhasználásával molekulárisan is térképeztük. Az 5' deléciók nagy kiterjedésűek, és az 5' nemtranszlálódó exonokat, valamint intronikus szekvenciákat érintenek. A 3' deléciók kisebbek (965-2538bp méretűek), de mindannyian érintik a *dDAAM* nyitott leolvasási keretét. Legnagyobb 3' deléciónk, a *dDAAM*<sup>Ex68</sup> összesen 457 aminosavat távolít el a prediktált fehérjéből (4.ÁBRA A,B).

Az 5' és 3' deléciók homozigóta formában -a legkisebb méretű (*dDAAM*<sup>Ex1</sup>, mely mindösszesen 12 aminosavat távolít el a fehérjéből) kivételével- letálisnak bizonyultak, egymást semmilyen kombinációban nem komplementálták. Hasonló módon a *dDAAM* lókuszt kitakaró *Df(1)AD11*, *Df(1)AC7* és *Df(1)sta* deléciók fölött sem tapasztaltunk komplementációt. Vad típusú kromoszóma fölött pedig heterozigóta formában a *dDAAM*

deléciók egyike sem mutatott mutáns fenotípust. Kísérleteink alapján a *dDAAM* deléciói recesszív hatásúak, a *dDAAM* gén esszenciális szereppel bír az egyedfejlődés során.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy milyen fejlődési stádiumra tehető a *dDAAM* homozigóta mutánsok letalitása. A letálfázis analízis szerint a nagyobb deléciókat hordozó mutánsok legkésőbbi letálfázisa korai L3-nak adódott. A *dDAAM<sup>Ex1</sup>* mutáció szemiletális, belőle homozigóta életképes törzset lehetett alapítani, melynek életképessége a vad típushoz viszonyítva 17% volt a kikelő felnőtt legyek tekintetében. A *dDAAM<sup>Ex1</sup>* mutáns kromoszóma fölött minden új delécióval -a legnagyobb 3' deléciók (*dDAAM<sup>Ex36</sup>* és *dDAAM<sup>Ex68</sup>*) esetében rendkívül ritkán -, de minden esetben kaptunk felnőtt életképes egyedeket. A kapott adult életképes transzheterozigóta egyedek száma korrelált a *dDAAM<sup>Ex1</sup>* fölött hordozott nagyobb régiókat kitakaró 3' deléció méretével. Minél nagyobb volt a vizsgált 3' deléció mérete, annál kevesebb transzheterozigóta felnőtt életképes egyedeket kaptunk.

Delécióink homozigóta letális fenotípusa 100%-ban menekíthető volt olyan genotípusú állatokban, melyek -amellet hogy a vizsgált delécióra nézve homozigóták- a *dDAAM* lókuszt transzpozíciós duplikáció (*Dp(1;3)sta* vagy *Dp(1;Y)Sz280*) formájában hordozzák. Ezek a kísérletek arra utaltak, hogy az általunk izolált deléciók a *dDAAM* lókuszbán valóban a *dDAAM* gén új alléljai lehetnek. Annak eldöntésére, hogy ez valóban így van-e, független menekítési kísérleteket végeztünk. A CG14622-RB izoformának megfelelő RE67944 jelű EST klónt használtuk, mely a teljes hosszúságú *dDAAM* fehérjét kódolja. A Gal4/UAS rendszer felhasználásával általános *tub-Gal4*, *act-Gal4* és *arm-Gal4* driverekkel túltermeltettük a teljes hosszúságú *dDAAM* fehérjét (*UAS-FL-DAAM*) *dDAAM* mutáns háttereken. A letalítás minden esetben szignifikánsan menekíthető volt. A *dDAAM<sup>Ex68</sup>* esetében a menekülő állatok 25,8%-a érte el a felnőttkort, a második legkisebb deléciót hordozó *dDAAM<sup>Ex65</sup>* esetében ez az arány 93,6%-nak adódott. Kísérleteink alapján a menekítésekben, és a *dDAAM<sup>Ex1</sup>*-gyel elvégzett komplementációs tesztekben tapasztalt

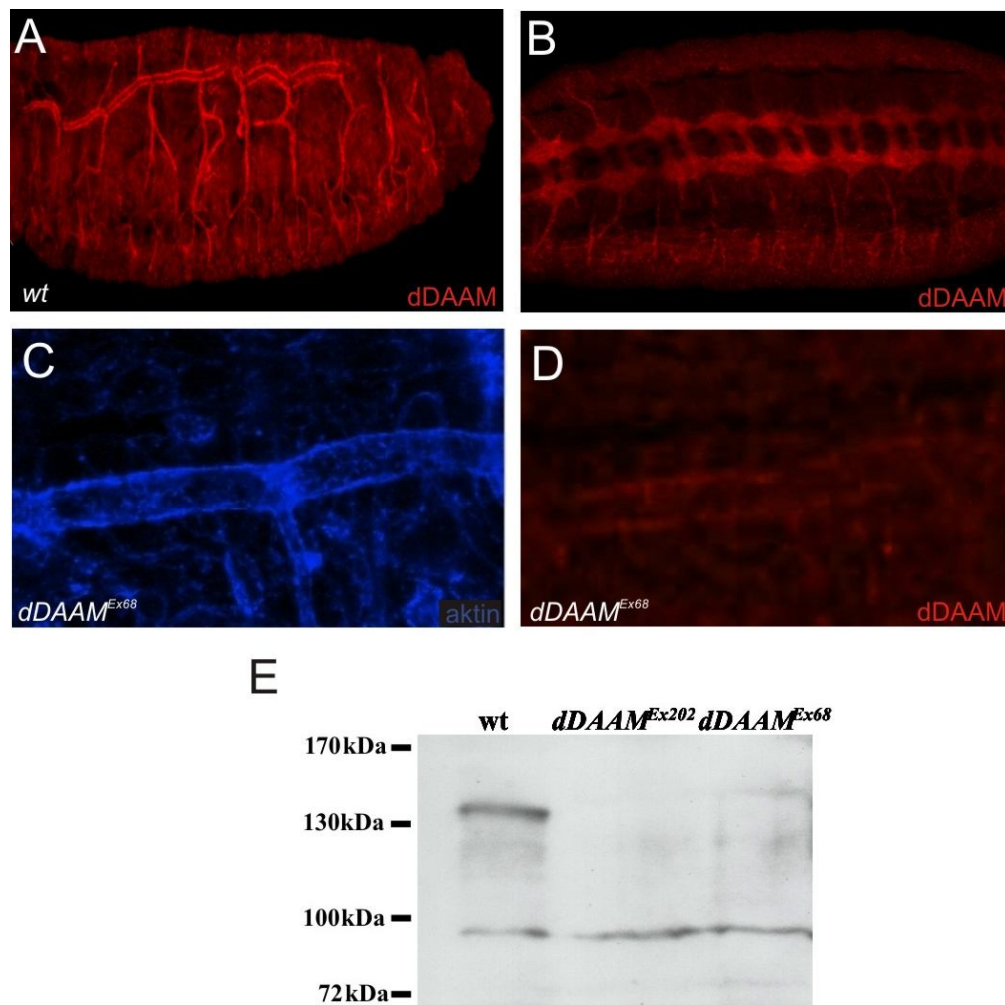
túlélési arányok alapján egy allélerősségi sort lehetett felállítani a különböző *dDAAM* mutánsok között. Eszerint minél nagyobb a *dDAAM*-ot érintő 3' deléción mérete, genetikai értelemben annál erősebb az adott *dDAAM* allél. Kísérleteink továbbá azt is igazolják, hogy a *dDAAM* lokuszban izolált deléciók valóban a *dDAAM* új alléljai, és nem érintenek más esszenciális genetikai elemet.

### ***A dDAAM funkciójának vizsgálatához szükséges ellenanyag létrehozása***

A *dDAAM* fehérje jellemzéséhez szükség volt egy, a *dDAAM*-ra specifikus ellenanyag előállítására. Ennek érdekében a *dDAAM* fehérje C-terminális régióját (mely az FH1, FH2, illetve a DAD doméneket tartalmazta) bakteriális rendszerben túltermeltettük, tisztítottuk, majd a tisztított fehérjével nyulakat immunizáltunk. Az immunizálást követően a szérumok specificitását Western-blotton, illetve immunhisztokémiai festésekben teszteltük. A kísérletek során *dDAAM*<sup>Ex68</sup> homozigóta mutáns embriókat és L2 lárvákat használtunk vad típusú kontroll mellett.

Az ellenanyag viselkedése megfelelt minden elvárásunknak. Vad típusú 15. stádiumban lévő embriókból, illetve L2 stádiumban lévő lárvákból készült fehérjeextraktumban felismert egy 130 kDa-os sávot Western-blotton, amely megfelelt a *dDAAM* fehérje prediktált tömegének. Ez a sáv *dDAAM*<sup>Ex68</sup> homozigóta mutáns L2 lárvákból készült fehérjeextraktumban nem volt kimutatható, valamint nem kaptunk a csonkolt fehérjére jellemző sávot sem (6.ÁBRA E). Ez arra utalt, hogy a *dDAAM*<sup>Ex68</sup> valódi fehérje null allél, a mutánsban vagy nem képződik csonkolt *dDAAM* fehérjetermék, vagy pedig az általunk használt kísérleti körülmények között rendkívül instabil. Az  $\alpha$ -*DAAM* ellenanyag vad típusú embriókban már a 10. stádiumban megjelölte a trachea prekursor sejteket, illetve a későbbi 16. stádiumban a teljes embrionális tracheát, valamint a teljes embrionális központi

idegrendszer (6.ÁBRA A,B).  $dDAAM^{Ex68}$  homozigóta embriókban azonban ez a festési minta megszűnt (6.ÁBRA C,D), amely szintén a  $dDAAM^{Ex68}$  fehérje null voltát bizonyítja, illetve, hogy végeredményben előállítottunk egy olyan ellenanyagot, mely specifikusan megjelöli az endogén dDAAM fehérjét, alkalmas sejbiológiai és biokémiai analízisére, illetve a  $dDAAM$  allélek jellemzésére (6.ÁBRA).



#### 6.ÁBRA A dDAAM fehérje kifejeződése a *Drosophila* embrióban, az $\alpha$ -dDAAM ellenanyag specificitása

Az A-D ábrák 15. fejlődési stádiumban lévő embriókat mutatnak  $\alpha$ -dDAAM ellenanyaggal festve (piros). **(A)** A dDAAM egyik fő expressziós doménje az embrionális trachearendszer, a **(B)** másik pedig az embrionális központi idegrendszer. **(C,D)**  $dDAAM^{Ex68}$  mutáns embrionális tracheákban az  $\alpha$ -dDAAM festés jelentősen meggyengül, a C panelen aktin festés (kék) jelöli a trachea egy részletét. **(E)** A dDAAM mutánsokból csonkolt fehérje Western-blotton nem kimutatható L2 lárvákból készült fehérjeextraktumon. A fehérjemennyiség kontrollja a Western-blotton az  $\alpha$ -DAAM ellenanyag által jelölt ~100kDa méretű specifikus sáv.



***A Drosophila dDAAM génnek nincs esszenciális szerepe a szöveti polaritást (PCP) szabályozó nem-kanonikus Wnt jelátviteli útban***

Gerincesekben a *hDaam1* és *xDaam1* szerepet játszanak a nem-kanonikus Wnt jelátviteli útban (Habas és mtsai. 2001), ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a *Drosophila dDAAM* ortológ funkcióvesztéses alléljeinél tetten érhető-e valamilyen, a PCP (planar cell polarity) jelátviteli út hibájára utaló fenotípus. A síkbeli sejtpolaritás a *Drosophila* összetett szemében az egységnyi szemek, ommatídiumok tükörszimmetrikus elrendeződésében nyilvánul meg. A szem dorzális és ventrális részén elhelyezkedő egységnyi szemekben a fotoreceptor sejtek rhabdomerjei tükörszimmetrikus elrendeződést mutatnak. A dorzális és ventrális oldalon elhelyezkedő tükörképi párok egymással fedésbe nem hozhatóak, királisak. A szimmetria tengely az összetett szem DV középvonala (ekvátor). A szárnyon a PCP a szárnyszőrök (trichomák) disztális irányultságában figyelhető meg. Vad típusban minden szárnysejtben egy, a szárnysejt disztális oldalán elhelyezkedő trichoma van, mely disztális irányba mutat. A PCP jelátviteli út elemeinek funkcióvesztéses mutánsaiban az összetett szemben felborul az ommatídiumok tükörszimmetrikus elrendeződése, és emellett szimmetrikus, akirális ommatídiumok jelennek meg, a szárnyban pedig a trichomák egységes disztális orientációja helyett örvények és/vagy hullámok alakulnak ki (Simons és Mlodzik 2008).

Azért, hogy kideríthessük, hogy a *dDAAM* része-e a PCP jelátviteli útnak *Drosophila*-ban, az összetett szemben és a szárnyakon az FRT/Flp rendszer (Golic és Lindquist 1989), illetve a *dDAAM*<sup>Ex68</sup> null allél felhasználásával mitotikus funkcióvesztéses homozigóta mutáns klónokat hoztunk létre. Sem az összetett szem, sem a szárny esetében nem kaptunk a PCP jelátviteli rendszer hibájára utaló fenotípust. Ezzel összhangban sem a homozigóta

mutáns  $dDAAM^{Ex1}$ -es állatok, sem a  $dDAAM^{Ex1}/dDAAM^{Ex249}$  transzheterozigóta felnőtt életképes legyek szövetein nem tapasztaltunk a PCP-t érintő mutáns fenotípusokat.

A továbbiakban alléljainkat episztázis analízisben teszteltük. Habas és munkatársai azt írták le, hogy a PCP jelátviteli út aktivációja hDaam1 függő, és az mDvl2 hDaam1 kölcsönhatás szükséges hozzá (Habas és mtsai. 2001). Megvizsgáltuk, hogy a  $dDAAM^{Ex68}$  egy kópiájának jelenléte befolyásolja-e a két fő PCP jelátviteli elem, a *Drosophila* Fz és Dsh fehérjék túltermelésével előidézhető PCP fenotípusokat. A kísérletben használt *sev-fz*, és *sev-dsh* transzgének jelenlétében a *Drosophila* összetett szemében az ommatídiumok tükörszimmetrikus elrendeződése felborul, rossz irányba fordult, illetve szimmetrikus (királis) ommatídiumok alakulnak ki (Boutros és mtsai. 1998; Tomlinson és mtsai. 1997). Munkánk során azt találtuk, hogy a  $dDAAM^{Ex68}$  egy kópiájának jelenléte nem befolyásolja sem a *sev-fz*, sem *sev-dsh* okozta túltermeléses fenotípusokat az összetett szemben.

A fenti kísérleti eredmények együttesen arra utalnak, hogy a *dDAAM* gén vagy egyáltalán nem eleme a PCP jelátviteli útnak *Drosophila*-ban, vagy legalábbis a funkciója teljesen redundáns ebben a rendszerben.

## **A *dDAAM* SZEREPE A *DROSOPHILA* TRACHEARENDSZERBEN**

### **BEVEZETÉS**

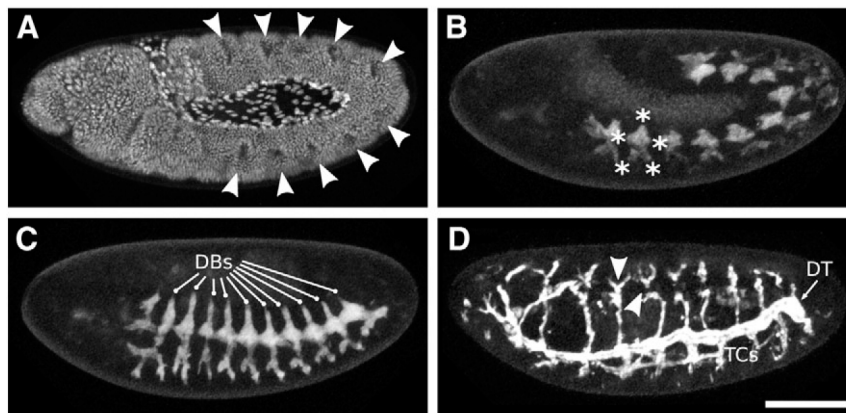
Dolgozatom ezen nagyobb fejezetében kerül tárgyalásra a *dDAAM* gén tracheában betöltött szerepének analízise. A teljes megértés érdekében szükség van azonban arra, hogy a *Drosophila* trachea fejlődéséről és felépítéséről egy rövid áttekintést adjak.

#### ***A trachea primordium sejtek specifikációja, lefűződése, az ágrendszer kialakulása***

A *Drosophila* trachearendszere ektodermális eredetű szövet. Az ektodermában a megtermékenyítés után 4 órával (a 9. embrionális stádium során) hemiszegmentenként egy-egy (összesen 20), egyenként kb. 20 sejtet tartalmazó sejtcsoport különül el. Ezek a sejtek kétszer osztódnak, így metamerenként mindkét oldalon összesen 80-80 trachea primordiális sejt jön létre. Ezekután a trachea primordiális sejtek lefűződnek az embrió belsejébe, és létrehozzák a trachea primordiumokat. Az egyedfejlődés során a trachea primordiumok sejtjei már nem osztódnak tovább. A lefűződött sejtekben aktív a *btl* (*breathless*) és a *dof* (*downstream-of-Fgfr*) gének expressziója, amely egyértelműen megkülönbözteti őket a környező nem-trachea típusú sejtektől. A *btl* lókuszt az Fgf (fibroblast growth factor) receptort, míg a *dof* egy Fgf-specifikus jelátviteli kapcsoló fehérjét kódol. A trachea primordiumot határoló sejtekben ezzel egy időben a *bnl* (*branchless*) fejeződik ki, melyről az Fgfr ligand íródik át. A határoló, nem-trachea irányba determinált sejtek által szekretált Fgf kemoattraktánsként irányítja a trachea primordium sejtek mozgását az embrióban.

Az invaginációval az embrió belsejébe jutott sejtek egy zsákszerű struktúrában kapcsolatban maradnak mind egymással, mind a szomszédos, nem-trachea típusú sejtekkel

(7.ÁBRA A). A trachea primordiális sejtek a lefűződés után az embrionális fejlődés 12. stádiumától kezdődően intenzív vándorlason (migráció) és ezzel egyidőben megnyúláson mennek keresztül (7.ÁBRA B,C). Ezeknek a sejtmozgásoknak a következtében a 13. stádium végére kialakulnak az elsődleges és a másodlagos trachea elágazódások a metamerikus egységekben (8.ÁBRA). Később megtörténik a metamerikus egységekben kialakult ágrendszer összekapcsolása a szegment határokon, és differenciálódnak a terminális elágazások is (7.ÁBRA D). Ennek következtében kialakul az embrionális trachearendszer végső ágrendszere, amelyet sejtes felépítése alapján három ágtípusra oszthatunk.

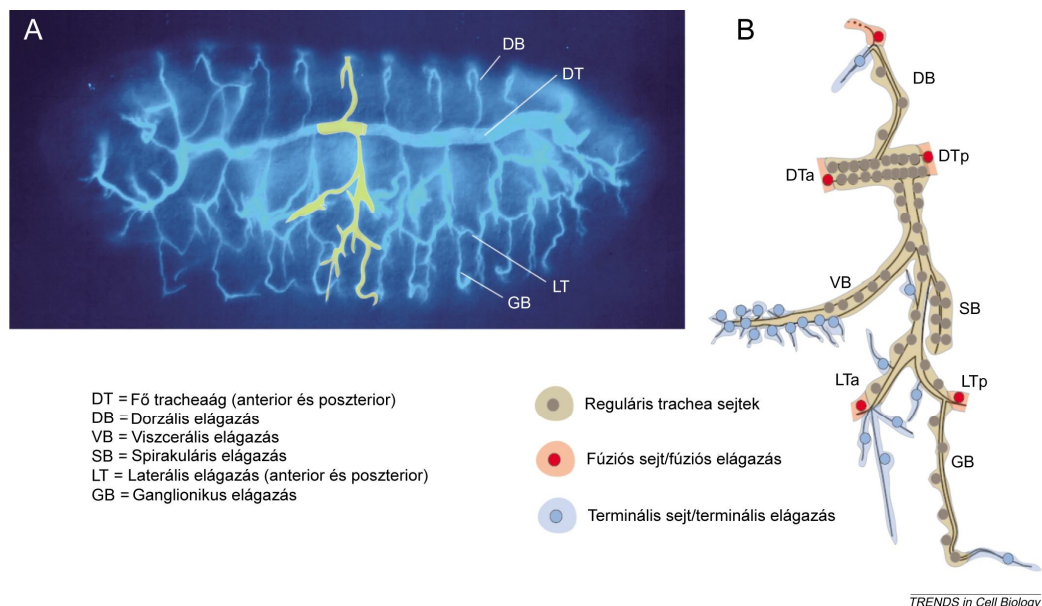


### 7.ÁBRA A trachearendszer embrionális fejlődése *Drosophila*-ban

(A) A 11. embrionális stádiumban a trachea primordiális sejtek (nyílhegyek) invaginációval az embrió belsejébe jutnak és ott egy zsákszerű struktúrában együtt maradnak. (B) A 12. embrionális stádiumba meghatározott irányokban (csillagok) megindul az elsődleges elágazások kialakulása. (C) A 14. stádiumra az elágazások megnyúlnak, majd (D) a 15. stádiumot elérve fuzionálnak és a metamerikus egységek a szegmenthatárokon összekapcsolódnak (nyílhegyek). Rövidítések: DBs, dorzális elágazások; DT, fő légvezeték; TCS, transzverzális kapcsolatok. Az ábrán az anterior irány balra a dorzális irány felfelé található. A skála mérete: 100  $\mu\text{m}$ . Az eredeti ábra forrása: (Affolter és Caussinus 2008).

Az első típusba a két hátoldali fő légvezeték tartozik. Átmérőjük az embrióban 4-5  $\mu\text{m}$ , multicelluláris felépítésűek, ahol a lument 2-5 ellaposodott sejt határolja. A sejtek intercelluláris apical junction-okon (AJ) keresztül, szoros sejt-sejt kölcsönhatások segítségével kapcsolódnak egymáshoz és alkotják a fő légvezetékét (8.ÁBRA). A második ágtípusba a dorzális, viscerális és ganglionikus elágazások tartoznak. Átmérőjük 0,5-5  $\mu\text{m}$

között változik. Ezek az elágazások szintén multicellulárisak, de a tracheasejtek elrendeződése eltér a fő légvezetékétől mert a sejtek egymás után sorban helyezkednek el fejtől-farokig („head-to-tail”) formációban, és így a légső üregét egy-egy autocelluláris AJ-okat tartalmazó sejt határolja (8.ÁBRA). A harmadik ágtípusba a terminális végződések sorolhatóak. Ezek egyetlen sejten belül alakulnak ki és tulajdonképpen sejten belüli kapilláris-szerű elágazódások, amelyek felszínén megtörténik a gázcsere. A terminális elágazások átmérője kicsi (0,1-0,5  $\mu\text{m}$ ), hosszuk azonban dinamikusan változó, elérheti a 60  $\mu\text{m}$ -t is (8.ÁBRA).



## 8.ÁBRA A kifejlett embrionális trachearendszer

(A) Lumenális antigénnel (m2A12) a teljes elágazásrendszer láthatóvá tehető. Az embrionális fejlődés végén összesen 20, egymástól függetlenül fejlődött trachea metamer alakul ki, melyeket a szegmenthatárokon a fúziós sejtek kapcsolnak össze. Egy tipikus metamer szerkezetét jelöli ki a sárga szín, és mutatja részleteiben a B panel. (B) Minden egyes metamer egy általános sztereotipikus elágazásmintát mutat. Egy metamer 80 sejtől áll, melyek pozíciója szigorúan rögzített a metameren belül. A primer elágazások multicelluláris felépítésűek (I. és II. típusú elágazások), melyeket reguláris tracheasejtek építenek fel (barna). Róluk unicelluláris IV. típusú elágazások, terminális végződések ágaznak le (kék). A metamerikus egységeket speciális fúziós sejtek (III. típus, piros) kapcsolják össze a szegmenthatárokon így biztosítva a légsőrendszer folyamatosságát. Az eredeti ábra forrása: (Uv és mtsai. 2003).

Végezetül az ágrendszer szerkezetével kapcsolatban említést érdemel még, hogy az egységes trachea ágrendszer kialakulásában fontos szereppel bírnak az ún. kapcsolósejtek is. Morfológiájukat tekintve ezek lapos, korong alakú sejtek, melyek a szegment határokon

szoros sejt-sejt kölcsönhatások révén biztosítják a légcsőrendszer folyamatosságát a fő ágak és az ún. laterális ágak összekapcsolása révén. (8.ÁBRA B).

### ***A légcső üregének (lumen) kialakulása és a tracheakutikula szerkezete***

A légcső üregének kialakulása aktív transzportfolyamatokat igényel. Első lépésben a tracheasejtek apikális felszínén intenzív szekréció történik, amely egy átmeneti fibrilláris, kitin-alapú extracelluláris mátrixot (ECM) eredményez a lumenális térben. Az ECM egyrészt vázat biztosíthat a későbbi kutikulaszekrécióhoz, másrészt nem-sejtautonóm -a tracheasejtek alakját befolyásoló- jelek továbbításának is teret ad. A mátrix jelenléte szükséges a minden helyen megfelelő átmérőjű légcsőüreg-rendszer kialakulásához, illetve a kutikulaszekréció helyeinek kijelöléséhez.

A kutikula szekréció az embrionális fejlődés 15. stádiumát követően indul meg az embrióban. A tracheakutikula felépítése azonban jelentősen eltér az ecetmuslica többi testtáját felépítő kutikula elemtől. Ez nem meglepő, hiszen a tracheának számos kihívásnak kell megfelelnie a lárvális élet során, tekintetbe véve azt a tényt is, hogy a levegő szállítása a rovarokban passzív módon történik. Ezért a légcsöveknek kellő flexibilitást kell mutatniuk, ugyanakkor ellen kell állniuk a folyamatosan áramló levegő nyomásának is. Másrészt a levegőnek minden egyes testi sejthez el kell jutnia, ami olyan nagyon vékony, de stabil struktúrák kialakítását igényli amelyek átjárhatóak a gázok számára, de védenek a dehidratáció és a mikroorganizmusok ellen. A vad típusú tracheakutikula szerkezete leginkább egy porszívócsőre emlékeztet. A légvezetékben a trachea hosszmetszetére merőleges lefutású kutikulabordákat (taenidial folds) láthatunk, keresztmetszeti képen ezek a bordák megfigyelhetők a trachea lumenében is (9.ÁBRA A,B). Ez a jellegzetes mintázat azt

sugallta, hogy a kutikulabordák hozzájárulnak ahhoz, hogy hosszanti irányban kellően flexibilisek, míg merőleges irányban kellően stabilak legyenek a légcsövek.

Az elméleti áttekintés a következő összefoglaló közlemények alapján készült: (Affolter és Caussinus 2008; Shilo és mtsai. 1997; Uv és mtsai. 2003).

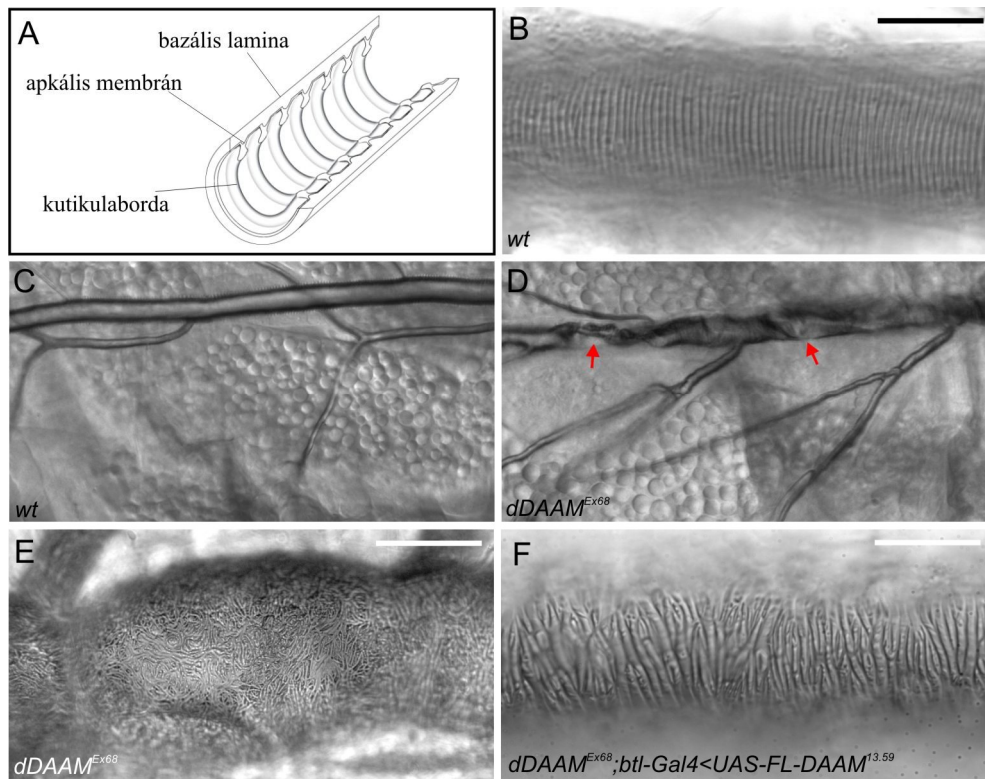
## EREDMÉNYEK

### *A $dDAAM^{Ex68}$ funkcióvesztéses null mutánsban sérül a tracheakutikula szerkezete*

Korábbi kísérleteinkből tudtuk, hogy mind a  $dDAAM$  mRNS, mind a  $dDAAM$  fehérje jelen vannak az embrionális trachearendszer sejtjeiben (kivéve a kapcsoló sejteket), és az embrionális fejlődés során folyamatosan kimutathatóak. Ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a  $dDAAM$  hiánya okoz-e fenotípust a trachearendszerben, és ha igen, akkor annak mi lehet a magyarázata. Ennek érdekében első lépésben megvizsgáltuk a  $dDAAM$  mutánsok lárvális légcsöveit.

Azt találtuk, hogy a  $dDAAM$  mutánsok légcsőrendszere rendben kialakul, az elágazások száma és szerkezete vad típusú (9.ÁBRA D). A légcső kutikuláján azonban a vad típustól eltérő mintázatot figyeltünk meg, amely sokszor párosult a fő tracheaágakon megfigyelhető benyomódásokkal, szakadásokkal (9.ÁBRA D,E). A  $dDAAM^{Ex68}$  homozigóta mutáns állatokban sérült a taenidiumok szerkezete: a kutikulabordák lefutása minden tracheasejtben (nemcsak a fő tracheaágban, hanem még a harmadlagos elágazásokban is) abnormális, cseppszerű, koncentrikus körökre emlékeztet (9.ÁBRA E). L3 lárvális stádiumban a fő légvezeték anterior oldala sokszor teljesen elvékonyodott, nemritkán hiányzott, ami arra utalt, hogy a  $dDAAM^{Ex68}$  mutánsokban a trachea megnyúlásra képtelen, hiszen a tracheasejtek az embrionális életet követően már nem osztódnak, hanem megnyúlnak

és ellaposodnak a lárva növekedésének megfelelően. A *dDAAM* lókuszt transzpozíciós duplikáció (*Dp(1;3)sta* vagy *Dp(1;Y)Sz280*) formájában hordozó *dDAAM*<sup>Ex68</sup> homozigóta mutáns állatok tracheakutikula fenotípusa vad. Emellett, ha *dDAAM*<sup>Ex68</sup>-as háttéren a *dDAAM* fehérjét kódoló cDNS-t (FL-DAAM) az UAS/Gal4 rendszer segítségével általánosan *act-Gal4*, illetve tracheaspecifikusan *btl-Gal4* felhasználásával túltermeltettük, akkor részlegesen visszakaptuk a vad típusra jellemző kutikulamintázatot (9.ÁBRA F). Ez azt jelenti, hogy a *dDAAM* génben létrehozott új deléciók okozta mutáns tracheakutikula fenotípus valóban a *dDAAM* gén funkciójának hiányához köthető.



### 9. ÁBRA A vad típusú és *dDAAM* mutáns tracheák kutikulaszerkezete

Az (A) panel egy sematikus tracheát ábrázol, ahol a tracheasejtek belső, lumen felé eső apikális felszínén egy speciális szerkezetű kutikula alakul ki. A tracheakutikulában a légcső hossz tengelyére merőleges lefutású bordák találhatók, melyek L3 stádiumban (B) a kiboncolt fő légvezetéken is megfigyelhetők. A vad típussal (C) összehasonlítva a *dDAAM*<sup>Ex68</sup> homozigóta mutáns lárvák (D) légcsővein benyomódások és szakadások figyelhetők meg (piros nyilak). (E) A *dDAAM*<sup>Ex68</sup> homozigóta mutáns állatokban sérült a taenidiumok szerkezete. (F) A *btl-Gal4* forrás segítségével meghajtott *UAS-FL-DAAM*<sup>13.59</sup> transzgén részlegesen menekíti a kutikula defektusokat *dDAAM*<sup>Ex68</sup> háttéren. A skála mérete: 50  $\mu$ m.



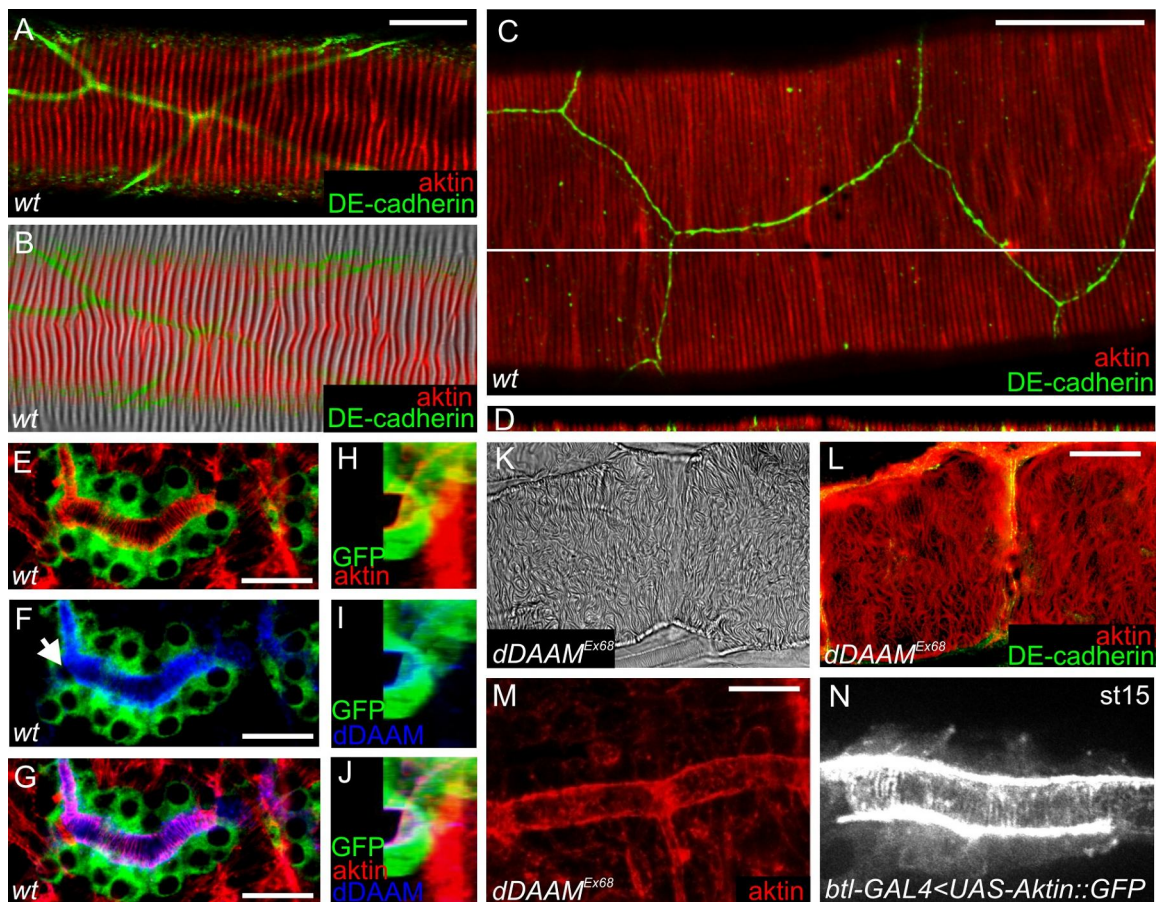
Ezzel összhangban, ha a *dDAAM* gént RNS interferencia felhasználásával tracheaspecifikusan csendesítettük, akkor a *dDAAM* funkcióvesztéses mutánsokra jellemző fenotípus jelent meg. Ez a kísérleti eredmény szintén arra utalt, hogy a *dDAAM* gén funkciója a légcsőrendszerben a megfelelő kutikulamintázat kialakításában rejlik.

### ***A dDAAM fehérje kolokalizálódik az apikális aktinkötegekkel az embrionális trachea sejtjeiben***

Mivel a forminok egyik fő funkciója az aktin citoszkeleton nemelágazó kötegeinek kialakítása, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy *dDAAM* mutáns állatokban kialakuló abnormális kutikulaminta összefüggésbe hozható-e az aktin citoszkeletont érintő változásokkal. Ehhez szükség volt arra, hogy sejtszinten is megvizsgáljuk a tracheasejtek aktinvázának szerkezetét, illetve a *dDAAM* fehérje lokalizációját a légcsőrendszer sejtjeiben.

Ennek érdekében immunfestést végeztünk Rhodamin-Phalloidin felhasználásával, mely specifikusan megjelöli az aktin filamentumokat. Megfigyeltük, hogy az embrionális élet folyamán a trachea hossztengelyére merőlegesen, a tracheasejtek apikális felszínén vastag aktinkötegek alakulnak ki, melyek lefutása hasonló a kutikulabordákéhoz (10.ÁBRA E). Zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) jelölt aktint (*UAS-actin::GFP*) *btl-Gal4* forrás felhasználásával tracheaspecifikusan túltermelve, élő embriókban megfigyeltük azt is, hogy ezek az aktinkötegek még a trachea kutikula szekréciója *előtt* (a késői 15. embrionális stádiumot megelőzően) létrejönnek (10.ÁBRA N).

Következő lépésben megvizsgáltuk az L3 stádiumban lévő vad típusú lárvák tracheasejtjeinek aktin citoszkeletonját. Az apikális aktinkötegeket a lárvális légcsőrendszer sejtjeiben is megfigyeltük, ahol a kötegek lefutása és száma szintén megfeleltethető volt a kutikulabordák számának és lefutási mintájának (10.ÁBRA A,B,C,D).



## 10.ÁBRA A dDAAM funkciója a párhuzamos lefutású aktinkábelek kialakítása a trachea sejtjeiben

(A) A vad típusú tracheasejtben az aktin párhuzamosan futó kötegekbe rendeződik, melyek lefutása merőleges a légső hossz tengelyére. (B) A kábelek száma és lefutási mintája tökéletesen megfeleltethető a kutikulabordák számának, és lefutási mintázatának. (C,D) A sejtekben a kábelek az adherens junction-ok (AJ) régiójában futnak. (C) Konfokális mikroszkóppal készült Z-tengely irányú projekció, ahol az aktin piros színnel jelölt, a DE-cadherin AJ marker fehérje pedig a zöld csatornában látható. (D) XZ optikai metszet a szürke vonallal jelölt részen a C panelről. (E-G) Az embrionális tracheában a dDAAM és az aktin szoros kolokalizációt mutat. A Z-irányú projekció 16. stádiumban lévő vad típusú embrió fő légvezetékéből készült. A tracheasejtek citoplazmája GFP-vel jelölt (zöld csatorna), az aktin piros, a dDAAM fehérje festődési mintája pedig kék színben látszik. Az F panelen a nyíl egy fúziós sejtpárt jelöl a szegmentháton, ahol az endogén dDAAM fehérje nincs jelen. (H-J) Az E-G panelek 3D projekciói, ahol az optikai metszeteket XZ irányban 90 fokkal elforgattuk. (J) A légsővek apikális membránján a dDAAM szorosan kolokalizálódik az aktinnal. *dDAAM<sup>Ex68</sup>* mutáns tracheákban mind a kutikulaminta (K), mind az aktinkötegek lefutása súlyosan károsodik a lárvális (L) és az embrionális légsővekben is (M). A kialakuló aktinfilamentumok vékonyabbak és rövidebbek, mint a vad típusban, és nem rendeződnek párhuzamos lefutású kötegekbe. (N) Az aktinkötegek először a korai 15. embrionális stádiumban vehetők észre élő embrióban GFP-vel jelölt aktin transzgént (aktin::GFP) használva. A skálák mérete: 20  $\mu$ m az A panelen, 50  $\mu$ m a C panelen; 50  $\mu$ m az L panelen; 10  $\mu$ m az E-G paneleken és 10  $\mu$ m az M panelen.

Amennyiben a dDAAM a tracheában az aktin sejtvázon keresztül fejt ki hatását, akkor elvárható, hogy szoros térbeli közelségben legyen az aktingyűrűkkel. 15. stádiumban lévő vad típusú embriókon együttesen elvégezve az immunfestést aktinra és dDAAM-ra azt

láttuk, hogy a dDAAM fehérje erős kolokalizációt mutat az aktingyűrűkkel a trachearendszer sejtjeinek apikális felszínén (10.ÁBRA F-J).

Ezek után kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen szerkezetű az aktin sejtváza  $dDAAM^{Ex68}$ -ra homozigóta mutáns embriókban és lárvákban. A  $dDAAM^{Ex68}$  mutáns állatokban vékonyabbak az aktingyűrűk, emellett az aktin filamentumok mennyisége is számottevően lecsökken, párhuzamos lefutású aktinkötegek helyett pedig egy randomizálódott, hálózatos mintát figyeltünk meg mind az embrionális, mind a lárvális tracheasejtekből (10.ÁBRA L,M). Az aktinkötegek lefutása  $dDAAM^{Ex68}$  homozigóta mutánsokban a vad típushoz hasonlóan egybeesett a kutikulabordák mintázatával (10.ÁBRA K,L). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a dDAAM gén funkciója a tracheában azoknak az aktinkötegeknek a létrehozása és a rendezése, melyek direkt vagy indirekt módon kijelölik a későbbi kutikulabordák helyét.

### ***A dDAAM funkciónyeréses mutáns fenotípusa***

Megvizsgáltuk, hogy a teljes hosszúságú fehérje túltermelése önmagában okoz-e fenotípust a lárvális trachea sejtjeiben. A teljes hosszúságú fehérjét ( $UAS-FL-DAAM$ ) ezért  $btl-Gal4$  segítségével tracheaspecifikusan túltermeltettük, és megfigyeltük, hogy a dDAAM teljes hosszúságú fehérje tracheaspecifikus túltermelésének nincs hatása a kutikulamintára, sem a reguláris tracheasejtekből, sem pedig a kapcsolósejtekből (ahol a dDAAM fehérje endogén módon nem is fejeződik ki). Következő kérdésünk az volt, hogy ha eltávolítjuk az autoinhibícióért felelős DID domént tartalmazó teljes N-terminális régiót, akkor valóban a dDAAM konstitutívan aktív formáját kapjuk-e meg. Ennek érdekében létrehoztunk egy olyan  $dDAAM$  mutáns formát ( $UAS-C-DAAM$ ), mely csupán a működéshez elengedhetetlen FH1 és FH2 doméneket, illetve a DAD régiót tartalmazta, a dDAAM fehérje N-terminális részét nem

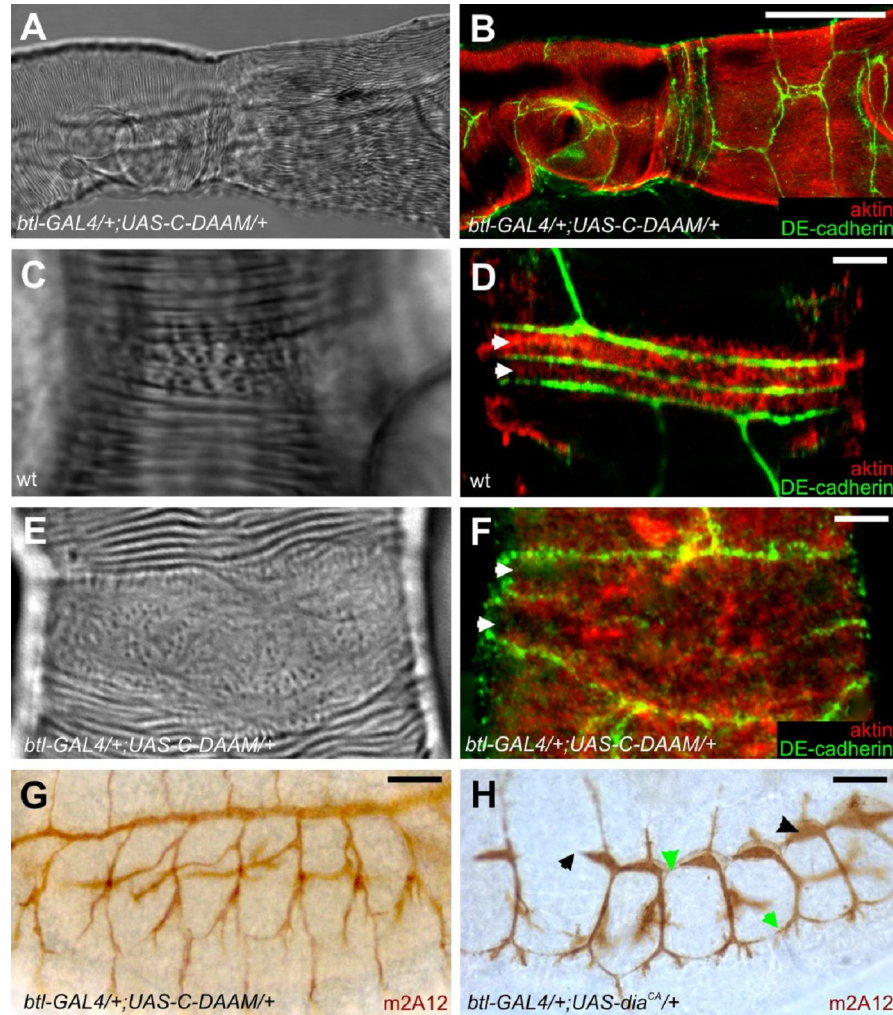
(4.ÁBRA C). Kontrollként – annak megmutatására, hogy a várt fenotípusok valóban az aktivált dDAAM-ra jellemzőek-, és nem egy általános forminfunkcióhoz köthetőek- kísérleteinkben felhasználtuk a legjobban jellemzett *Drosophila* DRF formin, a Diaphanous konstitutívan aktív formáját is (*dia*<sup>CA</sup>) (Somogyi és Rørth 2004).

Az *UAS-C-DAAM* tracheaspecifikus túltermelése nem befolyásolta az elágazások kialakulását az embrionális tracheában, míg a *Dia*<sup>CA</sup> túltermelésben szakadásokat, fúziós hibákat figyeltünk meg (11.ÁBRA G,H). Ez arra utalt, hogy a C-DAAM túltermelés okozta tracheafenotípusok csak erre a forminra jellemzőek és az aktivált dDAAM-ra specifikus funkciót vizsgálhatjuk velük.

A C-DAAM-ot túltermelő normális tracheasejtekben a funkcióvesztéses fenotípushoz nagyban hasonlító randomizált borda lefutási mintát láttunk. A sejtekben az aktingyűrűk lefutása is követte az abnormális kutikulamintát (11.ÁBRA A,B). Ez az megfigyelés összhangban van a vad típus és a funkcióvesztéses *dDAAM*<sup>Ex68</sup>-as allél vizsgálatában kapott eredményekkel.

A kapcsolósejtekben szintén jelentős változások történtek mind a kutikulaminta, mind az aktin citoskeleton szintjén. A kapcsolósejtek kutikulája és aktin sejtváza eltér a reguláris tracheasejtekben tapasztalt mintától. Ezek a sejtek kicsik, korong alakúak, kutikulájuk pöttyözött, szemben az elnyúlt reguláris tracheasejtek bordázatos mintájával. Az aktin sejtváz is követi az előbb említett mintát (11.ÁBRA C,D). A C-DAAM-ot kifejező kapcsolósejtek morfológiájukban a normális tracheasejtekhez kezdtek hasonlítani. Kutikulájukból és aktin sejtvázaikból is eltűnt a pöttyözött minta, helyette egy inkább hosszanti lefutású, a normális tracheasejtekre jellemző kutikulaminta jelent meg. Ugyanakkor a kialakult aktinkötegek nem rendezettek, lefutásuk véletlenszerű volt (11.ÁBRA E,F). Emellett, a vad típusú kapcsoló sejtekkel összehasonlítva a mutáns kapcsolósejtekben nagyban megnövekedett a filamentózus

aktin mennyisége. Eredményeink arra utalnak, hogy a C-DAAM elősegíti az új aktinláncok képződését, de a kész filamentumok rendezésére képtelen.



### 11.ÁBRA A dDAAM és a Dia aktivált formáinak túltermelése a trachea sejtjeiben

(A) A C-DAAM tracheaspecifikus túltermelése befolyásolja a kialakuló kutikulamintát és az aktin citoszkeleton szerkezetét a trachea sejtjeiben (B). (C) A vad típusú fúziós sejtek kutikulamintája kompakt, pöttyözött, a sejtek korong alakúak, könnyen megkülönböztethetőek a reguláris tracheasejtektől. (D) Az aktin ezekben a sejtekben szintén pöttyözött mintát mutat. Amikor a C-DAAM ektopikusan kifejeződik a fúziós sejtekben, akkor a pöttyözött kutikula-, és aktinminta eltűnik (E,F), a kapcsolósejtek kutikulamintája részlegesen transzformálódik és a taenidial fold mintázatra emlékeztet (E). Ezen felül a C-DAAM-ot kifejező fúziós sejtekben erős aktinfeldúsulás figyelhető meg, és gyakran láthatóak bennük egyedi, hosszanti lefutású aktin filamentumok (F). A fluoreszcens festéseket tartalmazó paneleken (B,D,F) a sejthatárokat DE-cadherin festéssel jelöltük (zöld), a kapcsolósejteket a D és F paneleken fehér nyilak mutatják. (G) A C-DAAM túltermelés nem befolyásolja a légcsőrendszer szerkezetét, míg a (H) Dia<sup>CA</sup> aktivált Diaphanous forma túltermelése gyakran fúziós hibákat eredményez a fő légvezetékben (fekete nyíl), elvékonyodásokat a fúziós sejteknél (zöld nyílhegy), megvastagodásokat (fekete nyílhegy), illetve a terminális végződéseken differenciálódási hibákat (zöld nyíl) okoz. A G és H paneleken a trachearendszert a m2A12 lumenális ellenanyag segítségével tettük láthatóvá. A skálák mérete: 50 μm a B panelen; 10 μm a D panelen; 10 μm az F panelen és 10 μm a G és H paneleken.

Mi lehet a fenti megfigyelések magyarázata? A reguláris tracheasejtek esetében a *dDAAM* funkcióvesztéses fenotípusra jellemző mintázatot kaptunk. Az irodalomból ismert, hogy a DRF forminok többnyire dimerként működnek, az emlős Fhos forminról pedig leírták, hogy az FH1-FH2 (C-DAAM ekvivalens) darabja képes kötődni a teljes hosszúságú fehérjéhez (Takeya és Sumimoto 2003). Elképzelhető tehát az a modell, miszerint a C-DAAM fehérje az endogén *dDAAM*-mal összekapcsolódva heterodimer formában valójában kimeríti a normális tracheasejtekben meglévő *dDAAM* mennyiséget, ami ilyen módon egy antimorf hatás, és funkcióvesztéses fenotípus kialakulásához vezethet. Ugyanakkor az aktinkábelek lefutásából az is nyilvánvaló, hogy a C-DAAM önmagában homodimer formában nem képes párhuzamosan futó kötegekbe rendezni az aktint és kialakítani az aktinyűrűket. A C-DAAM fehérjéből hiányzik a teljes N-terminális régió. Láttuk, hogy ez a csonkolt fehérje képtelen a megfelelő helyen elősegíteni a normális aktinkábel elrendeződést. Tehát a *dDAAM* fehérje N-terminális része, amellet, hogy szerepet játszik a fehérje inaktív állapotának fenntartásában és az aktiválódásában is, fontos lehet a fehérje megfelelő sejten belüli lokalizációjához is.

A kapcsolósejtekben vad típusban az endogén *dDAAM* fehérje nincs jelen, tehát amit láttunk, az a C-DAAM túltermelés saját fenotípusa. Azaz ebben a rendszerben, ektopikus helyen kifejeztetve egy neomorf hatást tapasztaltunk a C-DAAM részéről, hiszen a kapcsolósejtek szerkezete drasztikusan átalakult.

Amennyiben a C-DAAM valóban képes közvetlenül kapcsolódni az endogén *dDAAM* fehérjéhez és gátolni annak aktivitását, akkor az *UAS-C-DAAM* és a teljes hosszúságú *dDAAM* fehérjét tartalmazó *UAS-FL-DAAM* konstrukciók együttes tracheaspecifikus túltermelése gyengébb kutikula és aktin fenotípushoz vezethet, mint az *UAS-C-DAAM* túltermelés önmagában. Ebben az elrendezésben ugyanis visszapótoljuk a rendszerbe a teljes hosszúságú *dDAAM* fehérjét, így módon gyengítve az antimorf komponenst. Elvégezve az előbb említett kísérletet valóban azt tapasztaltuk, hogy az FL-DAAM jelenléte a rendszerben



gyengítette a C-DAAM túltermeléses mutáns fenotípusát a trachea sejtjeiben, ugyanakkor a kapcsolósejtek fenotípusára nem volt semmilyen hatással (13. ÁBRA E). Ez az eredmény a fenti elmélet helyességét támasztja alá.

#### ***A csonkolt dDAAM fehérjék in vivo aktivitása, légcső fenotípusai***

További kísérleteinkben azt kívántuk kideríteni, hogy melyek azok a fehérjedomének, melyek szükségesek a dDAAM aktivitásához *in vivo* a trachea sejtjeiben. Ennek a vizsgálatára létrehoztunk a dDAAM különböző csonkolt formáit tartalmazó transzgéneket: *UAS-FH2*, *UAS-FH1-FH2*, és *UAS-N-DAAM*. Az egyes konstrukciókat *btl-Gal4* forrás felhasználásával tracheaspecifikusan túltermeltük, és megvizsgáltuk a transzgéneket túltermelő lárvák légcsőveit.

A csak az FH2 domént tartalmazó *UAS-FH2* túltermelése önmagában nem eredményezett fenotípust a trachearendszerben. A konstruktot és a drivert is tartalmazó állatok életképesek voltak, a légcsőrendszer kutikulamintája pedig vad fenotípusú volt. Az FH2 doménról kimutatták, hogy *in vitro* képes dimerizálódni és új aktinláncok képződését nukleálni. *In vivo* azonban -legalábbis a dDAAM-ot illetően- nem jelenik meg ez az aktivitás, ez a fehérje önmagában működésképtelen a trachea sejtjeiben.

Az FH1-FH2 régiókat tartalmazó *UAS-FH1-FH2* konstrukciót meghajtva láttunk kutikula fenotípust, mely a C-DAAM túltermelés okozta funkciónyeréses fenotípusnak volt megfeleltethető. Emellett a *btl-Gal4* meghajtó elemet és a konstruktot is tartalmazó mutáns lárvák késői L2 állapotban elpusztultak. Ez azt mutatja, hogy az FH1-FH2 doméneket tartalmazó csonkolt fehérje a C-DAAM-hoz hasonlóan konstitutívan aktív formaként viselkedik a trachea sejtjeiben.

Az N-DAAM túltermelésétől funkcióvesztéses fenotípusra emlékeztető tracheamintát vártunk. Az N-terminális régió tartalmazza a GBD domént, mely felelős a dDAAM-ot aktiváló kis GTP-áz megkötéséért, ugyanakkor hiányoznak belőle a fehérje aktivitásához elengedhetetlen FH1 és FH2 régiók. Amennyiben tehát az N-terminálist tartalmazó csonkolt fehérje fölös mennyiségben van jelen a tracheasejtben, úgy kimerítheti az endogén kis GTP-áz aktiváló faktor(ok) mennyiségét, ily módon a dDAAM fehérjéből kevesebb aktiválódik, és ez végeredményben domináns negatív hatást, azaz funkcióvesztéses fenotípust eredményezhet. Kísérleteinkben ezzel szemben az N-DAAM túltermelése a trachearendszerben önmagában nem mutatott kutikulafenotípust. Az N-DAAM túltermelés esetében a várt funkcióvesztéses fenotípus elmaradásának magyarázata az lehet, hogy a dDAAM aktivátora(i) fölös mennyiségben van(nak) jelen a légcsőrendszer sejtjeiben, ezért hiába titráltunk ki az N-DAAM túltermeléssel egy bizonyos részt, a megmaradó mennyiség képes lehetett megfelelő intenzitással aktiválni az endogén dDAAM-ot. Másrésről elképzelhető az is, hogy az aktivátor(ok) nagyobb affinitással kötődik(nek) a teljes hosszúságú fehérjéhez, mint a csonkolt N-DAAM molekulához, illetve az is lehetséges, hogy az N-DAAM csonkolt fehérje nem stabil a trachea sejtjeiben *in vivo*.

***A RhoA, az Src42A és a Tec29 domináns genetikai interakciót mutatnak a dDAAM<sup>Ex1</sup>-gyel***

Kísérleteink további iránya az volt, hogy meghatározzuk, hogy melyek azok a faktorok melyek együttműködnek a dDAAM fehérjével a trachearendszer területén. Ennek érdekében ismert aktin citoszkeleton regulátorok mutánsait vizsgáltuk domináns genetikai interakciókban a trachearendszerben dDAAM<sup>Ex1</sup> háttéren. A dDAAM<sup>Ex1</sup> hipomorf mutáció tracheakutikula fenotípusa moderált, ezért jó alany potenciális kölcsönható partnerek tesztelésére a trachearendszerben (12.ÁBRA A,E). Munkánk során három erős kölcsönható

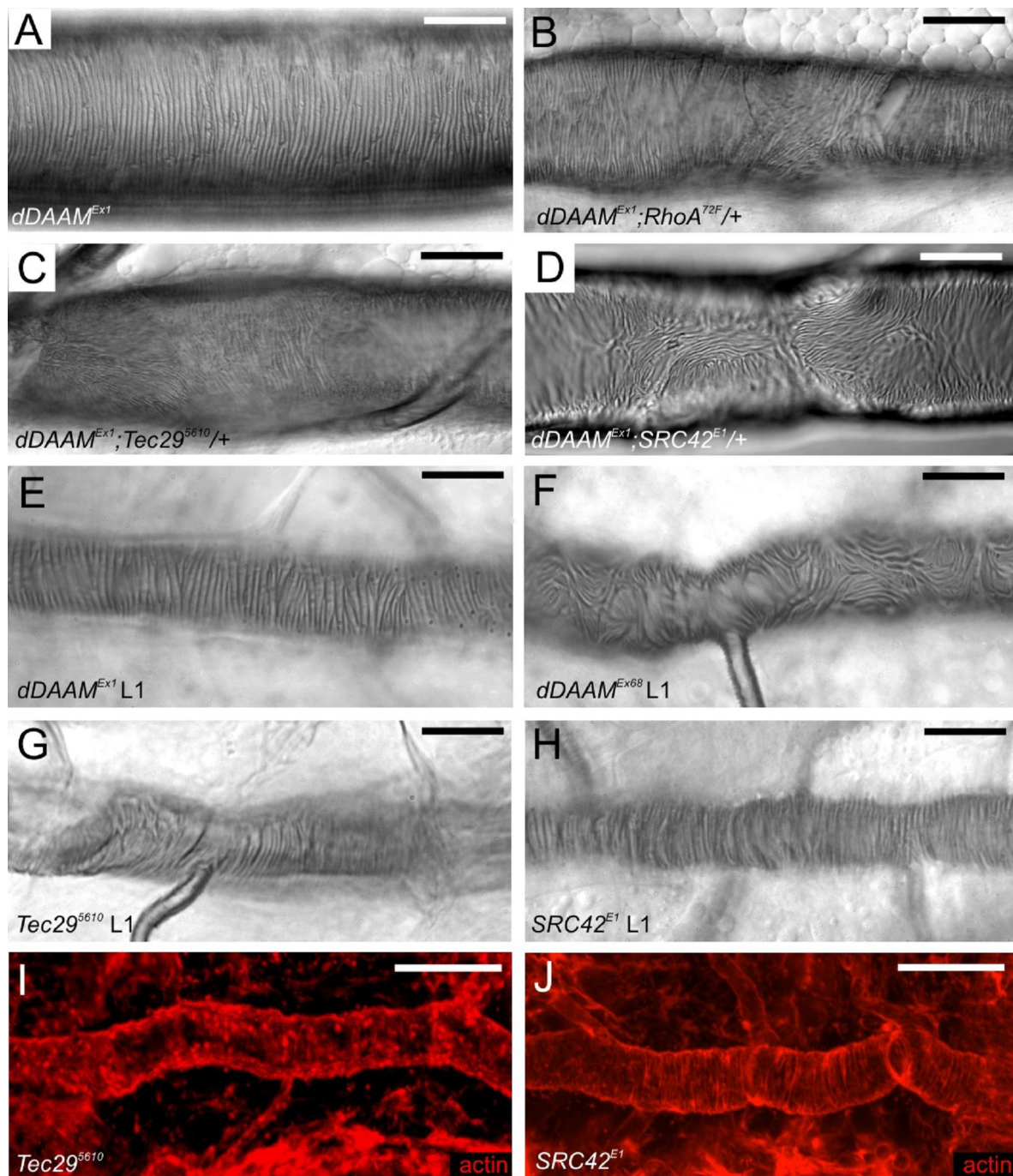


partnert azonosítottunk. Az egyik a RhoA kis GTP-áz funkcióvesztéses allélja, a *RhoA*<sup>72F</sup> mutáció. A másik kettő az Src-család génjeit, az *Src42A*-t és a *Drosophila Btk* homológ *Tec29*-et érinti, és szintén funkcióvesztéses mutációkat jelent (*Src42A*<sup>E1</sup>, *Tec29*<sup>5610</sup>). *dDAAM*<sup>Ex1</sup>-es háttéren egy kópia *RhoA*<sup>72F</sup>, *Src42A*<sup>E1</sup>, illetve *Tec29*<sup>5610</sup> mutáció jelenléte szignifikánsan erősítette a *dDAAM*<sup>Ex1</sup>-es mutáns tracheakutikula fenotípusát (12.ÁBRA B-D).

***Az Src42<sup>E1</sup> és a Tec29<sup>5610</sup> mutációk homozigóta formában a dDAAM<sup>Ex1</sup>-hez hasonló tracheakutikula fenotípust, és aktin citoszkeleton defektusokat mutatnak***

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a kölcsönható jelöltek közül melyiknek van saját kutikulafenotípusa a tracheában. A *RhoA* esetében ez a vizsgálat nem volt lehetséges, mert a *RhoA*<sup>72F</sup> homozigóta mutánsok a *RhoA* pleiotróp volta miatt még jóval a kutikulaszekréció előtt elpusztulnak. Az *Src42A*<sup>E1</sup> és a *Tec29*<sup>5610</sup> allélok esetében a legkésőbbi letálfázis az L1-es lárvastádiumra esik, így ezekben a ritkán megjelenő homozigóta mutáns lárvákban már vizsgálni tudtuk a tracheakutikula szerkezetét.

Mindkét génről leírták, hogy kifejeződnek az embrionális tracheában, azonban a funkcióvesztéses légcsőfenotípusukat eddig nekrozisként definiálták. Az L1-es stádiumig túlélő homozigóta *Src42A*<sup>E1</sup> illetve *Tec29*<sup>5610</sup> homozigóta mutáns lárvák tracheáin azonban már nem ez a fenotípus komponens dominált, a kutikulamintájuk sokkal inkább emlékeztetett a *dDAAM*<sup>Ex1</sup>-es funkcióvesztéses fenotípusára (12.ÁBRA G,H). Ugyancsak megfigyeltük azt is, hogy az *Src42*<sup>E1</sup> és *Tec29*<sup>5610</sup> homozigóta mutáns embriókban a trachearendszer aktin sejtváza is sérült, hasonló módon a *dDAAM* funkcióvesztéses mutánsokéhoz (12.ÁBRA I,J).

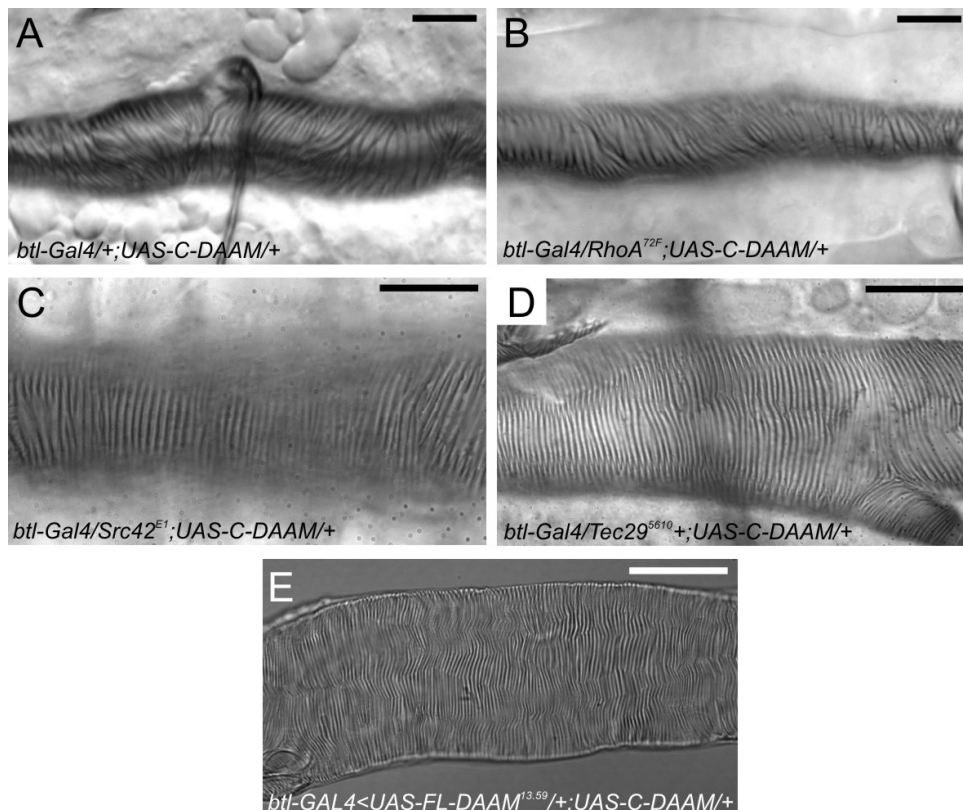


## 12.ÁBRA A dDAAM kölcsönható partnerei a trachearendszerben

(A) A *DAAM*<sup>Ex1</sup> hipomorf mutáns lárvális tracheáin csak moderált kutikula fenotípus látható, melyet egy kópia *RhoA* (B), *Tec29* (C) és *Src42* (D) hiánya nagymértékben felerősít. (E,F) A *dDAAM* mutánsok tracheafenotípusai már L1-es lárvális stádiumban is jól megfigyelhetők. (G,H) A *Tec29*<sup>5610</sup> és az *Src42*<sup>E1</sup> homozigóta mutáns L1 lárvák légcsövein egy közepesen erős, a *dDAAM*<sup>Ex1</sup>-hez hasonló kutikula fenotípus látható. Ezzel összhangban ezekben a mutánsokban az apikális aktinkábel struktúra is részlegesen sérült (I,J). A skálák mérete: 50  $\mu$ m az A-H paneleken; 10  $\mu$ m az I,J paneleken.

**A  $RhoA^{72F}$ , az  $Src42^{E1}$  és a  $Tec29^{5610}$  allélok hatása a C-DAAM túltermelés okozta tracheakutikula fenotípusra**

Kíváncsiak voltunk, hogy a *RhoA*, illetve az *Src42* és *Tec29* gének hol helyezkedhetnek el a gének hierarchiájában a *dDAAM*-hoz képest. Ezért episztázis analízist végeztünk, ahol jelölt génjeink egy-egy mutáns kópiája volt jelen *btl-Gal4/+;UAS-C-DAAM/+* háttéren. Azt vizsgáltuk, hogy a mutációk jelenléte befolyásolja-e a C-DAAM túltermelés okozta tracheafenotípust. A  $RhoA^{72F}$  mutáció nem volt hatással a C-DAAM túltermelés tracheafenotípusára (13.ÁBRA B), míg az  $Src42A^{E1}$  illetve a  $Tec29^{5610}$  egy mutáns kópiájának jelenlétében a C-DAAM fenotípus jelentősen meggyengült (13.ÁBRA C,D).



**13.ÁBRA Episztázis kísérletek C-DAAM-mal**

(A) A C-DAAM túltermelés okozta kutikulafenotípus a trachea sejtjeiben, (B) melyre egy kópia *RhoA* hiánya nincs hatással, de egy kópia *Src42* (C) vagy *Tec29* (D) hiánya és (E) a teljes hosszúságú *dDAAM* forma (*FL-DAAM<sup>13.59</sup>*) együttes túltermelése erősen szupresszálja azt. A skálák mérete: 50  $\mu$ m.

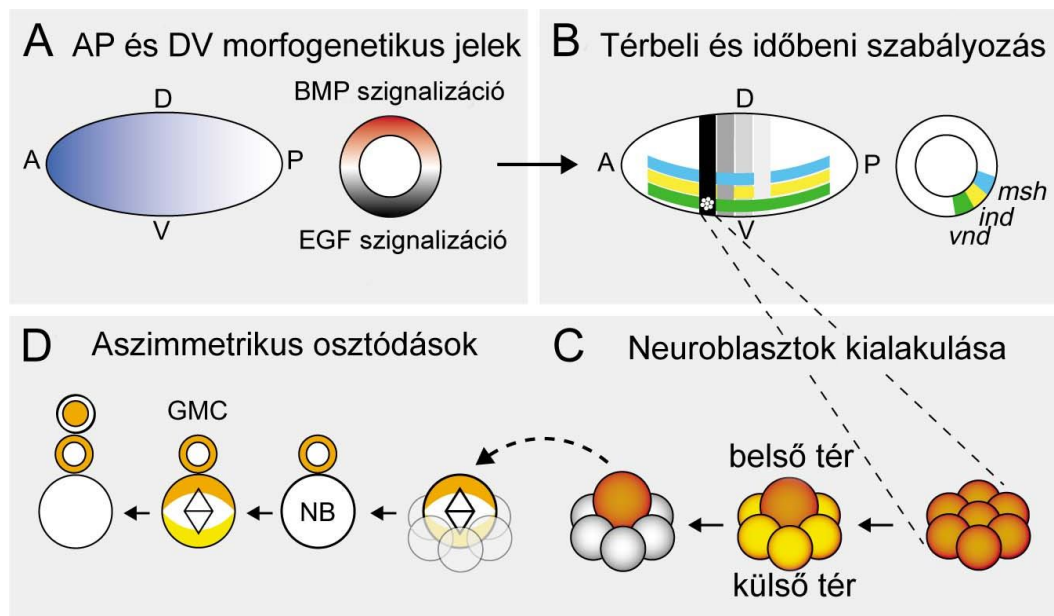
Ezek az eredmények alátámasztják az irodalomban is elfogadott modellt, miszerint a Rho kis GTP-ázok családjába tartozó fehérjék a DRF forminok aktivátorai, a gének hierarchiájában magasabb szinten (upstream) hatnak, míg az Src család elemei a forminoktól lentebb (downstream), vagy legalábbis egy szinten ható elemek.

# **A dDAAM SZEREPE AZ EMBRIONÁLIS KÖZPONTI IDEGRENDSZER NYÚLVÁNYAINAK KIALAKÍTÁSÁBAN**

## **BEVEZETÉS**

### ***A hasi idegköteg idegsejtjeinek specifikációja***

A korai embrióban a 8. stádiumot elérve a ventrális-laterális ektodermában kijelölésre kerül az a terület, a neurogén régió, melyből a későbbi embrionális KIR sejtjei származnak. A neurogén régiót két részre oszthatjuk. A procephalikus neurogén régióból (pNR) alakul ki az agy, míg a ventrális neurogén régióból (vNR) a hasi idegköteg (VNC: ventral nerve cord). Az idegrendszer sejtjeinek specifikációja térben és időben is pontosan szabályozott módon történik. A neurogén régióban elkülönülnek azok a sejtcsoportok (ekvivalencia csoportok), melyeknek minden sejtje képes lehet idegrendszeri progenitor sejtté válni (14.ÁBRA A,B). A következő lépésben ezekben a csoportokban kiválasztásra kerül egy sejt, mely azután delaminációval az embrió belsejébe jut és idegrendszeri progenitor sejtnek működik (14. ÁBRA C). Ezeket a sejteket, amelyekből minden hemiszegetben 30 darab alakul ki, neuroblasztoknak (NB) nevezzük. A neuroblasztok a delaminációt követően többször aszimmetrikusan osztódnak. Az inekvális osztódások eredményeként a nagyobb, apikális irányban elhelyezkedő leánysejt neuroblaszt marad, míg a másik, bazális irányban elhelyezkedő, kisebb méretű sejt ganglion anyasejt lesz (GMC, ganglion mother cell). A GMC limitált mitotikus potenciállal rendelkezik, mindösszesen egy osztódásra képes. A GMC osztódása két sejtet eredményez (posztmitotikus utódsejtek), melyek azután vagy idegsejt (motoneuron vagy interneuron) sejtorsót, vagy glia sejtorsót vesznek fel (14.ÁBRA D).



#### 14.ÁBRA Az embrionális hasi idegköteg kialakulása *Drosophila*-ban

(A) A korai embrióban a morfogenetikus gének termékei karakterisztikus mintákban, grádiensek mentén hatnak, és (B) neuroektodermában a szegmentpolaritási és a kolumnáris gének egy specifikus sakkáblaszerű mintázatát alakítják ki. Minden átfedő helyen (ekvivalencia csoportban) a regulátor gének egy egyedi kombinációja expresszálódik. (C) Az ekvivalencia csoportban azután kijelölésre kerülnek azok a sejtek, melyek delaminációval az embrió belsejébe jutva idegrendszeri progenitor sejtékként működnek (NB neuroblasztok). (D) A NB-ok ezután többször aszimmetrikusan osztódnak, és ganglion anyasejteket (GMC) hoznak létre. A GMC-k ezek után még egyszer osztódnak, utódsejtjeik pedig glia vagy idegsejt irányba differenciálódnak. Az eredeti ábra forrása: (Skeath és Thor 2003)

#### A *Drosophila* embrionális KIR nyúlványainak kialakulása

Az idegsejtek terminális differenciálódása során a központi idegrendszerben megindul a primer idegpályák kialakulása. A hasi idegkötegben minden pionír idegpálya az idegrendszer középvonalából eredő környezeti jelek, illetve a szomszédos idegsejtekből vagy a környező laterális sejtekből eredő jelek segítségével jut el a megfelelő effektor régióhoz (axon guidance). A növekedés irányát befolyásoló jeleket alapvetően két csoportba lehet sorolni. A növekvő nyúlványok anterior-poszterior, illetve dorzális-ventrális irányban is az attraktáns jelek felé haladnak, míg a repellens jelek ezzel egy időben megakadályozzák, hogy a nyúlványok rossz irányba növekedjenek.

*Drosophila*-ban jelenleg két fő olyan faktort ismerünk, melyek attraktív vagy repellens hatással bírnak a dorzális-ventrális irányban növekvő axonokra a hasi idegköteg

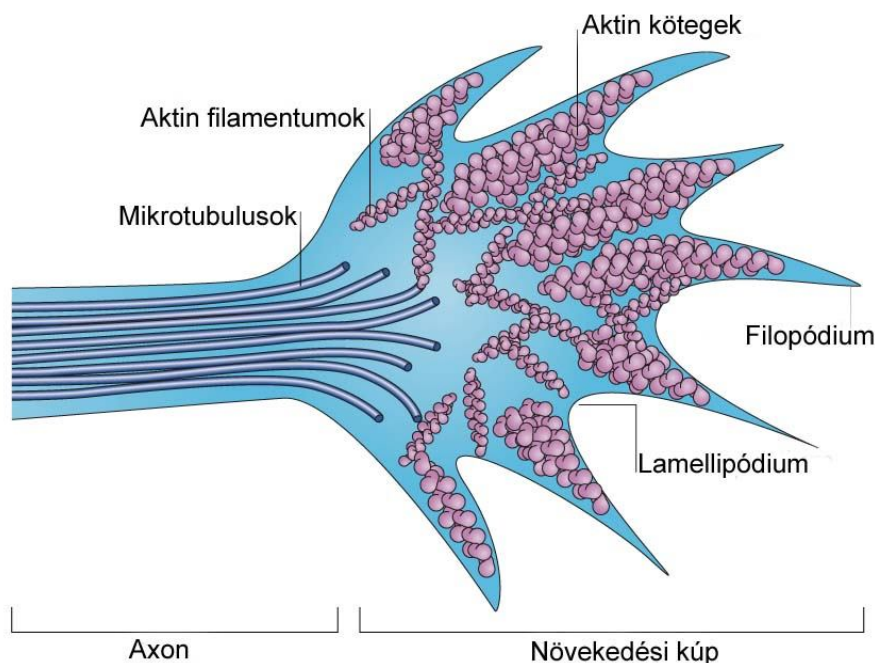
középvonalának átlépésekor. Ezek a faktorok a hasi idegköteg középvonalának sejtjeiben termelődő Netrinek, illetve a Slit. A Netrinek fő receptora *Drosophila*-ban a Frazzled fehérje, a Frazzled receptort expresszáló axonok a Netrin forrás, mint attraktáns felé mozognak. A Slit szignál ezzel szemben repellensként hat a jelet érzékelni képes axonokra a Robo (Roundabout) receptor fehérjéken keresztül. A Robo-t kifejező axonok nem képesek átlépni a hasi idegköteg középvonalán az ellenkező oldalra, míg a Robo funkcióvesztéses mutánsaiban a nyúlványok jóval nagyobb számban kereszteződnek át. Az átkereszteződés nélküli, illetve az átkereszteződést követően a longitudinális, anterior vagy poszterior lefutású axonok (jórészt az interneuronok nyúlványai) növekedését is attraktív illetve repellens jelek szabályozzák. Az átkereszteződésen átesett nyúlványokban a Slit/Robo rendszer vesz részt a szabályozásban, míg a hasi idegköteg külső laterális oldalán az Ephrinek és a Semaphorinok repellensként működve akadályozzák meg, hogy a normálisan hosszanti lefutású interneuronok ektopikus helyeken lépjenek ki a hasi idegkötegből.

A KIR fejlődését leíró áttekintéshez az alábbi közlemények szolgáltak alapul: (Schmid és mtsai. 1999; Sánchez-Soriano és mtsai. 2007; Kruger és mtsai. 2005; Dickson 2001; Skeath és Thor 2003).

### ***A növekedési kúp szerkezete***

Az idegsejt nyúlványok növekedési irányának (pathfinding) érzékelésében döntő szerepet játszanak a növekvő axonok és dendritek végén differenciálódó növekedési kúpok (growth cones). Az irodalomban már hosszú ideje ismert, hogy a növekvő axonvégek intaktsága elengedhetetlen a növekvő nyúlványok pontos navigálásához. A stabil, mikrotubulusokban gazdag axonnyúlvány végén egy dinamikus, aktingazdag struktúra található, melyet S Ramon y Cajal írt le, és nevezett el növekedési kúpnak („cono de

crecimiento”) (Cajal 1890). A növekedési kúp szerkezetére jellemző egy központi állomány (mely organellumokban, és statikus mikrotubulusokban gazdag), illetve egy perifériás, F-aktinban gazdag rész, ahol lamellipódiumokat és a filopódiumokat figyelhetünk meg (a növekedési kúpok perifériás részén is találhatóak kis számban mikrotubulusok, de azok - ellentétben a központi nyúlvány mikrotubulusaival- dinamikusak) (15.ÁBRA).



### 13.ÁBRA A növekedési kúp sematikus szerkezete

Az eredeti ábra forrása: (Ramesh 2004)

A filopódiumokon belül az aktin filamentumok gyorsan növekvő vége általában a filopódium csúcsa felé néz (Forscher és Smith 1988). A növekedési kúp végében folyamatos, retrográd irányú F-aktin transzport zajlik, azaz a növekedési kúpok filopódiumaiban az aktinfilamentumok gyorsan növekvő végén folyamatos G-aktin monomer beépülés, míg a lassan növekvő végén folyamatos depolimerizáció történik (Lin és Forscher 1995). *In vivo*, idegrendszeri sejt-kultúrákon a növekedési kúpok cytochalasinD kezelése után az axonok nem voltak képesek megfelelően navigálni a szubsztrátumon, nem érzékelték sem az attraktáns, sem a repellens jeleket, ugyanakkor a növekedési képességük megmaradt. Amikor a



rendszerből eltávolították a gátlószert, akkor az idegsejt nyúlványok ismét képessé váltak a pontos navigációra (Bentley és Toroian-Raymond 1986; Marsh 1984; Chien és mtsai. 1993; Zheng és mtsai. 1996). Ez azt jelenti, hogy az axonok navigációjában elsődlegesen a növekedési kúp aktin gazdag része játszik fontos szerepet, míg a mikrotubulus rendszer intaktsága elsődlegesen a nyúlványnövekedés fizikai feltétele.

### ***Az aktin sejtvez szabályozása axon növekedési kúpban***

Az előzők alapján világos, hogy az axon növekedés, illetve a növekedési kúp navigációja dinamikus sejtvez átrendeződéseket igényel. Ezeknek a folyamatoknak a szabályozásában részt vesznek a korábban említett „guidance” fehérjék és egyéb jelátviteli elemek is, mint pl. a Dlar receptor és az Abl kinázok (Wills, Marr és mtsai. 1999; Wills, Bateman és mtsai. 1999; Krueger és mtsai. 1996). A felsőbb szabályozó elemeken kívül ismert, hogy a Rho családba tartozó kis GTP-ázok (Rho, Rac, Cdc42) is kitüntetett szerepet játszanak a növekedési kúp citoskeletális szabályozásában, különös tekintettel az aktin sejtvezra. A Rac és a Cdc42 kis GTP-ázok az axonnövekedés pozitív regulátorai. A *Drosophila*-ban három *Rac* gén található, a *Rac1*, a *Rac2* és az *Mtl*. A *Rac* gének az embrionális KIR hasi idegkötegében is redundáns funkcióval bírnak az axonnövekedés szabályozásában, az általuk okozott fenotípusok erőssége függ a *Rac* mutációk dózisától. A *Rac1<sup>J10</sup>*, és *Rac2Δ* esetében az egyes, és kettős mutánsok nem mutatnak átkereszteződési hibákat a hasi idegkötegben. Az *MtlΔ* egyes mutánsokban azonban 33%-ban találtak ilyen jellegű defektusokat. A fenotípus penetranciája *Rac1<sup>J10</sup>,MtlΔ* kettős mutánsokban meghaladta a 75%-ot, *Rac2Δ,MtlΔ* kettős mutánsokban pedig a 40%-ot. A *Rac1<sup>J10</sup>,Rac2Δ,MtlΔ* hármas mutánsokban a hasi idegköteg axonjai teljesen dezorganizáltak, súlyos axonnövekedési defektusokat figyeltek meg (Hakeda-Suzuki és mtsai. 2002). A Cdc42 szerepe nélkülözhetetlen a filopódiumok kialakulásához (Nobes és Hall

1995), a Slit/Robo rendszer hatására inaktiválódik a repellens jelek érzékelése során, míg a domináns negatív forma túltermelése ezekben az axonokban gátolja a repellens jelek érzékelését (Wong és mtsai. 2001). Ugyanakkor a Cdc42 funkcióvesztéses homozigóta mutánsok nem mutatnak markáns fenotípust az embrionális központi idegrendszerben. A longitudinális kötegekben időnként szakadások illetve fúziók figyelhetők meg, de a KIR szerkezete többé-kevésbé normális marad (Genova és mtsai. 2000). A RhoA kis-GTP-áz a nyúlványnövekedés negatív regulátora, a repellens jelek érzékelését segíti elő a növekvő axonokban, míg a dendritek esetében pozitív regulátorként viselkedik (Lee és mtsai. 2000).

A felsőbb szabályozó elemeken kívül ismertek olyan fehérjék is, amelyek közvetlen módon vesznek részt az aktin dinamika szabályozásában. Ezek közé tartoznak az Ena/VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) fehérjék, melyek amellet, hogy meggátolják a capping fehérjék szabad véghez kapcsolódását, képesek az aktinláncok kötegekbe rendezését és polimerizációját is elősegíteni (Bachmann és mtsai. 1999). *In vitro* tesztekben kimutatták, hogy az emlős Ena/VASP fehérjék foszforilált formájának jelenléte elősegíti az aktinfilamentumok kötegekbe rendezését, míg defoszforilált formája gyorsítja az aktin polimerizációt (Laurent és mtsai. 1999). Az irodalmi adatok alapján az Ena szerepe a növekedési kúpok filopódiumainak kialakításában van. *Drosophila ena* mutánsokban axonhiányokat, és „bypass” típusú nyúlványnövekedési defektusokat tapasztaltak. Az emlős Mena fehérjéről leírták, hogy felhalmozódást mutat a növekedési kúpok filopódiumainak csúcsi részén hippokampális sejt kultúrában (Applewhite és mtsai. 2007; Lebrand és mtsai. 2004). Kortikális idegsejt kultúrában a mindhárom egér *Ena* génre mutáns *ENA/VASP/MENA* neuronokban nem képződnek filopódiumok (Kwiatkowski és mtsai. 2007).

Az aktin sejtváza közvetlen regulátorai közül említést érdemel a G-aktin kötő Profilin fehérje. A *Drosophila* Profilint a *chickadee (chic)* gén kódolja. A *chic* gén a

nyúlványnövekedés pozitív regulátora, funkcióvesztéssel mutánsaiban az embrionális KIR-ben megáll az axonnövekedés *in vitro* hasi idegköteg kultúrákban (Wills, Marr és mtsai. 1999).

Több kísérleti megfigyelés is arra utal, hogy az axon növekedés új aktin filamentumok képződését is igényli. Az új filamentumok képződéséhez azonban szükség van az ún. aktin nukleáló faktorokra, és ezért valószínűnek látszott, hogy közülük egy vagy több faktor is szükséges az idegsejt nyúlványok kialakulásához és növekedéséhez. Mindeztáig azonban ellentmondásos kép bontakozott ki arról, hogy mely nukleáló faktorok játszanak szerepet az axon növekedés során. *Drosophila*-ban az Arp2/3 komplex ArpC1 és Arp3 alegységeiről ismert, hogy funkcióvesztéssel mutációik axonprojekciós defektusokhoz vezetnek az embrionális KIR-ben (Zallen és mtsai. 2002). Az irodalomban több neuronális növekedés modellben is kimutatták, hogy az Arp2/3 komplex funkciójára szükség van a növekedési kúp filopódiumainak kialakításához (Mongiu és mtsai. 2007; Korobova és Svitkina 2008), más adatok azonban azt bizonyítják, hogy ez nem minden idegsejtre érvényes (Ng és Luo 2004; Strasser és mtsai. 2004). Ezen kívül az Arp2/3 komplex az elágazó-láncú filamentumok képződéséért felelős, ilyen struktúrákat pedig csak a növekedési kúpok lamellipódiumaiban találhatunk, de a növekedés szempontjából esszenciális filopódiumokban nem. A nemelágazó-láncú kötegek kialakítását a növekedési kúpok filopódiumaiban az acetmuslicában is azonosított faktorok közül a Spire, illetve a formin fehérjecsald tagjai végezhetnék. A Spire kifejeződik ugyan a KIR-ben (Schumacher és mtsai. 2004), de neuronális funkcióját eddig nem vizsgálták, illetve az Arp2/3 komplexhez hasonlóan a növekvő aktinfilamentumok lassan növekvő végével asszociált (Quinlan és mtsai. 2005). A forminokat illetően az mDia1 emlős forminról kimutatták, hogy kifejeződik a KIR-ben, illetve, hogy kultúrában nevelt granulás kisagyi sejtekben befolyásolja a nyúlványképződést (Arakawa és mtsai. 2003). Ugyanakkor ismert, hogy az *mDia1* knock-out egér tökéletesen életképes és nem mutat idegrendszer fejlődési hibákat (Eisenmann és mtsai. 2007; Peng és mtsai. 2007; Sakata és mtsai. 2007). Az

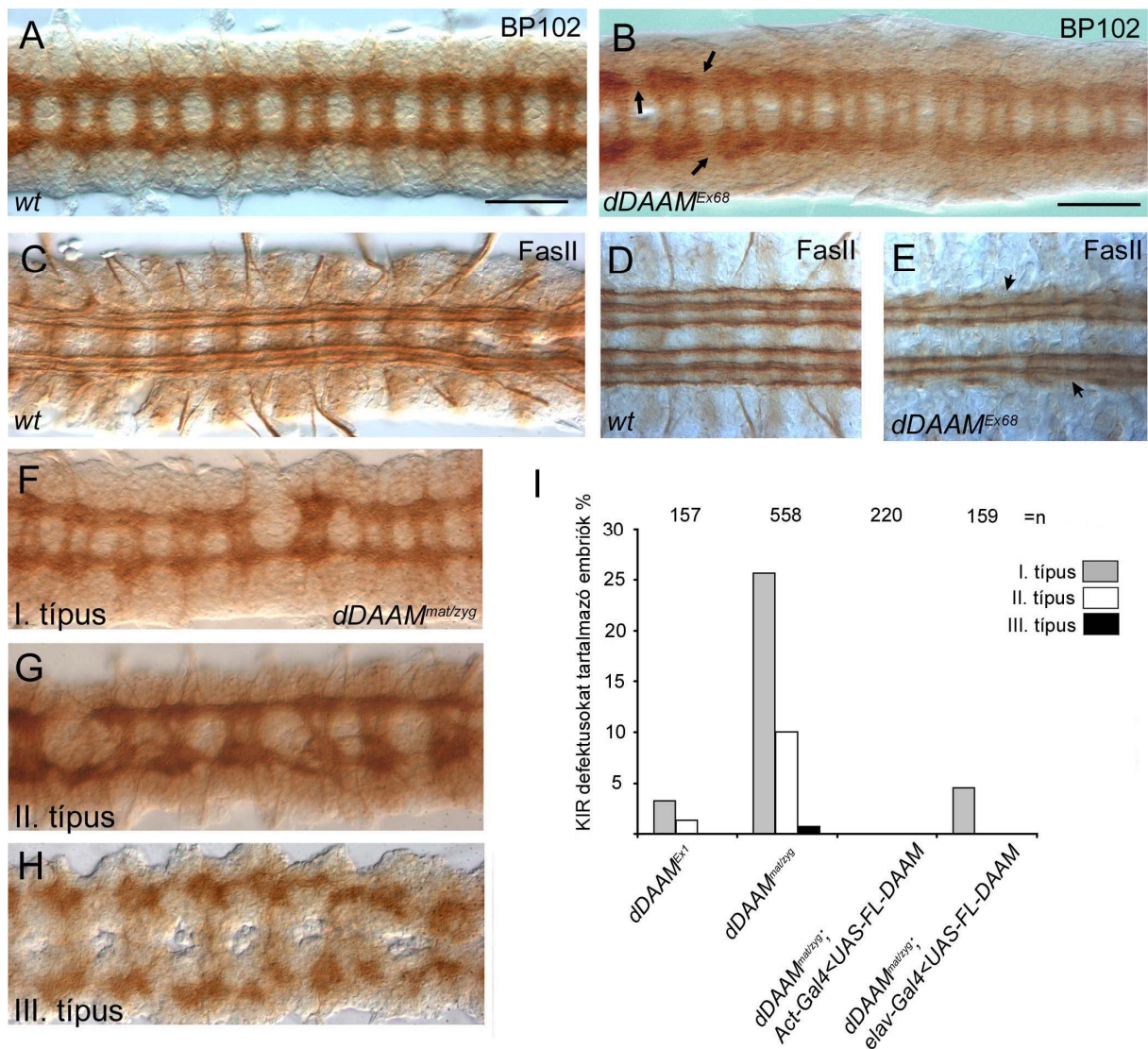
egér genomban található még egy *diaphanous* gén, az *mDia2*, melyről leírták, hogy képes menekíteni *Ena/Vasp* deficiens idegrendszeri sejtvonalban a filopódiumképződés defektusait. Azonban ez a gén nem expresszálódik a fejlődő idegrendszerben a nyúlványnövekedés időszakában (Dent és mtsai. 2007). Nem valószínű tehát, hogy a központi idegrendszer nyúlványainak növekedését bármely fentebb említett formin fehérje *in vivo* befolyásolná. Ezzel szemben a gerinces DAAM ortológokról leírták, hogy génjeik kifejeződnek a fejlődő központi idegrendszerben (Nakaya és mtsai. 2004; Kida és mtsai. 2004). Ezzel összhangban, kísérleteink során mi pedig azt találtuk, hogy az egyetlen *Drosophila* DAAM ortológ is pán-neurális kifejeződési mintát mutat.

## EREDMÉNYEK

### ***A dDAAM funkcióvesztéses mutációk nyúlványnövekedési defektusokat okoznak az embrionális KIR-ben***

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a *dDAAM* gén szerepét az idegrendszer fejlődésében, megnéztük, hogy a *dDAAM* mutánsokban van-e a KIR-t érintő elváltozás. Kísérleteinkben az  $\alpha$ -BP102 és  $\alpha$ -FasII ellenanyagokat, mint idegrendszeri markereket használtuk. Az  $\alpha$ -BP102 ellenanyag minden idegsejtnyúlványt megjelöl a központi idegrendszerben, míg az  $\alpha$ -FasII ellenanyag finomabb felbontást tesz lehetővé, mivel a bal és jobb oldalon mindösszesen 3-3 fő idegköteget, valamint a kilépő fő motoneuronok kötegeit festi meg. Ellenanyagaink felhasználásával immunfestéseket végeztünk 16. stádiumban lévő *dDAAM*<sup>Ex68</sup> homozigóta mutáns embriókon vad típusú kontroll mellett.

A *dDAAM*<sup>Ex68</sup> allélt homozigóta formában hordozó zigótikus null mutáns embriók központi idegrendszerei  $\alpha$ -BP102 markerrel festve nem mutattak jelentős eltérést a vad típusú központi idegrendszerekhez képest (16.ÁBRA A,B). Csupán az embriók 1,5%-ánál figyeltünk meg szakadásokat és elvékonyodásokat a hosszanti idegkötegekben. Az  $\alpha$ -FasII festést elvégezve a központi rész leglaterálisabb kötegeiben hiányokat tapasztaltunk (16.ÁBRA C,D,E). Ez a fenotípus nem túl erős ugyan, de számos más idegrendszeri funkcióval bíró gén esetében is előfordul. A jelenség magyarázata az lehet, hogy a kísérleteinkben vizsgált embriók *dDAAM*<sup>Ex68</sup> heterozigóta anyától származtak. A dolgozat korábbi részében már esett szó arról, hogy a *dDAAM* valószínűleg anyai hatású gén, az anyától származó géntermék pedig kompenzálhatta a *dDAAM*<sup>Ex68</sup> zigótikusan null állatokban a KIR nyúlványainak kialakulásakor a zigótikus *dDAAM* fehérje hiányát és emiatt gyengébb funkcióvesztéses fenotípusokat tapasztaltunk a hasi idegkötegekben.



## 16.ÁBRA Axonfejlődési rendellenességek a *dDAAM* mutáns embriókban

(A) Vad típusban a hasi idegkötegben az  $\alpha$ -BP102 ellenanyag a teljes neuropilt festi, mely egy létraszerű struktúrát alkot. A hosszanti lefutású kötegek mellett a mintában szegmentenként két kommisszúrális köteg található. (C,D) Az  $\alpha$ -FasII ellenanyag a hosszanti kötegek csak egy karakterisztikus csoportját jelöli meg. (B) *dDAAM<sup>Ex68</sup>* zigotikus null embriókban csak gyenge KIR defektusok tapasztalhatóak, a hosszanti kötegekben  $\alpha$ -BP102 festésen elvékonyodások, ritkán szakadások látszanak (nyilak). (E) Az  $\alpha$ -FasII festésen a leglaterálisabb hosszanti kötegekben hiányok figyelhetők meg. (F–H) A *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* embriókban megfigyelt fenotípus osztályok: I. típus, gyenge; II. típus, közepes; III. típus, erős fenotípus osztály. (I) A kapott KIR fenotípusok penetranciájának számszerű ábrázolása, valamint az *UAS-FL-DAAM* transzgén menekítő hatása a *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* fenotípusára. A skálák mérete 50  $\mu$ m.

További kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy az anyai eredetű *dDAAM* géntermék mennyiségének csökkentése súlyosbítja-e a *dDAAM<sup>Ex68</sup>* zigotikusan null embriókban megfigyelt KIR defektusokat. Az *dDAAM* géntermék anyai komponensének

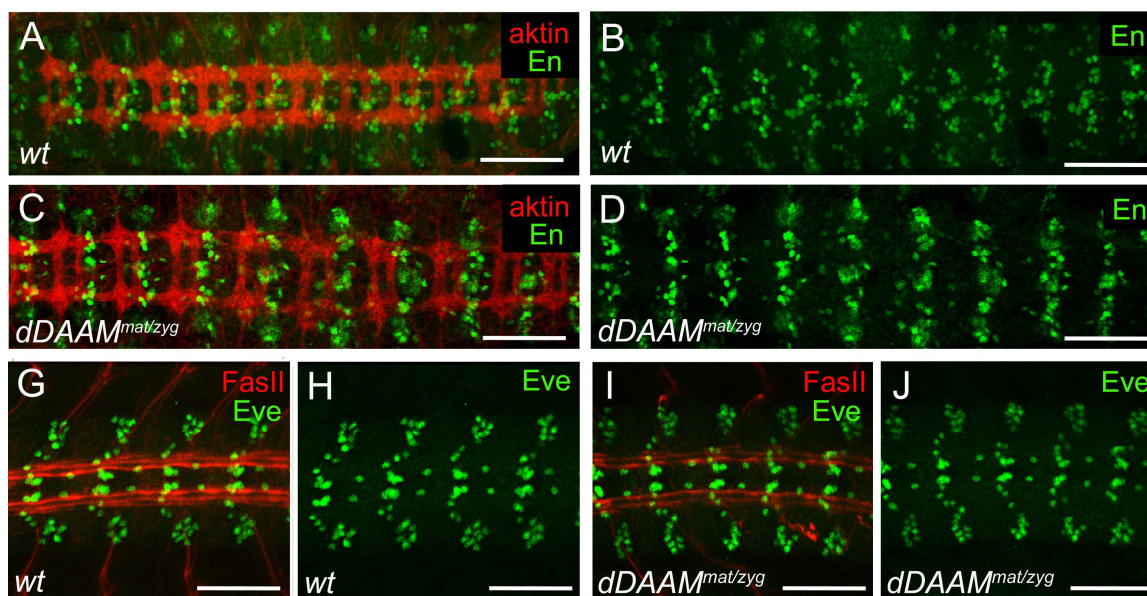
teljes eltávolításához első lépésben csíravonal klón kísérletben maternális és zigotikusan null embriókat hoztunk létre. Ezek az embriók azonban korai cellularizációs hibákat mutattak, és elpusztultak a KIR nyúlványainak kialakulása előtt, ezért alkalmatlanok voltak a további vizsgálatokra (Pataki Csilla személyes közlés). További kísérleteinkben ezért maternálisan és zigotikusan is gyengített  $dDAAM^{Ex1}/dDAAM^{Ex68}$  transzheterozigóta embriókat hoztunk létre (a továbbiakban  $dDAAM^{mat/zyg}$ ). A  $dDAAM^{mat/zyg}$  embriókat hipomorf homozigóta  $dDAAM^{Ex1}$  anyák és  $dDAAM^{Ex68}/Y^{Dp(1;Y)SZ280}$  apák keresztezésével állítottuk elő. A keresztezésből származó teljes embriópopuláció összesen 34%-ánál szakadásokat láttunk a hasi idegköteg interszegmentális kötegeiben, illetve a komisszúrális kötegekben (I. típus: 25%). Emellett az anterior és poszterior komisszúrák kötegei sokszor nem váltak el egymástól, az axonok rossz irányba növekedtek (II. típus: 9%), extrém esetekben a teljes interszegmentális köteg, valamint a komisszúrák is hiányoztak (III. típus: 1%) (Gombos Rita személyes közlés) (16.ÁBRA F-I). Kísérleteink azt mutatják, hogy a  $dDAAM$  valóban anyai hatású gén, és funkciója elengedhetetlen a hasi idegkötegben a normális axonképződéshez.

Azért, hogy biztosak lehessünk benne, hogy a  $dDAAM^{mat/zyg}$  kombinációban tapasztalt idegrendszeri fenotípusok valóban a  $dDAAM$  géntermék nagy részének hiányához köthetők, illetve nem sejthalál, vagy másodlagos, az idegrendszert érintő degeneratív elváltozások következményei, szükséges volt néhány kontroll jellegű kísérlet elvégzése. Első lépésben megvizsgáltuk, hogy a  $dDAAM$  allélek okozta idegrendszeri defektusokat valóban a  $dDAAM$  funkció kiesése okozza. Ennek érdekében *act-Gal4* és *elav-Gal* driverek felhasználásával általánosan, illetve specifikusan az idegrendszer területén túltermeltettük a teljes hosszúságú  $dDAAM$  fehérjét  $dDAAM^{mat/zyg}$  embriókban. Az embriókon  $\alpha$ -BP102 festést végeztünk. Az *act-Gal4*<*UAS-FL-DAAM* túltermelés  $dDAAM^{mat/zyg}$  mutáns háttéren 100%-ban menekítette a KIR hibáit. Az *elav-Gal4*<*UAS-FL-DAAM* idegrendszer specifikus menekítési kísérletben



95,8%-ban vad típusú idegrendszereket kaptunk (Gombos Rita személyes közlés) (16. ÁBRA I).

Második lépésben ki kellett zárunk azt a lehetőséget, hogy a *dDAAM* KIR fenotípusok (szakadások, részleges, vagy teljes köteghiányok) sejthalál miatt következnek be.



### 17.ÁBRA A *dDAAM* funkcióvesztéses mutánsban normális a neuronok száma

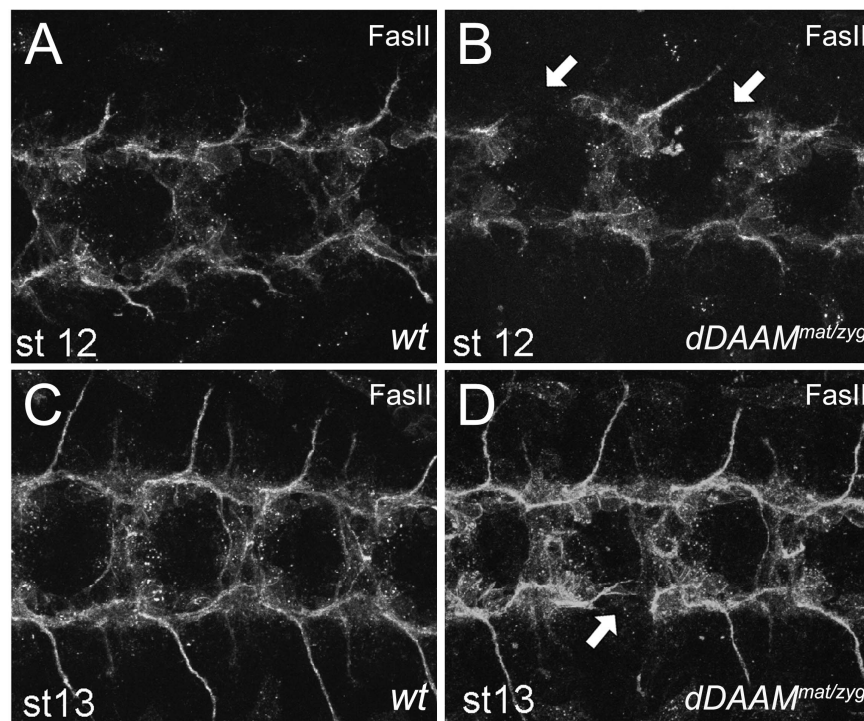
(A,B, zöld csatorna) Vad típusban a 16. embrionális stádiumban az  $\alpha$ -En ellenanyag 36-40 idegsejtet jelöl meg szegmentenként. (C,D zöld csatorna) *dDAAM*<sup>mat/zyg</sup> embriókban ez a szám nem változik. Az  $\alpha$ -Eve ellenanyag által festett minta szintén identikus a vad típus mintájával (G-J zöld csatorna). A festéseken a teljes KIR-eket aktinnal (A,C piros csatorna), a fő idegkötegeket  $\alpha$ -FasII festéssel (G,I piros csatorna) tettük láthatóvá. Az anterior irány minden panelen balra található. A skálák mérete 50  $\mu$ m.

Ennek érdekében *dDAAM*<sup>mat/zyg</sup> mutáns idegrendszereket vad típusú kontroll mellett általános idegrendszeri markerrel,  $\alpha$ -Elav ellenanyaggal festettük meg, mely a KIR szinte minden idegsejtjének sejtmagját láthatóvá teszi. Kísérleteinkben 16. stádiumban lévő embriókat használtunk. Az idegsejtek számát tekintve nem tapasztaltunk különbséget a vad típusú és a *dDAAM* mutáns idegrendszerek között (Gombos Rita személyes közlés), ugyanakkor ez a festés nem nyújtott elég részletes képet ahhoz, hogy egyértelműen kizárhassuk a sejthalál lehetőségét. A továbbiakban ezért olyan idegrendszeri jelölő fehérjék immunhisztokémiai festésével folytattuk az analízist, melyek szegmentenként csak egy jól körülhatárolható számú



idegsejtet jelölnek meg. Ilyenek az  $\alpha$ -Eve (N. H. Patel és mtsai. 1989) és az  $\alpha$ -En (N H Patel és mtsai. 1989) ellenanyagok. A vad típushoz képest ebben az esetben sem tapasztaltunk eltérést a szegmentenkénti idegsejtek számában (17.ÁBRA), tehát nem valószínű, hogy a dDAAM fenotípusok elsődleges oka az idegsejtek pusztulásával függ össze.

Végezetül, harmadik kontroll kísérletünkben azt a lehetőséget akartuk kizárni, hogy a  $dDAAM^{mat/zyg}$  mutáns KIR-ekben az axonok utólag egy degenerációs folyamat révén tűnnek el. Korai 12. stádiumban lévő embriókon elvégzett  $\alpha$ -FasII festés segítségével -mely jól kirajzolja az ebben az állapotban dinamikus növekedésen áteső fő idegkötegeket- megmutattuk, hogy a fejlődő axonok már ekkor növekedési defektusokat szenvednek  $dDAAM^{mat/zyg}$  embriókban (18.ÁBRA).



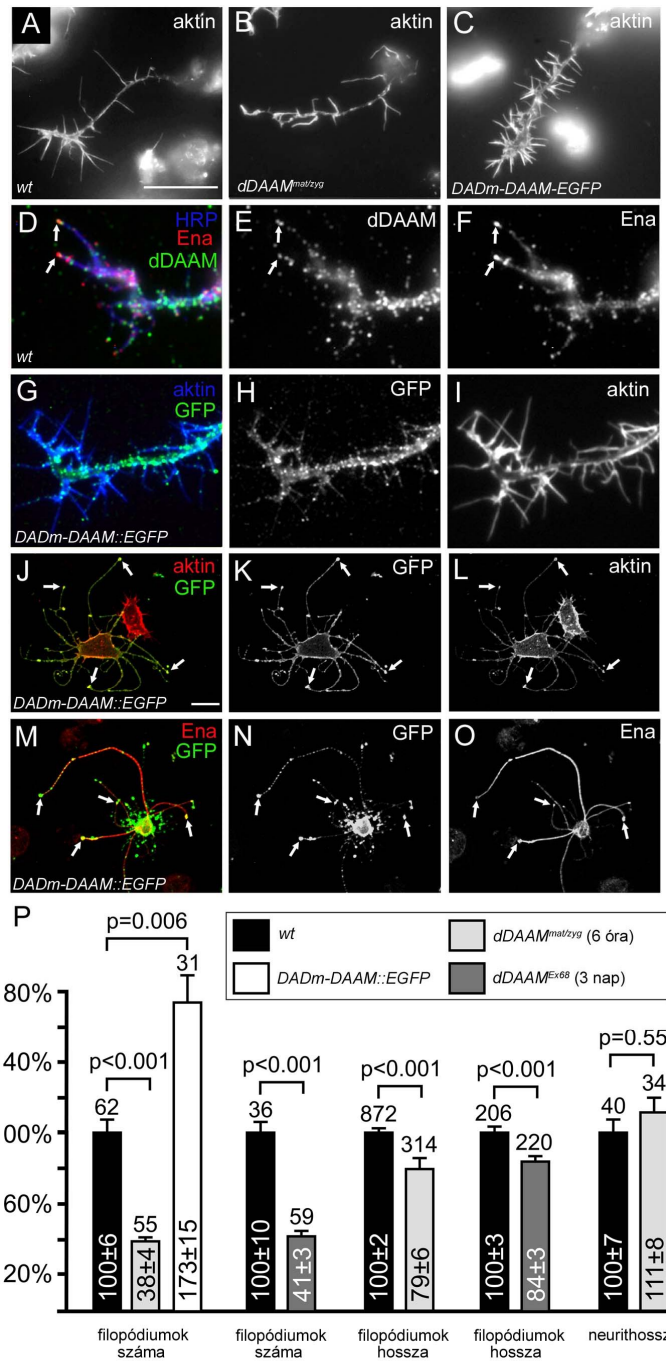
**18.ÁBRA Axon növekedési defektusok 12. és 13. stádiumban lévő  $dDAAM^{mat/zyg}$  embriókban**

A korai 12. (A,B) illetve 13. stádiumokban (C,D) elvégzett  $\alpha$ -FasII festés megmutatta, hogy a  $dDAAM^{mat/zyg}$  embriókban már az axongenezis korai stádiumában axon növekedési defektusok fedezhetőek fel (fehér nyilak) a vad típussal összehasonlítva.

A fenti kísérleti eredmények együttesen azt sugallják, hogy a dDAAM fehérje elsődleges funkciója a *Drosophila*-ban valóban a nyúlványnövekedés szabályozásában, nem pedig az idegsejtsors meghatározásában van, valamint a *dDAAM* mutációk okozta idegrendszeri fenotípusok a *dDAAM* gén hiányához köthetőek, és nem sejthalál, vagy utólagos degenerációs folyamatok következményei.

### ***A dDAAM lokalizációja a növekedési kúpokban***

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a dDAAM hogyan lokalizálódik szubcelluláris szinten a KIR idegsejtjeiben, és jelen van-e a növekedési kúpok területén. A kérdés vizsgálatához 11. stádiumú, vad típusú embriókból készült idegsejtenyészetben  $\alpha$ -DAAM ellenanyaggal immunfestést végeztünk. Az láttuk, hogy a dDAAM fehérje mind a központi nyúlványban, mind a növekedési kúpok perifériás részén és a filopódiumokban, az aktív növekedési zónában megtalálható (Natalia Sánchez-Soriano személyes közlés) (19.ÁBRA D,E). Az idegsejt kultúrákon kapott eredményeink felvetették azt a lehetőséget, hogy a dDAAM funkciójára szükség lehet a növekedési kúpok filopódiumaiban a nemelágazó aktinkötegek kialakításában.



## 19.ÁBRA Kultúrában nevelt embrionális neuronokban a dDAAM szükséges a filopódiumok kialakulásához a növekedési kúpokban

(A–I) Primer idegsejt kultúrák vad típusú, *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>*, *Sca-Gal4;UAS-DADm-DAAM::EGFP* embriókból. Festések: aktin (A–C, I fehér; G, kék csatornák),  $\alpha$ -Ena (D, kék; F, fehér csatornák),  $\alpha$ -dDAAM (D, zöld; E, fehér csatornák),  $\alpha$ -HRP (D, kék csatorna), illetve  $\alpha$ -GFP (G, zöld; H, fehér csatornák). A vad típusúhoz (A) képest a *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* mutáns neuronokban (B) kevesebb és rövidebb filopódium képződik, míg a *Sca-Gal4;UAS-DADm-DAAM::EGFP* neuronokban (C) több filopódium alakul ki. (D–F) Az endogén dDAAM az axon nyúlványban és a filopódiumok mentén is megfigyelhető, ahol a filopódiumok csúcsán az Ena fehérjével részleges kolokalizációt mutat. (G–I) A DADm-Daam::EGFP hasonló lokalizációs mintát mutat, mint a vad típusú fehérje. (J–O) S2 sejtekben a DADm-DAAM::EGFP (J és M, kék; K és N, fehér csatornák) hosszú, axonszerű kitüremkedéseket indukál. A fehérje gyakran dúsul fel a kitüremkedések csúcsán (J és K, nyílak), ahol az Ena fehérjével (M, piros; O, fehér csatornák) részleges kolokalizációt mutat (M–O, nyílak). (P) A vad típusú, a *Sca-Gal4;UAS-DADm-DAAM::EGFP*, a *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* és a *dDAAM<sup>Ex68</sup>* neuron kultúrákban kapott filopódium számok és filopódium hosszok statisztikai összehasonlítása, számszerűsítése. A skálák mérete 5  $\mu$ m.

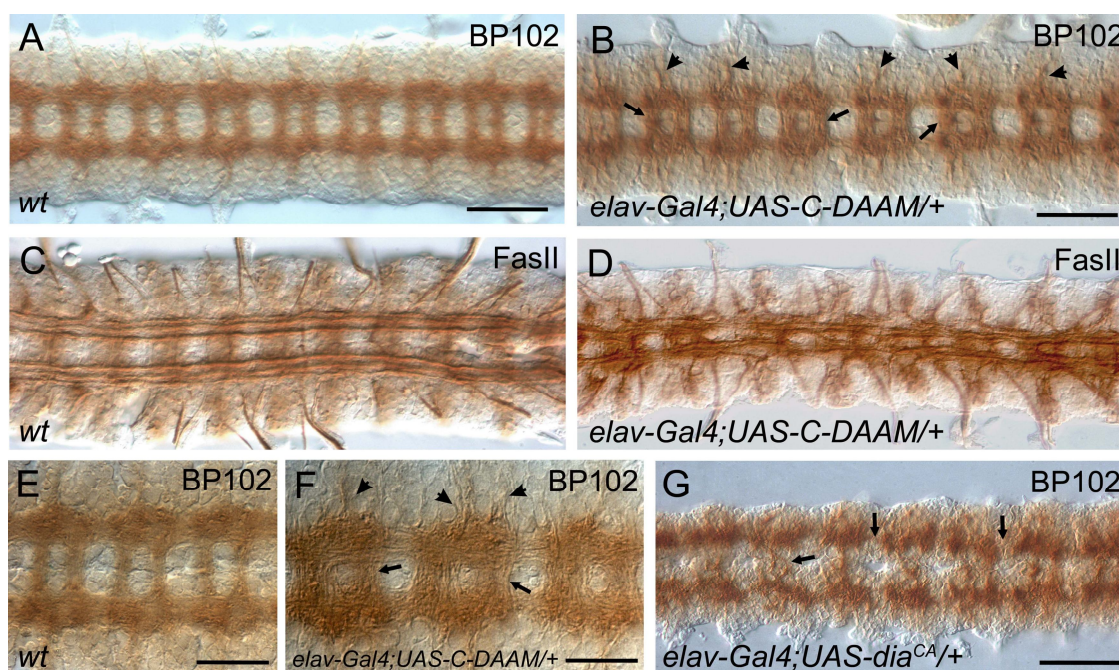
## ***A dDAAM funkciója a központi idegrendszer sejtjeiben a növekedési kúpok filopódiumainak kialakítása***

A teljes idegrendszert, vagy annak egy részét megjelölő ellenanyagok nem nyújtanak részletes információt arról, hogy a sejten belül milyen változások történnek *dDAAM* mutánsokban, amelyek végül a kifejlett embrionális idegrendszerekben fenotípusként jelenik meg. Ezért *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* mutáns embriókból idegsejt tenyészetet készítettünk, és megvizsgáltuk a kialakuló axonok és a növekedési kúpok szerkezetét vad típusú kontroll mellett.

6 órás *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* idegsejt tenyészetben 62%-kal csökkent a képződő filopódiumok száma a vad típushoz képest, a filopódiumok hossza pedig 26%-kal lett rövidebb. A központi nyúlvány hossza nem szenvedett változást (19.ÁBRA A,B,P). Következő lépésben megvizsgáltuk a *dDAAM<sup>Ex68</sup>* zigótikusan null embriókból készült idegrendszeri sejt kultúrát. A kultúrában három nap előzetes inkubációt követően vizsgáltuk az idegsejt nyúlványok képződését, lehetőséget adva így módon az anyai hatású géntermék mennyiségének csökkenésére. Az előző kísérlettel összhangban ezekben az idegsejtekben is számottevően (59%-kal) lecsökkent a filopódiumok száma a növekedési kúp területén, és a képződött filopódiumok a vad típushoz képest 16%-kal rövidebbek voltak (Natalia Sánchez-Soriano személyes közlés) (19.ÁBRA P). Ezek a kísérleti eredmények mindent egybevetve arra utalnak, hogy a *dDAAM* az embrionális központi idegrendszerben a növekedési kúpok filopódiumainak kialakításában játszik szerepet.

## A dDAAM funkciónyeréses mutánsok okozta KIR fenotípusok

Korábbi kísérleteinkből tudtuk, hogy a C-DAAM a tracheában a dDAAM konstitutívan aktív formájaként viselkedik. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a C-DAAM a KIR területén túltermeltetve milyen funkciónyeréses fenotípusokat okoz. Kísérleteinkben kontrollként ismét a Diaphanous DRF formin konstitutívan aktív formáját, a *dia<sup>CA</sup>*-t használtuk. A C-DAAM túltermelése nagy penetranciával (az *elav-Gal4/+;UAS-C-DAAM/+* genotípusú embriók 78%-ában) és állandó, erős expresszivitással eredményezett funkciónyeréses fenotípust a hasi idegkötegben (20.ÁBRA B,C,F).



### 20.ÁBRA A C-DAAM idegrendszeri túltermelése axon növekedési defektusokat okoz

A vad típussal (A,E) összehasonlítva a C-DAAM túltermelése hibás axon morfogenezishez vezet. Az *elav-Gal4/+;UAS-C-DAAM/+* genotípusú embriók (B,F) hasi idegkötegeiben az axonok kötegei sokkal kompaktabbak, megvastagodott keresztkötegeket (B,F nyilak), és ektopikus helyeken kilépő nyúlványokat láthatunk (B,F nyílhegyek). (D) A hosszanti lefutású kötegekben  $\alpha$ -FasII festésen a vad típussal (C) ellentétben fúziók láthatóak, az axonok rendellenes módon átlépnek a hasi idegköteg középvonalán, és laterális irányban ektopikus helyeken hagyják el a hasi idegköteget. (G) A *Dia<sup>CA</sup>* túltermelése ettől jelentősen eltérő fenotípusokat okoz, a longitudinális kötegekben és a keresztkötegekben is szakadások jelennek meg (nyilak). A skála mérete az A, B és G esetében 50  $\mu$ m; az E, F paneleken 25  $\mu$ m.

A C-DAAM fenotípus főbb komponensei a megvastagodott keresztkötegek, a hasi idegkötegből laterális irányba kilépő extra nyúlványok, és a laterális irányban erősen kompaktálódott szerkezet. A fenotípus magyarázata az lehet, hogy a C-DAAM az N-terminális domének hiányában szabályozatlan módon működik, valamint hibás sejten belüli lokalizációja miatt ektopikus helyeken is extra idegsejtnyúlványok képződését indíthatja el. Az *UAS-dia<sup>CA</sup>* idegrendszer specifikus túltermelése az C-DAAM okozta fenotípussal szemben eltérő komponenseket tartalmazó fenotípust eredményezett. A keresztkötegek jórészt hiányoztak vagy bennük a festődési minta meggyengült, ami axonhiányokra utal. Szakadásokat figyeltünk meg emellett minden szegment között az interszegmentális kötegek axonjaiban (20.ÁBRA, G). Ez arra utal, hogy az *UAS-C-DAAM* túltermelés okozta idegrendszeri fenotípusok valóban az aktivált dDAAM-hoz köthetőek és nem egy általános formin funkciót írnak le.

Végezetül arra voltunk kíváncsiak, hogy a konstitutívan aktív C-terminálison GFP-vel jelölt DADm-DAAM forma (mely az FH1 és FH2 domének felül a teljes N-terminális részt tartalmazza, és csak a DAD domén hiányzik belőle) jelenléte befolyásolja-e embrionális idegsejtkultúrában az idegsejtnyúlványok és a növekedési kúp szerkezetét, illetve lokalizálódik-e a növekedési kúpok területén a filopódiumok csúcsán. Az *UAS-DADm-DAAM*-ot kifejező idegsejtekben 73%-kal több filopódium képződött a növekedési kúpok területén változatlan központi nyúlványhossz mellett (Natalia Sánchez-Soriano személyes közlés) (20.ÁBRA, C,P). Elvégezve az immunfestést  $\alpha$ -GFP ellenanyaggal azt találtuk, hogy a DADm-DAAM::GFP jelen van a központi nyúlványban, a növekedési kúpok központi részén, és a periférián a filopódiumokban és azok csúcsán is (Natalia Sánchez-Soriano személyes közlés) (20.ÁBRA G,H,I).

Funkciónyeréses kísérleteink a funkcióvesztéses kísérletekkel összhangban tovább erősítik azt a munkahipotézist, miszerint a *dDAAM* gén funkciója hasi idegköteg sejtjeiben a növekedési kúpokban a filopódiumok kialakulásának szabályozása.

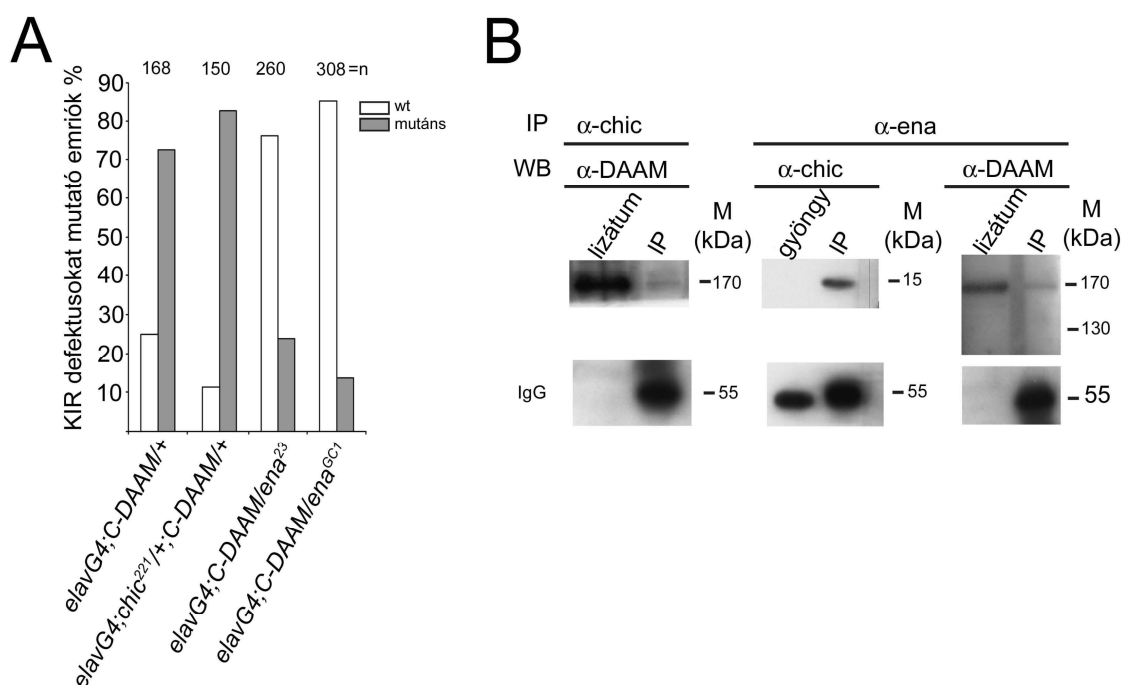
### ***A dDAAM együttműködik az Ena és Chic fehérjékkel az embrionális központi idegrendszerben***

Következő kérdésünk az volt, hogy melyek lehetnek azok a fehérjék/gének, melyekkel a *dDAAM* együttműködik a növekedési kúpok területén. A továbbiakban két olyan jelöltet mutatok be, melyekről bebizonyosodott, hogy a *dDAAM*-mal együttműködve fejthetik ki hatásukat, a növekedési kúpok csúcsi részén lokalizálódnak, és mutásaik befolyásolják a növekedési kúpok szerkezetét.

Az egyik ilyen jelölt a G-aktin kötő Profilin fehérje, mely a KIR-ben a nyúlvány-növekedés pozitív regulátora. Domináns genetikai interakciós kísérleteinkben a *profilin* (*chickadee*) génjének egy mutáns kópiája (*chic*<sup>221</sup>) *dDAAM*<sup>Ex68</sup> funkcióvesztéses háttéren nagyban erősítette a *dDAAM*<sup>Ex68</sup>-ban megfigyelt funkcióvesztéses fenotípusokat (Gombos Rita személyes közlés), az *elav-Gal4/+;UAS-C-DAAM/+* funkciónyeréses fenotípusára ugyanakkor nem volt hatással (21.ÁBRA A). A fenti eredmények azt sugallják, hogy egyrészt a Profilin fehérje a *dDAAM*-mal együttműködve befolyásolja az embrionális központi idegrendszer nyúlványainak kialakulását, másrészt a C-DAAM túltermelésen alapuló episztázis analízis eredménye szerint a *dDAAM* megfelelő aktivitásához (amennyiben a *dDAAM* forminhoz a Profilin közvetlenül kapcsolódik) a szükségesnél jóval több Profilin fehérje lehet jelen az idegrendszer sejtjeiben.

Kísérleteink arra utaltak, hogy a növekedési kúpokban a Profilin fehérje lehet felelős a *dDAAM*-hoz történő G-aktin szállításáért, ez pedig a két fehérje között közvetlen fizikai

Embrionális idegsejtkultúrában a Profilin és a dDAAM immunfestési mintázatában találtunk átfedő helyeket a növekedési kúpok perifériális részén. A DADm-DAAM::GFP-vel transzfektált S2 sejtek 75%-ában radiális irányban hosszú, több sejtátmérő hosszú nyúlványok jelentek meg, míg a csak GFP-t kifejező kontroll plazmid esetében ez az arány mindössze 8% volt (19.ÁBRA J-O).



**(A)** Az *ena*<sup>23</sup>, *ena*<sup>GCI</sup> és *chic*<sup>221</sup> mutációk egy kópiájának a C-DAAM túltermelésre gyakorolt hatása. A számszerűsítés alapja a C-DAAM túltermelésében tapasztalt KIR defektusok közül a keresztkötegek megvastagodása. Az ábrán az „n” a megvizsgált embriók számát jelenti. **(B)** Immunoprecipitációk (IP) DADm-DAAM::EGFP-vel transzfektált S2 sejtekből α-chic és α-ena ellenanyagok felhasználásával. A α-chic ellenanyag koprecipitálja az aktivált dDAAM-ot (bal panel, α-DAAM Western-blot (WB)). Az α-ena IP-ban mind az aktivált dDAAM, mind a Profilin kimutatható Western-blot analízissel (jobb panel, α-chic, és α-dDAAM WB-ok).



A DADm-DAAM::GFP-vel transzfektált S2 sejtek hosszú nyúlványainak csúcsi részeiben is megfigyeltük a két fehérje kolokalizációját. Ugyanezen S2 sejtek egy másik populációjából  $\alpha$ -Chic ellenanyaggal immunoprecipitációt végeztünk. A precipitátumban az  $\alpha$ -dDAAM ellenanyaggal elvégzett Western-blot analízis kimutatta, hogy az endogén Profilin fehérje együtt precipitálódik az aktivált dDAAM-mal, ami erősíti azt az elképzelést, hogy a két fehérje *in vivo* képes közvetlen fizikai kölcsönhatásba lépni egymással (21.ÁBRA B).

Másik jelöltünk az Enabled (Ena) fehérje volt, amely az Ena/VASP fehérje család tagja. A fentieknek megfelelő kísérleti elrendezésben először megvizsgáltuk különböző *ena* mutációk egy-egy kópiájának a hatását a *dDAAM* funkcióvesztéses és funkciónyeréses fenotípusaira. A *dDAAM*<sup>Ex68</sup> homozigóta funkcióvesztéses fenotípusát az *ena* mindkét általunk használt funkcióvesztéses mutáns allélje (*ena*<sup>02029</sup>, *ena*<sup>GC5</sup>) egy kópiában szignifikánsan erősítette (Gombos Rita személyes közlés). Ugyanakkor az *elav-Gal4/+;UAS-C-DAAM/+* túltermelés fenotípusát két másik funkcióvesztéses *ena* mutáció (*ena*<sup>23</sup>, *ena*<sup>GC1</sup>) egy kópiájának jelenléte erősen meggyengítette, szuppressálta (21.ÁBRA A), ami arra utal, hogy genetikai értelemben a gének hierarchiájában -melyek a nyúlványnövekedést szabályozzák- az *ena* a *dDAAM* alatt helyezkedik el.

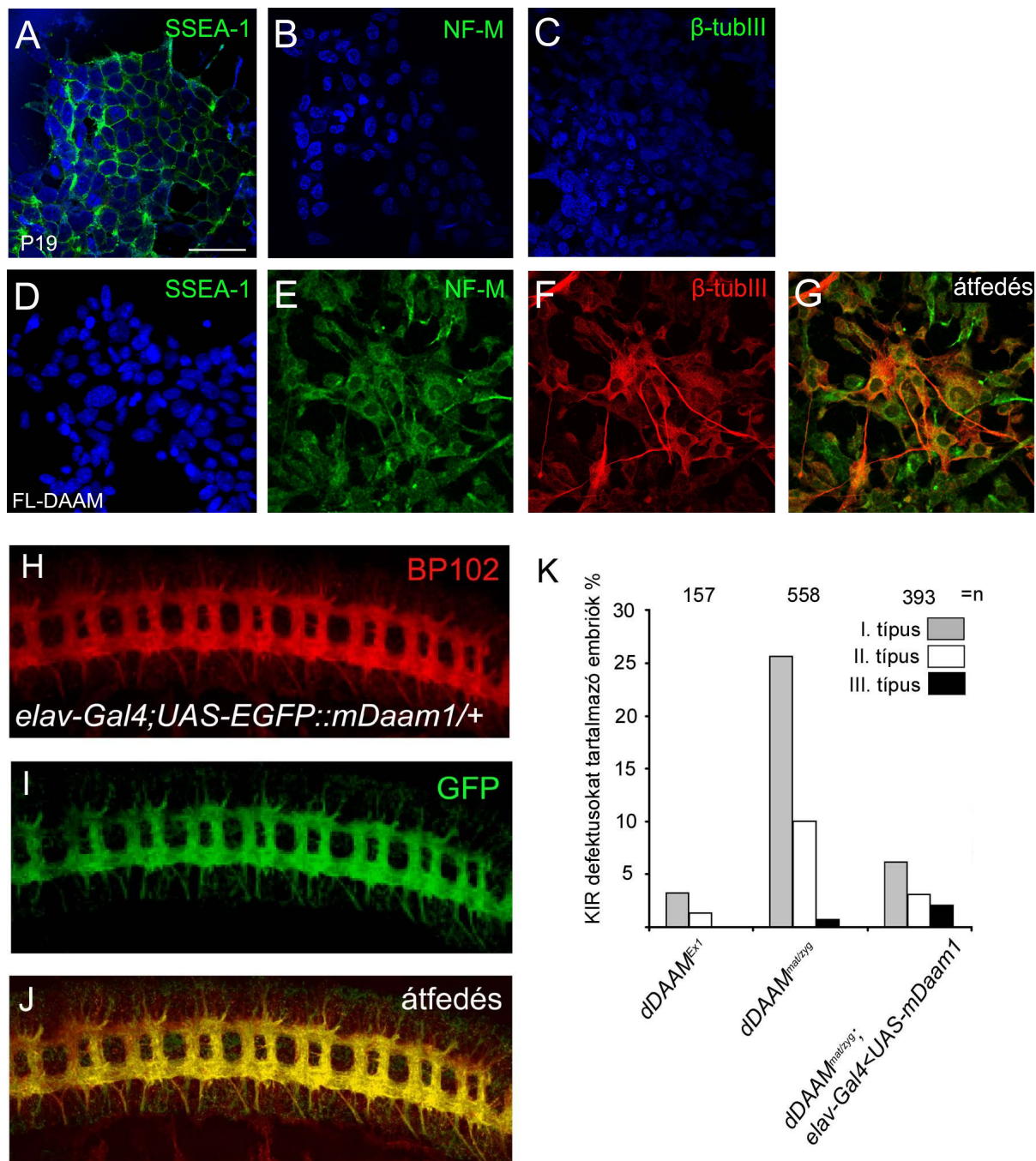
Vad típusú embrionális idegsejtkultúrában a dDAAM és Ena fehérjék részlegesen átfedő festődési mintát adtak a növekedési kúpok perifériális részén (19.ÁBRA D-F). Ugyancsak részleges átfedést figyeltünk meg a DADm-DAAM-mal transzfektált S2 sejtek hosszú nyúlványaiban az endogén Ena fehérje és a DADm-DAAM::GFP transzgenikus fehérje között a nyúlványok csúcsi részén (19.ÁBRA M-O). Az immunhisztokémiai festések mellett az ugyanebből a transzfekcióból származó párhuzamosan nevelt tenyészetből immunprecipitációt végeztünk  $\alpha$ -Ena ellenanyaggal. A precipitátumban Western-blot kísérletben mind a DADm-DAAM::GFP-t, mind a Profilin fehérjét sikerült kimutatnunk (21.ÁBRA B). Ezek a kísérleti eredmények együttesen arra utalnak, hogy a növekedési kúpok

filopódiumaiban a dDAAM-Profilin-Enabled modul megléte együttesen szükséges ahhoz, hogy a filopódiumok a megfelelő időben és számban alakuljanak ki a növekedési kúpok perifériáján.

### ***A DAAM gének idegrendszeri funkciója evolúciósan konzervált***

A gerinces *DAAM* gének expressziós mintázatának leírására több publikáció is született. A közleményekben leírták, hogy a *Xenopus*, a csirke és az egér *DAAM* gének egyik fő kifejeződési helye a fejlődő központi idegrendszer (Nakaya és mtsai. 2004; Kida és mtsai. 2004). Az Aspenström és munkatársai, valamint a Habas és munkatársai által használt *hDaam1* (humán) illetve *TDaam1* (patkány) cDNS-ek szintén agyból készült cDNS könyvtárból származtak (Habas és mtsai. 2001; Aspenström és mtsai. 2006). Ez arra utalt, hogy a *DAAM* fehérjék idegrendszeri funkciója evolúciósan konzervált lehet.

Az evolúciós konzerváltság vizsgálata érdekében két modellrendszert használtunk. Először arra voltunk kíváncsiak, hogy a *Drosophila* dDAAM fehérje jelenléte P19 egér teratokarcinóma sejtvonalban hatással van-e a P19 sejtek idegi irányú differenciációs képességére. A P19 sejtvonal pluripotens, a P19 sejtek retinsav (RA) koncentrációtól függő módon képesek endodermális, vagy neurogén irányba differenciálódni (McBurney és mtsai. 1982). Kísérleteinkben a teljes hosszúságú dDAAM-ot (FL-DAAM) kifejező stabil P19 sejtvonalat készítettünk, és megvizsgáltuk annak idegi irányú differenciációs képességét. A stabil dDAAM transzfektáns sejtekben zajló differenciációs változásokat ismert idegrendszeri differenciációs markerek mRNS szintjének mérésével, real-time PCR-rel (RT-PCR), illetve immunhisztokémiai festésekkel követtük nyomon, transzfektálatlan P19 és csak GFP-t expresszáló stabil P19 sejtvonal kontrollok mellett. Kísérleteinkben két, csak a neuronokra jellemző citoskeletonális markert használtunk.



## 22.ÁBRA A dDAAM kifejeztetése P19 sejtekben, és az egér mDaam1 kifejeztetése a *Drosophila* embrionális KIR-ben

(A–C) A nem differenciált P19 sejtek kifejezik az SSEA-1 antigént (A, zöld csatorna), de az NF-M és  $\beta$ tubIII idegrendszeri differenciálódási markereket nem (B,C zöld csatorna). (D–G) A *Drosophila* FL-DAAM transzgént tartalmazó P19 sejtekben szinte teljesen eltűnik az SSEA-1 expressziója (D, zöld csatorna), míg a sejtek egy alpopulációja kifejezi mind az NF-M, mind a  $\beta$ tubIII markereket (E és F, zöld és piros csatornák). Az NF-M és  $\beta$ tubIII pozitív sejteken hosszú, axonszerű kitüremkedések jelennek meg. A sejtmagokat az A–D paneleken DAPI festés (kék csatorna) jelöli. (H–J) Az *UAS-EGFP::mDaam1* transzgén kifejeződési mintázata a *Drosophila* embrionális KIR-ben. A transzgenikus fehérje (I és J, zöld csatorna) szoros kolokalizációt mutat a hasi idegköteg nyúlványaiban az  $\alpha$ -BP102 festéssel (H és J, piros csatorna). (K) Az *UAS-mDaam1::GFP* transzgén menekítő hatása a dDAAM<sup>mat/zyg</sup> fenotípusára. A skála mérete 50  $\mu$ m.

Az egyik a  $\beta$ -tubulinIII izoforma, melyről kimutatták, hogy specifikusan a növekvő axonokban halmozódik fel (Fanarraga és mtsai. 1999). Másik markerünk egy intermediér filamentum fehérje, az NF-M (neurofilament medium) volt, mely szintén csak az idegrendszer érett neuronjainak axonjaiban található meg (Paterno és mtsai. 1997). Immunfestéseinken a P19 sejtek differenciáltsági állapotát egy harmadik ellenanyaggal is monitoroztuk. Ez az ellenanyag az  $\alpha$ -SSEA1, mely egy olyan membránfehérjét jelöl meg, mely kizárólag a differenciálatlan sztem sejteken van jelen (Knowles és mtsai. 1978).

A dDAAM-ot stabilan kifejező P19 sejtekben a sejtek 21%-ánál RA indukció nélkül is neuritszerű kitüremkedéseket figyeltünk meg (22.ÁBRA D-G). Ezekről a sejtekről hiányzott az SSEA1 antigén, míg mind a  $\beta$ -tubulinIII, mind az NF-M megtalálható volt a nyúlványaikban. Az RT-PCR analízis megmutatta, hogy az NF-M mRNS szintje közel ötszöröse, míg a  $\beta$ -tubulinIII mRNS szintje közel háromszorosa a kontroll P19 sejtekben mért szintnek (Czibula Ágnes és Széchenyi Anita személyes közlés). Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a dDAAM jelenléte a P19 sejtekben RA indukció nélkül is spontán idegi irányú differenciációt indukál. A dDAAM-ot kifejező P19 sejteket  $10^{-7}$ M RA hozzáadásával idegi irányba differenciáltatva azt találtuk, hogy az NF-M mRNS szintje még inkább megemelkedik a kontrollként differenciáltatott nem transzfektált P19-hez képest, a  $\beta$ -tubulinIII mRNS szintjében nem volt jelentős különbség (Czibula Ágnes és Széchenyi Anita személyes közlés). Végezetül vizsgáltuk az endogén mDaam1 RNS szintjének változását az idegi irányú differenciáció során nemtranszfektált P19 sejtekben. Azt találtuk, hogy a P19 sejtek idegi irányú differenciációja során az mDaam1 mRNS-e hatszoros mennyiségben van jelen a differenciálatlan P19 kontrollhoz képest (Czibula Ágnes és Széchenyi Anita személyes közlés). Másodsorban kíváncsiak voltunk arra, hogy az egér *mDaam1* képes-e helyettesíteni a *Drosophila* dDAAM funkcióját az embrionális KIR-ben. A kérdés megválaszolásához elkészítettük az egér mDaam1 túltermelésére alkalmas *UAS-mDaam1::GFP* konstrukciót. A

transzgént idegrendszer specifikusan *elav-Gal4* forrás segítségével túltermeltettük vad típusú, és *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* háttereken. Az *mDaam1::GFP* transzgenikus fehérjét  $\alpha$ -GFP ellenanyaggal immunfestve azt láttuk, hogy az endogén dDAAM-mal megegyező lokalizációt mutat vad típusú háttéren a központi idegrendszer nyúlványaiban (22.ÁBRA H-J), és túltermelése nem okoz látható fenotípusos elváltozásokat a KIR-ben. *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* háttéren az *elav-Gal4 < UAS-mDaam1::GFP* túltermelés 70%-ban vad típusú idegrendszereket eredményezett, azaz szignifikánsan menekítette az KIR-beli axondefektusokat (22.ÁBRA K) (Gombos Rita személyes közlés). Összességében tehát kísérleteink azt mutatják, hogy a DAAM génnek idegrendszeri funkciója evolúciósan erősen konzervált.

## AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

### ***A dDAAM nem része a PCP jelátviteli útnak Drosophila-ban***

A forminok az aktin sejtváz fontos regulátorai közé tartoznak. A forminok sejten belüli funkcióját és működés módját azonban eddig elsősorban *in vitro* rendszerekben vizsgálták. Mi célul tűztük ki, hogy klasszikus genetikai és sejtbiológiai módszerekkel vizsgáljuk a DAAM formin alcsalád *Drosophila* tagjának *in vivo* funkcióját. Korábban a human és a *Xenopus* DAAM ortológokat kapcsolatba hozták az egyik nem-kanonikus Wnt jelátviteli rendszerrel, amelyet PCP jelátviteli útnak is nevezünk. Ezért a *Drosophila* DAAM gén funkcióvesztéses alléljainak izolálása után elsőként azt vizsgáltuk milyen szerepe van a *dDAAM*-nak a *Drosophila*-ban rendkívül jól jellemzett PCP jelátviteli útban. A *dDAAM* allélekkel elvégzett funkcióvesztéses analízis és episztázis kísérletek eredményei azonban azt jelzik, hogy a *dDAAM* nem része a PCP jelátviteli útnak *Drosophila*-ban, vagy pedig funkciója teljes mértékben redundáns. Az utóbbi hipotézis tesztelésére kiváló eszköz lehet a további kísérletekben az egyes *Drosophila* forminokra specifikus RNS-interferencia konstruktok egyedüli és/vagy együttes túltermelése a megfelelő szövetspecifikus meghajtó elemekkel.

### ***A rovarok légcsőrendszerének stabilitásához szükség van egy speciális magasabbrendű aktinstruktúrára***

A rovarok légcsőrendszerének szerkezete egy minden rovarfajban meglévő, konzervált felépítésű tubuláris hálózat. A rovarok légcsőrendszerének oly módon kellett fejlődnie, hogy a gázcsere biztosítása mellett megakadályozza az állatok dehidratációját és a

mikroorganizmusok behatolását is. Emellett a levegőtranszporthoz kellő rigiditás és szilárdság kell, de egyben az is szükséges, hogy a légcsőrendszer kellően flexibilis is legyen, hiszen a rovarokban a gázok szállítása passzívan, az állat mozgásával történik. Ezeknek a feladatoknak és igényeknek a biztosításában fontos szereppel bír a speciális szerkezettel rendelkező tracheakutikula. Feltételezhető volt, hogy ez a porszívócsőre emlékeztető mintázat hozzájárul ahhoz, hogy a légcsövek ellenálljanak a külső-belső nyomásváltozásoknak, és ugyanakkor kellő flexibilitást is biztosítsanak pl. a lárvák mozgása során. Ezt a hipotézist tökéletesen alátámasztotta a *dDAAM<sup>Ex68</sup>* mutánsok vizsgálata, hiszen a homozigóta mutánsokban a légcsőkutikula struktúrájában súlyos elváltozások keletkeztek, amelyek a trachearendszer egészét tekintve összenyomódásokban, szakadásokban nyilvánultak meg.

Kísérleteink alapján a vad típusú kutikulaminta kialakításához még a kitin alapú szerkezeti elemek szekréciója *előtt* szükség van egy apikálisan rendezett vastag nemelágazó F-aktin láncokból álló aktinköteg sorra, melynek szerepe az lehet, hogy direkt, vagy indirekt módon megjelöli a későbbi kutikulabordák helyét. Ezzel összhangban az általunk elsőként leírt és vizsgált apikális aktinkábel struktúra lefutási mintája tökéletesen megfeleltethető volt a kutikulabordák lefutási mintázatának. A vad típusú embrionális légcsőrendszerben a *dDAAM* szoros kolokalizációt mutatott az apikális aktinkötegekkel, amely arra engedett következtetni, hogy közvetlenül befolyásolhatja azok szerkezetét. Ezzel összhangban a tracheában megfigyelt apikális aktinkötegek száma, lefutása, és szerkezete *dDAAM* hiányában nem megfelelő, amely a kutikula szintjén súlyos defektusokban jelentkezik. *dDAAM<sup>Ex68</sup>* mutáns állatok embrionális és lárvális légcsőveiben a párhuzamos lefutású aktinkábelek helyett egy hálózatos, rendezetlen aktinminta alakult ki. A tracheakutikula aktin citoszkeleton függő kialakulására utal emellett az is, hogy a *dDAAM<sup>Ex68</sup>* mutánsban a randomizált aktinkábel szerkezetnek megfelelő kutikulaminta figyelhető meg.

A fenti megfigyelések és kísérleti eredmények összességében arra utalnak, hogy a dDAAM szerepe a *Drosophila* légcsőrendszerében az apikális aktinkábelek kialakítása és rendezése. Azt, hogy ez valóban így van, általános és szövetspecifikus menekítési kísérletekkel igazoltuk. A teljes hosszúságú dDAAM fehérje általános illetve tracheaspecifikus túltermelése szignifikánsan menekítette mind a letalitást, mind a trachekutikula funkcióvesztéses fenotípusát. Kísérleti adataink alapján az aktinköteg rendezés egy új formin funkció, ami nem a dDAAM nukleáló aktivitásához köthető. Egyik kollaborációs partnerünkönél jelenleg is folynak olyan *in vitro* kísérletek, melyek alapján elmondhatjuk, hogy a dDAAM valóban rendelkezik egy kötegrendező (bundling) aktivitással is, a fehérje FH1-FH2 csonkolt formája képes a jelölt aktinfilamentumokat egymás mellé rendezni (Nyitrai Miklós személyes közlés).

#### **A dDAAM a RhoA/Src/Tec29 modulon keresztül fejti ki aktivitását a tracheában**

További kísérleteinkben a dDAAM funkcióját szabályozó genetikai elemeket, fehérjéket kerestünk. Kimutattuk, hogy a dDAAM gént aktivitását a tracheában valószínűleg a RhoA kis GTP-áz szabályozza. A *RhoA*<sup>72F</sup> mutáció egy kópiájának jelenléte erősítette a dDAAM<sup>Ex1</sup> homozigóta lárvák moderált légcsőkutikula fenotípusát, de a *btl-Gal4/+;UAS-C-DAAM/+* funkciónyeréses fenotípusára nem volt hatással. Kísérleti eredményeink cáfolni látszanak a Habas és munkatársai által bemutatott modellt, amelyben a DAAM a Rho kis GTP-ázoktól magasabb hierarchikus lépcsőn helyezkedik el. Eredményeink alapján a *Drosophila* dDAAM aktivitása a DRF forminokhoz hasonló módon szabályozott, azaz a dDAAM formint a RhoA kis GTP-áz család tagjai aktiválhatják, és nem pedig fordítva. Fennáll persze az esélye annak is, hogy az hDaam1 aktivációjához valóban nem (vagy nem csak) a RhoA-GTP N-terminálison történő kötődése szükséges, más Rho családba tartozó kis



GTP-áz is aktiválhatja a hDaam1 fehérjét (bár Habas és munkatársai nem tudtak fizikai kölcsönhatást kimutatni a hDaam1 és a másik két kis GTP-áz, a Rac és a Cdc42 között, míg Aspenström és munkatársai a RhoA és a Cdc42 esetében is (Habas és mtsai. 2001; Aspenström és mtsai. 2006). Hasonló módon elképzelhető az is, hogy az inaktív hDaam1 a Dvl mellett más, a C-terminálison kötődő egyéb faktorok által kerülhet aktív állapotba. Egy alternatív hipotézis szerint az is lehetséges, hogy a kezdetben inaktív DAAM forminok RhoGEF fehérjékhez kapcsolódva direkt módon aktiválják a Rho kis GTP-ázokat és azután kerülnek aktív állapotba. Az aktivált forminok egy része ezt követően ismét kapcsolódhat RhoGEF-ekhez, és egy pozitív visszacsatolós mechanizmus révén elősegítheti a többi inaktív formin molekula aktiválódását.

Kísérleteink első ízben világítottak rá arra, hogy az *Src42A<sup>E1</sup>* és *Tec29<sup>5610</sup>* mutációk homozigóta formában tracheakutikula fenotípust okoznak az egyedfejlődés folyamán. Az *Src42A<sup>E1</sup>* és *Tec29<sup>5610</sup>* mutánsokban emellett az apikális aktinkábel struktúra is sérült. A *dDAAM<sup>Ex1</sup>*-gyel mindkét gén erős genetikai interakciót mutatott, annak moderált kutikulafentotípusát egy kópia *Src42A<sup>E1</sup>* illetve *Tec29<sup>5610</sup>* mutáció jelenléte nagymértékben felerősítette. Ugyanakkor a C-DAAM túltermelés fenotípusát mindkét gén funkcióvesztéses allélja egy kópiában szignifikánsan szuppresszálta. Megmutattuk tehát, hogy a tracheafejlődés során a dDAAM az Src, illetve Tec29 nem-receptor típusú tirozin kinázokkal együttműködve fejt ki hatását. Kísérleteink nem adnak világos képet arról, hogy a gének hierarchiájában a *dDAAM*, illetve az *Src42A/Tec29* gének milyen szinteken helyezkednek el egymáshoz képest, vagy éppen párhuzamos utakban hatnak-e. Nem tudjuk, hogy az *Src42A* és/vagy *Tec29* fehérje tényleges fizikai kölcsönhatásba lép-e a dDAAM-mal, vagy egy komplexben helyezkednek-e el. Az irodalomból azonban ismert, hogy a forminok képesek közvetlen fizikai kölcsönhatásba lépni az SH3 domén tartalmú fehérjékkel. Aspenström és munkatársai kimutatták, hogy a hDaam1 GST pull-down kísérletben valóban képes az Src és a Btk (*Tec29*

humán homológ) SH3 doménjének kötésére Leírták ezen felül azt is, hogy az hDaam1 koimmunoprecipitációs kísérletekben fizikailag is kölcsönhat az Src fehérjével, illetve kolokalizálódik vele a sejtkitüremkedésekben (Aspenström és mtsai. 2006). További adatok szintén arra utalnak, hogy az Src családba tartozó gének egyrészt jól eséllyel a forminoktól alacsonyabb szinten hatnak, másrészt a két fehérjecsald elemek fizikailag is egymás közelében kell lenniük. Például mind az egér mDia1 és mDia2 működése Src aktivitást igényel (Tominaga és mtsai. 2000), valamint a humán DIA2C is Src aktiváción keresztül szabályozza az endoszóma dinamikát (Gasman és mtsai. 2003), illetve, hogy a Limb deformity protein (mely szintén egy formin) egér fibroblaszt sejtek perinukleáris membránján kölcsönhatásba lép az Src-vel (Uetz és mtsai. 1996).

#### ***A dDAAM N-terminálisan csonkolt formája (C-DAAM) konstitutívan aktív a trachea sejteiben***

A C-DAAM túlermelés okozta kutikulafenotípusok nagyban emlékeztettek a dDAAM mutáns allélek okozta funkcióvesztéses fenotípusra a trachea azon sejteiben, ahol az endogén dDAAM fehérje is jelen van. Ez a megfigyelés felvetette annak a lehetőségét, hogy a C-DAAM képes heterodimerek kialakítására az endogén dDAAM-mal, és ez a komplex valószínűleg nem működőképes. Ily módon a C-DAAM túlermelés egy domináns negatív (antimorf) hatást fejt ki a trachea sejteiben. Kísérleteink azt igazolják, hogy ez a feltevés valóban helyes lehet, hiszen az FL-DAAM és a C-DAAM együttes túlermelése jóval enyhébb kutikulafenotípust eredményezett. A trachea kapcsolósejteiben (ahol endogén dDAAM fehérje nem mutatható ki) a C-DAAM túlermelése szintén súlyos defektusokhoz vezetett. Megváltozott a sejtek karakterisztikus pontszerű kutikulamintája, helyette egy hálózatos, aktinkötegekkel tarkított minta alakult ki. Ezzel párhuzamosan a kapcsolósejteiben

szignifikánsan megnőtt a filamentózus aktin mennyisége is. A kapcsolósejtekben kapott aktin és kutikulafenotípus arra utal, hogy a C-DAAM képes önmagával dimert alkotva funkcionálni, és neomorf hatásként átalakítani ezen sejtek aktin citoszkeletonját.

***A dDAAM megfelelő in vivo aktivitásához minimálisan a fehérje FH1 és FH2 doménjeire van szükség***

A DRF forminok változatos sejten belüli funkcióihoz rendkívül fontos a megfelelő sejten belüli lokalizáció. A közelmúltban több olyan tudományos közlemény is napvilágot látott, amelyek a DRF forminok különböző csonkolt formáinak sejten belüli lokalizációját vizsgálják. Az mDia1 és mDia2 emlős forminok esetében arra a következtetésre jutottak, hogy a sejten belüli lokalizációban az N-terminálison fellelhető CC és DD domének együttesen fontosak (Copeland és mtsai. 2007). A dDAAM esetében is felvetődött a kérdés, hogy melyek azok a fehérjerészek, melyek megszabják a pontos sejten belüli elhelyezkedést és elégségesek a fehérje aktivitásához *in vivo*. A probléma vizsgálatára létrehoztuk a dDAAM fehérje különböző N- (N-DAAM), illetve C-terminálist (FH2, FH1-FH2, C-DAAM) tartalmazó csonkolt formáit, és azok *in vivo* aktivitását a fejlődő tracheában teszteltük. Azt találtuk, hogy az FH2 domén *Drosophila*-ban *in vivo* önmagában nem aktív (bár *in vitro* képes az aktinfilamentumok képződését elősegíteni és elongációs aktivitása is van). Az FH1-FH2 doméneket tartalmazó csonkolt fehérje, illetve a C-DAAM már mutattak *in vivo* aktivitást, tracheaspecifikus túltermelésük funkciónyeréses kutikulafenotípust okozott. Ez arra utal, hogy a C-terminálison található katalitikus domének közül szükséges és elégséges feltétel az FH1-FH2 domének jelenléte a nukleációs és polimerizációs aktivitáshoz *in vivo*.

## ***A dDAAM szerepe nélkülözhetetlen a KIR nyúlványainak növekedésében***

A növekedési kúp aktin citoszkeleton átrendeződéseinek vizsgálata során számos olyan fehérjét azonosítottak, melyek közvetlenül vagy közvetve hatással bírnak erre a struktúrára a KIR-ben. Nem sikerült azonban olyan formint találni, mely egyrészt endogén módon expresszálódik a fejlődő KIR axonjaiban, illetve ezzel egyidejűleg az endogén fehérje hiányában axonnövekedési defektusok mutathatóak ki.

Munkánk során elsőként írtuk le, hogy a pán neurális kifejeződési mintát mutató *Drosophila* ortológ *dDAAM* formin hiánya axonnövekedési defektusokhoz vezet a fejlődő KIR-ben. Kísérleteinkben az RNS *in situ* hibridizációs adatokat genetikai adatokkal megtámogatva megmutattuk, hogy a *dDAAM* egy anyai hatású gén. *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* mutáns központi idegrendszerekben nagy arányban köteghiányokat illetve nyúlványrövidüléseket tapasztaltunk a hasi idegkötegben. Azt, hogy ez a fenotípus valóban a *dDAAM* hiányához köthető, menekítési kísérletekkel igazoltuk. További kontrollkísérletekkel kizártuk azt is, hogy az általunk megfigyelt idegrendszeri defektusok sejthalál, vagy nekrotikus folyamatok következményei. Az analízist kiterjesztettük *dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* mutáns, illetve *dDAAM<sup>Ex68</sup>* homozigóta mutáns embriókban szubcelluláris szintre. Az ezekből készült idegsejtkultúrákban szignifikánsan lecsökkent a filopódiumok száma a növekedési kúpokban, míg a központi nyúlvány hossza nem változott. Embrionális idegsejtkultúrán elvégzett kísérleteink alapján arra következtethetünk, hogy a *dDAAM* funkciója a KIR sejtjeiben a növekedési kúpok filopódiumszámának szabályozása.

Az aktivált C-DAAM forma túltermelése a hasi idegkötegben ezzel összhangban keresztköteg megvastagodáshoz és laterálisan ektopikus helyen kilépő nyúlványokhoz vezetett, a másik konstitutívan aktív forma, a DADm-DAAM pedig megemelte embrionális

idegsejtkultúrában a növekedési kúpok filopódiumszámát, de a központi nyúlvány hosszára nem volt hatással.

Tovább erősítette a fenti elképzelést az is, hogy mind az *ena*, mind a *chic* -melyek kimutathatóan evolúciósan konzervált szereppel bírnak a központi idegrendszer nyúlványnövekedésének szabályozásában- mindkét irányból domináns genetikai interakciót mutattak a *dDAAM<sup>Ex68</sup>*-cal (Gombos Rita személyes közlés), valamint, hogy egy kópia *ena* mutáció jelenléte szignifikánsan szuppresszálta a C-DAAM idegrendszerbeli túltermelésének fenotípusát. Az interakciós kísérleti eredményekkel összhangban vad típusú embrionális idegsejt kultúrán beláttuk, hogy a dDAAM fehérje jelen van a növekedési kúpok perifériás részén a filopódiumokban, ahol kolokalizációt mutat az Enabled fehérjével, illetve a Profilinnal. Ezzel egyidejűleg tranziensen transzfektált S2 sejtekből készült koimmunoprecipitációs és immunhisztokémiai tesztekben beláttuk azt is, hogy az aktivált dDAAM egy komplexben található mind az Enabled mind a Profilin fehérjével. Eredményeink azt mutatják, hogy a dDAAM fehérje funkciója a *Drosophila* KIR-ben a növekvő axonvégek növekedési kúpjaiban a filopódiumok nemelágazó aktinkötegeinek kialakítása az Enabled illetve Profilin fehérjékkel valószínűleg egy komplexet alkotva.

Arra vonatkozóan, hogy az Ena/Profilin/dDAAM modul milyen módon működik, jelenleg nincsenek információink. Nem tudjuk, hogy a növekedési kúpokban a dDAAM valóban polimerizálja-e az aktint, vagy a filamentumok növekedése az Ena aktinpolimerizációt elősegítő tulajdonságának segítségével valósul-e meg. Az irodalomban NIH 3T3 sejtekben kimutatták, hogy az endogén mDia1 és a VASP (emlős Ena homológ) fehérjék mindkét irányból koimmunoprecipitálhatóak egymással, és Rho függő módon, effektorként működnek. A kísérletekből az derült ki, hogy mind az mDia1, mind a VASP funkciójára egyidejűleg szükség van az aktinfilamentumok polimerizációjában, bár egyik immunprecipitációs kísérletben sem találtak aktint a precipitátumban (Grosse és mtsai. 2003).

Ezek alapján kérdéses lehet például az, hogy az Ena foszforilált (kötegrendező aktivitású) vagy defoszforilált (aktinpolimerizációt elősegítő) formája (Laurent és mtsai. 1999) van-e jelen a dDAAM/Ena/Chic komplexben, illetve az is, hogy az inaktív dDAAM vajon képes-e kapcsolódni az Ena-hoz. Lehetséges, hogy a dDAAM fehérje polimerizáló aktivitásához a Profilin biztosítja a G-aktin monomereket, a kész F-aktin filamentumokat pedig az Ena rendezi kötegekbe a növekedési kúpok filopódiumainak területén. Ez a hipotézis jól összeegyeztethető a Dytlostelium modellen kapott formin/VASP együttműködés eredményezte filopódiumnövekedés szabályozásával (Schirenbeck és mtsai. 2005).

Érdekes kérdés a dDAAM aktivációjának tanulmányozása is a KIR-ben. Kísérleteink alapján tudjuk, hogy a trachea sejtjeiben a dDAAM-ot valószínűleg a RhoA kis-GTP-áz aktiválhatja. Kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a hasi idegköteg esetében is igaz-e, vagy más kis-GTP-ázra van szükség az autoinhibíciós mechanizmus feloldásához. Kísérleteink alapján a valószínűleg repellens jelek továbbításában résztvevő *RhoA* nem mutat szignifikáns domináns genetikai interakciót a *dDAAM<sup>Ex68</sup>*-cal. Ugyanakkor a *Rac* kis-GTP-ázokra mutáns kromoszómák a *Rac* mutációk dóziséntől függően erősítik a *dDAAM<sup>Ex68</sup>* mutáns fenotípusát domináns genetikai interakciós kísérletekben, de az *elav-Gal4/+;UAS-C-DAAM/+* fenotípusra nincsenek hatással (Gombos Rita személyes közlés). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a KIR-ben a dDAAM aktivátorai a *Rac* kis GTP-ázok lehetnek. A dDAAM szabályozása kapcsolatban állhat a *Rac* fehérjén keresztül a Trio RhoGEF fehérjével is. A Trio fehérjéről kimutatták, hogy a KIR-ben a nyúlványnövekedést a *Rac* GTP-ázok aktiválásán keresztül befolyásolja (Bateman és mtsai. 2000; Steven és mtsai. 1998). Emellett a Trio kölcsönhatásba lép a Frazzled receptor citoplazmatikus doménjével (Forsthoefel és mtsai. 2005), ami arra utal, hogy a Netrinek közvetítette attraktáns jel a Trio-n keresztül is lefordíthat az aktin citoszkeleton szintjére, mégpedig dDAAM függő módon.

## ***A DAAM-ok idegrendszeri funkciója evolúciósan konzervált***

A *dDAAM* az első olyan formin, melynek *in vivo* funkcióját genetikai eszközökkel is sikerült bizonyítani a központi idegrendszer nyúlványainak kialakításában. Figyelemre méltó ugyanakkor az is, hogy a gerinces *DAAM* ortológok is erősen expresszálódnak a központi idegrendszerben. Ezért laboratóriumunkban vizsgáltuk az evolúciós konzerváltság kérdését is. Kísérleteink azt mutatták, hogy az egér *mDaam1* fehérje a központi idegrendszerben (70%-os hatékonysággal) helyettesíteni képes a *dDAAM*-ot. Ezen kívül, egy kollaborációs munka keretein belül azt találtuk, hogy a P19 egér pluripotens sejtvonal neuronális differenciálódásában részt vesznek az egér *Daam* gének is. Eredményeink alapján tehát elmondhatjuk, hogy a *DAAM* formin alcsalád *Drosophila* és egér tagjait vizsgálva azonosítottuk az axon növekedés egyik fontos faktorát, és funkcionális bizonyítékokat gyűjtöttünk arra nézve, hogy ez a *DAAM* alcsalád evolúcionálisan erősen konzervált funkciója lehet.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A sejtekben a sejtvázcitoszkeleton szerepe nélkülözhetetlen számos élettani folyamatban. A sejtek plaszticitása, a sejtosztódás, vagy az organelláris transzport mind mind intenzív citoszkeletális átrendeződéseket igényelnek. A sejtvázcitoszkeleton fő alkotóelemei a mikrotubulusok (makrofilamentumok), az intermedier filamentumok, és a mikrofilamentumok (aktin citoszkeleton). Az aktin citoszkeleton a sejtvázcitoszkeleton dinamikus alkalmazkodóképességét biztosítja a sejtek környezeti jelekre adott válaszaiban. Építőkövei a G-aktin monomerek, melyek helikális szerkezetű filamentumokba rendeződnek. Az új aktinfilamentumok képződése során először egy három aktinmonomerből álló ún. nukleációs mag jön létre, melyen azután mindkét irányban megindulhat az aktinmonomerek beépülése. A monomerek beépülése és leszakadása a filamentum két végén eltérő dinamikával zajlik, a beépülés elsődlegesen az ún. „barbed end”-en, a filamentumok gyorsan növekvő végén történik meg. Az aktin nukleáció energiaigényes folyamat, az élő sejtben rendkívül ritkán zajlik le spontán módon, a sejtben az új nukleációs magok kialakítását kifejezetten erre a feladatra specializálódott fehérjék végzik. Ilyen faktorok a formin fehérjecsalád tagjai, melyek nemágazó láncú aktinfilamentumok képződését segítik elő. A forminok multidomén fehérjék, melyek dimerként működnek. A dimerizáció az FH2 (formin homológia 2) doméneken keresztül történik meg, majd a nukleációt követően a formin dimer folyamatosan asszociált marad a filamentum gyorsan növekvő végével elősegítve az új aktinmonomerek beépülését, és ezzel egyidejűleg megakadályozva a szabad filamentumvéget lefedő fehérjék kapcsolódását. Az FH2 domén aminosav szekvenciájának evolúciós konzerváltsága alapján a metazoa forminokat hét nagy családba sorolták be: DIA, FMN, FHOD, delfilin, INF, FRL, és DAAM. Ezek közül a legintenzívebben tanulmányozott a DRF forminok csoportja, melybe a DIA, az FRL, és a DAAM forminok tartoznak. A DRF forminok alapállapotban egy



intramolekuláris autoinhibíciós mechanizmus révén inaktívak a sejtben. A gátlás a formin kitüntetett C-, és N-terminális doménjeinek összekapcsolódásával jön létre. A DRF forminok C-terminális részén három szerkezeti és funkcionális elemet különíthetünk el: a Profilin-kötő FH1 domént, a katalitikus FH2 domént, és a Diaphanous autoregulációs domént (DAD), mely az autoinhibíciós mechanizmus egyik résztvevője. Az N-terminálison található a Diaphanous inhibíciós domén (DID), mely a DAD doménnel kapcsolódva biztosítja a formin inaktív állapotának fenntartását, egy dimerizációs (DD), illetve egy coiled-coil (CC) domén, valamint egy GTP-áz kötő domén (GBD), melyhez aktivált, Rho családba tartozó kis GTP-ázok kapcsolódhatnak. A kis GTP-áz kötődésével az intramolekuláris autoinhibíció megszűnik, és a formin aktív állapotba kerül.

A DAAM formin alcsalád első tagját (Daam1) élesztő kettőshibrid kísérletben azonosították, amelyben a Dishevelled (Dsh/Dvl) Wnt jelátviteli fehérje PDZ doménjével kölcsönható partnereket kerestek. A kutatások egy új modell kidolgozásához vezettek, mely szerint a Daam1 RhoGEF fehérjéken keresztül Rho kis GTP-ázt aktiválhat a síkbeli sejt polaritást szabályozó PCP (planar cell polarity) jelátviteli útban, illetve az autoinhibíciós mechanizmus feloldásához elsődlegesen nem RhoGTP-re, hanem a C-terminálison kötődő Dvl fehérjére van szükség. Ugyanakkor más kísérleti eredmények szerint a Daam1 a konvencionális formin aktivációs modell szerint működik, és aktivált Rho kötődésével kerülhet először aktív állapotba.

A Daam1 működési modelljét jórészt sejttenyészeteken elvégzett, illetve *in vitro* biokémiai vizsgálatok alapján állították fel, de valódi funkcióvesztéses genetikai analízisből származó *in vivo* adatok a DAAM alcsalád tagjaira nem álltak rendelkezésre. Modellorganizmusunk, a *Drosophila melanogaster* kiválóan alkalmas részletes genetikai vizsgálatok elvégzésére. Genomja egyetlen DAAM gént tartalmaz, laborunkban ezért célul tűztük ki, hogy elvégezzük a *Drosophila* DAAM ortológ (*dDAAM*) genetikai és funkcionális

analízisét. Ennek érdekében első lépésben funkcióvesztéses *dDAAM* alléleket izoláltunk. Ezt követően megvizsgáltuk a *dDAAM* mRNS, és a *dDAAM* fehérje kifejeződési mintázatát az egyedfejlődés során. Mind az mRNS, mind a fehérje specifikus kifejeződési mintát mutatott a fejlődő embrionális trachearendszerben, az embrionális központi idegrendszerben (KIR), illetve az embrionális szívcső kuboidális myoblasztjaiban. Korai fejlődési stádiumban, transzkripcionálisan inaktív embriókban *dDAAM* mRNS felhalmozódást figyeltünk meg, ami arra utalt, hogy a *dDAAM* anyai hatású gén. További kísérleteink során arra kívántunk fényt deríteni, hogy milyen szerepe lehet a *dDAAM*-nak a PCP jelátviteli útban, a tracheakutikula mintájának kialakításában, és a KIR nyúlványaiban.

A *dDAAM* PCP funkcióját funkcióvesztéses környezetben, illetve episztázis analízissel vizsgáltuk. *dDAAM*<sup>Ex68</sup> (fehérje null allél) homozigóta mutáns szomatikus szárny-, és szemmozaikokban sem tapasztaltunk a PCP hibájára utaló fenotípust. Emellett a *dDAAM*<sup>Ex68</sup> egy kópiájának jelenléte nem befolyásolta a két fő PCP jelátviteli fehérje, a Fz és a Dsh túltermelésével kapott PCP fenotípusokat sem az összetett szemben, sem a szárnyon. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a *dDAAM* vagy egyáltalán nem része a PCP jelátviteli rendszernek *Drosophila*-ban, vagy a funkciója redundáns ebben a rendszerben.

A vad típusú tracheasejtek apikális (a légcső ürege felé eső) felszínükön speciális szerkezetű kutikulát választanak ki, melyen a légcső hossz tengelyére merőleges lefutású kutikulabordák (taenidial folds) találhatóak. *dDAAM* mutánsokban rendezetlen taenidiumokat figyeltünk meg. Kimutattuk, hogy a vad típusú tracheasejtekben egy speciális aktin sejtváza található, a sejtek apikális felszíne alatt vastag aktingyűrűk alakulnak ki az embrionális fejlődés folyamán még a kutikulaszekréció előtt. Az aktingyűrűk száma és lefutási mintája korrelál a kutikulabordák számával és lefutási mintázatával az embrionális és a lárvális légcső esetében is. *dDAAM* mutánsokban az aktinkábelek elvékonyodnak, és lefutásuk randomizálódik, a kutikulaminta pedig követi ezt az abnormális mintát. Vad típusban a

dDAAM fehérje szoros kolokalizációt mutat az aktinnal az embrionális tracheasejtek apikális felszínén. Eredményeink arra utalnak, hogy az aktinkábelek szerepe a légcsőrendszerben az, hogy meghatározzák a kutikulaszekréció helyét a fejlődő embrionális trachearendszerben, a dDAAM szerepe pedig az aktinkábelek létrehozása, és párhuzamos lefutású kötegekbe rendezése.

A forminokról számos tesztrendszerben kimutatták, hogy az FH1 és FH2 doméneket tartalmazó csonkolt formáik konstitutívan aktívak. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a dDAAM katalitikus aktivitásának kifejtéséhez az FH1 és FH2 domének jelenléte szükséges és elégséges feltétel *in vivo*.

Azért, hogy a *dDAAM* szabályozását megismerjük, és együttműködő partnereit azonosíthassuk a légcsőrendszer területén, genetikai interakciós kísérleteket végeztünk. Munkánk során olyan ismert aktinsejtváz szabályozó elemek mutánsait teszteltük, melyek kifejeződnek az embrionális légcsőrendszerben. Három erős kölcsönható partnert azonosítottunk, a *RhoA*, a *Tec29*, és az *Src42* géneket. Kimutattuk, hogy az *Src42* és a *Tec29* hiánya önmagában is légcsőkutikula, és aktinsejtváz hibákat eredményez a trachearendszerben. Episztázis analízisben a konstitutívan aktív dDAAM forma (C-DAAM) légcsőspecifikus túltermelése által okozott kutikulafenotípusra egy kópia *RhoA* hiánya nem volt hatással, míg az *Src42* és a *Tec29* egyszeres dózisa gyengítette a kutikuladefektusokat. Eredményeink arra utalnak, hogy a *dDAAM* a klasszikus formin szabályozási modell szerint működik, a *RhoA* alatt helyezkedik el a gének hierarchiájában, míg az *Src42* és a *Tec29* a *dDAAM*-tól lentebb, vagy vele párhuzamosan ható elemek.

Kísérleteink további iránya az volt, hogy megvizsgáljuk a dDAAM szerepét a KIR nyúlványainak kialakításában. A *dDAAM*<sup>Ex68</sup> homozigóta zigótikusan mutáns embriókban moderált KIR defektusokat figyeltünk meg. Mivel az anyai hatású vad típusú géntermék megtalálható a *dDAAM*<sup>Ex68</sup> zigótikusan mutáns embriókban, ezért a további vizsgálatokhoz

anyailag, és zigótikusan is gyengített transzheterozigóta mutáns embriókat ( $dDAAM^{mat/zyg}$ ) hoztunk létre. A  $dDAAM^{mat/zyg}$  embriókban súlyos nyúlványnövekedési defektusokat figyeltünk meg a KIR-ben. A növekedési hibák már korai stádiumokban is jelentkeztek, ugyanakkor a  $dDAAM$  géntermék erősen csökkent mennyisége az idegsejtek számát nem befolyásolta. Ezek az eredmények együttesen arra utaltak, hogy a  $dDAAM$  mutánsokban az idegsejt nyúlványok nem utólag degenerálódnak, vagy sejthiány miatt tűnnek el, hanem a  $dDAAM$  specifikus szereppel bír a KIR nyúlványnövekedésének szabályozásában.

Azért, hogy betekintést nyerhessünk a  $dDAAM$  funkciójába sejtes szinten, primer idegsejt kultúrákat készítettünk vad típusú,  $dDAAM^{mat/zyg}$  és  $dDAAM^{Ex68}$  embriókból. A vad típusú  $dDAAM$  fehérje a fő idegsejt nyúlványban és a növekedési kúpok filopódiumainak csúcsi részén is lokalizálódott. A mutáns idegsejtekben az axonok növekedése ugyan normális volt, azonban a növekedési kúpok területén a filopódiumok száma, és hossza is számottevően lecsökkent a vad típushoz képest. Funkcióvesztéses kísérleteink arra utalnak, hogy a  $dDAAM$  szabályozó szereppel bír a filopódiumok számát és hosszát illetően a növekedési kúpokban, és ezért látunk axonnövekedési defektusokat *in vivo* a teljes KIR-ben.

A konstitutívan aktív C-DAAM fehérje idegrendszer specifikus túltermelése súlyos faszcikulációs defektusokat okozott, és embrionális letalitáshoz vezetett. Az embriók nagy többségében megvastagodott keresztkötegeket, és ektopikus helyeken kilépő extra nyúlványokat láttunk. A  $dDAAM$  aktiváció hatását szubcelluláris szinten is vizsgáltuk, DADm-DAAM::EGFP-t (mely szintén egy konstitutívak aktív  $dDAAM$  forma) fejeztettünk ki S2 sejtekben és primer idegsejt kultúrában. A primer idegsejtek növekedési kúpjaiban az aktivált fehérje a vad típussal megegyező módon lokalizálódott, és 35%-os filopódiumszám növekedést indukált. A DADm-DAAM::EGFP-vel transzfektált S2 sejtek 73%-ában több sejtátmérő hosszúságú, axonszerű nyúlványok jelentek meg, az aktivált  $dDAAM$  fehérje a sejtmembrán mentén, a nyúlványokban, és a nyúlványok csúcsi részén dúsult fel. A nem-

idegsejt típusú S2 sejtekben megfigyelt karakterisztikus sejtalakváltozások, és az aktivált dDAAM túltermelése által okozott nyúlványnövekedési fenotípusok arra utalnak, hogy a dDAAM funkciója a funkcióvesztéses kísérletekkel összhangban a növekedési kúpok filopódiumszámának, és az idegsejtek morfológiájának szabályozása.

További kísérleteinkben a *dDAAM*-mal a KIR-ben együttműködő partnereket kerestünk. Azt találtuk, hogy az *ena* és a *chic* gének erős genetikai interakciót mutatnak a *dDAAM*-mal. Az Ena, a Chic, és a dDAAM fehérjék lokalizációja átfed a növekedési kúpok filopódiumainak csúcsi részén primer idegsejt kultúrában, és a DADm-DAAM::EGFP-vel transzfektált S2 sejtek hosszú nyúlványainak csúcsi részén is. Ezzel összhangban immunprecipitációs kísérletekben kimutattuk, hogy az aktivált dDAAM egy komplexben található mind az Ena-val, mind a Chic-kel *in vivo*.

Az irodalomban vizsgált gerinces DAAM forminok mindegyikéről ismert, hogy kifejeződnek a fejlődő központi idegrendszerben. Tudható továbbá, hogy az axonnövekedés szabályozó elemei széles körben konzerváltak az élővilágban. Munkánk során azt találtuk, hogy a *Drosophila* DAAM jelenléte P19 egér teratokarcinóma sejtekben neurit-szerű kitüremkedésekhez vezet, a sejtekben megnő az idegrendszeri irányú differenciációt jelző mRNS-ek szintje, az egér mDaam1 pedig részlegesen képes helyettesíteni a dDAAM funkcióját a *Drosophila* embrionális KIR-ben. Ezek az adatok együttesen arra utalnak, hogy a DAAM fehérjék szerepe az idegsejt nyúlványok növekedésének szabályozásában evolúciósan konzervált funkció lehet.

## SUMMARY

The cytoskeleton plays a fundamental role in many physiological processes, including organelle transport, cytokinesis, plasticity, and cell movements. Among the main structural elements (macrofilaments, intermediate filaments, and microfilaments/actin cytoskeleton) the actin cytoskeleton is a highly dynamic structure, new filaments born and die in every second, as our cells adopt different size and shape according to the environmental cues. Therefore the organization and the targeting of the new actin filaments has to be tightly regulated. Actin monomers self-assemble into helical filaments. However the initial “nucleation phase” (assembly of dimeric and trimeric complexes) is highly unfavourable and slow in the living cell, but, once overcome, filament elongation is much more rapid. Thus the cell needs nucleation factors which help to overcome the energetic barrier of spontaneous actin nucleation. At present, one of the best studied actin nucleators is the formin family of proteins. Formins are single polypeptide, multidomain proteins. All formins studied to date are dimeric, due to dimerization of their formin homology 2 (FH2) domain, which in addition is responsible for driving actin nucleation. After nucleation, the FH2 domain remains bound at the barbed end of the actin filament, and moves processively as it elongates, promoting elongation by preventing the access of capping proteins. The FH2 domain is the defining feature of the formin protein family. Phylogenetic analysis of the FH2 domain has led to classification of formin family proteins into phylogeny-based groups. Metazoan formins segregate into 7 groups: DIA, FMN, FHOD, delfilin, INF, FRL, and DAAM. The most extensively studied group to date is the Diaphanous related formins (DRFs), which act as direct effectors of Rho family GTPases. The DRFs include the metazoan DIA, DAAM, and FRL formins, and the yeast Bni1, Bnr1, and SepA. The domain architecture of DRF proteins is preserved and contains two parts: a C-terminal region, which is directly involved in actin

assembly, and an N-terminal regulatory region, which mediates an intramolecular interaction with the C terminus to maintain DRFs in an auto-inhibited state. The C-terminal half of DRFs contains three structural and functional elements: the profilin-binding FH1 domain, the actin-binding FH2 domain, and the Diaphanous Auto-regulatory Domain (DAD) motif. The N-terminal part includes a Diaphanous Inhibitory Domain (DID), which binds the C-terminal DAD motif, the dimerization domain (DD), and the GTPase-binding domain (GDB), which binds Rho-family GTPases in their activated (GTP bound) state, and this binding alleviates the intramolecular autoinhibitory interaction between the DID and the DAD domains.

The DAAM class of formins was originally discovered in a yeast two-hybrid screen for proteins interacting with the PDZ domain of the Wnt signaling protein Dishevelled. The results lead to a model in which Daam1 recruits Rho GEFs to activate Rho and effect cytoskeletal remodeling to polarize the cell. Recent studies have found that auto-inhibition is relieved by Dsh/Dvl interaction, rather than Rho GTPase binding, allowing Daam1 to induce Rho activation in the PCP (planar cell polarity) pathway. On the other hand, different studies have found that Rho can relieve the DID/DAD-mediated inhibition of Daam1 actin filament assembly, suggesting that Rho may indeed be upstream of Daam1.

As a first step to gain further insights into the function of this novel class of FH2 proteins, we generated loss-of-function alleles of the single *Drosophila* member of the DAAM family (*dDAAM*). In addition we examined the expression of *dDAAM* as well, and found that the mRNA and protein is expressed in the developing embryonic tracheal system, in the developing embryonic central nervous system (CNS), and in cardiac myoblasts. Also we found, that in early, transcriptionally inactive embryos *dDAAM* mRNA is highly enriched suggesting that *dDAAM* has a considerable maternal contribution. In our further experiments we examined the role of *dDAAM* in PCP establishment, trachea cuticle development, and neurite formation of CNS.

To test whether the *Drosophila* DAAM is involved in PCP signaling, we carried out a loss-of-function analysis of the gene, and in addition compared the effects of Fz and Dsh overexpression in the wing or eye in wild-type and *dDAAM*<sup>Ex68</sup> (protein null allele) heterozygous mutant backgrounds. No significant difference between the wild-type and the *dDAAM* mutant backgrounds was observed. Thus, the loss-of-function analysis and the epistasis data argue that the *Drosophila* DAAM ortholog is either not required for PCP signaling or plays a redundant role during PCP establishment.

Wild-type tracheal cells secrete a cuticle on their apical (luminal) surface, which is continuous with the epidermal cuticle, but easily distinguished by the presence of cuticle ridges called taenidial folds that project into the lumen. Tracheal tubes of *dDAAM* mutant larvae show disorganized pattern of taenidial folds. At the subcellular level, our analysis revealed that in wild-type tracheal cells apically localized actin is organized into parallel bundles running perpendicular to the axis of the tubes, and the number of actin rings and taenidial folds in a given tracheal region is equal to each other. Our analysis also revealed that the dDAAM protein shows strong colocalization with the apical actin rings. We found, that actin rings are not only present when cuticle secretion begins, but are also detected through the third larval instar stage. In contrast to the remarkable actin organization found in wild-type tracheal cells, in *DAAM*<sup>Ex68</sup> mutants this organization is completely abolished, actin cables formed are much shorter and thinner than in wild type.

Truncated formins consisting only of the C-terminal FH1 and FH2 domains behave as constitutively active forms in many contexts. Our data indicate that dDAAM activity minimally requires the FH1 and FH2 domains, the presence of these domains are necessary and sufficient for the *in vivo* catalytic activity of dDAAM protein.

To gain insights into the regulation of dDAAM and to identify potential partners that work together with dDAAM, we carried out a genetic interaction test with a panel of



cytoskeleton regulators known to be expressed in the *Drosophila* respiratory system. We identified *RhoA*, *Src42A* and *Tec29*, as strong genetic interactors. We have shown, that the very few hatching *Src42A* and *Tec29* mutant larvae exhibit an abnormal taenidial fold pattern similar to that of *dDAAM* mutant larvae. Epistasis analysis indicated that while *RhoA* did not modify the effect of C-DAAM (constitutively active dDAAM form) expression, *Src42A* and *Tec29* dominantly suppressed the respective cuticle defects.

Based on the *dDAAM* mRNA and protein expression data, our next set of experiments targeted the question, whether dDAAM has a role in the embryonic central nervous system. The *dDAAM*<sup>Ex68</sup> homozygous mutant embryos displayed only subtle defects in the neuropile. Because the maternal dDAAM product is present in the embryos, next we generated embryos (*dDAAM*<sup>mat/zyg</sup>) in which maternal and zygotic *dDAAM* functions are both impaired. The *dDAAM*<sup>mat/zyg</sup> mutant embryos showed enhanced CNS phenotypes, tests with neuron-specific markers did not reveal any obvious alterations in neuron numbers in *dDAAM*<sup>mat/zyg</sup> mutant CNSs, suggesting that the CNS phenotypes are caused by defects in neurite growth rather than aberrant lineage formation. Additionally, we proved, that axonal growth defects already occur at early stages, demonstrating that dDAAM has a specific role in axonal development.

To address the subcellular function of dDAAM, we generated primary neuronal cultures from *dDAAM*<sup>mat/zyg</sup> and *dDAAM*<sup>Ex68</sup> mutant embryos. While these neurons were able to develop axons of similar length as their wild-type counterparts, both the number and the length of filopodia were reduced in mutant neurons. Thus, these loss-of-function experiments show that dDAAM regulates filopodium formation in growth cones, which is likely to be the subcellular cause for the axonal growth phenotypes observed *in vivo*.

Expression of C-DAAM in the embryonic CNS resulted in severe fasciculation defects and embryonic lethality. The majority of embryos displayed a more prominent neuropile than observed in the wild type situation, especially commissures and nerve roots appeared thicker.

To test the effect of dDAAM activation at the subcellular level, we expressed DADm-DAAM::EGFP (expected to behave as a constitutively active form as well) in cultured primary neurons and S2 cells. In growth cones of cultured primary neurons, the activated protein exhibited a very similar localization pattern as the wild type protein, and induced a 35% increase in axonal filopodia number. In *Drosophila* S2 cells, the activated protein induced characteristic cell shape changes in ~73% of the transfected cells including of the formation of long neurite-like protrusions stiffened by actin and microtubules. The activated dDAAM protein is enriched at the cell cortex in these cells and also in the long protrusions including their distal tips. The formation of axon-like protrusions in the non-neuronal S2 cells suggests that dDAAM might be an important determinant of neuronal morphology.

In our further experiments we tested a set of candidate genes to investigate the regulatory context in which dDAAM operates within the CNS. We found that *chic* and *ena* show a strong dominant genetic interaction with *dDAAM*. In support of the genetic interactions, dDAAM tends to colocalize with Ena along filopodia in primary neurons, including their filopodial tip complexes. Similarly, Ena and Chic are highly enriched in the cellular protrusions induced by activated dDAAM in S2 cells, where both proteins show a colocalization with activated dDAAM. To verify that these proteins associate *in vivo*, coimmunoprecipitation experiments were carried out. When Ena or Profilin was immunoprecipitated from lysates of S2 cells transfected with DADm-DAAM::EGFP, some of this activated dDAAM was found to be associated with Ena and Profilin. Thus, taken it together with our genetic interaction and localization data, these results indicate that dDAAM operates in close association with Ena and Profilin *in vivo*.

Daam has been demonstrated to be a highly abundant formin in the developing nervous system of various vertebrate species, and axonal growth regulation appears to be an evolutionary highly conserved process regulated by a very similar set of molecules in each

species investigated. We have shown that dDAAM promotes the formation of neurite-like protrusions when expressed in mouse P19 cells, whereas murine Daam1 can functionally replace dDAAM in *Drosophila*. Significantly, although mutant analysis has not been reported for the vertebrate Daam orthologs, these data suggest that the regulation of actin assembly during axon growth is very likely to signify an evolutionary conserved DAAM function.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *Felhasznált Drosophila törzsek*

$w^{1118}$

*Ore-R*

$w, Df(1)AD11/FM7c$  (BL#1098)

$w, Df(1)AC7/FM7c$  (BL#1144)

$Tp(1;3)sta; sta^1:ss^{sta}/FM3$  (BL#844)

$y^1, l(1)EFd5/Dp(1;Y)Sz280$

$y^2/FM6, l(1)11^{11}$  (BL#6021)

$dDAAM^{Ex1}/dDAAM^{Ex1}$

$dDAAM^{Ex36}/FM7c, ftz-lacZ$

$dDAAM^{Ex65}/FM7c, ftz-lacZ$

$dDAAM^{Ex68}/FM7c, ftz-lacZ$

$dDAAM^{Ex202}/FM7c, ftz-lacZ$

$dDAAM^{Ex249}/FM7c, ftz-lacZ$

$dDAAM^{Ex68}/Y^{Dp(1;Y)Sz280}/C(1)DX$

$dDAAM^{Ex68}, arm-lacZ/Y^{Dp(1;Y)Sz280}/C(1)DX$

$RhoA^{72F}/CyO, ftz-lacZ$

$chic^{221}/CyO, ftz-lacZ$

$ena^{GC5}/TM3, ftz-lacZ$

$ena^{23}/TM3, ftz-lacZ$

$Src42A^{E1}/CyO, ftz-lacZ$

$Tec29^{5610}/CyO, ftz-lacZ$

$UAS-dia^{CA}$

*UAS-FH2/CyO*

*UAS-FH1-FH2*

*UAS-N-DAAM*

*UAS-C-DAAM/TM3,Kr-GFP*

*UAS-C-DAAM/TM3, ftz-lacZ*

*UAS-DADm-DAAM:EGFP*

*w;UAS-DAAM-RNSi T129M*

*UAS-EGFP::mDaam1*

*UAS-Aktin::EGFP/CyO*

*Sca-Gal4*

*btl-Gal4*

*btl-Gal4<UAS-EGFP*

*elav-Gal4 C-155*

*elav-Gal4;UAS-C-DAAM/TM3, ftz-lacZ*

*act-Gal4<UAS-FL-DAAM<sup>13.59</sup>/CyO,ftz-lacZ*

*elav-Gal4<UAS-FL-DAAM<sup>13.59</sup>/CyO,ftz-lacZ*

*btl-Gal4<UAS-FL-DAAM<sup>13.59</sup>/CyO,Act-GFP*

*tub-Gal4<UAS-FL-DAAM<sup>13.59</sup>/CyO,Act-GFP*

*arm-Gal4<UAS-FL-DAAM<sup>13.59</sup>/CyO,Act-GFP*

*elav-Gal4<UAS-EGFP::mDaam1/CyO,ftz-lacZ*

## ***Sejtkultúrák***

A *Drosophila* S2 sejteket Schneider táptalajban (Lonza) tartottuk fenn. A transzfekciók során az Effectne transzfekciós kitet használtuk (Quiagen), a sejteket a transzfekciót követően 24 óra múlva fixáltuk.

## ***Embriók preparálása***

A legyeket, szén és agar tartalmú táptalajon petéztettük 4 órán át. Az embriókat ezután a megfelelő kor eléréséig szobahőmérsékleten tartottuk. Kétféle fixálási eljárást alkalmaztunk annak függvényében, hogy a vizsgálat során az embrió mely struktúrájára voltunk kíváncsiak.

## ***Metanolos fixálás***

Az embriókat 50%-os Chlorox-ban dechorionizáltuk, majd n-heptán:PBS+ 4% formaldehid 1:1 arányú keverékében szobahőn 30 percig fixáltuk. Ezt követően a vizes fázis eltávolítása után a fixált embriókat n-heptán:metanol 1:1 arányú keverékében rázással devitellinizáltuk, majd az embriókat 1 ml PBS : metanol (1:1) keverékében rehidratáltuk, és PBS-T-vel (PBS, 0,1% Triton-X) 3-szor 10 percig mostuk. Az immunfestést megelőzően az embriókat PBS-BT-ben (PBS, 0,1% Triton-X, 0,2% BSA) blokkoltuk minimum 1 h-t szobahőn.

## ***„Lassú” fixálás***

Az aktin sejtváz vizsgálatára, csak az ezzel a módszerrel fixált embriók voltak használhatóak, mert a metanol az aktin sejtvázat a phalloidin-nel történő festésre

alkalmatlanná teszi. A dechorionizációs lépés megegyezett a metanolos fixálás során leírtakkal. Ezután az embriókat egy előre (legalább egy nappal hamarabb) elkészített, fixáló reagensbe tettük (37%-os formaldehiddel telített n-heptán). A fixálási lépés 40 percig tartott, majd az embriókat petricsészére helyeztük ki, és hagytuk, hogy a heptán elpárologjon. Ezután az embriókat PBS-sel fedtük le, és rovartű segítségével, mikroszkóp alatt megsértettük az embriót borító vitellin membránt. Az eljárás során a kézzel devitellinizált embriók kiúsztak a PBS-be. Az embriókat az összegyűjtést követően 3-szor 10 percig mossuk PBS-T-vel, majd minimum 1h-n át PBS-BT-vel blokkoltuk.

### ***Lárvák preparálása***

A lárvákat szilikonlemezen rovartűk segítségével rögzítettük, majd egy csepp PBS-ben szemsebészeti ollóval a ventrális oldalon felnyitottuk. A trachea kivételével minden belső szervet, illetve a zsírtestet is eltávolítottuk, majd a preparált tracheákat 2% paraformaldehid PBS-es oldatában fixáltuk 20 percig szobahőn. A fixálás után a preparátumot 3x10 percig PBS-T-vel mostuk, majd Eppendorf csőbe helyeztük, és PBS-BT-ben 1h-t szobahőn blokkoltuk.

### ***S2 és P19 sejtek fixálása***

A fedőlemezeken növesztett sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd PBS-sel mostuk őket. Ezt követően a fedőlemezeket 4% formaldehid PBS-es oldatában 30 percig fixáltuk szobahőn, majd a fixálást követően 3x10 percig PBS-sel mostuk őket. A mosás után a sejteket PBS-T-vel 3 percig permeabilizáltuk, majd ismét mostuk PBS-sel 3x10 percig. Az

utolsó mosási lépés után a permeabilizált sejteket PBS+5% FBS oldatában 1h-ig blokkoltuk szobahőn az immunfestés előtt.

### ***Immunhisztokémia***

A embriókat és a lárvális tracheapreparátumokat egy éjszakán keresztül festettük 4°C-on. Az elsődleges ellenanyagokat PBS-BT-ben hígítottuk ki a megfelelő koncentrációra. Az inkubálást követően a mintákat legalább 5-ször 20 percig PBS-T-vel mostuk, majd PBS-BT-vel kihígított fluoreszcens, vagy biotinilált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk 2-3 h-t szobahőmérsékleten. Ezt követően 5-ször 30 percig mostuk őket, majd glicerin:PBS (1:1) keveréket mértünk az rájuk. Ezt miután a minták az Eppendorf cső aljára süllyedtek, glicerin:PBS (4:1)-re cseréltük. Az ily módon előkészített embriókat és lárvális tracheákat tárgylemezekre helyeztük, és lefedtük.

A csapadék-képződéses festéseknél a másodlagos ellenanyagok inkubálást követő utolsó 30 perccel a mosás lejárta előtt előkészítettük a Vectastatin ABC reagenst. A 30 perc letelte után az embriókat 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk ABC reagensben. Az inkubációt követően az embriókat 5x10 percig PBS-T-vel mostuk, majd egy előre összemért DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagenst mértünk rájuk. A csapadékképződést mikroszkóp alatt ellenőriztük, majd a megfelelő csapadékdenzitás elérése után PBS-sel leállítottuk a folyamatot. Az embriókat PBS-T-vel mostuk, majd a fluoreszcens festési eljárásnál leírtak szerint kezeltük. Az embrionális KIR-eket glicerin:PBS 4:1 oldatában rovártuk segítségével boncoltuk ki mikroszkóp alatt.

Az S2 és P19 sejtek immunhisztokémiai festése abban tért el a fent leírtaktól, hogy a sejteket az elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal PBS+5% FBS-ben inkubáltuk 4 órán



keresztül szobahőn, illetve, hogy az egyes inkubációs lépések között a mosásokhoz PBS-t használtunk.

### ***Felhasznált elsődleges ellenanyagok, és hígításaik***

$\alpha$ -DAAM: 1:4000 (immunfestésen), 1:500 (Western-blotton)

$\alpha$ -BP102: 1:5 (DSHB)

$\alpha$ -FasII: 1:50 (DSHB)

anti- $\beta$ -galaktozidáz: 1:1000 (Promega)

egér-anti- $\beta$ -tubulinIII:1:1000 (Millipore)

nyúl-anti- $\beta$ -tubulinIII:1:1000 (SIGMA)

$\alpha$ -NF-M:1:10 (DSHB)

$\alpha$ -SSEA1:1:1 (DSHB)

$\alpha$ -ena:1:500 (DSHB)

$\alpha$ -chic:1:10 (immunfestésen), 1:1 (Western-blotton) (DSHB)

$\alpha$ -En:1:10 (DSHB)

$\alpha$ -Eve:1:1000 (M. Frasch jóvoltából)

$\alpha$ -DCAD2: 1:10 (DSHB)

$\alpha$ -m2A12: 1:5 (M. Krasnow jóvoltából)

$\alpha$ -EGFP: 1:1000 (Invitrogen)

### ***Felhasznált másodlagos ellenanyagok, és egyéb reagensek***

Rhodamin-Phalloidin: 1:100 (Invitrogen)

Al488-Phalloidin: 1:100 (Invitrogen)

Al647-Phalloidin: 1:100 (Invitrogen)

DAPI (100µg/ml): 1:500

Egérben termelt ellenanyagra specifikus:

α-egér-biotinilált: 1:500 (Vector Laboratories)

α-egér-biotinilált IgM: 1:300 (Vector Laboratories)

α-egér-Al-488: 1:600 (Invitrogen)

α-egér-FITC IgM: 1:100 (SIGMA)

α-egér-Al-546: 1:600 (Invitrogen)

α-egér-Al-633: 1:600 (Invitrogen)

α-egér-HRP-konjugált: 1:5000 (DAKO)

Nyúlban termelt ellenanyagra specifikus

α-nyúl-biotinilált: 1:500 (Vector Laboratories)

α-nyúl-Al-488: 1:600 (Invitrogen)

α-nyúl-Al-546: 1:600 (Invitrogen)

α-nyúl-Al-633: 1:600 (Invitrogen)

α-nyúl-HRP-konjugált (SIGMA): 1:600

Patkányban termelt ellenanyagra specifikus

α-patkány-Al-488, felhasznált hígítás: 1:600

### ***RNS in situ hibridizáció***

Az RE67944 EST klónt tartalmazó pFLC-I plazmidot *in vitro* transzkripcióhoz EcoRI (Fermentas) restrikciós enzimmel emésztettük, QUIAGEN Gel Extraction Kittel tisztítottuk, majd ROCHE DNA Labelling Kit felhasználásával a *dDAAM* mRNS-re specifikus próbát készítettünk. A hibridizációhoz az embriókat 2 órás időablakokban fixáltuk (metanolos fixálás), methanol:PBS hígítási sorozatban (methanol: PBS 9:1, 7:3, 5:5, 3:7 lépéseken keresztül) rehidratáltuk, 7,5% formaldehid PBS-es oldatában 20 percig szobahőn posztfixáltuk, majd 3x2 percig PBS-T-vel mostuk. Az embriókat ezt követően PBS-T+50µg/ml ProteinázK-val 4 percig permeabilizáltuk, majd az emésztést 2mg/ml glycin oldatával leállítottuk. A permeabilizált embriókat 5x20 percig PBS-T-ben, majd PBS-T:hibridizációs puffer (5ml formamid, 2,5ml 20x SSC, 0,1 ml carrier DNS, 100 µl 10mg/ml tRNS, 5µl heparin, 10µl Tween-20, 2,3ml H<sub>2</sub>O) 1:1 arányú keverékével mostuk. Ezek után hibridizációs pufferben egy éjszakán át 48 °C-on prehibridizáltuk, majd a hibridizációs puffert az elkészített próbával kiegészítve további 24h-n át hibridizáltunk. A hibridizációs lépést követően az embriókat 5x15 percig PBS-T-vel mostuk, majd 1:10000 α-DIG (ROCHE) ellenanyaggal festettük.

### ***Western-blot***

A kísérletek során 20-20 L2 stádiumban lévő lárvát homogenizáltunk 80 µl lízis pufferben, majd a homogenizátumot jégen inkubáltuk 1h-ig. Ezt követően a homogenizátumokat 5 percig 4°C 14000rpm fordulattal centrifugáltuk, és a felülúszót óvatosan egy új Eppendorf csőbe pipettáztuk. A felülúszókhöz 5x töménységű Laemmli puffert adtunk, majd 10 percig forraltuk őket. A forralás után a mintákat 5 percig 14000rpm-en

centrifugáltuk, majd azok 1/5 részét denaturáló SDS gélen megfuttattuk. Az elválasztott fehérjéket Millipore nejlon membránra blottoltuk. A blottolási lépést követően a membránokat 5% sovány tejport tartalmazó TBST-ben blokkoltuk 1h-ig szobahőn, majd egy éjszakán át inkubáltuk őket a megfelelő elsődleges ellenanyagokkal. Ezt követően a membránokat TBST-ben 3x20 percig mostuk, majd a megfelelő másodlagos ellenanyagokkal kiegészített 5% sovány tejpor TBST-s oldatában 1 h-t szobahőn inkubáltuk. Ezek után a membránokat 3x20 percig TBST-ben mostuk, majd Millipore Immobilon kemilumineszcens detekciós reagenssel előhívtuk.

### ***Immunprecipitáció***

Az immunoprecipitáció során  $6 \times 10^6$  pAWM-DADm-DAAM::EGFP-vel tranziensen transzfektált S2 sejtet tártunk fel, 1 óráig inkubálva a sejteket 4°C-on lízis pufferben (0,1% SDS, 0,2% NaDoc, 0,5% NP-40, 150mM NaCl, 50mM TrisHCl, pH=8.0). A lizátumokat azután az aspecifikus kötődések csökkentésének érdekében 100-100µl IgG mentes ProteinA-Sepharose gyöngyökkel inkubáltuk (CL4B, Pharmacia) 1 órán keresztül 4°C-on. A kimerítést követően az IgG mentes gyöngyöket lízis pufferrel mostuk és félretettük, a továbbiakban gyöngy kontrollként, míg a lizátum 1/10 részét Western-blot kontrollként használtuk (a gélekre a Western-blot kontrollok és a gyöngy kontrollok 1/10 részét vittük fel).

A kimerítési lépés alatt 50-50µl ProteinA Sepharose gyöngyöt a precipitációkhoz használni kívánt elsődleges ellenanyagokkal lízis pufferben telítettünk (az  $\alpha$ -ena esetében 250µl ellenanyag, míg az  $\alpha$ -chic esetében 500µl ellenanyag került felhasználásra 1ml végtérfigatban). Az ily módon elkészített prekomplexeket rövid ideig (3x5percig) lízis pufferrel mostuk, majd az ellenanyagokkal telített gyöngyök felét félretettük, ez a továbbiakban IgG kontrollként szolgált.

A kimerített lizátumokat a maradék (25-25 $\mu$ l) prekomplexekkel egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, majd a felülúszó eltávolítása után a gyöngyöket 3x20 percig lízis pufferrel mostuk. A kötődött fehérjéket Laemmli pufferben eluáltuk 56°C-on 1h-ig, majd forralással 10 percig. Rövid centrifugálást követően a precipitátumot Pasteur pipettából készült kapillárisal óvatosan leszívtuk, a továbbiakban ezt használtuk a Western-blot analízisek során (a gélekre a precipitátumok 2/5 részét vittük fel).

## FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK

|       |                                                   |
|-------|---------------------------------------------------|
| Arp   | actin-related protein                             |
| Bni1  | bud neck involved                                 |
| Btk   | Bruton's tyrosine kinase                          |
| Btl   | breathless                                        |
| CC    | coiled-coil domén                                 |
| DAAM  | dishevelled associated activator of morphogenesis |
| DAD   | diaphanous autoregulatory domain                  |
| DD    | dimerizációs domén                                |
| dDAAM | <i>Drosophila</i> DAAM                            |
| DID   | diaphanous inhibitory domain                      |
| DRF   | diaphanous related formin                         |
| FAB   | F-actin binding                                   |
| FH1   | formin homology 1                                 |
| FH2   | formin homology 2                                 |
| GBD   | GTPase-binding domain                             |
| GFP   | zöld fluoreszcens fehérje                         |
| IF    | intermedier filamentum                            |
| KIR   | embrionális központi idegrendszer                 |
| NF    | neurofilamentum                                   |
| NF-M  | neurofilament medium                              |
| PBS   | phosphate buffered saline                         |
| PCP   | planar cell polarity                              |
| RA    | retinsav                                          |
| Scar  | suppressor of cAMP receptor                       |
| WASP  | Wiscott-Aldrich Syndrome Protein                  |
| WH2   | WASP homology 2                                   |

## IRODALMOMJEGYZÉK

- Affolter, M. és Caussinus, E., 2008. Tracheal branching morphogenesis in *Drosophila*: new insights into cell behaviour and organ architecture. *Development*, 135(12), 2055-2064.
- Agnew, B.J., Minamide, L.S. és Bamburg, J.R., 1995. Reactivation of Phosphorylated Actin Depolymerizing Factor and Identification of the Regulatory Site. *J. Biol. Chem.*, 270(29), 17582-17587.
- Ahuja, R. és mtsai., 2007. Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, 131(2), 337-350.
- Alberts, A.S., 2001. Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem*, 276(4), 2824-2830.
- Applewhite, D.A. és mtsai., 2007. Ena/VASP Proteins Have an Anti-Capping Independent Function in Filopodia Formation. *Mol. Biol. Cell*, 18(7), 2579-2591.
- Arakawa, Y. és mtsai., 2003. Control of axon elongation via an SDF-1{alpha}/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J. Cell Biol.*, 161(2), 381-391.
- Aspenström, P., Richnau, N. és Johansson, A., 2006. The diaphanous-related formin DAAM1 collaborates with the Rho GTPases RhoA and Cdc42, CIP4 and Src in regulating cell morphogenesis and actin dynamics. *Exp Cell Res*, 312(12), 2180-2194.
- Bachmann, C. és mtsai., 1999. The EVH2 Domain of the Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Mediates Tetramerization, F-actin Binding, and Actin Bundle Formation. *J. Biol. Chem.*, 274(33), 23549-23557.
- Bateman, J., Shu, H. és Van Vactor, D., 2000. The guanine nucleotide exchange factor trio mediates axonal development in the *Drosophila* embryo. *Neuron*, 26(1), 93-106.
- Bentley, D. és Toroian-Raymond, A., 1986. Disoriented pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. *Nature*, 323(6090), 712-715.
- Block, J. és mtsai., 2008. Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *J Microsc*, 231(3), 506-517.
- Bosch, M. és mtsai., 2007. Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin. *Mol Cell*, 28(4), 555-568.
- Boutros, M. és mtsai., 1998. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell*, 94(1), 109-118.
- Buttery, S.M., Yoshida, S. és Pellman, D., 2007. Yeast Formins Bni1 and Bnr1 Utilize Different Modes of Cortical Interaction during the Assembly of Actin Cables. *Mol. Biol. Cell*, 18(5), 1826-1838.

- Cant, K. és mtsai., 1994. *Drosophila* singed, a fascin homolog, is required for actin bundle formation during oogenesis and bristle extension. *The Journal of Cell Biology*, 125(2), 369-80.
- Carroll, E.A. és mtsai., 2003. Cordon-bleu is a conserved gene involved in neural tube formation. *Dev Biol*, 262(1), 16-31.
- Chan, D.C., Bedford, M.T. és Leder, P., 1996. Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *The EMBO Journal*, 15(5), 1045-54.
- Chang, F., Drubin, D. és Nurse, P., 1997. cdc12p, a Protein Required for Cytokinesis in Fission Yeast, Is a Component of the Cell Division Ring and Interacts with Profilin. *J. Cell Biol.*, 137(1), 169-182.
- Chien, C.B. és mtsai., 1993. Navigational errors made by growth cones without filopodia in the embryonic *Xenopus* brain. *Neuron*, 11(2), 237-51.
- Copeland, S.J. és mtsai., 2007. The diaphanous inhibitory domain/diaphanous autoregulatory domain interaction is able to mediate heterodimerization between mDia1 and mDia2. *J Biol Chem*, 282(41), 30120-30130.
- Dent, E.W. és mtsai., 2007. Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nature Cell Biology*, 9(12), 1347-59.
- DeRosier, D.J. és Edds, K.T., 1980. Evidence for fascin cross-links between the actin filaments in coelomocyte filopodia. *Experimental Cell Research*, 126(2), 490-4.
- Dickson, B.J., 2001. Rho GTPases in growth cone guidance. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(1), 103-10.
- Eisenmann, K.M. és mtsai., 2007. T cell responses in mammalian diaphanous-related formin mDia1 knock-out mice. *J Biol Chem*, 282(34), 25152-25158.
- Evangelista, M. és mtsai., 1997. Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*, 276(5309), 118-122.
- Evangelista, M. és mtsai., 2002. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol*, 4(3), 260-269.
- Evangelista, M., Zigmond, S. és Boone, C., 2003. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci*, 116(Pt 13), 2603-2611.
- Fanarraga, M.L., Avila, J. és Zabala, J.C., 1999. Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. *The European Journal of Neuroscience*, 11(2), 517-27.



- Forscher, P. és Smith, S.J., 1988. Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *The Journal of Cell Biology*, 107(4), 1505-16.
- Forsthoefel, D.J. és mtsai., 2005. The Abelson tyrosine kinase, the Trio GEF and Enabled interact with the Netrin receptor Frazzled in *Drosophila*. *Development*, 132(8), 1983-1994.
- Gasman, S., Kalaidzidis, Y. és Zerial, M., 2003. RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol*, 5(3), 195-204.
- Genova, J.L. és mtsai., 2000. Functional Analysis of Cdc42 in Actin Filament Assembly, Epithelial Morphogenesis, and Cell Signaling during *Drosophila* Development. *Developmental Biology*, 221(1), 181-194.
- Golic, K.G. és Lindquist, S., 1989. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell*, 59(3), 499-509.
- Goode, B.L. és Eck, M.J., 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*, 76, 593-627.
- Grosse, R. és mtsai., 2003. A role for VASP in RhoA-Diaphanous signalling to actin dynamics and SRF activity. *The EMBO Journal*, 22(12), 3050-61.
- Habas, R., Kato, Y. és He, X., 2001. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell*, 107(7), 843-854.
- Hakeda-Suzuki, S. és mtsai., 2002. Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature*, 416(6879), 438-42.
- Higashi, T. és mtsai., 2008. Biochemical Characterization of the Rho GTPase-regulated Actin Assembly by Diaphanous-related Formins, mDia1 and Daam1, in Platelets. *J. Biol. Chem.*, 283(13), 8746-8755.
- Higgs, H.N. és Peterson, K.J., 2005. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol Biol Cell*, 16(1), 1-13.
- Hudson, A.M. és Cooley, L., 2002. A subset of dynamic actin rearrangements in *Drosophila* requires the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, 156(4), 677-687.
- Hufner, K. és mtsai., 2001. The Verprolin-like Central (VC) Region of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Induces Arp2/3 Complex-dependent Actin Nucleation. *J. Biol. Chem.*, 276(38), 35761-35767.
- Imamura, H. és mtsai., 1997. Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 16(10), 2745-2755.

- Insall, R. és mtsai., 2001. Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton*, 50(3), 115-128.
- Iwasa, J.H. és Mullins, R.D., 2007. Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr Biol*, 17(5), 395-406.
- Kamei, T. és mtsai., 1998. Interaction of Bnr1p with a novel Src homology 3 domain-containing Hof1p. Implication in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 273(43), 28341-28345.
- Kida, Y., Shiraishi, T. és Ogura, T., 2004. Identification of chick and mouse Daam1 and Daam2 genes and their expression patterns in the central nervous system. *Developmental Brain Research*, 153(1), 143-150.
- Knowles, B.B., Aden, D.P. és Solter, D., 1978. Monoclonal antibody detecting a stage-specific embryonic antigen (SSEA-1) on preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 81, 51-3.
- Kohno, H. és mtsai., 1996. Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 15(22), 6060-6068.
- Korobova, F. és Svitkina, T., 2008. Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Mol Biol Cell*, 19(4), 1561-1574.
- Krebs, A. és mtsai., 2001. Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 114(20), 3663-3672.
- Krueger, N.X. és mtsai., 1996. The transmembrane tyrosine phosphatase DLAR controls motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell*, 84(4), 611-22.
- Kruger, R.P., Aurandt, J. és Guan, K., 2005. Semaphorins command cells to move. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(10), 789-800.
- Kwiatkowski, A.V. és mtsai., 2007. Ena/VASP Is Required for Neuritogenesis in the Developing Cortex. *Neuron*, 56(3), 441-455.
- Lammers, M. és mtsai., 2005. The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho\*GTP. *EMBO J*, 24(23), 4176-4187.
- Laurent, V. és mtsai., 1999. Role of Proteins of the Ena/VASP Family in Actin-based Motility of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.*, 144(6), 1245-1258.
- Lebrand, C. és mtsai., 2004. Critical Role of Ena/VASP Proteins for Filopodia Formation in Neurons and in Function Downstream of Netrin-1. *Neuron*, 42(1), 37-49.
- Lee, L. és mtsai., 1999. Control of mitotic spindle position by the *Saccharomyces cerevisiae* formin Bni1p. *J Cell Biol*, 144(5), 947-961.

- Lee, T. és mtsai., 2000. Essential Roles of Drosophila RhoA in the Regulation of Neuroblast Proliferation and Dendritic but Not Axonal Morphogenesis. *Neuron*, 25(2), 307-316.
- Li, F. és Higgs, H.N., 2003. The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol*, 13(15), 1335-1340.
- Li, F. és Higgs, H.N., 2005. Dissecting Requirements for Auto-inhibition of Actin Nucleation by the Formin, mDia1. *J. Biol. Chem.*, 280(8), 6986-6992.
- Lin, C.H. és Forscher, P., 1995. Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron*, 14(4), 763-71.
- Maas, R.L. és mtsai., 1990. Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant limb deformity alleles. *Nature*, 346(6287), 853-855.
- Machesky, L.M. és Insall, R.H., 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8(25), 1347-1356.
- Mahajan-Miklos, S. és Cooley, L., 1994. The villin-like protein encoded by the Drosophila quail gene is required for actin bundle assembly during oogenesis. *Cell*, 78(2), 291-301.
- Manseau, L.J. és Schüpbach, T., 1989. cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the Drosophila embryo. *Genes & Development*, 3(9), 1437-52.
- Marsh, L., 1984. Growth of neurites without filopodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin B. *The Journal of Cell Biology*, 99(6), 2041–2047.
- McBurney, M.W. és mtsai., 1982. Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature*, 299(5879), 165-7.
- Mongiu, A.K. és mtsai., 2007. Kinetic-structural analysis of neuronal growth cone veil motility. *J Cell Sci*, 120(Pt 6), 1113-1125.
- Moseley, J.B. és Goode, B.L., 2005. Differential activities and regulation of Saccharomyces cerevisiae formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J Biol Chem*, 280(30), 28023-28033.
- Moseley, J.B. és mtsai., 2004. A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell*, 15(2), 896-907.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. és Pollard, T.D., 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 6181-6186.

- Mullins, R.D., Stafford, W.F. és Pollard, T.D., 1997. Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol*, 136(2), 331-343.
- Nakano, K. és mtsai., 2002. The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *J Cell Sci*, 115(Pt 23), 4629-4639.
- Nakaya, M. és mtsai., 2004. Identification and comparative expression analyses of Daam genes in mouse and *Xenopus*. *Gene Expr Patterns*, 5(1), 97-105.
- Nezami, A.G., Poy, F. és Eck, M.J., 2006. Structure of the autoinhibitory switch in formin mDia1. *Structure*, 14(2), 257-263.
- Ng, J. és Luo, L., 2004. Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron*, 44(5), 779-93.
- Nishida, E., Maekawa, S. és Sakai, H., 1984. Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry*, 23(22), 5307-13.
- Nobes, C.D. és Hall, A., 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1), 53-62.
- Otomo, T., Otomo, C. és mtsai., 2005. Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1. *Mol Cell*, 18(3), 273-281.
- Otomo, T., Tomchick, D.R. és mtsai., 2005. Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*, 433(7025), 488-494.
- Ozaki-Kuroda, K. és mtsai., 2001. Dynamic localization and function of Bni1p at the sites of directed growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 21(3), 827-839.
- Patel, N.H. és mtsai., 1989. Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell*, 58(5), 955-68.
- Patel, N.H. és mtsai., 1989. The role of segment polarity genes during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev*, 3(6), 890-904.
- Paterno, G.D. és mtsai., 1997. Regulation of neurofilament L, M and H gene expression during retinoic acid-induced neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 49(1-2), 247-54.
- Peng, J. és mtsai., 2007. Myeloproliferative defects following targeting of the Drf1 gene encoding the mammalian diaphanous related formin mDia1. *Cancer Res*, 67(16), 7565-7571.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. és Mullins, R.D., 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29, 545-576.

- Pollard, T.D., 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36, 451-477.
- Pruyne, D. és mtsai., 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*, 297(5581), 612-615.
- Quinlan, M.E. és mtsai., 2005. Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature*, 433(7024), 382-388.
- Quinlan, M.E. és mtsai., 2007. Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappuccino. *J Cell Biol*, 179(1), 117-128.
- Ramesh, V., 2004. Merlin and the ERM proteins in Schwann cells, neurons and growth cones. *Nat Rev Neurosci*, 5(6), 462-470.
- Renault, L., Bugyi, B. és Carlier, M., 2008. Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends Cell Biol*, 18(10), 494-504.
- Rosales-Nieves, A.E. és mtsai., 2006. Coordination of microtubule and microfilament dynamics by Drosophila Rho1, Spire and Cappuccino. *Nat Cell Biol*, 8(4), 367-376.
- Rose, R. és mtsai., 2005. Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature*, 435(7041), 513-518.
- Sagot, I. és mtsai., 2002. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol*, 4(8), 626-631.
- Sakata, D. és mtsai., 2007. Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *J Exp Med*, 204(9), 2031-2038.
- Sanchez-Soriano, N. és mtsai., 2007. Drosophila as a genetic and cellular model for studies on axonal growth. *Neural Development*, 2(1), 9.
- Schirenbeck, A. és mtsai., 2005. Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 6), 1256-1259.
- Schmid, A., Chiba, A. és Doe, C.Q., 1999. Clonal analysis of Drosophila embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development*, 126(21), 4653-4689.
- Schulte, A. és mtsai., 2007. Purification, crystallization and preliminary structural characterization of the N-terminal region of the human formin-homology protein FHOD1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 63(Pt 10), 878-881.
- Schulte, A. és mtsai., 2008. The human formin FHOD1 contains a bipartite structure of FH3 and GTPase-binding domains required for activation. *Structure*, 16(9), 1313-1323.
- Schumacher, N. és mtsai., 2004. Overlapping expression pattern of the actin organizers Spir-1 and formin-2 in the developing mouse nervous system and the adult brain. *Gene Expression Patterns: GEP*, 4(3), 249-55.

- Shilo, B.Z. és mtsai., 1997. Branching morphogenesis in the *Drosophila* tracheal system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 62, 241-247.
- Simons, M. és Mlodzik, M., 2008. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet*, 42, 517-540.
- Skeath, J.B. és Doe, C.Q., 1998. Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS. *Development*, 125(10), 1857-1865.
- Skeath, J.B. és Thor, S., 2003. Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(1), 8-15.
- Somogyi, K. és Rørth, P., 2004. Evidence for Tension-Based Regulation of *Drosophila* MAL and SRF during Invasive Cell Migration. *Developmental Cell*, 7(1), 85-93.
- S. Ramón Y Cajal. *Anat. Anz.*, 5: 609, 1890
- Steven, R. és mtsai., 1998. UNC-73 Activates the Rac GTPase and Is Required for Cell and Growth Cone Migrations in *C. elegans*. *Cell*, 92(6), 785-795.
- Strasser, G.A. és mtsai., 2004. Arp2/3 is a negative regulator of growth cone translocation. *Neuron*, 43(1), 81-94.
- Szent-Györgyi, A., 1945 Studies on muscle. *Acta Physiol Scandinav*, 9 (suppl. 25)
- Takeya, R. és Sumimoto, H., 2003. Fhos, a mammalian formin, directly binds to F-actin via a region N-terminal to the FH1 domain and forms a homotypic complex via the FH2 domain to promote actin fiber formation. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 22), 4567-75.
- Tominaga, T. és mtsai., 2000. Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. *Molecular Cell*, 5(1), 13-25.
- Tomlinson, A., Strapps, W.R. és Heemskerk, J., 1997. Linking Frizzled and Wnt signaling in *Drosophila* development. *Development*, 124(22), 4515-4521.
- Uetz, P. és mtsai., 1996. Molecular Interaction between Limb Deformity Proteins (Formins) and Src Family Kinases. *J. Biol. Chem.*, 271(52), 33525-33530.
- Uv, A., Cantera, R. és Samakovlis, C., 2003. *Drosophila* tracheal morphogenesis: intricate cellular solutions to basic plumbing problems. *Trends Cell Biol*, 13(6), 301-309.
- Watanabe, N. és mtsai., 1999. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nature Cell Biology*, 1(3), 136-43.

- Welch, M.D., Iwamatsu, A. és Mitchison, T.J., 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 385(6613), 265-269.
- Welch, M.D. és mtsai., 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, 281(5373), 105-108.
- Wills, Z., Bateman, J. és mtsai., 1999. The Tyrosine Kinase Abl and Its Substrate Enabled Collaborate with the Receptor Phosphatase Dlar to Control Motor Axon Guidance. *Neuron*, 22(2), 301-312.
- Wills, Z., Marr, L. és mtsai., 1999. Profilin and the Abl Tyrosine Kinase Are Required for Motor Axon Outgrowth in the *Drosophila* Embryo. *Neuron*, 22(2), 291-299.
- Wong, K. és mtsai., 2001. Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell*, 107(2), 209-21.
- Xu, Y. és mtsai., 2004. Crystal Structures of a Formin Homology-2 Domain Reveal a Tethered Dimer Architecture. *Cell*, 116(5), 711-723.
- Yin, H.L., Zaner, K.S. és Stossel, T.P., 1980. Ca<sup>2+</sup> control of actin gelation. Interaction of gelsolin with actin filaments and regulation of actin gelation. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(19), 9494-500.
- Zallen, J.A. és mtsai., 2002. SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *J Cell Biol*, 156(4), 689-701.
- Zheng, J.Q., Wan, J.J. és Poo, M.M., 1996. Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 1140-9.
- Zhu, M. és mtsai., 2003. Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). *American Journal of Human Genetics*, 73(5), 1082-91.
- Zuniga, A. és mtsai., 2004. Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes & Development*, 18(13), 1553-64.