

dc\_21\_10

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A SZÖVETI POLARITÁS ÉS EGY ÚJ AKTIN SEJTVÁZ  
SZABÁLYOZÓ FEHÉRJE VIZSGÁLATA  
*DROSOPHILA MELANOGASTERBEN***

MIHÁLY JÓZSEF

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA  
SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT  
GENETIKAI INTÉZET

SZEGED

2010

dc\_21\_10

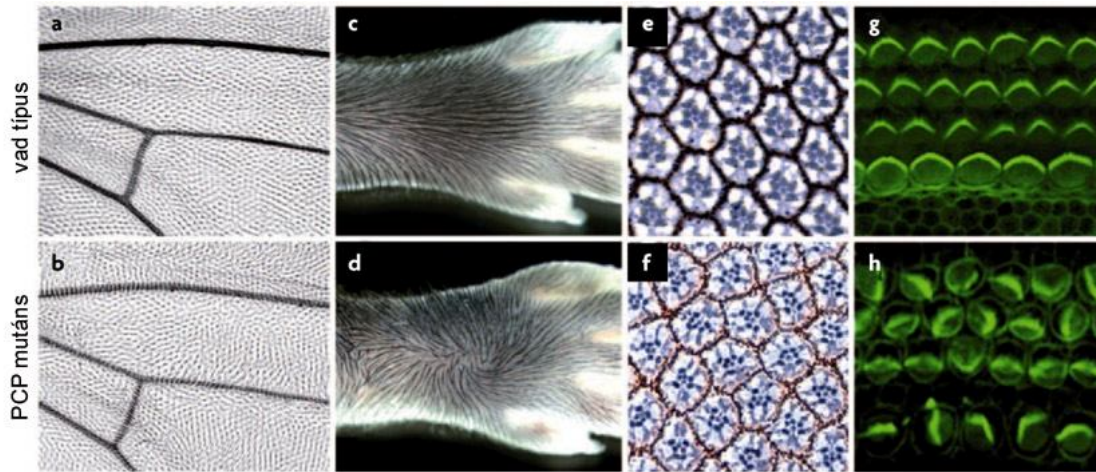
## 1. BEVEZETÉS

A polaritás az élőlényeket felépítő sejtek egyik legszembetűnőbb tulajdonsága. Sejtjeink változatos polaritási mintákat mutatnak, a legjobban ismert példák közé sorolhatjuk az epitéliális sejtek apiko-bazális polaritását és az idegsejtek axonális-dendritikus polaritásának kialakulását. Nyilvánvaló, hogy a sejtek polarizálódása elengedhetetlenül szükséges a megfelelő szöveti funkciók ellátásához, így pl. az apiko-bazális polaritás kialakulása és fenntartása elengedhetetlenül szükséges a folyadék transzportjához a vese glomerulusok hámjában vagy különböző anyagok (ionok, enzimek, hormonok) kiválasztásához a mirigyhámokban és egyéb szövetekben. A sejtek szintjén megvalósuló polaritáson kívül az is jellemző azonban a többsejtű élőlényekre, hogy a polaritás egy magasabb szerveződési szinten, a szövetek szintjén is megjelenik. A szöveti polarizálódás, vagy planáris sejt polarizálódás (PCP az angol planar cell polarity kifejezés után), jellemző tulajdonsága pl. az epitéliális szöveteknek amelyek gyakran polarizációt mutatnak az epitélium síkjában, tehát egy az apiko-bazális síkra merőleges síkban is.

A szöveti polaritás tanulmányozása rovar fejlődésbiológiai vizsgálatokkal kezdődött több mint három évtizeddel ezelőtt. A *Drosophila* szárnyát, potrohát és notumát borító kutikuláris képletek, ill. az összetett szem polaritási mintáját meghatározó faktorok vizsgálata évtizedekig a terület vezető modell organizmusává tették a közönséges ecetmuslicát. Időközben magasabb rendű modell szervezeteken végzett vizsgálatok bebizonyították, hogy a gerincesek egyedfejlődésének számos aspektusa planáris polarizálódási folyamatnak tekinthető. Példaként említhető a belső fül érzékhamja, ahol az epitéliális szőrsejtek érzékelő nyúlványainak polarizált elhelyezkedése biztosítja a fül maximális hangérzékenységét; és a gerincesek korai embriogenezisére jellemző polarizált sejtmozgások, amelyek a gasztruláció és a neuruláció elengedhetetlen lépései. Figyelemreméltó módon ezeknek a folyamatoknak a szabályozásában ugyanazok a gének, ugyanazok a jelátviteli utak játszzák a legfontosabb szerepet, mint a muslicák szöveti polaritásának kialakításában (**1. ábra**). Legújabban pedig az is nyilvánvalóvá vált, hogy a PCP faktorok mutációi fontos szerepet játszanak súlyos emberi fejlődési rendellenességek és betegségek kialakulásában, ezáltal a szöveti polaritás vizsgálata nem „csupán” egy érdekes biológiai probléma megoldását célozza, hanem fontos biomedikai jelentőségű is bír.

Az eddigi tapasztalatok azt bizonyítják, hogy a szöveti polaritás tanulmányozásának leghatékonyabb módja a genetikai megközelítés. Muslicákban genetikai kísérletekkel számos olyan mutációt azonosítottak, amelyek elrontják az epitéliális képletek szigorúan szabályozott irányultságú elrendeződését és véletlenszerű polaritási minták kialakulásához vezetnek. A polaritási gének részletes vizsgálata feltárta, hogy azok egy része minden vizsgált szövettípusban és testtájon szükséges a vad típusú polaritási mintázat kialakulásához, míg néhány más gén szövetspecifikus hatásokkal rendelkezik. A két géncsoport közötti fenotípus eltérések azt sugallták, hogy azok a gének amelyek minden szövettípusban szükségesek a planáris polaritás kialakításához, valószínűleg egy közös jelátviteli út elemei, amely a polarizáló jelet továbbítja, míg a másik géncsoport tagjai szövetspecifikus végrehajtó fehérjéket vagy szövetspecifikus polaritási jelmolekulákat kódolhatnak. Ezek alapján a PCP kialakulása az általános elképzelések szerint egy három lépésből álló folyamatként

modellezhető: (1.) egy nagy távolságban ható polarizáló jel kialakulása, (2.) a polarizáló jel érzékelése és továbbítása, (3.) szövetspecifikus sejtválaszok létrejötte.



**1. ábra:** A szöveti polaritás megnyilvánulása vad típusú *Drosophila* szárnyon (a) és szemben (e), ill. az egér epidermiszen (c) és a belső fül érzékhámján (g). (b,d,f,h) PCP mutáns fenotípusok a fenti szövetekben.

Munkánk kezdetén célunk az volt, hogy hozzájáruljunk a szöveti polarizálódás folyamatának jobb megértéséhez. Akkoriban ez már egy intenzíven tanulmányozott kutatási terület volt, de számos fontos kérdés megoldásra várt. Így például nem volt ismert a globális polaritási információ természete, keveset tudtunk az elsődleges polaritási fehérjék közötti kapcsolatokról és arról is, hogy milyen molekuláris végrehajtó fehérjék szükségesek a szövetspecifikus sejtválaszok létrejöttéhez és azok pontosan milyen molekuláris és sejtbiológiai változásokat idéznek elő. Úgy gondoltuk a lényeges kérdések egy részének megoldásához fontos lehet a már ismert PCP gének működésének részletesebb jellemzése, de a PCP jelátviteli rendszer addig még ismeretlen új elemeinek azonosítása is szükségesnek látszott. Ezért a kezdetekben néhány ismert PCP gén (mint pl. a *frizzled* és a *kayak/Fos*) részletesebb vizsgálatára fókuszáltunk, majd elhatároztuk, hogy új PCP géneket is azonosítunk. Ennek során jelölt gének (pl. a *yan*, *pnt*, *dTAK* és *dDAAM*) feltételezett PCP szerepét vizsgáltuk, majd egy nagyléptékű, genetikai mozaikosságon alapuló mutagenézis kísérlet során nagyszámú új polaritási mutánst izoláltunk.

Az egyik PCP jelölt génünk, a *Drosophila* DAAM ortológ, analízise során funkcióvesztéses allélokat izoláltunk, és megállapítottuk, hogy a gerinces DAAM ortológokkal ellentétben, a *dDAAM* nem játszik lényeges szerepet a Fz/PCP jelátviteli folyamatokban. A *dDAAM* gén az aktin sejtvázas szabályozásában fontos szerepet játszó formin fehérje család egyik tagját kódolja. Tekintve, hogy ennek a rendkívül fontos és érdekes fehérje családnak a tagjait többsejtű állatokban genetikai módszerekkel korábban csak kevéssé jellemezték, elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk milyen fejlődésbiológiai funkciókkal bír a *dDAAM*. A *dDAAM* embrionális kifejeződési mintájának vizsgálata bebizonyította, hogy a fejlődő embrionális központi idegrendszerben, az embrionális tranchearendszerben, valamint a kardioblaszt sejtekben is magas szinten expresszálódik a fehérje, ami egyértelműen felvetette azt a lehetőséget, hogy a *dDAAM* érdekes szövetspecifikus funkciókkal bír az egyedfejlődés során.

## 2. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 2.1. A *Drosophila* Frizzled receptorok jelátviteli specificitásának vizsgálata

Korábbi kísérletek alapján ismert volt, hogy a Wnt/Wg típusú molekulák különböző jelátviteli utakat képesek aktiválni, úgy mint a kanonikus Dsh/ $\beta$ -katenin/TCF függő utat, a szintén Dsh és polaritási protein függő PCP jelátviteli utat, továbbá egy G-protein/ $\text{Ca}^{2+}$ /PKC függő utat is. A jelátviteli specificitás mibenléte azonban nem volt világos. Erre a kérdésre egy a Fz és Fz2 receptorok szerkezet-funkció analízisére épülő vizsgálat sorozattal próbáltunk választ adni.

A *Drosophila* Fz és Fz2 receptorok imaginális eredetű szövetekben és *Xenopus* embriókban való túltermelése alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a két receptor jelentősen különböző mértékben képes a Wnt/ $\beta$ -katenin, ill. a Wnt/PCP jelátviteli utak aktiválására. Nevezetesen a Fz2 jóval erősebben aktiválja Wnt/ $\beta$ -katenin utat, míg a Fz a Wnt/PCP út hatékony aktivátora. Kiméra receptorok vizsgálata alapján azt találtuk, hogy a túltermeléses kísérletekben tapasztalt különbség, ha nem is kizárólagosan, de elsősorban a receptorok citoplazmatikus doménjétől függ. Ez arra utal, hogy a Frizzled receptor család, ill. rajtuk keresztül a Wnt/Wg jelátviteli rendszer specificitását alapvetően befolyásolják a receptorok intracelluláris doménjei közti különbségek, amelyek valószínűleg eltérő affinitást mutatnak a különböző Wnt effektor irányába. A GOF és LOF adatok egybevetése alapján a citoplazmatikus domén minőségén túl egyéb faktorok is hozzájárulhatnak az *in vivo* specificitás meghatározásához, de eredményeink azt jelzik, hogy a Wnt/Wg jelátviteli rendszer specificitást alapvetően a jelet érzékelő Fz receptor citoplazmatikus doménje határozza meg.

### 2.2. A Frizzled/PCP és az Egfr jelátviteli utak együttműködése a *Drosophila* összetett szemének szöveti polarizálódása során

Az ecetmuslicák összetett szemében a szöveti polarizálódás eredményeképpen egy tükörszimmetrikus elrendeződés alakul ki, ahol a szem ventrális fele tükörképi párja a dorzális félnek. Ennek az elrendeződésnek a kialakulásában kitüntetett szerepe van az R3/R4 fotoreceptor sejtpárnak, amelyik aszimmetrikus pozíciót foglal el az egységnyi szemén, az ommatídiumon belül. Korábbi kísérletek bizonyították, hogy az R3-R4 sejtors meghatározás a polarizálódás kulcs lépése, melynek során a Fz/PCP jelátviteli út az R3, míg a Notch jelátviteli út az R4 sejtors determinálódását segíti elő.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a muslicák összetett szemében a Fos, Yan és Pnt transzkripciós faktorok, valamint az Egfr jelátviteli rendszer is részt vesznek a szöveti polarizálódás szempontjából kulcsfontosságú R3/R4 fotoreceptor sejtpár sorsának meghatározásában. LOF és GOF kísérleteink jelezték, hogy ezek a transzkripciós faktorok integrálják a Fz/PCP és az Egfr jelátviteli utak felől érkező jeleket, ami a Notch receptortól a Su(H) transzkripciós regulátoron keresztül érkező jelekkel együttesen határozzák meg az R3 és R4 sejtorsokat. Eredményeink alapján azt a modellt állítottuk fel miszerint az AP-1 komplex a Fz/PCP úttól alsóbb szinten működve az R3 sejtors determinációját segíti elő, míg ezzel egy időben a Yan aktivitása gátolja az R4 specifikus gének bekapcsolódását az R3

sejtben. Ezzel szemközt az Egfr, valószínűleg a Yan gátlása és a Pnt aktiválása útján, az R4 specifikációt segíti elő, csakúgy mint a Notch/Su(H) útvonal. A szem polarizálódásának kritikus lépése tehát több jelátviteli rendszer összehangolt működésén alapul. Egy ilyen finoman és precízen hangolható szabályozási rendszer valószínűleg előfeltétele annak, hogy az imágó korongok rendkívül dinamikus fejlődő sejtcsoportjai hibátlanul végre tudják hajtani a fejlődési programjukat.

### 2.3. A *Drosophila* TAK homológ funkcionális vizsgálata

Az előző alfejezetben bemutatott, ill. más korábbi eredmények alapján azt gondoljuk, hogy a JNK szerepet játszik az összetett szem PCP mintájának kialakításában. A JNK azonban maga is egy kináz kaskád alsó elemeként funkcionál és aktiválódásához szükség van egy JNK kinázra (JNKK), amit viszont egy JNKK kináz (JNKKK) aktivál. Munkánk kezdetén ugyan már ismert volt egy *Drosophila* JNKK molekula, de abban az időben JNKKK típusú kinázt ecetmuslicában még nem írtak le. Ellenben gerinces modelleken elvégzett kísérletek alapján ismertté vált egy olyan emlős MAPKKK típusú kináz (TAK), amelyet kapcsolatba hoztak a JNK aktiválódásával, ezért felmerült, hogy érdemes lenne megvizsgálni részt vesz-e a *Drosophila* TAK homológ a JNK útvonal és specifikusan a PCP szabályozásában.

A *Drosophila* TAK homológ funkciójának több szövetben történő vizsgálata azt jelzi, hogy a dTAK a JNK jelátviteli út potens aktivátora, amit mind az embrionális epidermiszben, mind pedig az szemben megfigyelhettünk. A DN dTAK kifejeződése torzáródási hibákat eredményezett, ami egy ismert JNK LOF fenotípus, és ezért szintén támogatja azt az elképzelést, hogy a dTAK a JNK jelátviteli út egyik komponense lehet. Azt is bizonyítottuk, hogy a dTAK magas szintű kifejeződése apoptózist indukál. A dTAK szem-specifikus túltermelése hasonló polaritási hibákat eredményezett, mint a Fz vagy a Hep, Bsk és Jun túltermelése [45,56,57]. Mivel ez a fenotípus erősen szuppresszáható a JNK útvonal mutánsaival, ez az adatsor támogatta a dTAK-JNK kapcsolat PCP szabályozásban betöltött funkcionális jelentőségét. Ezekon túl a szemben elvégzett genetikai interakciós kísérleteink arra utaltak, hogy a dTAK nem kizárólag a JNK útvonal aktiválására képes, hanem a Nemo és p38 típusú kinázokat is aktiválhatja.

Ugyanakkor a *dTAK* gén csendesítése nem befolyásolta jelentősen az embrionális háti záródás folyamatát. Ez a dTAK-JNK kapcsolatnak részben ellentmondó megfigyelés arra utal, hogy az embrionális epidermisz sejtekben a dTAK csak elhanyagolható mértékben járul hozzá a JNK aktiválódáshoz, vagy hiányát egyéb kinázok teljesen kompenzálni tudják, tehát ebben a szövetben majdnem teljesen redundáns funkcióval bír.

### 2.4. Új szöveti polaritási mutánsok azonosítása és genetikai térképezése

Tekintve, hogy a szöveti polarizálódás folyamatának a különböző szövetekben számos olyan aspektusa van, amit a korábban azonosított PCP gének vizsgálatával nem lehetett megérteni, új PCP gének azonosítására is szükség volt. Ennek érdekében egy nagyléptékű mutagenézis kísérletet végeztünk az új polaritási gének azonosítására. Egy olyan, elsősorban

funkcióvesztéses mutánsok előállítására irányuló kísérleti rendszert dolgoztunk ki, amely genetikai mozaikosságon alapult és ezért homozigóta fenotípusok vizsgálatát tette lehetővé egy adott mutációra nézve egyébként heterozigóta mutáns egyedekben, másrészt a limitált spektrumú transzpozon inszerciók helyett a sokkal általánosabb hatású kémiai mutagének használatára épült. Ehhez hasonló megközelítést előttünk nem alkalmaztak PCP mutánsok előállítására.

A nagyléptékű mutagenézis kísérlet során sikerrel izoláltunk több tucat új polaritási mutánst. Később bebizonyítottuk, hogy az új mutánsok kb. fele már ismert PCP géneket azonosít, míg a többi mutáció új PCP géneket érint jelezvén, hogy mutánsizolálási stratégiánk hatékony eszköznek bizonyult a kísérleti célkitűzés elérése érdekében. A nagyszámú új mutáns részletes jellemzése még nem zárult le, de az eddig génszinten térképezett mutánsok példája alapján mutáns gyűjteményünk vizsgálata értékes új eredményekkel járulhat hozzá a PCP megértéséhez.

## 2.5. A *Drosophila Rab23* szöveti polaritási funkciójának jellemzése

A nagyléptékű mutagenézis kísérletünk során azonosított egyik új polaritási gén a *Drosophila Rab23* volt. A Rab családba tartozó fehérjék a kis mólsúlyú GTPázok szupercsaládjába tartoznak, és központi szerepet játszanak a vezikuláris transzport folyamatok szabályozásában. Az egér *Rab23* ortológot kódoló *open brain (opb)* mutánsok vizsgálata azt mutatta, hogy a *Rab23* esszenciális szerepet játszik az embrionális központi idegrendszer fejlődésében, melynek során a dorzális sejtors kialakulását segíti elő a velőcsőben a Sonic hedgehog (Shh) jelátviteli út gátlásán keresztül. BHK-21 vese fibroblaszt sejteken végzett kísérletek azt sugallták, hogy a *Rab23* fehérje a korai endoszómás vezikulákon halmozódik fel, míg HeLa sejtekben azt találták, hogy a *Rab23* fehérje elősegíti a fagoszóma-lizoszóma fúziót. Így a *Rab23* membrántranszport folyamatokban betöltött pontos szerepe kérdésesnek volt tekinthető, a *Drosophila Rab23* ortológáról pedig még egyáltalán nem jelent meg funkcionális adat a szakirodalomban.

Vizsgálataink szerint a *Drosophila Rab23* gén egyik legfontosabb funkciója, hogy részt vesz az adult epidermiszt borító trichómák szöveti síkban történő polarizálódásában. A *Rab23* a lábon, a szárnyon és az abdomenen is szükséges a trichómák orientálódásához, de nem befolyásolja sem az érzékszőrök, sem az összetett szem planáris polarizációját. Ezek alapján a *Rab23* egy egyedi viselkedésű PCP gén, mert ellentétben a többi PCP génnel, amelyek általában szövet specifikusan működnek, strukturális specificitást mutat: kizárólag a trichómák fejlődését szabályozza.

A trichóma fejlődés folyamatán belül a *Rab23* két fontos lépéshez is köthető, egyrészt hozzájárul a trichómák helyes orientálódásához, másrészt szabályozza a sejtenkénti trichóma számot. A szárny esetében azt találtuk, hogy a szárnyiszőrök irányultsága viszonylag kis mértékben tér el a normálistól a *Rab23* mutánsokban. Ezen kívül azt is megfigyeltük, hogy a *Rab23* mutánsok szintén viszonylag kis mértékben, de egyértelműen megzavarják a PCP fehérjék aszimmetrikus sejten belüli felhalmozódását. A szárnyiszőrök irányultságában megnyilvánuló gyenge fenotípus jól magyarázható a PCP fehérje eloszlásra gyakorolt hasonlóan gyenge hatással. Kimutattuk, hogy a Pk fehérje egy komplexben található a *Rab23*-

mal, ami alapján elképzelhető, hogy a Rab23 befolyásolja a Pk protein proximális felhalmozódását. Miután a Rab fehérjék családja a vezikula transzport szabályozásában vesz részt, eredményeink megerősítik azt a korábbi hipotézist, miszerint a polarizált membrán transzport fontos szerepet játszik a PCP fehérjék aszimmetrikus felhalmozódásában. A szárny és a potroh kutikula példáját összevetve érdekes látni, hogy az abdomenen a szárnyal ellentétben erős trichóma orientációs hibákat figyelhetünk meg. Az abdomen esetében a sejt belüli PCP fehérje eloszlásról nincsenek publikált adatok, de genetikai bizonyítékok utalnak arra, hogy az aszimmetrikus felhalmozódás az abdominális hisztoblaszt sejtekben is megtörténik. Ily módon elképzelhető, hogy a *Rab23* ebben a vonatkozásban szövet specifikusan működik és a szárnyban ugyan csak mérsékelt szerepe van, de az abdominális kutikulán kritikus szereppel bír.

A szárnysejtek polarizálódásával kapcsolatban általánosan elfogadott az a modell miszerint a disztális csúcsban a trichóma iniciációt egy Fz-függő mechanizmus segíti elő, míg ezzel párhuzamosan, egy a proximális Stbm fehérjétől függő mechanizmus gátolja azt a sejt többi részében. A gátlás mechanizmusáról azt gondoljuk, hogy a proximális membrándóménben felhalmozódó Stbm és Pk fehérjék rekrutálják a In komplexet, ami viszont szabályozza az Mwh fehérje sejt belüli eloszlását és aktivitását. Az Mwh fehérjéről pedig tudjuk, hogy grádiens-szerű felhalmozódást mutat a sejtekben (a grádiens csúcsa a proximális oldalon van), és valószínűleg direkt módon képes megakadályozni az aktin filamentumok kötegbe rendeződését, ily módon a szőr iniciációt. Mi azt találtuk, hogy a Rab23 fehérje is részt vesz a trichóma iniciáció gátlásában. Mi lehet ennek a mechanizmusa, hogyan illeszkedik a Rab23 a fenti hierarchiába? Kettős mutáns analízisünk azt sugallja, hogy a Rab23 az elsődleges PCP fehérjékkel egy szinten, míg az In csoporthoz és az Mwh-hoz képest fölsőbb szinten hat. Feltűnő volt, hogy a *pk*; *Rab23* kettős mutánsok fenotípusa gyakorlatilag megegyezik az *in* mutánsok fenotípusával, ami azt jelzi, hogy a Rab23 és a Pk együttesen szükségesek és elégségesek az In komplex teljes aktiválódásához. Ezek alapján javaslatunk az, hogy a Rab23 az In komplex aktiválásában játszik szerepet és így járul hozzá a szőr iniciáció gátlásához. Az In komplex teljes aktiválódásához azonban a Pk fehérjére is szükség van, ami szükséges az In komplex megfelelő lokalizációjához és valószínűleg egy attól független mechanizmus útján is hozzájárul az aktivációhoz.

Az egér *Rab23* ortológgal ellentétben, a *Drosophila Rab23* nem szükséges az életképességhez és nem vesz részt a Hedgehog jelátviteli folyamatok szabályozásában. Miután kimutatták az egér Rab23 fehérje endoszómális vezikulákhoz történő lokalizációját, logikus elképzelésnek tűnt, hogy a Rab23 GTPáz valamelyik membrán-asszociált Hedgehog jelátviteli komponens sejt belüli szállításában vesz részt. A későbbi vizsgálatok azonban kudarcot vallottak ennek a kapcsolatnak a megerősítésében, és ma sem világos mi módon járul hozzá a Rab23 a Hedgehog útvonal gátlásához. *Drosophila* kísérleteink alapján azt találtuk, hogy a Rab23 asszociál a Pk fehérjével, ami viszont azt sugallja, hogy a Rab23 részt vesz a Pk protein szállításában. Ily módon a Pk fehérje lenne a Rab23 első ismert direkt targetje. Ezzel összefüggésben figyelemreméltó, hogy gerinces fajokban nagyfokú átfedés mutatható ki a *pk* és a *Rab23* gének embrionális kifejeződési mintájában, és mindkét gén mutációi előidézhetik a *spina bifida* fenotípust. Ezek az adatok együttesen felvetik annak a lehetőségét, hogy a Rab23-Hh kapcsolattal ellentétben, a Rab23-Pk kapcsolat evolúciósan a rovaroktól a gerincesekig konzervált.



## 2.6. *Drosophila* DAAM mutánsok előállítása és a PCP funkció vizsgálata

Tekintve, hogy egyik fontos kísérleti célkitűzésünk új PCP gének azonosítása volt, a nagyléptékű mutánsizolálási kísérletünkön kívül elméleti alapon kiválasztott jelölt géneket is vizsgáltunk. Így került látókörünkbe a formin típusú fehérjét kódoló *Drosophila* DAAM (*dDAAM*) gén is, amelynek humán homológját Dsh-hez kötődő fehérjeként azonosították és biokémiai kísérletek alapján kapcsolatba hozták a PCP jelátviteli úttal. Mivel a muslica PCP jelátviteli rendszer Dsh alatti tagjairól abban az időben keveset tudtunk, és mert a *Drosophila* genom csak egyetlen DAAM ortológot kódol, elhatároztuk, hogy klasszikus mutáns analízis segítségével vizsgáljuk meg a *dDAAM* gén szerepét a PCP vagy más fejlődésbiológiai folyamatok során. Ennek érdekében sikeresen izoláltunk funkcióvesztéses allélokat. Ezek segítségével megállapítottuk, hogy a gerinces DAAM ortológokkal ellentétben, a *dDAAM* nem játszik lényeges szerepet a Fz/PCP jelátviteli útban. A *dDAAM* embrionális kifejeződési mintájának vizsgálata azonban rávilágított, hogy ez a formin típusú fehérje érdekes szövet specifikus funkciókkal bírhat az egyedfejlődés során.

## 2.7. A dDAAM formin homológia doménjeinek biokémiai jellemzése

A dDAAM részletes funkcionális vizsgálata előtt a fehérje alapvető biokémiai jellemzését is el akartuk végezni, mert rovar forminok esetében ilyen vizsgálatokat még nem végeztek és azt is be akartuk látni, hogy a dDAAM valóban rendelkezik a forminokra jellemző aktin sejtvez szabályozó funkciókkal. Mivel az aktin összeszerelésben közvetlenül az FH1 és FH2 domének vesznek részt, kísérleteinket ennek a két doménnek a biofizikai és biokémiai analizésére fókuszáltuk.

A *Drosophila* DAAM fehérje formin homológia doménjeinek biokémiai vizsgálata során bebizonyítottuk, hogy az FH2 domén magában, ill. az FH1 doménnel kiegészülve is *bona fide* formiként viselkedik, tehát mutatja az egyéb forminokra is jellemző legfontosabb tulajdonságokat. Az FH2 és FH1-FH2 fragmentumok profilin hiányában egymáshoz nagyon hasonló módon viselkedtek szinte minden *in vitro* tesztünkben, de profilin jelenlétében markáns funkcionális különbségeket tudtunk kimutatni közöttük. Ezek közül kiemelendő, hogy az FH1-FH2 fragmentum profilin jelenlétében jelentősen fokozta az aktin polimerizáció sebességét, míg az FH2 domén erősen gátolta azt. Biomimetikus motilitási tesztekben szintén egyértelmű volt, hogy az FH1-FH2 domén profilin jelenlétében erős processzív elongációs aktivitást mutat, de ezt profilin hiányában nem tapasztaltuk, az FH2 domén pedig semmilyen körülmények között nem mutatta ezt a hatást. Mindezeket a sejt kísérletekkel egybevetve legfontosabb következtetésünk az, hogy az FH1 domén lehetővé teszi a profilin-aktinként raktározott aktin monomerek beépítését a növekvő aktin filamentumba, és az FH2 domén processzív elongációs aktivitásához mind az FH1 doménre, mind pedig profilinre szükség van. A formin homológia domének aktin polimerizációban betöltött szerepén túl, adataink arra is rávilágítottak, hogy a dDAAM fehérje *in vitro* körülmények között nem csak az aktin filamentumok szöges végéhez képes kötődni, hanem a filamentumok oldalához is és a filamentumok keresztkötésére, kötegekbe rendezésére is képes.

## 2.8. A *dDAAM* szerepe a *Drosophila* trachearendszerben

A *dDAAM* általános jellemzése során megállapítottuk, hogy a gén magas szinten fejeződik ki a fejlődő embrionális légcsőrendszerben, ami azt jelezte, hogy ebben a szövetben szerepe lehet az aktin sejtvázas szabályozásában. Tekintve, hogy a tubuláris felépítésű szövetek szerkezetének és morfogenezisének megértése a biológiai kutatások egyik fontos területe, és a *Drosophila* légcsőrendszere pedig a terület egyik legfontosabb modellrendszerét reprezentálja, elhatároztuk, hogy részletesebben is megvizsgáljuk milyen szerepet játszhat egy formin típusú aktin sejtvázas regulátor a trachearendszer fejlődése során.

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 csőrendszer stabilitásához kellő rigiditás és szilárdság kell, de egyben flexibilitás is szükséges, hiszen a rovarokban a gázok szállítása passzívan, az állat mozgásával történik. Régóta feltételezhető volt, hogy ezeknek a feladatoknak és igényeknek a biztosításában fontos szereppel bír a speciális szerkezettel rendelkező tracheakutikula. A kutikula porszívó- vagy gégecsőre emlékeztető felépítése biztosíthatja, hogy a légcsövek ellenálljanak a külső-belső nyomásváltozásoknak, és ugyanakkor kellően flexibilisek legyenek pl. a lárvák mozgása során. Munkánk nyomán a *dDAAM* mutánsok vizsgálatával először sikerült kísérletesen is bizonyítani a fenti hipotézist, hiszen a kutikula minta összeomlása súlyos elváltozásokat okozott a trachearendszer struktúrájában és működésében.

Kísérleteink alapján a vad típusú kutikula mintázat kialakításához még a kitin alapú szerkezeti elemek szekréciója előtt szükség van egy apikálisan elhelyezkedő, rendezett aktinkábelekből álló vázra, ami direkt vagy indirekt módon kijelöli a későbbi kutikulabordák helyét. Ily módon 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 abnormálissá válik, ami a kutikula szintjén is súlyos defektusokat okoz. A *dDAAM* mutánsokban rendezetlenek az apikális aktin filamentumok és alacsonyabb az F-aktin szint, mint a vad típusban, ami arra utal, hogy a *dDAAM* az apikális aktinkábelek kialakításában és rendezésében is részt vesz. Míg az aktin összeszerelő aktivitás egy ismert formin tulajdonság, az aktinköteg rendezés egy új formin funkció, amit a jövőben érdemes lehet behatóbban is tanulmányozni.

Genetikai interakciós kísérleteink alapján a *dDAAM* protein aktivitását a tracheában a RhoA GTP-áz szabályozza. Megfigyeléseink szerint a *dDAAM* egyértelműen az autoinhibícióval szabályozódó forminok közé tartozik, és aktivitása a DRF forminokhoz hasonló módon szabályozódik. A *RhoA* génen kívül két másik potenciális együttműködő partnert is azonosítottunk, és megmutattuk, hogy az *Src42A* és *Btk29* gének is hozzájárulnak a trachea kutikula minta kialakulásához. A *dDAAM* és az *Src*, ill. *Btk29* közötti direkt kölcsönhatást mi ugyan nem bizonyítottuk, de figyelemreméltó, hogy episztázis vizsgálataink konklúziójával megegyező módon kimutatták, hogy az egér *mDia1* és *mDia2* az *Src*

aktiválásán keresztül idéz elő sejtváz átrendeződéseket. Ezen túlmenően arra is fény derült, hogy a humán DIA2C is Src aktiváción keresztül szabályozza az endoszómális vezikulák dinamikáját. Ezekre az adatokra támaszkodva, logikus következtetésnek látszik, hogy *Drosophila* tracheasejtekben a RhoA/DAAM/Src modul nem pusztán az aktin filamentumok elrendeződését szabályozza, hanem kapcsolatot teremthet a vezikuláris transzport, a szekréció irányába is.

## **2.9. A dDAAM fehérje evolúciósan konzervált szerepet játszik az axon növekedés szabályozásában**

A központi idegrendszer (KIR) fejlődése során a növekedési kúp esszenciális szerepet játszik az axonok megfelelő projekciójában. Jól ismert ugyanakkor az is, hogy az axon növekedés új aktin filamentumok képződését igényli, tehát minden bizonnyal aktin nukleáló faktorokra is szükség van. Mindezidáig azonban rendkívül ellentmondásos kép bontakozott ki arról, hogy mely nukleáló faktorok játszanak szerepet az axon növekedés során. Tekintve, hogy a *Drosophila* forminok embrionális kifejeződési mintájának tanulmányozása azt jelezte, hogy a DAAM ortológ az egyetlen pán-neuronális kifejeződési mintát mutató formin, míg mi azt találtuk, hogy a dDAAM FH1-FH2 fragmentuma S2 sejtekben filopódiális nyúlványok képződést indukálta, a dDAAM kiváló jelöltnek tűnt az axon növekedés szabályozására. Elhatároztuk tehát, hogy funkcióvesztéses mutánsaink birtokában feltérképezzük milyen szerepet játszik a *dDAAM* gén a központi idegrendszer fejlődésében.

Munkánk során LOF és GOF analízis segítségével bizonyítottuk, hogy a *dDAAM* meghatározó szerepet játszik az embrionális központi idegrendszeri axonok növekedésében. A *dDAAM* adult idegrendszeri funkciójának vizsgálata tisztázta, hogy az embrionális KIR-en kívül a *dDAAM* a felnőtt agyban található idesejtek fejlődését is befolyásolja. Szintén csak az embrióban tapasztaltakhoz hasonlóan, a *dDAAM* mutánsok fenotípusa arra utal, hogy a fehérje legfontosabb funkciója az axon növekedés elősegítése. Ezek alapján tehát a neuron nyúlványok kialakításában betöltött szerep egy általános *dDAAM* funkciónak tekinthető, a *dDAAM* valószínűleg az egyedfejlődés minden stádiumában részt vesz az axonok növekedésében és ezzel az idegkötegek kialakulásában. Ezen kívül azt is megmutattuk, hogy szubcelluláris szinten a dDAAM fehérje a növekedési kúp perifériális régiójában, a filopódiumokban halmozódik fel és a *dDAAM* mutáns idegsejtek kevesebb és rövidebb filopódiumot növesztenek, mint vad típusú társaik. A filopódiumok kruciális szerepet játszanak az axon növekedésben. Felszínük a navigációs jelekre érzékeny receptorokban gazdag, amelyek segítségével a különböző irányokba kibocsájtott filopódiumok letapogatják a környezetüket, majd közülük a megfelelő jelet érzékelő filopódium stabilizálódik és meghatározza a növekedés irányát. Ezek alapján a *dDAAM* mutánsokban megfigyelhető filopódiális defektusok jól magyarázzák a teljes idegrendszer szintjén megjelenő nyúlványnövekedési hibákat.

Az aktin összeszerelő faktorként működő dDAAM tehát egy fontos molekuláris effektornak látszik, feltételezhető ugyanakkor, hogy a dDAAM aktivitását számos növekedési és navigációs jel befolyásolja. Ezekről a jelekről egyelőre keveset tudunk, de kísérleteink fényt derítettek arra, hogy mind az adult, mind az embrionális KIR-ben a dDAAM közvetlen

aktivátorai a Rac GTP-ázok lehetnek. Ez a domináns genetikai kölcsönhatásokra alapozott hipotézis jó összhangban van a Rac GTPázok ismert axon növekedési szerepével *Drosophila*-ban és más organizmusokban is, továbbá azzal a ténnyel, hogy néhány gerinces DAAM ortológusról kimutatták, hogy Rac GTPázokhoz képesek kötődni.

Genetikai kísérleteink során további kölcsönható partnereket is azonosítottunk, és ezeket az interakciókat biokémiai kísérletekkel is igazoltuk az Ena és a profilin esetében, továbbá megmutattuk, hogy a dDAAM fehérje részleges kolokalizációt mutat ezzel a két fehérjével a növekedési kúp területén, különös tekintettel a filopódiumokra. Ezek a megfigyelések együttesen azt sugallják, hogy az Ena/Profilin/dDAAM modul a filopódiális aktin sejtvezeték átrendeződések kritikus szabályozó eleme. Az Ena/Profilin/dDAAM komplex pontos molekuláris működését egyelőre nem tisztáztuk, de korábbi eredmények, továbbá episztázis vizsgálataink és a fehérjék biokémiai tulajdonságai alapján úgy gondoljuk, hogy a profilin szerepe itt is az aktin monomerek biztosítása a dDAAM aktin polimerizáló aktivitásához, míg a növekvő filamentumokat az Ena kötegekbe rendezi, ami elengedhetetlen a filopódiumok iniciálódásához. Természetesen egyéb lehetőségek is elképzelhetők, hiszen az Ena/VASP fehérje család tagjai az elongációt is segítik, míg saját eredményeink alapján a dDAAM is rendelkezhet kötegfórmáló aktivitással. Ettől függetlenül figyelemreméltó, hogy Schirenbeck és mtsai szerint *Dyctiostelium*-ban is egy hasonló, formin/VASP-függő mechanizmus szabályozza a filopódium képződést.

A dDAAM fehérje vizsgálata P19 egér teratokarcinóma sejtvonaltban, ill. az egér *mDaam1* gén vizsgálata *Drosophila*-ban feltárta, hogy a dDAAM és az *mDaam1* evolúciósan erősen konzervált idegrendszeri funkciókkal rendelkeznek, ami megmutatkozik a fehérjék sejten belüli lokalizációjában és abban a képességükben, hogy egymást nagymértékben helyettesíteni tudják. Legfontosabb következtetésünk tehát az, 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 evolúciósan erősen konzervált funkciója lehet. Ez jó összhangban van a gerinces DAAM gének expressziós mintázatának vizsgálatával, melynek során megállapították, hogy a *Xenopus*, a csirke és az egér DAAM gének egyik fő kifejeződési helye a fejlődő központi idegrendszer.

### 3. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk kezdetén célunk az volt, hogy hozzájáruljunk a szöveti polarizálódás folyamatának jobb megértéséhez. Úgy gondoltuk a lényeges kérdések egy részének megoldásához fontos lehet a már ismert PCP gének működésének részletesebb jellemzése is, de a PCP jelátviteli rendszer addig még ismeretlen új elemeinek azonosítása is szükségesnek látszott. Ezért a kezdetekben néhány ismert PCP gén (mint pl. a *fz* és a *kay/Fos*) részletesebb vizsgálatára fókuszáltunk, majd elhatároztuk, hogy új PCP géneket is megpróbálunk azonosítani. Ennek során jelölt gének (pl. a *yan*, *pnt*, *dTAK* és *dDAAM*) feltételezett PCP szerepét vizsgáltuk, majd egy nagyléptékű, genetikai mozaikosságon alapuló mutagenézis kísérlet során három autoszómális kromoszóma karon izoláltunk nagyszámú új polaritási mutánst. A PCP gének vizsgálata során főbb eredményeink a következők voltak:

(1) A *Drosophila* Fz és Fz2 receptorok összehasonlító vizsgálata alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a két receptor jelentősen különböző mértékben képes a Wnt/ $\beta$ -katenin, ill. a Wnt/PCP jelátviteli utak aktiválására: a Fz2 jóval erősebben aktiválja Wnt/ $\beta$ -katenin utat, míg a Fz a Wnt/PCP út hatékony aktivátora. Kiméra receptorok vizsgálata alapján azt találtuk, hogy a jelátviteli specificitást elsődlegesen a receptorok citoplazmatikus doménje határozza meg, míg kisebb mértékben az extracelluláris domén is hozzájárul. Ez arra utal, hogy a Fz receptorok intracelluláris doménje eltérő affinitást mutat a különböző Wnt effektorok irányába, ami alapvetően meghatározza a különböző irányok jelátviteli hatékonyságát, vagyis effektív PCP jelátvitel csak a Fz sejten belüli doménjének jelenlétében valósulhat meg.

(2) Megállapítottuk, hogy a Frizzled/PCP és az Egfr jelátviteli utak együttműködve szabályozzák a *Drosophila* összetett szemének szöveti polarizálódását. Ezek a jelátviteli utak az AP-1 (Jun/Fos), a Yan és a Pnt transzkripciós faktorokon keresztül részt vesznek a szöveti polarizálódás szempontjából kulcsfontosságú R3/R4 fotoreceptor sejt pár sorsának meghatározásában. Kísérleteink jelezték, hogy ezek a transzkripciós faktorok integrálják a Fz/PCP és az Egfr jelátviteli utak felől érkező jeleket, ami a Notch receptortól a Su(H) transzkripciós regulátoron keresztül érkező jelekkel együttesen határozza meg az R3 és R4 sejt sorsot.

(3) Kidolgoztunk egy olyan új, genetikai mozaikosságon alapuló mutáns izolálási stratégiát, amelynek segítségével sikeresen állítottunk elé több tucat új polaritási mutánst. Később bebizonyítottuk, hogy az új mutánsok fele már ismert PCP géneket azonosít, míg a többi mutáció új PCP géneket érint jelezvén, hogy stratégiánk igen hatékonyan működött. Az új mutánsok közül kettőt molekuláris szinten is térképeztünk, ami lehetővé teszi a részletes jellemzésüket.

(4) Az egyik új PCP gén a *Drosophila* *Rab23* ortológ volt. Mutáns analízis segítségével megállapítottuk, hogy a *Rab23* szükséges az adult epidermiszt borító trichómák szöveti polarizálódásához, de nem befolyásolja sem az érzékszőrök, sem az összetett szem planáris polarizációját. Ezek alapján a *Rab23* egy egyedi PCP gén, amely kizárólag a trichómák

fejlődését szabályozza, de nem befolyásolja a többsejtű struktúrák polaritását. A trichóma fejlődés folyamatán belül a *Rab23* két fontos lépéshez köthető, egyrészt hozzájárul a trichómák helyes orientálódásához, másrészt szabályozza a sejtenkénti trichóma számot. Genetikai interakciós, biokémiai és sejtbiológiai vizsgálataink alapján azt találtuk, hogy szárnysejtekben a *Rab23* fehérje a Pk fehérjével és az In komplex fehérjével együttműködve szabályozza a sejtenkénti trichóma számot. Eredményeink arra utalnak, hogy a *Rab23*-tól függő vezikula transzport folyamatok és a Pk együttesen járulnak hozzá a PCP effektorok aktiválódásához.

Az egyik PCP jelölt génünk, a *Drosophila* DAAM ortológ, analízise során funkcióvesztéses allélokat izoláltunk, és megállapítottuk, hogy a gerinces DAAM ortológokkal ellentétben, a *dDAAM* nem játszik lényeges szerepet a Fz/PCP jelátviteli folyamatokban. A *dDAAM* gén az aktin sejtvezérlés szabályozásában fontos szerepet játszó formin fehérje család egyik tagját kódolja. Tekintve, hogy ennek a rendkívül fontos és érdekes fehérje családnak a tagjait többsejtű állatokban genetikai módszerekkel korábban csak kevésbé jellemezték, megvizsgáltuk milyen fejlődésbiológiai funkciókkal bír a *dDAAM*. A *dDAAM* funkcionális analízise során legfontosabb eredményeink a következők voltak:

(1) A *Drosophila* DAAM fehérje formin homológia doménjeinek biokémiai vizsgálata során bebizonyítottuk, hogy az FH1-FH2 fragmentum aktin nukleáló aktivitással bír és profilin jelenlétében erős processzív elongációs aktivitást mutat, ily módon *in vitro* körülmények között jelentősen fokozza az aktin polimerizáció sebességét. Az FH2, ill. az FH1-FH2 fehérjéket S2 sejtekben kifejezve azt tapasztaltuk, hogy az FH2 domén *in vivo* nem okoz fenotipikus változásokat, míg az FH1-FH2 fragmentumot kifejező sejtek erősen megnövekedett F-aktin szintet mutattak és gyakran lamellipódiális vagy filopódiális sejtnyúlványokat növesztettek. Megfigyeléseink tehát jelezték, hogy az FH1 domén jelenléte drámaian megváltoztatja az FH2 domén *in vivo* aktivitását, és együttesen olyan aktivált formiként viselkednek, ami aktin sejtvezérlés alapú motilis sejtnyúlványok képződését segíti elő.

(2) *dDAAM* mutánsok vizsgálatával feltártuk, hogy a gén hiánya súlyos defektusokat okoz a légszűrőrendszer belső felszínét borító kutikula fejlődésében. A trachea kutikula kialakul ugyan, de a vad típusra jellemző bordaminta összeomlik, ami súlyos elváltozásokat okoz a trachearendszer struktúrájában és működésében. Kísérleteink alapján a vad típusú kutikula mintázat kialakításához szükség van egy apikálisan elhelyezkedő aktin vázra, ami direkt vagy indirekt módon kijelöli a strukturális szempontból fontos kutikulabordák helyét. A *dDAAM* mutánsokban kimutatható rendezetlen aktin filamentumok és az alacsonyabb az F-aktin szint arra utaltak, hogy a *dDAAM* részt vesz az apikális aktinkábelek kialakításában, és egyben egy új *in vivo* formin funkcióra is fényt derítettek, ami egy filamentum rendező aktivitást jelent.

Genetikai interakciós kísérleteink alapján a *dDAAM* protein a tracheában valószínűleg a RhoA GTP-ázzal és az Src42A, ill. a Btk29 kinázokkal együttműködve szabályozza a kutikula fejlődést. Adataink együttesen azt jelzik, hogy a RhoA/DAAM/Src modul szabályozza az aktin filamentumok elrendeződését, és elősegíti a kutikula szekréciót.

(3) Munkánk során LOF és GOF analízis segítségével bizonyítottuk, hogy az egyetlen pán neurális kifejeződési mintát mutató *Drosophila* formin, a *dDAAM* meghatározó szerepet játszik mind az embrionális, mind pedig az adult központi idegrendszeri axonok növekedésében. Azt is megmutattuk, hogy sejtes szinten a *dDAAM* fehérje a növekedési kúp perifériális régiójában elhelyezkedő filopódiumok képződését segíti elő, és tekintve, hogy a filopódiumok esszenciális szerepet játszanak a növekedési kúp előrehaladásában, ez jól magyarázza a teljes idegrendszer szintjén megfigyelhető axon növekedési defektusokat. Biokémiai, genetikai interakciós és fehérje lokalizációs kísérleteink azt sugallják, hogy az Ena/Profilin/*dDAAM* szabályozó modul kritikus szerepet játszik a filopódiális aktin sejtvezérelési irányításában.

Végezetül az egér *mDaam1* gén vizsgálata ecetmuslicában, ill. a *dDAAM* vizsgálata egér P19 sejtekben feltárta, hogy ezek a forminok evolúciósan erősen konzervált idegrendszeri funkciókkal rendelkeznek, ami megmutatkozik a fehérjék sejten belüli lokalizációjában és abban a képességükben, hogy egymást nagymértékben helyettesíteni tudják. Legfontosabb következtetésünk tehát az, hogy azonosítottuk az axon növekedés egyik fontos faktorát, és funkcionális bizonyítékokat gyűjtöttünk arra nézve, hogy ez a *DAAM* alsó család evolúciósan erősen konzervált funkciója lehet.

#### 4. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban bemutatott tudományos eredmények megszületése számos ember hozzájárulásának köszönhető. Mindenekelőtt családomnak szeretnék köszönetet mondani. Feleségem Dr. Liker Erika és leánya támogatása nélkül nem élvezhettem volna a kutatás örömét. Hálás vagyok megértő szeretetükért és hogy biztos támaszt nyújtottak minden időben. Köszönöm a szüleimnek az egész életen át tartó támogatást, érdeklődést és bátorítást.

Tudományos indíttatásomban döntő szerepet játszottak kitűnő egyetemi genetika tanárain, Dr. Maróy Péter és Dr. Gausz János. Hálás vagyok továbbá Dr. Udvardy Andornak és Dr. Szabad Jánosnak, akik első labor szárnypróbálgatásaim során egyengették az utamat. Őszinte köszönettel tartozom PhD szakvezetőmnek, Dr. Francois Karchnak és posztdoktori mentoromnak, Dr. Marek Mlodziknak a bizalomért és a támogatásért amivel fejlődésemet segítették. Az értekezésben bemutatott munka javarészt már itthoni eredményeinket tükrözi, amelyek eléréséért elsősorban közvetlen munkatársaimat, tanítványaimat illeti köszönet. Érkezési sorrendben Matusek Tamás, Pataki Csilla, Gombos Rita, Gedai Anita, Molnár Imre, Kalmár Tibor és Migh Ede segítettek, ill. segítik a munkámat. Hálás vagyok nagyszerű asszisztenseinknek, Csendesné Rehák Annának, Berente Anikónak, Bozsó Szilviának, Ördög Edinának és Velkeyné Krausz Ildikónak a biztos technikai háttér megteremtéséért. Rajtuk kívül ki kell emelnem az SZBK Drozis közösségét, ahol évtizedek óta pezsgő szellemi és inspiráló tudományos légkör uralkodik. Őszinte hálával tartozom mindannyiuknak, hogy *anno* befogadtak és barátságukkal sokan azóta is kitüntetnek. Szoros szakmai kapcsolatok, együttműködések fűznek az intézet számos csoportjához, így köszönet illeti Raskó István, Gyurkovics Henrik, Sipos László, Erdélyi Miklós, Andó István, Ádám Géza és Udvardy Andor csoportját. Külön öröm számomra, hogy gyümölcsöző együttműködést alakítottunk ki a PTE Biofizika tanszékén Dr. Nyitrai Miklóssal. A határokon túl együttműködünk Marek Mlodzik (Mount Sinai School of Medicine, New York), Francois Karch (Genfi Egyetem), Michael Boutros (DKFZ, Heidelberg), Andreas Prokop (University of Manchester), Maria Dominguez (Alicantei Egyetem, Spanyolország), Andreas Jenny (Albert Einstein College of Medicine, New York) és John Sparrow (University of York) laboratóriumával, köszönet illeti mindnyájukat.



## 5. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

### 5.1. A doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények listája (IF: impakt faktor)

1. Boutros, M., **Mihaly, J.**, Bouwmeester, T. and Mlodzik, M. Signaling specificity by Frizzled receptors in *Drosophila*. **Science** 288, 1825-1828 (2000), (IF: 23.872)
2. **Mihaly, J.**, Kockel, L., Gaengel, K., Weber, U., Bohmann, D. and Mlodzik, M. The role of the *Drosophila* TAK homologue dTAK during development. **Mechanisms of Development** 102, 67-79 (2001), (IF: 3.687)
3. **Mihaly\***, J., Matussek T. and Pataki Cs. Diego and friends play again. Old planar cell polarity players in new positions. **FEBS Journal** 272: 3241-3252 (2005), (IF: 3.164)
4. Matussek, T., Djiane, A., Jankovics, F., Brunner, D., Mlodzik, M. and **Mihály\***, J. The *Drosophila* formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton. **Development** 133: 957-966 (2006), (IF: 7.764)
5. Weber U, Pataki C, **Mihaly, J.** and Mlodzik M. Combinatorial signaling by the Frizzled/PCP and Egfr pathways during planar cell polarity establishment in the *Drosophila* eye. **Dev. Biol.** 316:(1) 110-123 (2008), (IF: 4.416)
6. Matussek, T., Gombos, R., Szécsényi, A., Sánchez-Soriano, N., Czibula, A., Pataki, C., Gedai, A., Prokop, A., Raskó, I. and **Mihály\***, J. Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth. **J. Neurosci.** 28: 13310-13319 (2008), (IF: 7.452)
7. Pataki C, Matussek T, Kurucz E, Andó I, Jenny A. and **Mihály\* J.** *Drosophila* Rab23 is Involved in the Regulation of the Number and Planar Polarization of the Adult Cuticular Hairs. **Genetics** 184: 1051-1065 (2010), (IF: 3.889)
8. Barko S, Bugyi B, Carlier MF, Gombos R, Matussek T, **Mihaly J.** and Nyitrai M. Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of *Drosophila* DAAM. **J. Biol. Chem.** 285: 13154-13169 (2010), (IF: 5.328)

\* Hivatkozási szerző

**Az értekezésben tárgyalt közlemények száma: 8**

**Az értekezésben tárgyalt közlemények összesített impakt faktora: 59,572**

### 5.2. Egyéb közlemények

1. **Mihaly, J.**, Hogga, I., Gausz, J., Gyurkovics, H. and Karch, F. In situ dissection of the *Fab-7* region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a *Polycomb*-response element. **Development** 124, 1809-1820 (1997), (IF: 9.781)
2. **Mihaly, J.**, Hogga, I., Barges, S., Galloni, M., Mishra, R.K., Hagstrom, K., Muller, M., Schedl, P., Sipos, L., Gausz, J., Gyurkovics, H. and Karch, F. Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex. **CMLS, Cellular and Molecular Le Sciences** 54, 60-70 (1998), (IF: 1.545)
3. Sipos, L., **Mihaly, J.**, Karch, F., Schedl, P., Gausz, J. and Gyurkovics, H. Transvection in the *Drosophila Abd-B* domain: extensive upstream sequences are involved in anchoring distant *cis*-regulatory regions to the promoter. **Genetics** 149, 1031-1050 (1998), (IF: 4.450)
4. **Mihaly, J.**, Mishra, R.K. and Karch, F. A conserved sequence motif in *Polycomb*-response elements. **Molecular Cell** 1, 1065-1066 (1998), (IF: 12.400)
5. Barges, S., **Mihaly, J.**, Galloni, M., Hagstrom, K., Muller, M., Shanower, G., Schedl, P., Gyurkovics, H. and Karch, F. The *Fab-8* boundary defines the distal limit of the bithorax complex *iab-7* domain and insulates *iab-7* from initiation elements and a PRE in the adjacent *iab-8* domain. **Development** 127, 779-790 (2000), (IF: 9.353)
6. Lippai, M., Tirian, L., Boros, I., **Mihaly, J.**, Erdelyi, M., Belec, I., Mathe, E., Posfai, J., Nagy, A., Udvardy, A., Paraskeva, E., Görlich, D. and Szabad, J. The *Ketel* gene encodes a *Drosophila* homologue of importin- $\beta$ . **Genetics** 156, 1889-900 (2000), (IF: 4.687)
7. Mishra, M., **Mihaly\*, J.**, Hagstrom, K., Schweinsberg, S., Barges, S., Spierer, A., Karch, F. and Schedl, P. The *iab-7* Polycomb Response Element maps to a nucleosome free region of chromatin and requires both GAGA and Pleiohomeotic for silencing activity. **Molecular and Cellular Biology** 21, 1311-1318 (2001), (IF: 9.836)
8. Hogga, I., **Mihaly, J.**, Barges, S. and Karch, F. Replacement of *Fab-7* by the gypsy or scs Insulator Disrupts Long-Distance Regulatory Interactions in the *Abd-B* Gene of the Bithorax Complex. **Molecular Cell** 8, 1145-1151 (2001), (IF: 16.611)
9. **Mihaly J**, Barges S, Sipos L, Maeda R, Cleard F, Hogga I, Bender W, Gyurkovics H, Karch F Dissecting the regulatory landscape of the *Abd- B* gene of the bithorax complex. **Development** 133: 2983-2993 (2006), (IF: 7.764)

\* Megosztott első szerzőség

**Összes közlemények száma: 17**

**Összes közlemény összesített impakt faktora: 135,999**

**Az első és utolsó szerzős közlemények összesített impakt faktora: 67,282**

**Összes hivatkozások száma: 694**

**Független hivatkozások száma: 570**

**FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

AP-1	Activator Protein 1
DAAM	Dishevelled associated activator of morphogenesis
Dsh	Dishevelled
DN	domináns negatív
Egfr	Epidermal Growth Factor Receptor
Ena/VASP	Enabled/Vasodilator-stimulated Phosphoprotein
FH1	Formin homológia domén 1
Fz	Frizzled
GOF	Gain of function
In	Inturned
JNK	Jun N-terminal kinase
LOF	Loss of function
MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
mDia1	mouse Diaphanous1
Mwh	Multiple wing hairs
PCP	Planar Cell Polarity
Pk	Prickle
Src	Sarcoma protein, RTK a Rous sarcoma vírusból
Stbm	Strabismus
Su(H)	Suppressor of Hairless
TAK	TGF- $\beta$ activated kinase
Wg	Wingless
Wnt	Wingless-int1 homológ fehérje