MTA Doktori Pályázat Doktori értekezés

A szöveti polaritás és egy új aktin sejtváz szabályozó fehérje vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben

Mihály József

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézet

Szeged 2010

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. ELŐSZÓ ÉS KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. SZÖVETI POLARIZÁLÓDÁS	7
2.1.1. Szöveti polarizálódás muslicában	8
2.1.1.1. Drosophila PCP modellrendszerek	8
2.1.1.2. Drosophila PCP gének	11
2.1.1.3. Aszimmetrikus PCP fehérje lokalizáció	13
2.1.1.4. A globális polaritási jel és a szöveti polarizálódás	
általános modellie	17
2.1.2. Szöveti polarizálódás gerincesekben	19
2.1.2.1. Konvergens extenzió	21
2.1.2.2. A belső fül érzékhámia	21
2 1 2 3 Aszimmetrikus fehérie lokalizáció	22
2.1.2.4 Policisztás vesebetegség csilló kénződés és	
hal-iobh aszimmetria	22
2125 A gerinces PCP effektor elemek a seitváz	
szabálvozásában vesznek részt	25
2.2 AZ AKTIN SEITVÁZ FELÉPÍTÉSE ÉS MŰKÖDÉSE	26
2.2. 1.2.1 A seitváz általános jellemzői és felénítése	26
2.2.1. It söjtvaz attalanos jelenízot és jelepítése 2.2.2. Az aktin filamentumok felénítése és szerveződése	20 27
2.2.2. 112 datal framentamon felepítése és szerveződése 2.2.3. Az aktin kötő fehériék	29
2.2.5. 12 ukin kolo jenerjek 2.2.4. Aktin nukleáló faktorok	31
2.2.4. Inditt hukeuto junotok 2.2.5. 47. Arn 2/3 kompler felénítése és működése	33
2.2.5. 12 mp2/5 komptex felépílése és működése 2.2.6. A Spire, a Cordon-bley és a Lejomodin fehériék szerkezete	55
2.2.0. A Spire, a Coraon-oica es a Leiomouin jenerjek szerkezete és működése	34
227 A forminok szerkezete és működése	35
2.2.7. A forminok szerkezete és műkölése 2.2.8. A DAAM alcsalád funkcionális jellemzőj	38
2.2.6. A DAAM diesuidd funkcionaiis feilem201	50
3 FRFDMÉNVFK ÉS MFCVITATÁSUK	/1
3.1 A Drosonkila Frizzlad rocantorok jalátvitali snacificitásának	71
vizsgálata	/1
vizsgalata 3.2 A Frizzlod/PCP ás oz Egfr jolátvitoli utok ogyüttműködáso	41
a Drasankila összatott szamának szövati nalarizáládása sarán	17
2 2 A Drosophila TAK homelág funkcionális vizsgálata	4/ 55
3.5. A Drosophila TAK homolog funkcionans vizsgalata 2.4. Új szöveti peleritési muténsek ezenesítése és genetikei térkénezése	33 67
3.4. Uj szöveti polaritási mutansok azonositása és genetikai terképezése 3.5. A. Droson <i>hila Pab 23</i> szöveti nelevitési funkcióiónek jellemzése	02
3.5. A <i>Drosophua Kab25</i> szöveti polaritasi fulkciojanak jenemzese 3.6. Drosophila D 4.4M mutónsok olőóllítóso és o DCD funkció vizsgólato	00 92
3.0. <i>Drosopniu DAAM</i> mutansok eloamtasa es a FCF lunkcio vizsgalata	04
3.7. A dDAAM formin nomologia domenjelnek blokemial jellemzese	80 02
5.6. A <i>dDAAM</i> szerepe a <i>Drosopnua</i> trachearendszerben	92
3.9. A dDAAM tenerje szerepe az embrionalis axon novekedes	103
szabaiyozasaban	103
3.10. A dDAAM szerepe az adult központi idegrendszerben	114
3.11. A forminok DAAM alcsaladja evoluciosan konzervalt szerepet	1.0.0
jatszik az axon növekedes során	120
4. ÖSSZEFOGLALÁS	124

4. ÖSSZEFOGLALÁS

5. IRODALOMJEGYZÉK	129
6. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	151
6.1. A doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények listája	151
6.2. Egyéb közlemények	151
7. FÜGGELÉKEK	153
7.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	153
7.2 Összefoglaló táblázat a dolgozatban bemutatott PCP génekről	163
7.3 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	165

1. ELŐSZÓ ÉS KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Tudományos pályám során számos biológiai probléma kutatásával foglalkoztam, de mindegyiket összeköti, hogy Drosophila modellrendszeren végzett fejlődésbiológiai vizsgálatok voltak. Kezdetekben az MTA SZBK Genetikai Intézetében Dr. Szabad János laboratóriumában domináns nőstény steril mutációk jellemzésében vettem részt. Szakdolgozóként a ma már rég elfeledett genomiális séta módszerével klónoztam a Ketel gént, ami akkoriban még ismeretlen fehérjét kódolt, később viszont kiderült, hogy a Drosophila importin-β homológot azonosítja. PhD hallgatóként a Genfi Egyetemen Dr. Francois Karch laboratóriumában a *Drosophila* bithorax-komplex vizsgálatával foglalkoztam, ami a fejlődésbiológiai modellrendszerek egyik klasszikus példáját szolgáltatja. Ez a rendkívül bonyolult felépítésű gén komplex évtizedeken keresztül a gén reguláció és a kromatinszintű szabályozás vizsgálatának vezető modellrendszere volt. Időközben ugyan más tudományos problémák is elkezdtek foglalkoztatni, de a "bithorax hatás" megmaradt és Dr. Gyurkovics Henrik és Dr. Sipos László kollégámmal együttműködve a mai napig is végzek bithorax-os kutatásokat. Posztdoktori éveim alatt Dr. Marek Mlodzik laboratóriumában (EMBL, Fejlődésbiológiai Program) a szöveti polaritás tanulmányozásával kezdtem el foglalkozni. Arra kerestük a választ milyen gének, milyen jelátviteli rendszerek irányítják az epidermális képletek szigorúan szabályozott elrendeződését, vagy mi határozza meg egy sejtcsoport polarizált mozgását? Az EMBL-ből hazatérve Dr. Gausz János csoportjához csatlakoztam az MTA SZBK Genetikai Intézetében, de félig már "szabad emberként", hiszen folytathattam posztdoktori munkámat, a polaritási gének jellemzését. Ez néhány évvel később elvezetett bennünket egy formin típusú aktin sejtváz szabályozó fehérje részletes jellemzéséhez, amit már formálisan is önálló témavezetőként irányítottam.

Az MTA doktori cím elnyerése céljából írt értekezésemben két ontogenetikailag egymáshoz kapcsolódó tudományos témában végzett vizsgálatainkat foglalom össze az elmúlt tíz-tizenkét évben végzett kutatásaink alapján. Ez magában foglalja korábbról ismert és újonnan azonosított polaritási gének jellemzését és egy érdekes szövetspecifikus funkciókkal bíró aktin sejtváz szabályozó fehérje részletes biofizikai, biokémiai és sejtbiológiai jellemzését. Az aktuálisan vizsgált biológiai problémák ugyan széles spektrumot fednek le, de kiinduló pontjuk minden esetben a szöveti polaritás vizsgálatához köthető. További szoros összekötő kapocs közöttük, hogy vizsgálataink minden esetben a *Drosophila* genetikai és sejtbiológiai eszköztár széleskörű alkalmazására épülnek.

4

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. Ők biztosították, hogy tanult, világlátott ember lettem, és ők neveltek a munka és az emberi tisztesség becsületére, ami minden emberi és tudományos közösség alapja.

Tudományos indíttatásom kitűnő egyetemi tanáraimnak köszönhető. A genetika tudományára Dr. Maróy Péter és Dr. Gausz János okított, de az ő kiváló előadásaikon kívül nagy hatással voltak rám Dr. Udvardy Andor, Dr. Duda Ernő és Dr. Venetianer Pál speciális kollégiumai is. Gyakorlati téren első szárnypróbálgatásaim Udvardy Bandi laborjában voltak, aki megtanított a molekuláris biológia alapjaira, a precíz, pontos munkára és tudományos elhivatottságával követendő emberi példát mutatott mindnyájunknak számára. Aztán mégsem biokémikus, hanem muslica fejlődésbiológus lett belőlem, ami főként Dr. Szabad Jánosnak köszönhető. János lebilincselő előadásai hatására döntöttem el, hogy én is ezen a területen szeretnék dolgozni. Laboratóriumában Dr. Török István, Baksa Katalin, Máthé Endre és Erdélyi Miklós egyengették a fejlődésemet. Egyben tagja lettem az SZBK Drozis közösségének, ahol pezsgő szellemi és inspiráló tudományos légkör uralkodott Gyurkovics Henrik, Gausz János, Kiss István, Sipos László, Hoffmann Gyula és Török Tibor részvételével. Őszinte hálával tartozom mindannyijuknak, hogy befogadtak és barátságukkal azóta is kitüntetnek.

A szakdolgozó évek után a Genfi Egyetemen kezdtem el PhD tanulmányaimat Dr. Francois Karch laboratóriumában. Szerencsésnek érzem magam, hogy a bithorax kutatások egyik vezető laboratóriumában és a Denis Duboule nevével fémjelzett nagyszerű fejlődésbiológiai intézetben töltöttem az inas éveket. Francois bizalma és támogatása elengedhetetlen volt abban, hogy nemzetközi szintű kitekintésem lett tudományterületemre. Munkatársaim és barátaim, Stephane Barges, Rakesh Mishra, Kostas Kaloulis, Francesco DeRubertis, Daniel Pauli, Guisy Pennetta, Takashi Kondo és Zákány József környezetében kialakult a magas tudományos minőség iránti igényem és a részletekre is kiterjedő tudományos szemléletem, ami azóta is meghatározza tudományos gondolkodásomat. Nem hallgathatom el, hogy a genfi évek alatt szakvezetőm Francois Karch személyében is egy nagyszerű barátra tettem szert, de mellette Gyurkovics Henrik is igazi mentorom volt, nélküle talán picivel kevésbé szép emlékeket őriznék a Lac Leman partjáról.

5

Posztdoktori éveimet az EMBL-ben töltöttem Dr. Marek Mlodzik laboratóriumában. Európa egyik vezető molekuláris biológiai intézetében, egy kiváló fejlődésbiológiai intézetben, egy nagyszerű témavezető mellett kezdtem új téma vizsgálatába. Közvetlen munkatársaim, Michael Boutros, Manolis Fanto, Ursula Weber, Jennifer Curtiss és Christina Blaumueller sokat segítettek abban, hogy gyorsan beletanuljak a muslica "szemészeti" kutatásokba. Az EMBL persze egy sokkal-sokkal nagyobb, de rendkívül összetartó és tudomány központú család volt, és mi ex-EMBL-esek mindenhová a heidelbergi intézet szellemiségét szeretnénk elvinni. Én haza akartam hozni belőle egy keveset, így kerültem vissza az SZBK Genetikai Intézetébe, ahol Igazgató Urunk, Dr. Raskó István továbbá Erdélyi Miklós és Gausz János támogatásával hamarosan önálló témavezető lettem.

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 segítették, ill. segítik a munkámat. Hálás vagyok nagyszerű asszisztenseinknek, Csendesné Rehák Annának, Berente Anikónak, Bozsó Szilviának, Ördög Edinának és Velkey Ildikónak a biztos technikai háttér megteremtéséért. 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, ami szélesítette látókörünket és összeköt minket a nagy hagyományokkal rendelkező hazai aktin kutatásokkal. Az értekezés Eredmények részében az egyik fejezet a pécsi biofizikusokkal közösen elvégzett munkát foglalja össze. A határokon túl együttműködtünk 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. Ezek a kapcsolatok összekötnek bennünket a nemzetközi tudományos véráramlatokkal és jelentősen bővítik szakmai és pályázati lehetőségeinket.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. SZÖVETI POLARIZÁLÓDÁS

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, míg az idegrendszer működésének alapja az axonális és dendritikus nyúlványok differenciált aktivitása. 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 [1], majd néhány évvel később David Gubb és Antonio Garcia-Bellido a közönséges ecetmuslica (Drosophila melanogaster) kutikuláris szőreinek polaritási mintáját érintő mutációk genetikai analízisével teremtette meg a tudományterület alapjait és definiálta a szöveti polaritás fogalmát [2]. A Drosophila szárnyát, potrohát és notumát (a tor hátoldalát) borító kutikuláris képletek, ill. az összetett szem polaritási mintáját meghatározó faktorok vizsgálata évtizedekig a terület vezető modell organizmusává tették a muslicát. A kezdeti kísérleteket hamarosan szisztematikus mutánsizolálási kísérletek követték, majd molekuláris és funkcionális vizsgálatokkal azonosították és jellemezték a szöveti polaritás kialakításában szerepet játszó legfontosabb géneket [3,4,5]. Időközben magasabb rendű modell szervezeteken végzett vizsgálatok bebizonyították, hogy a gerincesek egyedfejlődésének számos aspektusa planáris polarizálódási folyamatnak tekinthető. Példaként említhető a belső fül érzékhámja, 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

7

szabályozásában ugyanazok a gének, ugyanazok a jelátviteli utak játsszák a legfontosabb szerepet, mint a muslicák szöveti polaritásának kialakításában [6,7,8]. Legújabban pedig az is nyilvánvalóvá vált, hogy a PCP faktorok mutációi fontos szerepet játszanak súlyos emberi fejlődési rendellenességek és betegségek kialakulásában [9], ezáltal a szöveti polaritás vizsgálata nem "csupán" egy érdekes biológiai probléma megoldását célozza, hanem fontos biomedikai jelentőséggel is bír.

2.1.1. Szöveti polarizálódás muslicában

2.1.1.1. Drosophila PCP modellrendszerek

Az adult ecetmuslicák jó néhány szövete könnyen észlelhető planáris polaritási mintát mutat. Közülük is kiemelkedik az egyszerű szöveti felépítéssel bíró szárny, amely a legbehatóbban tanulmányozott és legmélyebben megértett PCP modell rendszernek tekinthető. A szárnylemezt egy dorzális és egy ventrális epitéliális sejtréteg építi fel. A pupális (báb) állapot során a hatszögletű szárnysejtek mindegyikén kifejlődik egy aktin és mikrotubulus sejtváz elemekben gazdag kitüremkedés ami a sejtek disztális csúcsában iniciálódik és disztális irányba növekszik. Ennek eredményeként az adult szárnysejtek mindegyike hordoz egy sejtnyúlványt, egy ún. trichómát ami disztális irányba mutat a szárny teljes felületén (1. ábra). A PCP jelátviteli rendszer hibás működése esetén a trichómák a disztális csúcsi régió helyett a sejtek közepén iniciálódnak, emiatt orientációjuk gyakran eltér a disztálistól és az is előfordul, hogy egy sejtben több mint egy (akár 4-5) abnormális orientációjú trichóma képződik (1. ábra) [10]. A potroh kutikulát alkotó tergit, sternit és pleurális lemezeken szintén trichómákat figyelhetünk meg, és ezek orientációja is kitüntetett amennyiben minden trichóma a poszterior irányba néz. A PCP faktorok hibás működése ebben az esetben is trichóma orientációs hibákat okoz [11].

A trichómák mellett a tergit és sternit lemezek nagyobb méretű érzékszőröket is hordoznak csakúgy, mint az adult epidermisz egyéb területei, így pl. a notum. Ezek a szőrök tulajdonképpen egy négy sejtből álló egyszerű érzékszerv részei, amely szintén a báb állapot során alakul ki egy ún. érzékszerv prekurzor sejt (SOP) kétszeri aszimmetrikus sejtosztódása után. Az érzékszőrök a toron és a potrohon egységesen a poszterior irányba mutatnak (**1**. **ábra**). A PCP jelátviteli út hibái nem befolyásolják a SOP sejtek osztódásának aszimmetrikus jellegét, és ezáltal az utódsejtek sejtsorsát, ellenben megváltoztatják a szőrsejtek orientációját, ami véletlenszerűvé válik az anterior-poszterior (A-P) testtengelyhez képest (**1. ábra**). Mára bebizonyosodott, hogy az érzékszőrök orientációját elsődlegesen a prekurzor sejtek osztódási

síkjának az iránya határozza meg, és a PCP rendszer ebben az esetben a mitotikus orsó és az aszimmetrikusan felhalmozódó sejtsors determinánsok elrendeződését koordinálja az A-P tengelyhez képest [12,13,14].



1. ábra: Szöveti polaritás a szárnyon és a notumon. (A) Egy vad típusú Drosophila trichómákkal borított szárnyfelszínének egy részlete. Látható, hogy a szárnyszőrök egy irányba mutatnak, ami a disztális iránynak felel meg. (B) Egy fz mutáns szárny, amelyen rosszul orientálódott trichómák figyelhetők meg. (C) Egy in mutáns szárny, ahol az orientációs hibák mellett kettőshármas szőrkinövéseket vehetünk észre. Az A-C paneleken a bal oldali a proximális, a jobb oldali a disztális irány. (D) Egy vad típusú notum poszterior irányba mutató érzékszőrökkel. (E) Egy fmi mutáns notumon az érzékszőrök egy része hibás orientációt mutat.

Végezetül a szöveti polarizálódás egy másik, az előzőekhez képest kevésbé nyilvánvaló és egyben jóval komplexebb példája a muslicák (és egyéb Diptera fajok) összetett szemének dorzo-ventrális (D-V) tükörszimmetriája. A felnőtt muslicák összetett szemét kb. 800 egyszerű szem (ommatídium vagy facetta) alkotja. Minden ommatídium húsz sejtből épül fel amelyek között megtaláljuk a fényérzékelésért felelős fotoreceptor sejteket, a lencsetermelő sejteket és a pigmentsejteket. Ezek együttesen egy aszimmetrikus és egyben királis sejtcsoportot alkotnak (2. ábra), ahol az aszimmetriát az R3-as és R4-es jelű fotoreceptor sejtek elhelyezkedése okozza. Az ommatídiumok elrendeződése mind az A-P, mind a D-V tengelyekhez képest szigorúan szabályozott. Érdekes módon a szem dorzális felében kizárólag az egyik, míg a szem ventrális felében kizárólag az ellenkező kiralitást mutató ommatídiumok fordulnak elő. Így a muslicák összetett szemének dorzális és ventrális felei egymás tükörképének felelnek meg, ahol a tükrözési tengely a D-V középvonallal (egyenlítő v. equator) esik egybe (2. ábra). A facettákon belül mindig az R3 sejt helyezkedik el az elülső-poláris oldalon, míg az R4 fotoreceptort a hátulsó-egyenlítői oldalon találjuk (2. ábra). Ez a facetta elrendeződés már a szem fejlődésének korai időszakában, az imágó korongokban (imaginális diszkuszokban) kialakul (2. ábra). A szem imaginális korongjai a

muslica egyedfejlődésének harmadik lárvális stádiumáig egyrétegű, differenciálódás előtt álló epitéliális sejtek halmazából állnak, amelyek a felnőtt állatok összetett szemének prekurzor sejtjei. A harmadik lárvális stádium végén, amikor az imaginális differenciáció megkezdődik a szemdiszkuszban, fotoreceptor sejtcsoportok differenciálódnak. Ezek a még nem teljesen differenciálódott, és eredetileg szimmetrikus képződmények a szomszédos R3/R4 sejtpár csoporton belüli elmozdulásával fokozatosan aszimmetrikussá válnak, és 90 fokos szögben elfordulnak eredeti tengelyükhöz képest (**2. ábra**). A fordulás iránya ellentétes a szem dorzális, ill. ventrális felében, így kialakul a már említett tükörszimmetrikus elrendeződés [15]. A PCP fehérjék kitüntetett szerepet játszanak mind az R3/R4 sejtsors meghatározásában, mind pedig az ommatídium rotáció szabályozásában, hiszen hibás működésük esetén szimmetrikus (R3/R3 vagy R4/R4 típusú) ommatídiumok jöhetnek létre, ill. az ommatídiumok nem a megfelelő irányba vagy nem a megfelelő mértékben fordulnak el (**2. ábra**) [16,17].



2. ábra: Szöveti polaritás az összetett szemben. (A) Egy vad típusú *Drosophila* összetett szemének tangenciális metszete. Jól kirajzolódnak a pigmentsejtekkel határolt ommatídiumok, amelyeken belül sötéten festődnek a fényérzékelő sejtek fotopigmentekben gazdag rabdomerjei. Egy-egy ommatídiumon belül a rabdomerek királis, trapézoid alakot formálnak, amelyek egymás tükörképi párjai a dorzális, ill. a ventrális szemmezőben. A vastag fekete vonalakkal jelzett tükörtengely megfelel a dorzo-ventrális középvonalnak (egyenlítő). Balra az anterior, jobbra a poszterior, fölfelé a dorzális, alulra a ventrális irány esik. (B) Az ommatídiumot felépítő sejtek kezdetben szimmetrikus sejtcsoportot alkotnak, ami aszimmetrikussá válik az R3 (zölddel jelölve) és R4 (pirossal jelölve) fotoreceptor sejtek differenciálódásával, majd azok egymáshoz képesti elmozdulásával. Egyidejűleg a sejtcsoport egy 90 °-os rotációs mozgáson is átmegy, amelynek ellentétes az iránya az egyenlítő két oldalán. (C) PCP mutánsokban a szem tükörszimmetriája sérül, ami megnyilvánulhat rotációs hibákban, szimmetrikus ommatídiumok keletkezésében és dorzo-ventrális inverziókban. Ezeket a hibákat kinagyítva mutatja a D panel.

Mindezek alapján világossá vált, hogy a PCP rendszer sejtbiológiai szinten egymástól gyökeresen különböző folyamatok összehangolására képes, hiszen a trichómák esetében a sejtváz aktiváció helyét, az érzékszőrök esetében az osztódási orsó irányát, míg az összetett szemben a sejtsorsot és egy sejtcsoport forgását határozza meg. Hogyan működhet egy ilyen rendkívül általános hatású szabályozási mechanizmus? Az erre vonatkozó elképzelések részletei ugyan sokat finomodtak az elmúlt évek intenzív kutatásai nyomán, de tulajdonképpen hosszú ideje elfogadott az a nézet miszerint a szöveti polaritás kialakulása három fontos lépésre bontható [18,19]. Elsőként egy az adott szövet általános polarizálódási irányát kijelölő polarizáló jel keletkezik, ami a szövet teljes területén, mintegy globális polaritási információként szolgál. A következő lépésben a polarizáló jel érzékelése és továbbítása történik szövetspecifikus effektorok felé, amelyek a harmadik lépés során létrehozzák a megfelelő sejtválaszokat, tehát a polarizálódás megtörténik az egyedi sejtek szintjén is.

2.1.1.2. Drosophila PCP gének

Melyek azok a faktorok amelyek szükségesek a szövetek síkbeli polarizálódásához? Az elmúlt évtizedek során muslicákban számos olyan gént azonosítottak amelyek mutációi elrontják az epitéliális képletek szigorúan szabályozott irányultságú elrendeződését [3,8,20]. Ezeket a géneket szöveti polaritási vagy PCP géneknek nevezzük (lásd összefoglaló táblázat a 163. oldalon). Fenotípus analízis alapján a több tucatnyi ismert PCP gént három fő csoportba sorolhatjuk, amelyek megfelelnek a szöveti polarizálódás három fő fázisának. A PCP gének első csoportjába a fat (ft), dachsous (ds), four-jointed (fj) és atrophin (atro) gének tartoznak. A Ft/Ds csoport tagjai közül a ft és a ds nagyméretű atipikus cadherin molekulákat, a fj egy II típusú Golgi transzmembrán fehérjét, míg az *atro* egy transzkripcionális ko-represszort kódol [21,22,23,24,25,26,27]. A Ft/Ds csoport tagjainak közös jellemzője, hogy minden vizsgált szövetben szükségesek a megfelelő polaritási minták kialakulásához. Mutációik jellegzetesen polaritás inverziókat okoznak, ami jól megfigyelhető mind a szárnyon, mind az összetett szemben [21,28,29,30,31]. Ezen kívül nem-sejtautonóm hatásuk is van, ami azt jelenti, hogy pl. egy *ft* mutáns sejtklón a szomszédságában elhelyezkedő ft^+ sejtek polaritását is képes megváltoztatni. Ezek alapján a Ft/Ds csoport tagjai a teljes szövetre kiterjedő, globális polaritási információ meghatározásában vesznek részt, ami sejt-sejt kommunikációs folyamatokat is magában foglal.

A polaritási gének második csoportjába soroljuk a frizzled (fz), strabismus (stbm) vagy más néven Van Gogh (Vang), flamingo (fmi) vagy más néven starry night (stan), dishevelled (dsh), prickle (pk) és diego (dgo) géneket. Tekintve, hogy ezek a gének is minden vizsgált szövettípusban és testtájon szükségesek a vad típusú polaritási mintázat kialakulásához [5,32,33,34,35,36,37,38,39], és mert történetileg a fz és dsh gének voltak az első részletesen is tanulmányozott PCP gének, ezt a csoportot összefoglalóan elsődleges polaritási géneknek nevezzük (az angol szakirodalom a core polarity gene kifejezést használja). A fz gén a Wingless/Wnt típusú ligandok receptorát kódolja [40], és ismert, hogy a PCP jelátvitel során egy a kanonikus β-katenin-TCF/LEF függő Wnt jelátviteli úttól független úton fejti ki hatását [41,42,43]. A Dsh három funkcionális domént (PDZ, DEP és DIX) tartalmaz és a Fz-hez hasonlóan szintén esszenciális eleme mind a kanonikus Wnt jelátviteli útnak, mind pedig a PCP jelátviteli útnak [44,45]. A stbm egy membrán fehérjét kódol [36,39], csakúgy mint az atipikus cadherint kódoló *fmi* gén [38], a *pk* három LIM domént és egy PET domént tartalmazó fehérjét [34], míg a dgo egy Ankyrin motívumokat hordozó fehérjét kódol [33]. Az elsődleges polaritási gének közül tehát a fz, a stbm és a fmi transzmembrán fehérjét, míg a másik három gén citoplazmatikus, de membrán asszociációra képes fehérjét kódol. Mai tudásunk alapján az elsődleges PCP fehérjék részt vesznek a globális polaritási információ érzékelésében és aszimmetrikus szubcelluláris felhalmozódásukkal hozzájárulnak egy sejten belüli polarizáció kialakulásához (az aszimmetrikus lokalizáció részleteit lásd a következő alfejezetben). Azt is tudjuk azonban, hogy ezeken a sejtautonóm funkciókon kívül a transzmembrán fehérjéket kódoló polaritási gének, tehát a fz, a stbm és a fmi, nemsejtautonóm funkcióval is bírnak és részt vesznek a szomszédos sejtek közötti kommunikációs folyamatok szabályozásában is [3,46,47]. Fontos megfigyelés, hogy a sejtautonóm és nemsejtautonóm fz és stbm funkciók időben jól elválaszthatók egymástól amennyiben a nemsejtautonóm funkcióra a bábállapot kezdetén, míg a sejtautonóm funkcióra csak órákkal később, a trichóma iniciációt közvetlenül megelőző időszakban van szükség [46]. Együttesen ezek az eredmények azt jelzik, hogy a fz, stbm és fmi gének két egymástól jól elkülönülő funkcióval bírnak, egyrészt hozzájárulnak a globális polaritás meghatározásához, másrészt szükségesek a globális polaritási információ sejten belüli polaritássá történő átalakításához.

Végezetül a PCP gének harmadik csoportjába a gyakran szövetspecifikus módon működő PCP effektor elemeket (PEE), ill. az elsődleges PCP génekhez képest alsóbb szinten ható géneket soroljuk, amelyek ténylegesen részt vesznek a morfológiailag is detektálható polarizált sejten belüli struktúrák (pl. trichómák) kialakításában. Ez egy viszonylag sok tagot számláló és funkcionálisan vegyes géncsoport, ezért az alábbiakban a teljesség igénye nélkül

csak a legbehatóbban tanulmányozott szárny szövet és az összetett szem ismert effektor elemeit foglalom össze. Az inturned (in), fuzzy (fy) és fritz (frtz) gének (együttesen az ún. Inturned csoport) mutációi csak a szárnyon és notumon okoznak polaritási hibákat [10,48,49,50,51]. Nevezetesen a szárnysejteken egyetlen disztális orientációjú trichóma helyett két-három azonos méretű, de rosszul orientálódott szárnyszőr figyelhető meg, míg a notumon az érzékszőrök irányultsága válik abnormálissá. A multiple wing hairs (mwh) gén mutációi egy GBD és FH3 doméneket tartalmazó fehérjét érintenek [52,53], és kizárólag a szárnyszőrök számát és orientációját változtatják meg, de ellentétben az Inturned csoport mutációival, sejtenként akár öt-hat különböző méretű trichóma is megfigyelhető az mwh szárnyakon. Ezek a fenotípusok jól jelzik, hogy az Inturned csoport és a Mwh oly módon járulnak hozzá a szárnysejteken belüli polaritás kifejeződéséhez, hogy a sejtek disztális csúcsán kívüli területeken megakadályozzák az aktin felhalmozódást és a szőr iniciációt. Rajtuk kívül említést érdemelnek még a sejtváz szabályozó RhoA és Drok (Drosophila Rho kinase) fehérjék, amelyek szintén a sejtenkénti trichóma szám szabályozásához járulnak hozzá [43,54], és a miozin II (Zipper), ill. a miozin szabályozó MRLC/Sqh fehérjék [54]. Az összetett szem esetében genetikai interakciós kísérletek segítségével a RhoA és drok géneken kívül a Rac és Cdc42 kis mólsúlyú GTP-ázokat és az élesztő STE20 homológ Misshapen (Msn) kinázt is Fz/Dsh alsó elemként azonosították [55,56]. A Fz/Dsh PCP jelátviteli út egy további feltételezett eleme pedig a JNK (Jun N-terminális Kináz) kaszkád [45,57], ami a transzkripciós faktorként működő Jun fehérje aktiválódását eredményezi. Végezetül a nemo (nmo) gén által kódolt kináz említhető, ami az ommatídiális rotáció szabályozásában vesz részt szem-specifikus végrehajtó elemként [58]. Látható tehát, hogy a szárny esetében az effektor elemek a sejtváz szabályozásán keresztül fejtik ki hatásukat, míg a bonyolultabb felépítésű szem esetében a direkt sejtváz módosítás mellett fontos szereppel bírhat a transzkripciós szintű szabályozás is.

2.1.1.3. Aszimmetrikus PCP fehérje lokalizáció

A PCP gének azonosítása majd klónozása után, a tudományterület legnagyobb hatású felfedezése a polaritási fehérjék sejten belüli aszimmetrikus felhalmozódásának kimutatása volt. A kezdeti lokalizációs kísérletek az elsődleges PCP fehérjék vizsgálatára irányultak és bebizonyították, hogy ezek a fehérjék szubcellulárisan polarizált felhalmozódást mutatnak a szárnysejtekben, az SOP sejtekben és az ommatídiumok R3/R4 fotoreceptor sejtjeiben is [33,38,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71]. A PCP fehérjék eloszlására vonatkozó

részleteket itt most csak a szárny példáján fogom bemutatni, mert egyrészt ezt a modell rendszert ismerjük legjobban, másrészt az SOP és a fotoreceptor sejtekben a szárny esetének szinte teljesen megfeleltethető folyamatok játszódnak le.

Szárnysejtek esetén a trichómák a bebábozódás után kb. 32-36 órával kezdenek kifejlődni aktin kötegekben gazdag szőrkezdeményként. Az elsődleges PCP fehérjék sejten belüli elhelyezkedését érintő első lényeges felismerés az volt, hogy ezek a fehérjék a fejlődő bábszárny sejtjeiben (a trichóma képződést megelőző időszakban) az apiko-laterális membrán mentén halmozódnak fel, nagyjából az adherens junkciók magasságában. Később kimutatták, hogy az apikális lokalizáció a normális PCP jelátvitel szükséges előfeltétele mert a mesterségesen a bazális membrán doménbe targetált PCP fehérjék (így pl. Fz) nem voltak képesek menekíteni a megfelelő fehérje hiányát [72]. Ennél is érdekesebb megfigyelés volt azonban, hogy az elsődleges PCP fehérjék a bábképződés után 24 órával ugyan még egyenletes eloszlást mutattak a sejtmembrán mentén, de közvetlenül ezután átrendeződtek és a bábképződés utáni 24-32 órás periódusban markáns proximo-disztális (P-D) polarizációt mutattak (3. ábra). Ez a polarizáció csak erre az időszakra korlátozódik, mert a bábképződés után 36 órával már nem mutatható ki, bár a PCP fehérjék apikális lokalizációja fennmarad. Tehát a kezdeti vizsgálatok alapján a PCP fehérjék aszimmetrikus felhalmozódása kizárólag a trichóma iniciációt közvetlenül megelőző néhány órás periódusra korlátozódik, de ez az elrendeződés feltétlenül szükséges a megfelelő iniciációhoz. Ebben az időszakban a Fz, Dsh és Dgo fehérjék a disztális oldalon halmozódnak fel, a Stbm és Pk fehérje a proximális oldalon található, míg a Fmi mind a proximális mind a disztális oladalon kimutatható, de a többi fehérjéhez hasonlóan erősen csökkent szintet mutat az A-P membránok mentén.

A különböző PCP mutánsokon végzett fehérje lokalizációs kísérletek kimutatták, hogy a hat elsődleges PCP fehérje lokalizációja egymás jelenlététől függ [59,60,61,62,67,68,73], vad típusú elrendeződés csak akkor valósul meg, ha mind a hat fehérje rendelkezésre áll (**3. ábra**). Ezek az eredmények azt sugallták, hogy az elsődleges polaritási fehérjék egymással komplexeket alkotva működnek. Ezzel összhangban, fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatával kimutatták, hogy a Fz képes a Dsh fehérjét kötni és elősegíti annak membrán asszociációját [44,74]. A Stbm és Pk fehérjék közötti kölcsönhatás is kimutatható volt, ugyanakkor a Dgo fehérje a Pk, a Stbm és a Dsh fehérjékkel is kölcsönhatásba lép, míg a Dsh-Pk és Dsh-Stbm interakciókat szintén kimutatták [60,61,63]. Részletesebb fenotípus analízissel azt is ki lehetett mutatni, hogy a különböző PCP fehérjék eltérő szerepet játszanak a sejten belüli lokalizáció szabályozásában. Így például a Fz, Stbm vagy Fmi fehérjék hiánya megakadályozza a többi fehérje apikális lokalizációját (**3. ábra E**), míg a citoplazmatikus

fehérjéket kódoló PCP gének mutánsai csak a többi fehérje aszimmetrikus elrendeződését akadályozzák meg (**3. ábra D**) [75]. Ezek a figyelések azt jelezték, hogy az elsődleges



3. ábra: Az elsődleges PCP fehérjék lokalizációja a szárnyban. (A) A hat elsődleges PCP fehérje a bebábozódás után 24 órával (24h APF) még egyenletesen oszlik el az apiko-laterális membrán mentén, később (32h APF) relokalizálódnak és bizonyos fehérjék a proximális, más fehérjék a disztális oldalon halmozódnak fel. (B) A Fz fehérje eloszlása 24 órás bábszárnyban még nem polarizált, de 32 órásban már igen (C). (D) 32 órás *dsh* mutáns bábszárnyban a Fz aszimmetrikus felhalmozódása sérül, míg (E) *fmi* mutánsban az apiko-laterális lokalizáció sem detektálható.

polaritási fehérjék sejten belüli eloszlása két egymásra épülő lépcsőből áll: a fehérjék először az adherens junkciók zónájában dúsulnak fel, majd később aszimmetrikus eloszlású komplexekbe rendeződnek át. A transzmembrán proteinek (Fz, Stbm és Fmi) elősegítik a citoplazmatikus Dsh, Dgo és Pk fehérjék membrán lokalizációját, amelyek viszont szükségesek a polarizált komplexek képződéséhez és/vagy fenntartásához. Az már a korábban említett kísérletek alapján is világos volt, hogy a sejtek disztális oldalán egy Fz-Dsh komplex stabilizálódik, míg a proximális oldalon egy Stbm-Pk komplex alakul ki. Ezek egymáshoz képest antagonisztikus aktivitással bírnak és kizárják a másik komplex jelenlétét az adott membrándoménben. Az újabb eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a Stbm-Pk komplex a Pk-Dsh kölcsönhatáson keresztül megakadályozza, hogy a proximális oldalon stabil Fz-Dsh

komplexek alakuljanak ki, míg a disztális oldalon a Dgo fehérje a Dgo-Dsh kölcsönhatáson keresztül stabilizálja a Fz-Dsh membrán komplexet, mert megakadályozza a Pk-Dsh interakciót. Végeredményben tehát a disztális oldalon a magas Fz-Dsh jelátviteli aktivitás a korábban említett effektor elemeken keresztül elősegíti a szőr iniciációt, míg ezzel egy időben a proximális oldalon a Stbm-Pk komplex gátolja a sejtváz aktivációt (**4. ábra**) [52,76].

Az elsődleges polaritási fehérjék lokalizációjával kapcsolatos eredményeket rendkívül nagy tudományos izgalom övezte az ezredforduló időszakában, ám az azt követő évek is tartogatottak néhány meglepetést ebben a vonatkozásban. Az egyik ilyen megfigyelés az volt, hogy az elsődleges PCP fehérjék sejten belüli polarizációja már a késői harmadik stádiumos lárvák szárny diszkuszaiban és a néhány órás bábszárnyakon is megfigyelhető [77]. Később ez a minta felborul, és ahogy azt korábban már leírták, a 24-32 órás bábokban lesz újra nyilvánvaló. Egy másik megfigyelés szerint a widerborst (wdb) gén által kódolt protein foszfatáz 2A (PP2A) szabályozó alegység is aszimmetrikus lokalizációt mutat a korai pupális szárnysejtekben már a bábozódás után 8 órával [78]. A Wdb fehérje lokalizációját nem befolyásolják az elsődleges PCP gének mutációi, ellenben a wdb mutánsokban sérül az elsődleges PCP fehérjék aszimmetrikus felhalmozódása. Összegészében ezek az adatok arra utalnak, hogy az elsődleges PCP fehérjék lokalizációja is bonyolultabb szabályozás alatt áll, mint korábban gondoltuk, másrészt az elsődleges PCP fehérjéken kívüli fölső faktorok is hozzájárulnak a szárnysejtek P-D polarizációjához. Úgy tűnik tehát, hogy az elsődleges PCP fehérjék valójában csak egy morfológiailag jól látható polarizált struktúra, a trichóma képződés helyének kijelölésében elengedhetetlenek, de a sejtek tőlük függetlenül is rendelkeznek P-D polarizációs információval.

Végezetül érdekes új megfigyeléseket publikáltak a korábban kevesebb figyelmet kapó szárnyspecifikus polaritási effektor fehérjék sejten belüli eloszlásáról is. Ezekből a munkákból kiderült, hogy az Inturned csoport fehérjéi és a Mwh is polarizált felhalmozódást mutatnak a szárnysejtek proximális oldalán [52,53,79]. Összhangban a korábbi genetikai episztázis kísérletekkel, az Mwh fehérje lokalizációja függ az elsődleges PCP gének és az Inturned csoportba tartozó gének jelenlététől, míg az Inturned csoportba tartozó fehérjék megfelelő lokalizációjához szükség van az elsődleges PCP fehérjék jelenlétére és a csoport többi tagjára, viszont sem az *mwh* sem az *in* mutánsok nem zavarják meg az elsődleges PCP fehérjék sejten belüli eloszlását. További fontos adat, hogy a membrán asszociált Inturned komplex stabilizálja a sejtek proximális felében grádiens eloszlást mutató Mwh fehérjét [52], ami nagy valószínűséggel az aktin filamentumok képződését elősegítő formin fehérjék gátlására képes.



4. ábra: A PCP effektor fehérjék szerepe a szőr iniciációban. Az In/Fy/Frtz fehérjék a Stbm/Pk komplexen keresztül a proximális oldalon (P) halmozódnak fel és stabilizálják az Mwh proteint, ami grádiens szerű eloszlást mutat és gátolja az aktin polimerizációt. A disztálisan (D) felhalmozódó Fz/Dsh komplex viszont más effektorokon keresztül elősegíti a lokális sejtváz aktivációt.

Együttesen ezek az új eredmények egyértelmű bizonyítékot szolgáltattak arra vonatkozóan, hogy amíg a szárnysejtek disztális csúcsára korlátozódó Fz-Dsh jelátviteli aktivitás pozitíve elősegíti a lokális aktin felhalmozódást és ezáltal a szőr iniciációt, addig a proximális oldalon a Stbm-Pk komplex az Inturned és az Mwh fehérjéken keresztül gátolja a sejtváz aktivációt (**4. ábra**). A Fz-Dsh és a Stbm-Pk rendszer működése a szomszédos sejtek között is össze van hangolva, és a vad típusra jellemző polaritási minta csak abban az esetben alakulhat ki, ha mindkét rendszer hibátlanul működik.

2.1.1.4. A globális polaritási jel és a szöveti polarizálódás általános modellje

Az eddig tárgyalt eredmények alapján látható, hogy a sejteken belüli polarizálódási folyamatokról igen tekintélyes ismeretanyaggal rendelkezünk. A tudományterület egyik legfontosabb kérdése azonban az, vajon hogyan határozódik meg egy szövet globális polaritási mintája. Mi az a jel ami meghatározza egy szövet általános polarizálódási irányát, hogyan olvasódik ez a teljes szövetre kiterjedő polaritási információ, hogyan alakul ki a kezdeti aszimmetria? Fenotípus elemzések alapján egyetértés van abban, hogy a Ft/Ds csoport tagjai, ill. az elsődleges polaritási gének közül a nem-sejtautonóm funkcióval is bíró fz/stbm/fmi csoport bizonyosan hozzájárulnak a globális minta létrehozásához. Molekulárisan a Ft egy sejtadhéziós fehérje, ami transzmembrán receptorként is szolgál és heterofilikus interakcióba lép a szintén kadherin típusú Ds fehérjével [80,81]. A Fj pedig egy Golgi asszociált kináz ami a Ft és a Ds extracelluláris doménjeinek foszforilálásával modulálja azok aktivitását [82]. Figyelemreméltó módon a ds és fj gének transzkriptjei a szárnyban a P-D irányban, míg az összetett szemben a D-V tengely mentén mutatnak grádiens szerű eloszlást [29,80,83], ami egy szintén grádiens szerű Ft-Ds aktivitást eredményez ezekben a

szövetekben. Tekintve, hogy az összetett szemben elvégzett episztázis kísérletek azt sugallták, hogy a Ft/Ds csoport a Fz csoport fölső szabályozó elemeként működik, a kezdeti elképzelések szerint ez a Ft-Ds aktivitás grádiens szükséges és egyben elegendő ahhoz, hogy valamilyen módon kis mértékben polarizálja a Fz receptor eloszlását vagy aktivitását a sejtekben (5. ábra) [84,85,86]. A későbbiekben ez a kezdeti Fz aszimmetria a többi elsődleges PCP fehérjétől függő módon a szomszédos sejtek közötti kommunikációs folyamatok segítségével megerősödik, ami végső soron az elsődleges polaritási fehérjék erősen aszimmetrikus eloszlásához vezet. Ez a modell kétségkívül jól ötvözi a Ft/Ds és a Fz/Stbm jelátviteli modulokra vonatkozó ismeretek zömét, de több fontos kérdés nyitva maradt. Az egyik, hogy nem tudjuk mi szabályozza a ds és fj gének kifejeződését, tehát a globális szintű kezdeti aszimmetria eredete továbbra is ismeretlen. A másik, hogy nem világos hogyan fordítódik le a Ft-Ds grádiens Fz eloszlási és/vagy aktivitási grádienssé. Mivel ismert, hogy a Fz a Wnt/Wg családba tartozó ligandok receptora, elképzelhető volt, hogy a Ft egy Wnt típusú diffúzibilis ligand képződését szabályozza. Ez a hipotézis azonban valószínűleg nem állja meg a helyét, mert Drosophila-ban az intenzív vizsgálatok ellenére egyetlen olyan Wnt fehérjét sem találtak, ami alkalmas jelölt lenne. Időközben kimutatták viszont, hogy a Fz receptor családnak a Wnt fehérjéktől különböző ligandjai is léteznek [87]. Mivel azokat muslicában még nem vizsgálták, elképzelhető, hogy a Fz/PCP jelátviteli rendszert egy eddig ismeretlen ligand aktiválja. Létezik azonban egy ettől teljesen különböző elképzelés is, ami



5. ábra: A szöveti polarizálódás kialakulásának általános modelljei. A grádiens modell szerint egy diffúzibilis anyag szolgál globális polaritási jelként. Ez a jel a Ft/Ds aktivitáson és/vagy a Fz aktivitáson keresztül fordítódik le sejten belüli polaritássá. Az ún. dominó modell szerint a globális polaritási információ sejtről-sejtre adódik át lokális sejtek közötti kommunikációs mechanizmusokkal, amelyek szintén a Ft/Ds és Fz csoportok aktivitásától függnek.

azt prediktálja, hogy a Ft-Ds rendszer a mikrotubulus kötő Wdb fehérjén keresztül szabályozza a Fz fehérje sejten belüli eloszlását [85]. Szárnysejtekben kimutatták, hogy a Fz fehérje mikrotubulus asszociált vezikulákon szállítódik a sejtek disztális oldalára [88]. Mindezt összevetve azzal, hogy az elsődleges PCP fehérjék lokalizációja a *wdb* mutánsokban sérül, könnyen elképzelhető, hogy a Wdb a mikrotubulusok mentén megvalósuló vezikuláris transzport szabályozásában vesz részt. A Wdb és a Ft-Ds kapcsolat vonatkozásában viszont egyelőre nincsenek publikált adatok, ezért csak további kísérletek segítségével kapunk majd választ erre a fontos kérdésre.

Az előbbiekben ismertetett modell alapvetése az volt, hogy a Ft/Ds és Fz/Stbm jelátviteli modulok egy lineáris szabályozási rendszert alkotnak, amit a szemben elvégzett episztázis kísérletekre alapoztak [29]. Az abdomen kutikulán és a szárnyon végzett újabb kísérletek alapján azonban ez az elképzelés nem állja meg a helyét, sokkal inkább úgy tűnik, hogy ez a két fontos PCP modul egymástól függetlenül, párhuzamos utakon járul hozzá a globális polaritási minta kialakításához [89,90]. Ebben a pillanatban nem világos ezeknek az egymásnak ellentmondó konklúzióknak a magyarázata. Nem zárhatjuk ki azt az egyszerű lehetőséget, hogy a különböző szövetekben különböző mechanizmusok működnek, és a két fő PCP modul szerepe szövetről szövetre változik, de a szöveti polaritás egyéb vonatkozásokban rendkívül univerzálisnak látszó szabályozása miatt a tudományterület vezető kutatói egyelőre elvetik ezt a lehetőséget és parázs vitát folytatnak az alternatív modellekről [84,86,90,91]. Ettől függetlenül a Ft/Ds és a Fz/Stbm modulok kitüntetett szerepe nem kétséges. Véleményem szerint a legfontosabb kérdés pedig inkább úgy merül föl, mi a globális polaritási információ valódi természete? Létezik-e valóban egy morfogén szerű polaritási jelmolekula vagy a polaritási információ sejtről-sejtre adódik át és a dominó-elv szerint (5. ábra) terjed ki a teljes szövetre? Mikor determinálódik valójában a PCP? Lehetséges-e, hogy a sejtek születésüktől fogya "tudják" ezt az információt és a vizsgálataink középpontjában álló fehérjék valójában mind végrehajtó elemek, amelyek kivitelezik a szöveti differenciálódás utolsó lépéseit és morfológiai változások útján nyilvánvalóvá teszik az addig számunkra rejtett polaritási információt? Úgy gondolom a Drosophila PCP modell rendszerek alkalmasak ezeknek a kérdéseknek a vizsgálatára is, és ha a muslica genetikusok meg akarják őrizni prioritásukat a PCP területen, arra lesz szükség, hogy a kulcs kérdések megoldásában lépjenek előbbre.

2.1.2. Szöveti polarizálódás gerincesekben

Ha rápillantunk a halak pikkelyeinek vagy a madarak tollainak szigorúan szabályozott elrendeződésére, máris szembetalálkozhatunk a gerinces állatok szöveti polarizálódásának nyilvánvaló példáival. Hasonlóképpen, a belső szövetek között is ismerünk evidens példákat, hiszen a légzőrendszer vagy a női petevezeték csillós hámjának felépítése egyértelműen utal a szöveti síkban megnyilvánuló polarizálódásra. A különböző genom szekvenálási projektek után kiderült, hogy az eredetileg Drosophila-ban azonosított PCP gének szinte mindegyike evolúciósan konzervált fehérjét kódol, és innen már csak egy lépés választott el a funkcionális konzerváció bizonyításától. Ennek egyik legnyilvánvalóbb példáját az egér Fz6 mutánsok epidermiszén megfigyelhető szőr fenotípusok szolgáltatták, amelyek szembeszökő hasonlóságot mutatnak a Drosophila fz mutánsok szőr és trichóma orientációs hibáival (6. ábra) [92]. Történetileg azonban a gerinces PCP tudományterület az embriogenezis korai szakaszára jellemző, a szövetek síkjában polarizált sejtmozgások [93] és a belső fül érzékhámjának vizsgálatával kezdődött [94,95]. Manapság is ezeket tekintjük a meghatározó gerinces PCP modell rendszereknek, bár a gerinces PCP mutánsok részletesebb fenotípus analízise után kiderült, hogy az embrionális szemhéjak záródásában, a vesében található nefronok kanyarulatos csatornáinak megnyúlásában, és teljesen friss eredmények alapján a bal-jobb aszimmetria kialakulásában is [7,96,97,98] részt vesz a PCP rendszer.



6. ábra: Gerinces PCP modellrendszerek. (a) Az egér belső fülét borító érzékhám egy részelete. Minden sejt ék alakba rendeződött sztereocíliumokat hordoz, amelyek orientációja minden sejtben azonos és ily módon szabályos sorokba rendeződnek. (b) *Vangl2* egér mutánsokban a sztereocíliumok véletlenszerű irányultságot mutatnak. (c) A vad típusú egerek epidermiszét borító szőrök a végtagokon disztális irányba néznek, míg egy *Fz6* mutáns egér (d) esetében forgókat figyelhetünk meg a szőrmintában, ami igen hasonlatos a muslicák szárnyán megfigyelhető PCP fenotípusokhoz. (e) A konvergens extenziós sejtmozgások sémája. Látható, hogy a folyamat lényege a sejtek mediális irányba történő elmozdulása és interkalációja. (f) Egy vad típusú 24. stádiumú *Xenopus* embrióban a velőcső záródási defektusokat okoz (g). Az f és g paneleken *Pax3 in situ* hibridizációval tették láthatóvá a velőlemezeket. Az eredeti ábra forrása: Seifert and Mlodzik, 2007.

2.1.2.1. Konvergens extenzió

A gerinces fajok korai embrionális fejlődésének egyik jellegzetes közös vonása, hogy mezodermális és neuroektodermális eredetű sejtek populációi az embrió középvonala felé mozdulnak el, ami a sejtek interkalációja után az embrió megnyúlását eredményezi az A-P tengely mentén, és egyben karcsúsodását az oldalsó irányokban (**6. ábra**). Ezeket a szöveti síkban összehangolt, polarizált sejtmozgásokon alapuló folyamatokat, amelyek végső soron az embriók megnyúlásával járnak, konvergens extenziónak nevezzük (CE az angol convergent extension kifejezés után). Ismert, hogy a CE során a sejtek a mozgás irányában megnyúlnak, és lamellipódiumokra emlékeztető nyúlványok növesztésével polarizálódnak [93]. Főként egér, zebrahal és *Xenopus* modell rendszerek vizsgálatából kiderült, hogy az elsődleges PCP gének gerinces homológjai kivétel nélkül részt vesznek a CE szabályozásában [7,9], de rajtuk kívül a *Fat4*, az *in* és *fy* homológok szerepe is bizonyított legalább az egyik modell organizmus esetében [99,100] (**6. ábra**). A PCP gének hibás működése a konvergens extenzió során velőcső záródási problémákat okoz és nyitott gerincű embriók fejlődését eredményezi, ami egy rendkívül súlyos, gyakran halálos következményekkel járó fejlődési rendellenesség.

2.1.2.2. A belső fül érzékhámja

Az emlősök belső fülének érzékhámjában a hang és egyensúly érzékéléshez nélkülözhetetlen szőrsejteket találunk. A hallás érzékszervében, a Corti-szervben az érzéksejtek mindegyike hordoz egy csillót, egy ún. kinocíliumot az apikális felszínén, amelyet ék alakban sztereocíliumok vesznek körül (a sztereocíliumok mikrovillus-szerű, aktin gazdag sejtnyúlványok). Az érzéksejtek, ill. az ék alakba rendeződött apikális nyúlványok szabályos orientációjú sorokat alkotnak [94] (**6. ábra**), ahol a planáris polarizálódás egyértelműen megfigyelhető. Az elmúlt néhány évben leírták, hogy a muslica PCP gének egér homológjait érintő mutációk elrontják a sztereocíliumok orientációját, ami süketséget vagy halláskárosodást okoz. Ilyen fenotípust okoznak az egyik Stbm homológot kódoló *looptail* vagy *vangl2* [95], az egyik Fmi homológot kódoló *celsr1* [101], a Dsh homológokat érintő *dvl1, dvl2* kettős knock-out [102,103], a szintén kettős knock-out *Fz3, Fz6* [104] és a *Fat4* mutánsok [100]. Figyelemre méltó módon, a *Drosophila* modell rendszerhez teljesen hasonlóan, erős genetikai interakció mutatható ki a *dvl* és a *vangl2* mutánsok között [103]. Együttesen ezek az eredmények bizonyították azt a mutánsok analízisét jóval megelőző sejtést, miszerint a belső fül érzékhámja egy szöveti polarizálódási paradigmát reprezentál

[105], másrészt azt is megmutatták, hogy a szöveti polarizálódás valóban a hangérzékelés abszolúte kritikus előfeltétele.

2.1.2.3. Aszimmetrikus fehérje lokalizáció

A Drosophila PCP kutatások egyik legfontosabb megállapítása az volt, hogy a sejteken belüli aszimmetrikus PCP fehérje felhalmozódás fontos szereppel bír a szövetek síkbeli polarizációjában. A gerinces PCP modell rendszerek közül először a Corti-szerv sejtjeiben sikerült olyan molekuláris aszimmetriákat kimutatni a PCP fehérjék sejten belüli eloszlásában, amelyek hasonlóságot mutatnak a muslicában megfigyelt mintákkal. A részletekről ugyan egyelőre jóval kevesebbet tudunk, mint a Drosophila szárny esetében, de a Celsr1, Dvl2, Pk2, Fz3, Fz6 és Vangl2 fehérjék esetében a polarizáció egyértelműen kimutatható volt [103,104,106,107,108], és arra is vannak bizonyítékok, hogy a gerinces PCP fehérjék lokalizációja is kölcsönösen függ egymás jelenlététől [108]. Ezekkel a megfigyelésekkel egy időben a zebrahal Pk és Stbm homológjairól leírták, hogy azok is aszimmetrikusan halmozódnak fel a konvergens extenziós mozgásokban részt vevő neuroektodermális sejtekben [109]. Ezek a kísérleti eredmények tehát azt sugallják, hogy a PCP rendszer működése az aszimmetrikus sejten belüli felhalmozódás szempontjából is nagymértékben konzervált lehet. Ennek ellenére abban a vonatkozásban egyelőre nincs elegendő kísérleti bizonyíték, hogy a Fz-Dsh és Stbm-Pk komplexek működése, ill. eloszlása minden esetben hasonló polarizáltságot mutatna, mint a muslicák esetében. A PCP fehérjék sejten belüli eloszlásának részletes vizsgálata ezért továbbra is folytatódik, és néhány év múlva valószínűleg tisztázódik milyen mértékű a hasonlóság a különböző PCP modell rendszerek között a molekuláris aszimmetriák vonatkozásában.

2.1.2.4. Policisztás vesebetegség, csilló képződés és bal-jobb aszimmetria

A gerinces PCP kutatások egyik érdekes új iránya a PCP és vesetubulusok fejlődése közötti kapcsolat vizsgálata. Az emlősök veséjének működési egységei a nefronok, amelyek egyéb elemek mellett a kanyarulatos csatornákat is tartalmazzák. A kanyarulatos csatornák az embrionális fejlődés során sejtosztódások útján egy rendkívül nagymértékű megnyúláson mennek keresztül, anélkül, hogy az átmérőjük szignifikáns mértékben változna. Az ún. policisztás vesebetegségek (PKD) közös jellemzője, hogy a vesetubulusok megnyúlása zavart szenved, a csatornák átmérője megnő és azokon cisztás kitüremkedések jelennek meg [110].

Fischer és kollégái kimutatták, hogy a csatornák elongációját a sejtosztódások irányának szigorú szabályozása biztosítja [111]. Vad típus esetében az osztódások iránya mindig párhuzamos a csatorna hossztengelyével, míg egér és patkány PKD modell rendszerekben az osztódások iránya nagymértékben eltér ettől [111]. A sejtek osztódásának és pozíciójának ilyetén módon való meghatározását PCP jelenségnek tekinthetjük, különösen annak fényében, hogy az irányított sejtosztódások szerepe jól ismert a *Drosophila* érzékszőrök polarizálódása [14] és a zebrahal konvergens extenziós sejtmozgások során [112]. Ezt a felfogást erősíti az a megfigyelés is, hogy a PCP gént érintő *Fat4* egér mutánsok cisztás vesével fejlődnek (7. ábra), amelyben a sejtosztódások irányának koordinálása zavart szenved (7. ábra), és a *Fat4* mutánsok ebben a vonatkozásban domináns genetikai interakciót mutatnak a *Vangl2* és *Fjx* (*fj* homológ) mutánsokkal [100].



7. ábra: A *Fat4* egér mutánsok policisztás vesével fejlődnek. (a) Egy vad típusú vese metszetén Aquaporin2 (Aqp2) festéssel (piros színnel jelölve) jól láthatóvá tehetők a vese gyűjtőcsatornái. (b) Az Aqp2 pozitív csatornák sokkal rövidebbek és szélesebbek a *Fat4* mutáns egér vesében, ami egy tipikus PKD fenotípus. (c,d) *Fat4* mutánsokban (d) sejtszintű felbontás mellett is kimutatható a vesecsatornák kiszélesedése és megrövidülése. A sejthatárokat E-cadherin (E-cad) jelöli piros színnel. Az ábra eredeti forrása: Saburi et al., 2008.

A gerinces PCP terület másik izgalmas új felfedezése a szöveti polarizálódás és a csilló képződés közötti kapcsolat felismerése volt. A csillók hosszú idő óta ismert sejtszervecskék, de egészen a legutóbbi évekig főként csak a mozgásra képes csillók és ostorok vizsgálatára irányultak a kutatások. Időközben kiderült azonban, hogy a gerinces élőlények szinte minden sejtje hordoz egy immobilis, ún. elsődleges csillót. Ezeknek a csillóknak a funkcióját sokáig homály fedte, de ma már fontos érzékelő és jelátviteli funkciókat tulajdonítunk nekik, mert szerepük van a fényérzékelésben, a mechanikai stimulusok érzékelésében és a szaglásban, továbbá a Hedgehog (Hh) és a Wnt/PCP jelátviteli folyamatokban [113,114]. A csillóképződés és a PCP közötti kapcsolatra elsőként a Bardet-Biedl szindrómához köthető Bbs gének vizsgálata mutatott rá. A Bbs fehérjék a csillók alapi testéhez lokalizálódó fehérjék, amelyek a csillóképződés esszenciális elemei [115]. Megfigyelték, hogy a *Bbs1, Bbs4* és *Bbs6* géneket érintő egér mutánsok belső fülében a

kinocíliumok (amelyeket elsődleges csillónak tekintünk) és a sztereocíliumok rendezetlen módon állnak, tehát PCP hibákat mutatnak [116]. Ezeket a polaritási hibákat a *Vangl2* mutánsok domináns módon erősítik [116]. A kinocíliumok axonémájának képződését teljesen megakadályozó *Ift88* és *Kif3a* mutánsok szintén súlyos szöveti polaritási hibákat mutatnak megerősítve, hogy a csillók jelenléte instruktív szereppel a bír a belső fül polaritási mintájának meghatározásában [117].



8. ábra: Csilló képződés és szöveti polaritás a belső fül érzékhámjában. A belső fül érzékhámjában minden sejt apikális felszínén látható egy bazális testhez (piros körök) kötődő kinocílium (fekete vonal) és a kinocílium két oldalán a V-alakba rendeződött sztereocíliumok (zöld körök), amelyek orientációja vad típus esetében minden sejtben azonos (bal oldali panel). A csilló képződést megakadályozó mutánsokban a bazális testek sejten belüli pozíciója randomizálódik, ami súlyos defektusokat okoz a sztereocíliumok elrendeződésében is (középső panel). PCP mutánsokban szintén véletlenszerű a bazális testek és a kínocíliumok pozíciója, ami hibákat eredményez a sztereocíliumok elrendeződésében (jobb oldali panel). Ezek alapján a PCP fehérjék mellett a kinocíliumok is fontos szereppel bírnak a belső szöveti polarizálódásában. Az ábra eredeti forrása: Jones et al., 2007.

A PCP és a csillóképződés kapcsolatára más modell rendszerekben is van példa, hiszen a Xenopus *inturned* és *fuzzy* gének inaktiválása abnormális csillók képződését eredményezi és konvergens extenziós hibákat okoz [99]. A legfrissebb eredmények pedig azt jelzik, hogy a PCP rendszer a csillók helyének meghatározásával járul hozzá a gerincesek baljobb aszimmetriájának a kialakulásához. Eddigi ismereteink alapján a gerincesekben a baljobb aszimmetriát az embrionális nóduszban történő folyadékáramlás iránya (az óramutató járásával megegyező vagy ellentétes) határozza meg. Ezt az áramlást viszont a nódusz sejtek apikális felszínén poszterior pozícióban, aszimmetrikusan elhelyezkedő csillók összehangolt mozgása hozza létre [118]. Az egér Dgo homológot kódoló *inversin (inv)*, a *Vangl1, Vangl2* és a *Dvl* géneket érintő mutáns kombinációkban a csilló képződés sejten belüli helye randomizálódik, ami turbulens folyadékáramlást és végső soron bal-jobb aszimmetria zavarokat okoz [96,97,98,119]. Ezek az eredmények jelzik, hogy a PCP jelátviteli rendszer a

klasszikus szöveti polarizálódási folyamatokon kívül a gerinces embriók fejlődésének egy másik fontos korai eseményét, a bilaterális aszimmetria kialakulását is szabályozza.



9. ábra: A *Vangl* gének szerepe a bal-jobb aszimmetria kialakításában. (a) Egy 8 napos sematikusan ábrázolt egér embrión láthatjuk a nódusz (PNC) elhelyezkedését, amit kinagyítva mutat a (b) panel. D, dorzális; V, ventrális; A, anterior; P, poszterior; L, bal oldal; R, jobb oldal. (c) A vad típusú nódusz sejtek poszterior oldalán egy csillót találunk, amelyek mozgása egy bal oldalra irányuló folyadékáramlást idéz elő a nóduszon belül, ami a bilaterális szimmetriát megtöri és a bal-jobb aszimmetria kialakulásának első ismert jele. (d) *Vangl2; Vangl1* kettős mutánsokban a nódusz sejtek csillói nem a megfelelő sejten belüli pozícióban helyezkednek el, és ezáltal mozgásukkal turbulens folyadékáramlást generálnak a nóduszban, ami viszont bal-jobb aszimmetria hibák kialakulását idézi elő. Az ábra eredeti forrása: Song et al., 2010.

A velőcső záródási problémák és a policisztás vesebetegség a leggyakoribb humán születési rendellenességek közé tartoznak, míg a szintén gyakori veleszületett szívbetegségek többsége bal-jobb aszimmetria zavar miatt alakul ki. Természetesen nem állítható, hogy ezek a betegségek minden esetben a PCP gének hibás működésére vezethetők vissza, de a PCP rendszer és az említett betegségek közötti kapcsolat ma már nyilvánvaló [111,120], így a szöveti polarizálódás vizsgálata gerinces fajokban fontos orvosi vonatkozásokkal is bír, ami minden bizonnyal hosszú távon is garantálni fogja a terület rendkívül dinamikus fejlődését.

2.1.2.5. A gerinces PCP effektor elemek a sejtváz szabályozásában vesznek részt

A gerincesek PCP szabályozási rendszerének működését főként a Fz/Stbm és a Ft/Ds csoport vizsgálatával tanulmányozták. A gerinces PCP effektor fehérjékről emiatt viszonylag keveset tudunk. Az eddigi eredmények azt jelzik, hogy a sejtváz szabályozásához köthető JNK, Rho kináz és Rac fehérjék zebrahal és *Xenopus* esetében szükségesek a konvergens extenzió kivitelezéséhez [121,122]. Mindez összhangban van a muslicában kapott adatokkal, de gerincesek esetében az alsóbb szinten ható elemeket egyelőre nem ismerjük. Ismert azonban

egy aktin sejtváz szabályozó fehérje, a DAAM1 (dishevelled associated activator of morphogenesis), ami a Wnt/PCP jelátvitelhez köthető és ami *Xenopus* adatok alapján szintén részt vesz a konvergens extenziós sejtmozgások összehangolásában [123]. Ez a fehérje az eredeti elképzelések alapján elősegíti a Dvl függő Rho aktivációt. Azonban a DAAM1 egy formin-homológia doméneket hordozó fehérje, és korábbi adatok alapján a forminok aktivációja függ a Rho GTPázok jelenlététől [124]. Amikor ezek az eredmények napvilágot láttak, még nagyon keveset tudtunk a muslica PCP jelátviteli út Dsh alatti elemeiről, ezért munkacsoportunk elhatározta, hogy megvizsgáljuk a *Drosophila* DAAM ortológ (dDAAM) szerepét a szöveti polarizálódás során. Eredeti kísérleti célunk később elvezetett a dDAAM, PCP-hez már nem köthető, részletesebb genetikai és funkcionális analíziséhez. Tekintve, hogy a forminok az aktin sejtváz fontos szabályozó elemei, az értekezés következő részében rövid áttekintést adok az aktin sejtváz felépítéséről és az aktin dinamikát szabályozó fehérjékről.

2.2. AZ AKTIN SEJTVÁZ FELÉPÍTÉSE ÉS MŰKÖDÉSE

2.2.1. A sejtváz általános jellemzői és felépítése

A sejtváz az élő sejtek dinamikus változásokra képes szerkezeti eleme. A citoszkeleton rendkívül sokféle funkciót lát el, így pl. lehetővé teszi a sejtmozgásokat, a sejtalak fenntartását, az intracelluláris transzportfolyamatokat, az organelláris transzportot és a sejtosztódást. Az eukarióta sejtekben a sejtváz felépítését tekintve három fő szerkezeti egységet különíthetünk el: a mikrotubulusokat, az intermedier filametumokat és a mikrofilamentumokat vagyis az aktin sejtvázat. A mikrotubulusok polimer molekulák, melyeket α-, és β-tubulin alegységekből álló heterodimerek építenek fel. A heterodimerek fejfarok orientációban egy csőszerű struktúrába rendeződnek, így hozzák létre a polarizált szerkezetű mikrotubulusokat. A mikrotubulusok a sejtek legmerevebb, legrobosztusabb vázelemei, amelyek a stabilitás szempontjából viszont dinamikusan változó szerkezetek. Növekedésüket és lebomlásukat, ill. magasabbrendű struktúrákba való szerveződésüket a mikrotubulus asszociált fehérjék szabályozzák. Az új mikrotubulusok összeszerelése, nukleálása az eukarióta sejtekben a mikrotubulus organizáló központokból (MTOC) történik. Az újonnan kialakult mikrotubulusokban a (-) vég az MTOC felé, míg a (+) vég attól disztális irányba néz.

Az intermedier filamentumok (IF) homo-, vagy heteropolimerek, amelyek apoláris láncokat alkotnak. A mikrotubulusokhoz képest kevéssé dinamikusan változó struktúrák,

legfontosabb szerepük a sejtek általános szerkezeti stabilitásának biztosítása. Rendkívül sokféle intermedier filamentum létezik, ezeket szöveti előfordulásuk és szekvenciahomológiájuk alapján hat csoportba soroljuk. Az I. és II. csoportba a savas, illetve bázikus keratinok tartoznak, melyek epitéliális sejtekben fordulnak elő. A III. csoportba soroljuk vimentineket, melyek az összes IF fehérje közül a legszélesebb előfordulási gyakorisággal rendelkeznek. A szintén idetartozó dezmin az izmokra jellemző, 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. Az V. csoportot a laminok alkotják, amelyek a sejtmagban találhatóak, míg a VI. csoportba a nesztinek tartoznak, melyek főként izomsejtekben és embrionális neuronokban fordulnak elő.

A mikrofilamentumok 7-9 nm átmérőjű helikális szerkezetű polimer molekulák, melyeket aktin monomerek építenek fel. Az aktin sejtváz flexibilis és plasztikus, elsődleges funkciója a dinamikus sejtmozgások kivitelezésében van. Az aktin az eukarióta sejtek legabundánsabb fehérjéje, a rendelkezésre álló aktin mennyiség kb. fele monomer, globuláris formában (G-aktin) van jelen, míg a másik fele polarizált szerkezetű filamentumokat alkot (F-aktin) [125]. Az aktin fehérjék szekvenciája evolúciósan erősen konzervált, aminosav szinten az egysejtűektől a gerincesekig legalább 80%-os azonosságot mutatnak egymással. Ugyanakkor a magasabbrendű fajok genomja többféle aktin izoformát is kódol, jellemző módon az izomsejtekben különböző izoformákat találunk, mint a nem-izom típusú sejtekben.

2.2.2. Az aktin filamentumok felépítése és szerveződése

Az aktin filamentumok kettős helikális struktúrák, bennük két parallel lefutású Gaktinból álló lánc tekeredik egymásra, oly módon, hogy a monomerek egymáshoz képest fejfarok orientációban helyezkednek el (**10. ábra**). A filamentumok nemcsak strukturális, hanem funkcionális értelemben is polaritással rendelkeznek. A polaritás alapja az, hogy a kétértékű kationok (Mg^{2+} , Ca^{2+}) jelenlétében ATP/ADP kötésre képes aktin monomerek maguk is aszimmetrikusak. Ráadásul az aktin monomerek ATP-áz aktivitással is bírnak, amely



10. ábra: Az aktin filamentum szerkezete. (A) Az aktin monomer és a filamentum szalag modellje. Látható a monomer aszimmetrikus felépítése (a jobb oldalon a Mg^{2+} kötő zsebbel), és a filamentum spirális szerkezete, ill. a szöges (+) és a hegyes (-) vég. (B) A sematikus filamentum modell szemlélteti, hogy *in vivo* a szöges végen ATP-aktin (piros kör) beépülés történhet, ami az aktin saját ATPáz aktivitása miatt gyorsan ADP-aktinná (zöld kör) alakul. A hegyes vég a depolimerizóció helye, a leváló ADP-aktin monomerek pedig újra ATP-aktinná alakulhatnak.

jelentősen megnövekszik, ha beépülnek egy filamentumba. Az ATP hidrolízise után képződő ADP-aktin viszont olyan konformáció változást idéz elő a filamentumban, ami azt instabilabbá teszi, növeli a depolimerizációra való hajlamát [126]. Ezek a tulajdonságok *in vitro* körülmények között azt eredményezik, hogy ugyan a Mg-ATP aktin jelenlétében képződő filamentumok mindkét végén történhet monomer beépülés és disszociáció is, azok sebessége a két végen jelentősen eltérő. Az ún. szöges (+) végen, ahol elsősorban ATP-aktint találunk kb. 10-szer gyorsabb a beépülés sebessége, mint az ún. hegyes (-) végen amire az ADP-aktin jelenléte a jellemző [125]. Ez a különbség *in vivo* körülmények között az aktin monomer kötő fehérjéknek köszönhetően nagyságrendekkel nagyobb lehet, ezért növekedés gyakorlatilag csak a szöges végen történhet, míg a hegyes vég a depolimerizáció helye (**10. ábra**).

Az aktin filamentumokra jellemző, hogy gyakran több filamentumból álló magasabbrendű struktúrákat alkotnak. Ezeknek két fő típusát különböztetjük meg aszerint, hogy párhuzamos lefutású, nem-elágazó filamentumokból álló kötegekbe rendeződnek, vagy szövevényes hálózatokat alkotnak (**11. ábra**). Az aktin hálózatok is többfélék lehetnek: kialakulhatnak ún. gél-szerű hálózatok, ahol egymástól független eredetű fonalakat keresztkötő fehérjék tartanak össze, és olyan hálózatok is léteznek ahol a filamentumon meghatározott szögben oldalágak képződnek és egy bonyolult, polaritással rendelkező ágrendszer alakul ki. *In vivo* ezek a struktúrák kombinálódhatnak is egymással, de sok esetben "tiszta" formában fordulnak elő. Így pl. a filopódiumokra és mikrovillusokra jellemző, hogy kötegekbe rendeződött nem-elágazó aktin filamentumok merevítik őket, míg a lamellipódiumokban és sejtfodrozódásokban hálózatos aktin szerkezetet találunk (**11. ábra**) [127].

28



11. ábra: Magasabbrendű aktin struktúrák. Példák az elágazó és nem-elágazó filamentumokból álló aktin kötegekre. Az ábra eredeti forrása: Revenu et al., 2004.

2.2.3. Az aktin kötő fehérjék

Régóta ismert, hogy az aktin monomerek spontán módon is képesek filametumokba rendeződni, de ez a folyamat az élő sejtekben gyakorlatilag nem történhet meg, aminek legalább két fontos oka van. Egyrészt a spontán filamentum képződés kinetikai okok miatt nem támogatott, másrészt a spontán képződés beláthatatlan következményekkel járna, ezért *in vivo* körülmények között az aktin dinamika és a magasabbrendű aktin szerkezetek kialakulása térben és időben szigorú módon szabályozódik. Ezekben a szabályozó folyamatokban kitüntetett szereppel bírnak az aktin kötő fehérjék (**12. ábra**). A rendkívül nagyszámú ismert aktin kötő fehérjét kapcsolódásuk és funkciójuk szerint különböző csoportokba soroljuk. Vannak monomer kötő fehérjék, és vannak filamentumokhoz kötődő fehérjék, amelyek kötődhetnek az egyik vagy másik véghez vagy kapcsolódhatnak az F-aktin oldalához (**12. ábra**). A ktivitásuk alapján megkülönböztetjük a polimerizációt gátló, a polimerizációt elősegítő, a filamentumokat keresztkötő gél- és kötegformaló fehérjéket, a motorfehérjéket és az új filamentumok képződését elősegítő faktorokat (**12. ábra**).

A dinamikus aktin sejtváz átrendeződések egyik előfeltétele, hogy kellően magas legyen a mobilizálható aktin monomerek koncentrációja. A szabad monomerek magas koncentrációja azonban a spontán polimerizáció lehetősége miatt rendkívül veszélyes lenne, ezért a sejtekben a G-aktin igen nagy mennyiségben, de kötött formában van jelen [125]. A monomer kötő fehérjék legfontosabb típusát a profilin reprezentálja. Ez a fehérje oly módon kötődik az aktin monomerhez, hogy lehetetlenné teszi annak a filamentum hegyes végére történő beépülését [128]. Ugyanakkor a profilin elősegíti, hogy az ADP-aktin ATP-aktinná alakuljon át, és így biztosítja, hogy nagy mennyiségű olyan monomer álljon rendelkezésre, ami képes beépülni a meglévő filamentumok szöges végre [129]. Amennyiben a profilin limitáló mennyiségben van jelen a sejtekben, a fölös monomer mennyiséget szekvesztráló fehérjék kötik meg. A szekvesztráló fehérjék, mint pl. a thymosin β4, a profilinnel ellentétben úgy kötődnek a monomer raktár tehát azonnali polimerizációra alkalmatlan, csak úgy mobilizálható, ha előbb profilin-aktinná alakul, ami viszont szabad profilin jelenlétében



12. ábra: Az aktin kötő fehérjék típusai.

könnyen megtörténhet, mert a profilin nagyobb affinitással köti az aktint, mint a szekvesztráló fehérjék [132].

A polimerizációt gátló fehérjék közül a legfontosabbak az ún. sapkafehérjék, amelyek a szöges véghez kötődnek és megakadályozzák további monomerek beépülését [133]. Kötődésük stabilizálhatja azokat a filamentumokat, amelyeknek védett a hegyes vége, de elősegítheti a lebomlásukat is, ha ez nem áll fenn. A filamentumok hosszát tehát akkor lehet stabilizálni, ha a szöges végükön "sapkázzuk" őket és a hegyes végüket is megvédjük. Ilyen hegyes vég kötő fehérje a tropomodulin [134], ami izom sejtekben fontos szereppel bír a szarkomer hossz meghatározásában és stabilizálásában [135].

Az előbbiekben említett fehérjék a filamentum végéhez való kötődés után az adott végen gátolják a polimerizációt és a depolimerizációt. Ezzel szemközt olyan fehérjék is léteznek, amelyek a filamentum végéhez való kötődésük után elősegítik, gyorsítják a polimerizációt – a korábban elmondottak alapján, ez *in vivo* kizárólag a szöges végen történhet meg. Ezeket a fehérjéket elongációs faktoroknak is nevezzük, közülük legjobban az Ena/VASP fehérjecsalád tagjait ismerjük [136,137]. Az Ena/VASP fehérjékre az jellemző, hogy sapkázó fehérjék jelenlétében is képesek a szöges véghez kötődni, de profilin-aktint is kötnek, ezáltal gyorsítják a monomer beépülés sebességét [138,139,140].

A dinamikus sejtváz átrendeződésekhez a filamentumok képződése mellett szükség van az F-aktin irányított szétszerelésére is. Ezt a folyamatot a depolimerizációt és a fragmentációt elősegítő fehérjék irányítják. A depolimerizáló fehérjék a lassan növekvő végen hatnak, ahol elősegítik az ADP-aktin disszociációját, a fragmentáló fehérjék pedig az aktin filamentumon belül bontják meg a kapcsolatot az aktin monomerek között. Ilyen faktorok például az ADF/kofilin fehérjecsalád tagjai [141], amelyek a depolimerizációt és a filamentumok hasítását is elősegítik [142], vagy a fragmentáló fehérjék közé tartozó gelsolinok [143].

A filamentumok oldalához kötődő fehérjék közül említést érdemel a tropomiozin, ami jelentősen megnöveli a filamentumok stabilitását mind kémiai, mind pedig mechanikai értelemben [144]. A filamentumokat keresztkötő fehérjék szintén oldalkötő fehérjék. A gélformáló fehérjék közé tartozik pl. a filamin és a spektrin [145,146], míg a kötegformáló fehérjék közül legjobban az α -aktinin, a fimbrin, a fascin és a villin ismert [127,147,148,149].

2.2.4. Aktin nukleáló faktorok

Az aktin sejtváz szabályozásának egy eddig nem részletezett kritikus lépése az új filamentumok képződése. Tudjuk, hogy megfelelően magas monomer koncentráció mellett az aktin filamentumok spontán módon is összeszerelődhetnek. Az élő sejtekben azonban amellett, hogy a szabad monomer koncentráció rendkívül alacsony, a spontán filamentumképződés energetikai okoknál fogva sem támogatott, mivel az aktin dimerek és lineáris trimerek rendkívül instabilak [125]. Ezzel szemben, ha valami módon kialakul egy helikális trimer vagy egy tetramer, a polimerizáció energetikailag is favorizálttá válik (**13. ábra**). Világos tehát, hogy a filamentumképződés kulcslépése a nukleációs magként szolgáló aktin oligomerek (trimerek és tetramerek) képződésének elősegítése és/vagy azok stabilizálása. Ezt a folyamatot az ún. aktin nukleáló, aktin összeszerelő faktorok katalizálják.



13. ábra: A spontán filamentumképződés energetikai jellemzői. Látható, hogy az aktin dimerek instabilak, de egy helikális trimer már nukleációs magként tud szolgálni, a tetramer állapot elérése után pedig a filamentum elongációja energetikailag jóval kedvezőbb, mint a lebomlása.

Elméletileg három olyan molekuláris mechanizmus is elképzelhető ami alkalmas a spontán nukleációt gátló kinetikai akadály megkerülésére: (1) a polimerizációs intermedierek szerkezeti utánzása, (2) a spontán formálódó polimerizációs intermedierek stabilizálása, (3) egy polimerizációs mag képzése aktin monomerek rekrutálása útján [150]. Az eddig Metazoa sejtekben azonosított öt különböző felépítésű összeszerelő faktor, az Arp2/3 komplex [151,152], a formin fehérjék [153,154], a Spire [155], a Cordon-bleu (Cobl) [156] és a Leiomodin (Lmod) [157], mindhárom elméleti lehetőségre szolgáltatott példát. Az Arp2/3 komplex két aktin-szerű alegységet is tartalmaz és az ebből fakadó strukturális mimikri a működésének alapja (14. ábra). Fontos jellegzetessége, hogy láncelágazódások útján segíti elő az új filamentumok képződését [158]. Ezzel szemben a másik négy összeszerelő faktor a nem-elágazó aktin láncok képződéséhez járul hozzá. Közülük három fehérje, a Spire, a Cobl és a Lmod, aktin kötő doméneket tartalmaz, amelyek monomereket kötnek és így egy nukleációs mag képződését segítik elő a filamentum hegyes végén (14. ábra). Velük ellentétben a forminok a szöges véghez kapcsolódva aktin dimereket vagy trimereket képesek stabilizálni (14. ábra), és úgy kötődnek a szöges véghez, hogy processzív módon elősegítik a

filamentum polimerizációját is, tehát a nukleáló szerepen kívül elongációs faktorként is működnek [153,154].



14. ábra: A különböző aktin nukleáló faktorok működésének összehasonlítása. Az Arp2/3 komplex egy WASp-aktin aktiváló komplex segítségével egy aktin trimert mimikál és ily módon alakít ki egy nukleációs magot egy meglévő filamentum oldalán. A maguk is dimerként működő Forminok (zöld félkörök) egy aktin dimer stabilizálásával segítik elő a nukleációs mag keletkezését, majd a szöges véghez kötődve maradnak és az elongációt is katalizálják. A Spire fehérjék négy aktin monomer kötő WH2 domént (lila téglalapok) tartalmaznak. A monomerek kötődésével egy nukleációs mag alakul ki a filamentum hegyes végén. A növekvő filamentumok szöges végét szaggatott vonalú nyíl jelöli az ábrán. Az ábra eredeti forrása: Goode&Eck, 2007.

2.2.5. Az Arp2/3 komplex felépítése és működése

Az Arp2/3 komplexet összesen hét polipeptid lánc alkotja (ARPC1-5, illetve Arp2 és Arp3) (**14. ábra**) [151]. Az Arp2 és Arp3 alegységek fehérjeszekvenciái közel 50%-os egyezést mutatnak az aktinnal (Arp: actin-related protein), szerkezetük pedig olyan, hogy együttesen egy, a hegyes végen található aktin dimert mimikálnak aminek szabad a szöges oldala [159], ahová aktin monomerek kapcsolódhatnak. Az Arp2/3 komplex azonban pusztán aktin monomerek jelenlétében nem képes új láncok képződését elindítani, működéséhez szükség van egy már kész filamentumra, aminek az oldalához kapcsolódik, majd az

anyafilamentummal 70°-os szöget bezárva megindul az új aktinlánc kialakulása (**14. ábra**) [158]. Az Arp2/3 aktivitása ily módon hálózatos, dendritfára emlékeztető aktin struktúrák kialakítását teszi lehetővé, ahol az Arp2/3 az oldalágat alkotó aktin filamentumok hegyes végénél, az elágazódási pontokban helyezkedik el. Ezzel összhangban immunhisztokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy az Arp2/3 komplex mind lamellipódiumokban [160,161], mind membránfodrozódásokban megtalálható [162].

Az Arp2/3 komplex egy másik fontos vonása, hogy a komplex működéséhez az anyafilamentumon és az aktin monomereken kívül aktivátor fehérjékre is szükség van. Ennek elsősorban sztérikus okai vannak, ugyanis az aktivátor nélkül a komplex térszerkezete nem teszi lehetővé, hogy stabilan kötődjön a filamentumok oldalához, és az Arp alegységek is messze vannak egymástól, tehát nem alakul ki a nukleációs magként szolgáló aktin dimerre emlékeztető szerkezet. Az ismert aktivátor fehérjék közös jellemzője, hogy tartalmaznak egy CA domént, melynek egyik részén bázikus (kapcsoló régió-Connector region), a másikon pedig savas aminosavak találhatóak (savas régió-Acidic region) [163,164]. Az aktivátorok a CA régión keresztül kapcsolódnak az Arp2/3 komplexhez, ami olyan konformáció változásokat idéz elő a teljes komplexben, hogy az rendkívül stabilan tud kötődni az anyafilamentumhoz az ARPC alegységeken keresztül, ugyanakkor a két Arp alegység is képes lesz egymáshoz kapcsolódni. A CA régió azonban önmagában nem elégséges az Arp2/3 komplex aktiválásához in vitro, a sikeres aktiváláshoz aktin monomerek jelenlétére is szükség van. Ezért az ismert aktivátorok egy vagy több monomer aktint kötő domént is tartalmaznak, ami a legtöbb esetben az ún. WH2 (WASP homology 2) domén [163,164]. Az aktivátor tehát nemcsak az Arp dimerek formálódását segíti elő, hanem az új filamentum első monomerjét is azok közelébe "szállítja", és az így kialakuló trimer már stabil nukleációs magként szolgál (14. ábra). Az Arp2/3 komplex legjobban ismert aktivátorait a WASP, az N-VASP, a Scar/WAVE és a Cortactin fehérje családok tagjai alkotják [163,164], amelyek fontos szerepet játszanak az Arp2/3 komplex működésének térbeli és időbeli szabályozásában.

2.2.6. A Spire, a Cordon-bleu és a Leiomodin fehérjék szerkezete és működése

A Spire, Cobl és Lmod fehérjék aktin nukleáló aktivitását csak nemrégiben mutatták ki, emiatt az általuk katalizált nukleáló folyamatok részleteiről egyelőre viszonylag keveset tudunk. Ettől függetlenül az bizonyosnak látszik, hogy mindhárom fehérje hasonló módon segíti elő a filamenumképződést, nevezetesen 3-4 aktin monomert kötnek meg, amelyek egy nuklációs magot formálnak. A Spire-t először *Drosophila*-ban azonosították, mint az oocita

polaritásának kialakításáért felelős faktort [165]. Később kimutatták, hogy a Spire fehérje tartalmaz egy N-terminális KIND domént, négy G-aktin kötő WH2 domént, és egy C-terminális FYVE domént [155]. *In vitro* körülmények között a négy WH2 domén közül három is elégséges az aktin nukleáláshoz, bár a négy domén együtt nagyobb sebességet biztosít [155]. A javasolt modell szerint *in vivo* a Spire négy WH2 doménje platformot biztosít négy aktin monomer számára, és azok bekötődésével egy olyan nukleációs mag jön létre, ami mimikálja az aktin filamentum helikális szerkezetét (**14. ábra**).

A Cobl fehérje kizárólag a gerincesekben fordul elő, a központi idegrendszerben fejeződik ki, és hiánya velőcső záródási rendellenességeket eredményez [166]. A fehérje nagyrészt ismeretlen doménekből áll, kivéve a C-terminálison található három WH2 domént, és néhány rövid prolin-gazdag régiót, amelyeknek profilin kötésben lehet szerepük. A Cobl mindhárom WH2 doménje szükséges a fehérje nukleáló aktivitáshoz *in vitro*, és az is bizonyított, hogy a második és harmadik WH2 domén közötti linker (összekötő) régió hossza is kritikus szerepet játszik a nukleálásban [156]. A Cobl működése a javasolt modell szerint úgy történik, hogy az első két WH2 doménen lineáris orientációban G-aktin monomerek kötődnek, majd a flexibilis linkerrel elválasztott harmadik WH2 domén a következő aktin monomert laterális pozícióba helyezi el a másik kettő mellé. Ily módon egy aktin trimert tartalmazó nukleációs mag alakul ki [156].

A "legfiatalabb" nukleáló faktor az Lmod, amit 2008-ban írtak le először úgy mint egy izom specifikus összeszerelő faktor. Az Lmod fehérje N-terminális fele hasonlóságot mutat a hegyes vég kötő tropomodulinnal, és tartalmaz egy tropomiozin, ill. aktin kötő hélixet és egy leucin-gazdag régiót, ami szintén képes aktin monomerek kötésére [157]. Az Lmod Cterminálisa jóval hosszabb, mint a tropomuduliné és két hosszabb helikális domén mellett egy WH2 domént is tartalmaz. Összességében tehát a Cobl-höz hasonlóan az Lmod is három, jóllehet egymástól különböző aktin kötő doménnel rendelkezik. Ezek mindegyike szükséges a nukleáláshoz, amiről azt gondoljuk, hogy a három G-aktin kötő domén egy nukleációs magként szolgáló trimer kialakulását segíti elő [157].

2.2.7. A forminok szerkezete és működése

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 [167]. Későbbi vizsgálatok ugyan

kimutatták, hogy a mutáns fenotípus valójában a *formin-1* génnel szomszédos *gremlin* gén funkciójának kieséséhez köthető [168], de az időközben azonosított *formin-1* homológok megőrizhették beszédes nevüket.

A forminok több erősen konzervált protein domént is tartalmaznak. Ezek közül definíció szerint minden forminban megtalálhatóak az ún. formin homológia domének, a kisméretű prolin-gazdag FH1 és a jóval nagyobb (kb. 400 aminosavból álló) FH2 domének. A forminok rendkívül széles körben elterjedt fehérjék, a növényektől kezdve az élesztőkön át az emlősökig szinte minden fajban megtaláljuk őket. A Metazoa forminok FH2 doménjének összehasonlító filogenetikai analízise alapján a forminokat hét nagy alcsaládba soroljuk [169]: Diaphanous (DIA), formin-ralated proteins in leukocytes (FRL), Dishevelled-associated activator of morphogenesis (DAAM), formin homology domain proteins (FHOD), formins (FMN), delfilin és inverted formins (INF). Ezek közül az FH2 doménen kívül is jelentős hasonlóságot mutató DIA, FRL és DAAM alcsaládok együttesen a DRF (diaphanous related formins) családot alkotják. A nem-Metazoa organizmusokban található forminok FH2 domén szerkezetüket tekintve sok hasonlóság mutatkozik az irodalomban legjobban jellemzett DRF család tagjai és bizonyos élesztő forminok (pl. Bni1, Bnr1, SepA) között [170].

A forminok FH1 doménje egy forminról-forminra változó méretű, de általában 40-50 aminosavból álló prolin-gazdag régió az FH2 domén szomszédságában. Az FH1 domén legfontosabb ismert funkciója, hogy képes megkötni a profilin-aktin komplexet [124,171,172,173]. A profilinen kívül az FH1 doménhez kötődhetnek továbbá WW vagy SH3 doméneket tartalmazó egyéb kölcsönható partnerek is, mint pl. az Src kinázok családjába tartozó fehérjék [174,175,176,177].

Az FH2 domén a forminok aktin nukleáló doménje, amely *in vitro* körülmények között szükséges és elégséges a nukleációhoz [153,154,178]. Az FH2 domén a többi nukleáló faktorral ellentétben a filamentumok szöges végéhez kötődik és ott elősegíti a polimerizációt, a filamentum növekedését [179,180,181]. Az FH2 domének csak homodimer formában aktívak, amit bizonyít, hogy a dimerizációt akadályozó mutációk megszüntetik a nukleáló aktivitást [180,181,182]. Kristályszerkezeti vizsgálatok megmutatták, hogy az FH2 dimerek egy gyűrű-szerű szerkezetet alkotnak, amelyben a két monomert flexibilis hurkok tartják össze [181]. Később a Bni1 FH2 doménjét aktinnal együtt is sikerült kristályosítani, ami bizonyította, hogy az FH2 dimer két aktin monomer befogadására képes [179]. A szerkezet analízissel kapott eredmények együttesen azt sugallták, hogy az FH2 domén működése két konformációs állapot közötti átmeneteken alapul. A modell szerint a zárt állapotban mindkét
FH2 monomer szorosan kötődik a szöges végen található két terminális aktin monomerhez, ami lehetetlenné teszi további monomerek beépülését. Ez a szerkezet azonban egy konformáció változással nyitott állapotba tud átmenni, oly módon, hogy a gyűrű egyik fele kinyílik és ez helyet biztosít egy új monomer beépülésére, aminek a megtörténte után viszont újra zárt állapotba kerül. 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 [179]. Ez egy általánosan elfogadott elképzelés, de a modell fontos részét képző konformáció változás mechanizmusa egyelőre nem ismert. A legvalószínűbbnek az látszik, hogy az FH1 domén által az FH2 domén környezetébe kerülő profilin-aktin komplex jelenléte önmagában is elegendő a konformációs változások előidézéséhez.

A legintenzívebben tanulmányozott forminok, a DRF család tagjaira jellemző, hogy az előzőekben bemutatott formin homológia doméneken kívül is tartalmaznak konzervált doméneket, amelyek fontos szerepet játszanak az FH2 doménhez köthető nukleáló aktivitás szabályozásában. A DRF forminok két funkcionálisan különböző félből állnak. A Cterminális felükben helyezkedik el a két formin homológia domén, és a DAD domén (diaphanous autoregulatory domain) (15. ábra) [183,184]. A DRF-ek N-terminális fele a szabályozó rész, amelyik intramolekuláris kölcsönhatást létesít a DAD doménnel és ezáltal gátolni képes a nukleáló aktivitást. Az N-terminális felet négy funkcionális domén alkotja, a GBD (GTPáz kötő domén), a DID (diaphonous inhibitory domain), a DD (dimerizációs domén) és a CC (coiled-coil) domének (15. ábra) [185,186]. A DD és a CC domének az Nterminális fél dimerizációját segítik elő és valószínűleg szerepük van a sejten belüli lokalizáció szabályozásában is [185]. Ezzel szemközt a GBD és a DID domének a DAD doménnel való kölcsönhatást mediálják [186]. Ha azonban GTP kötött, aktivált Rho GTPáz kötődik a GBD doménhez, az intramolekuláris kölcsönhatás és gátlás megszűnik (15. ábra) [170,186]. Ily módon mai ismereteink alapján a Rho családba tartozó kis mólsúlyú GTPázok képviselik a DRF családba tartozó forminok legfontosabb aktivátorait. Ugyanakkor, ha az autoinhibíciós kölcsönhatásban részt vevő GBD, DID vagy DAD domének hiányoznak vagy sérülnek, az a forminok konstitutívan aktívvá válását eredményezi.

A többi formin alcsalád doménszerkezete, eltér a DRF családra jellemző felépítéstől. Az FMN és FHOD típusú forminok ugyan a DRF családhoz hasonlóan C-terminális az FH1 és FH2 doménekkel rendelkeznek, de az N-terminális régióban nem hordoznak egyértelműen azonosítható homológia doméneket [163,187]. A delfilin alcsalád megkülönböztető



15. ÁBRA A Diaphanous szerű forminok doménszerkezete és működése. Az ábra két DRF formin, mDia1 az és а Bni1 doménszerkezetét mutatja. Rövidítések: 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. Az autoinhibíció a DAD és а DID domének

kölcsönhatásával jön létre. Egy GTP-Rho fehérje kötődése a GBD doménhez megszünteti az autoinhibíciós kapcsolatot. Az FH2 domén új aktin filamentumok kialakítását segíti elő. Az FH1 domén kölcsönhatása a Profilin-aktinnal jelentősen gyorsítja a filamentum növekedését. Az eredeti ábra forrása: Goode&Eck, 2007.

bélyege egy N-terminális PDZ domén jelenléte, míg az INF alcsaládba tartozó INF1 esetében az FH1-FH2 domének N-terminális pozícióba kerülnek, de egyéb homológia domének nem ismerhetők fel benne [163,187].

2.2.8. A DAAM alcsalád funkcionális jellemzői

Az aktin nukleáló faktorok, azokon belül is a forminok szerkezetére irányuló vizsgálatokon kívül, rengeteg tanulmány foglalkozott a sejten belüli funkciók megismerésével is. A teljesség igénye nélkül említhető, hogy a forminok részt vesznek a sejtosztódás, a sejt vándorlás, a sejt adhézió, a sejten belüli transzport folyamatok, a filopódium képződés és a sejt polarizáció szabályozásában [170]. Ezeken túl az is kiderült, hogy az aktin sejtváz regulációján kívül bizonyos forminoknak fontos szerepe van a mikrotubulus rendszer szabályozásában, ill. az aktin és a mikrotubulus sejtváz működésének összehangolásában is [170,188]. Ebben az értekezésben nem célom, hogy részletesen is bemutassam mi módon járul hozzá a nagyszámú ismert formin a fent említett szintén nagyszámú sejtbiológiai folyamat szabályozásába. Ehelyett szemléltetésként csak az érdeklődésünk középpontjában álló DAAM alcsalád vonatkozásában foglalom össze a funkcionális adatokat.

A legfiatalabb formin alcsalád, a DAAM alcsalád névadó tagját egy élesztő kettős hibrid kísérlet során azonosították Habas és munkatársai 2001-ben, amikor az egér Dishevelled2 PDZ doménjével kölcsönható (mDvl2) partnereket kerestek. 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 Wnt/PCP szignalizációban van szükség [123]. Ezzel összhangban, ha Xenopus embriókban az xDaam1 (Xenopus Daam1) gént morpholino oligók injektálásával csendesítették, akkor a Wnt/PCP jelátviteli út elégtelen működésére jellemző funkcióvesztéses fenotípusokat detektáltak [123]. Habas és munkatársai azt is bemutatták, hogy HeLa sejtekben a nem-kanonikus Wnt jelátviteli út hatására a RhoA Dvl és hDaam1 függő módon aktiválódik, továbbá a hDaam1 N-terminális csonkolt formája kötődik a RhoAhoz. Ezek alapján azt a következtetést vonták le, hogy a hDaam1 molekuláris kapocsként működik a Wnt/PCP jelátviteli útban a Dvl és a RhoA között [123]. Ez az elképzelés azonban ellentmond a DRF forminok konvencionális szabályozási modelljének, hiszen aszerint a forminok aktivációja függ a Rho GTP-ázoktól, és nem fordítva [170,188].

A fehérje további vizsgálata után, Higashi és munkatársainak adatai azt sugallják, hogy aktivátorok hiányában a hDaam1 a DRF forminokhoz hasonlóan egy intramolekuláris autoinhibíciós mechanizmus révén inaktív állapotban van jelen a sejtben [189]. Azt is kimutatták, hogy nem-aktivált vérlemezkékből az α-hDaam1 ellenanyag csak kis hatékonysággal képes precipitálni a RhoA fehérjét, ellenben aktivált vérlemezkékből, ahol magas a GTP-kötött RhoA szintje, nagy hatékonysággal [189]. Ez arra utal, hogy a hDaam1 csak az aktivált RhoA-hoz kötődik *in vivo*. COS-7 sejtekben a hDaam1 mind a RhoA, mind a Cdc42 GTP-ázokhoz képes volt kötődni, azonban hDaam1 függő kis-GTP-áz aktivációt ebben a rendszerben sem a RhoA, sem a Cdc42 esetében nem lehetett kimutatni [190]. Ezek az eredmények tehát összhangban vannak a DRF típusú forminok működéséről alkotott korábbi elképzelésekkel, de ellentmondanak a Habas és munkatársai által javasolt modellnek, ezért az ellentmondás feloldásához további kísérletek lesznek szükségesek.

A Rho GTPázokon kívül arra is van adat az irodalomban, hogy a hDaam1 SH3 domént hordozó fehérjékhez kötődik, mint pl. az Src családba tartozó Src42 és Btk (Bruton's tyrosine kinase) tirozin kinázokhoz, ill. az Abl (Abelson) nem-receptor típusú tirozin kinázhoz [190]. COS-7 sejtekből történő koimmunprecipitációs kísérletek alapján az Src és a hDaam1 *in vivo* is egy komplexben található. A hDaam1 és az Y527FSrc (az Src aktivált formája) kolokalizálódik a podoszómák és a sejtkitüremkedések területén, illetve az Y527FSrc42 és a hDaam1 együttes jelenléte megemeli a sejtnyúlványok számát és azok hosszát a hDaam1 saját

hatásához képest. Az Src kinázokra (Src, Yes, Fyn) deficiens SYF fibroblaszt 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 [190].

Ezeken a vizsgálatokon 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 [191,192]. 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.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

3.1. A Drosophila Frizzled receptorok jelátviteli specificitásának vizsgálata

Boutros, M., Mihaly, J., Bouwmeester, T. and Mlodzik, M. Signaling specicity by Frizzled receptors in Drosophila. Science 288, 1825-1828 (2000) alapján

Háttér: Számos megfigyelés bizonyította, hogy a Wnt-Frizzled jelátviteli út rendkívül sokféle fejlődésbiológiai és homeosztatikus folyamat szabályozásában vesz részt mind gerinces, mind gerinctelen élőlényekben [193,194]. Nem volt azonban világos, hogy ugyanannak a jelátviteli modulnak a különböző időben és helyen történő aktiválódása hogyan válthat ki teljesen különböző sejtválaszokat, mi határozza meg a Wnt-Frizzled út jelátviteli specificitását? Az egyik fontos megfigyelés, ami segített ezt a kérdést megválaszolni, annak felismerése volt, hogy a Wnt/Wg típusú molekulák több egymástól részben különböző jelátviteli utat képesek aktiválni (**16. ábra**) [195]. Közülük legjobban a kanonikus Dsh/β-katenin/TCF függő utat ismerjük [196], de a szintén Dsh és polaritási protein függő PCP [8,197], továbbá a G-protein/Ca²⁺/PKC függő ún. nem-kanonikus utak is ismertek (**16. ábra**) [198]. A Wnt/Wg típusú ligandumok receptoraiként a Frizzled fehérjék szolgálnak [40,199]. *Drosophila*-ban ismertté vált, hogy a Fz és Fz2 receptorok redundáns szerepet játszanak



16. ábra: A fontosabb Wnt/Frizzled jelátviteli utak. (A) A kanonikus Wnt/Fz útvonal egyszerűsített sémája. A Fz aktiváció a Dsh-en keresztül a β-katenin stabilizálódásához és sejtmagi transzlokációjához vezet, ahol a TCF családba tartozó faktorok közreműködésével transzkripciós változások indukálódnak. (B) A Wnt/PCP jelátviteli út sémája. Itt a Fz aktiváció a Dsh-en keresztül más effektorokat szabályoz, mint a kanonikus útvonal. (C) A Wnt/Ca²⁺ modul G-proteineken keresztül fejti ki hatását, ami PKC aktiválódást eredményez. Az eredeti ábra forrása: Strutt, 2003.

a Dsh/β-katenin/TCF függő kanonikus Wnt jelátviteli út aktiválásában [42], annak ellenére, hogy a ligand kötő affinitásukban jelentős különbség van. Ugyanakkor a Fz fehérje nemredundáns szerepet tölt be a PCP jelátviteli útban. Felvetődött tehát a kérdés, hogy mi módon képes két egymáshoz nagymértékben hasonlító receptor egy közös jelátviteli elemen, a Dshen keresztül különböző effektor utakat aktiválni? Erre a kérdésre egy a Fz és Fz2 receptorok szerkezet-funkció analízisére épülő vizsgálat sorozattal próbáltunk választ adni.

Eredmények: A Fz (a könnyebb érthetőség kedvéért a továbbiakban Fz1) és Fz2 receptorok funkcionális összehasonlítása érdekében megvizsgáltuk, hogy a fehérjék túltermelése esetén milyen hatékonysággal aktiválják a Dsh/β-katenin ill. a PCP jelátviteli utakat. Ennek érdekében elsőként fejlődő szárny és szem-antenna imágó korongokban termeltettük túl a receptorok teljes hosszúságú vad típusú formáit. Azt tapasztaltuk, hogy a Fz1 túltermelése mindkét szövetben PCP hibákat eredményezett, míg a Fz2 túltermelésnek nem volt szignifikáns hatása a szöveti polarizálódás folyamatára (**17. ábra**). Ezzel szemközt, a Fz2 túltermelése számfeletti érzékszőrök kialakulását eredményezte a szárnyél mentén, ami egy tipikus *wg* funkciónyeréses (GOF) fenotípus, míg a Fz1 nem befolyásolta a szőrök számát. Ezek az eredmények tehát jelezték, hogy a Fz receptorok eltérő jelátviteli aktivitással bírnak az imágó korongokban, annak ellenére, hogy funkcióvesztéses (LOF) mutánsaik vizsgálata alapján a kanonikus Wnt/β-katenin jelátviteli útban egymást teljesen helyettesíteni tudják [42].



17. ábra: A Frizzled receptorok szemspecifikus túltermelése. (A-B) Tangenciális szemmetszetek Fz1-et (A) és Fz2-őt (B) expresszáló szemekből. A Fz1 túltermelése PCP defektusokat okoz ami nyilvánvaló a szimmetrikus és a rosszul orientálódott ommatídiumok nagy számában. Ezzel szemben a Fz2 túltermelés nagyon ritkán (< 1%-ban) okoz PCP hibákat. Az alsó paneleken nyilak jelzik az ommatídiumok orientációját, a Fz2 egyetlen ommatídium (zöld nyíl) kivételével vad típusú (fekete nyilak), míg a Fz1 esetében a többség hibás (zöld és piros nyilak).

Annak érdekében, hogy a két Fz receptor Wnt/β-katenin jelátviteli aktivitását egy kvantifikálható tesztben is összehasonlítsuk, egy heterológ rendszert, *Xenopus* embriókat használtunk. Amennyiben a Fz2 receptort kódoló mRNS-t injektáltuk az embriókba jelentős emelkedést figyeltünk meg a Wnt/β-katenin célgén *Xnr-3* és *Siamois* (*Sia*) kifejeződésében, míg a Fz1 csak sokkal moderáltabb mértékben emelte a célgének expressziós szintjét (**18**. **ábra**). Korábban az a lehetőség is felmerült a jelátviteli specificitás magyarázatára, hogy a Fz receptorok eltérő mértékben képesek a Dsh fehérjét a sejtmembránhoz vonzani [44], ezért a Dsh membrán lokalizációját is megvizsgáltuk a Fz mRNS-ekkel injektált embriókban. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy ebben a vonatkozásban a Fz1 és Fz2 nem mutat különbséget (**18**. **ábra B**). Együttesen tehát eredményeink azt jelezték, hogy a Fz2 erősebb aktivátora a Wnt/β-katenin jelátviteli útnak, míg a Fz1 potensebb aktivátora a Wnt/PCP jelátviteli útnak, de ez a különbség nagy valószínűséggel nem a Dsh membrán rekrutációjával van összefüggésben.



18. ábra: A Frizzled receptorok viselkedése Xenopus embriókban. (A) RT-PCR analízis alapján a Fz2 receptor emelt kifejeződése aktiválja a *Sia* és *Xnr-3* Wnt/β-katenin target gének kifejeződését, míg a Fz alig befolyásolja azt. Az *EF-1α* loading kontroll volt, αmyc festéssel pedig a Fz receptorok szintjét detektáltuk. (B) A Fz1 és Fz2 receptorok egyaránt elősegítik a Dsh-GFP membrán lokalizációját.

A Fz receptorok az ún. szerpentin transzmembrán fehérjék közé tartoznak, és három fontos funkcionális régiót különítünk el bennük: egy cisztein-gazdag régiót (CRD) tartalmazó extracelluláris domént, a hét transzmembrán domént és a C-terminális citoplazmatikus régiót. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk melyik fehérje doméneknek van szerepe a Fz receptorok jelátviteli tulajdonságainak meghatározásában, Fz1-Fz2 kiméra fehérjéket, ill. csonkolt fehérjéket hoztunk létre (**19. ábra**). A konstrukciók jelátviteli aktivitását később szisztematikusan analizáltuk az imágó korongokban és a *Xenopus* tesztrendszerben.



19. ábra: A Frizzled receptorok domén specificitásának vizsgálata kimérákkal. A Fz1-Fz2 kiméra receptorok szerkezete. Lila a Fz1, zöld a Fz2, piros a myc tag. Az extracelluláris (CRD), a transzmembrán (TM 1-7) és az intracelluláris domének jelölve vannak. Funkcionális *Drosophila* tesztként a Wg/ β -katenin útvonal aktiválódását, a Fz/PCP aktiválódást és a *fz* fenotípus menekítését használtuk. *Xenopus* tesztként a *Sia* és *Xnr-3* gének kifejeződését és a Dsh membrán rekrutálódását követtük nyomon.

A Fz1-2 és Fz1-1-2 kimérák a Fz2-höz hasonlóan ektopikus Wnt/β-katenin aktiválódást eredményeztek a szárny diszkuszban, amit az adult szárnyon megjelenő számfeletti marginális szőrök jeleztek (20. ábra E, I-K). Ugyanakkor egyetlen vizsgált szövetben sem volt hatásuk a PCP folyamatokra (20. és 21. ábra), ami azt sugallta, hogy a Wnt/β-katenin aktiválódás összefüggésben van a Fz2 citoplazmatikus doménjének a jelenlétével. Ezzel ellentétben, a Fz2-1 kimérák PCP GOF fenotípusokat eredményeztek (20. ábra F, H; 21. ábra), amelyek nagymértékben hasonlítottak a Fz1 túltermelés hatására. Emellett azonban azt is megfigyeltük, hogy a Fz2-1 és a Fz2-2-1 kimérák enyhe domináns negatív (DN) hatással voltak a Wnt/β-katenin jelátviteli útra, mert szárnyél hiányokat figyeltünk meg (20. ábra D, G), ill. a Wg/β-katenin target gén achaete (ac) [200] kifejeződésének a csökkenését (20. ábra A, B), amelyek egyértelműen wg funkcióvesztésre utalnak. Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a Fz2 extracelluláris ligand-kötő doménjét hordozó kimérák hatékonyan képesek kötni a Wg fehérjét, de a Fz2 intracelluláris domén hiányában nem képesek a megfelelő jelátviteli folyamatok elindítására. Ezt a hipotézist tesztelendő, megvizsgáltuk a Wg fehérje eloszlását olyan szárny imaginális diszkuszokban, amelyekben túltermeltük a kiméra fehérjéket. A Fz2 CRD domént hordozó kimérákban valóban megfigyelhető volt a Wg stabilizálódás, ami egyáltalán nem volt jellemző a Fz1-re vagy Fz1-2 kimérára (20. ábra L-N), és ily módon ezek az eredmények alátámasztották a

dc_21_10



20. ábra: Kiméra Frizzled receptorok aktivitása a szárnyban. (A-C) A Wg/β-katenin target Ac (zölddel jelölve) kifejeződése vad típusú szárny diszkuszban (A), *ap-Gal4>Fz2-1* (B) és *ap-Gal4>Fz1-2* (C) diszkuszokban. A dorzo-ventrális (D/V) határvonal mentén kifejeződő Ac pozitív sejtek száma egy DN hatás miatt csökken a Fz2-1 diszkuszokban, de emelkedik a Fz1-2 túltermelés esetén. (D-F) Vad típusú szárnyak. Az E panelen jól látszik az elülső szárnyél az érzékszőrökkel, az F panelen pedig a disztális irányba mutató trichómák. (G-H) A Fz2-1 fehérje túltermelése a szárnyél szőrök eltűnését eredményezi (G), ami egy *wg* LOF fenotípus, egyben trichóma orientációs hibák is kimutathatók (H). (I-K) A Fz1-2 túltermelése esetén számfeletti érzékszőrök (nyilak) jelennek meg a szárnyél mentén, ami egy *wg* GOF fenotípusnak felel meg. (L-N) Dpp-Gal4-es Fz1-2 (L), Fz2-1 (M) és membránkötött Fz2GPI (N) túltermelés szárny diszkuszokban. A Wg festés (piros) alapján látható, hogy Fz2 CRD domént hordozó konstrukciók stabilizálják a Wg fehérjét a *dpp* kifejeződési doménjében (M-N), ami merőleges az endogén Wg doménre, míg a Fz1-2 nem befolyásolja a Wg eloszlást (L).

DN hatás eredetére vonatkozó elképzelésünket. A *Drosophila* modellrendszerben tapasztalt citoplazmatikus régiók közötti funkcionális különbségeket *Xenopus* adataink is megerősítették, amennyiben a citoplazmatikus domének cseréje elegendőnek bizonyult a jelátviteli specificitás megváltoztatásához (**22. ábra**), míg a Dsh membrán asszociációjára nem gyakoroltak érdemi hatást (**19. ábra**).

Az a megfigyelés, hogy a Fz1-2 kiméra nem viselkedett DN módon a PCP jelátvitel szempontjából, azzal a ténnyel együtt, hogy muslicában nem ismert a Fz receptor szöveti polarizálódási ligandja, felvette a kérdést vajon szükséges-e a Fz CRD jelenléte a PCP jelátvitel során. Ezt az elgondolást oly módon teszteltük, hogy megvizsgáltuk képesek-e menekíteni a Fz kimérák a *fz* funkcióvesztéses PCP fenotípusát. Azt tapasztaltuk, hogy kizárólag a Fz1 teljes hosszúságú fehérje volt erre képes, de sem a Fz2 sem a Fz1-2 és Fz2-1 kimérák nem rendelkeztek ezzel a hatással (**19. ábra**). Ez azt jelenti tehát, hogy annak

dc 21 10



Frizzled 21. ábra: kimérák túltermelése a szemben. Látható, hogy a Fz2-1-es kiméra túltermelése súlyos PCP hibákat eredményez, hiszen szimmetrikus (zöld nyilakkal jelölve a lenti sémán) és rotációs hibát mutató (piros nyilak) ommatídiumok jelennek meg. Ezzel ellentétben Fz1-2 а kiméra nem befolyásolja а szem planáris polarizálódását.

ellenére, hogy a Fz2-1 túltermelése hasonló következményekkel jár mint a Fz1-é, funkcióvesztéses tesztekben a Fz2-1 kiméra nem tudja helyettesíteni a Fz1 fehérjét. Így eredményeink együttesen arra utalnak, hogy a Fz1 és Fz2-1 fehérjék fölös mennyiségben képesek megzavarni a polaritási jelátviteli utat, de a jelátviteli út megfelelő szintű aktivációja csak a Fz1 CRD doménjének (és valószínűleg ligandjának) a jelenlétében történhet meg.



22. ábra: Kiméra Frizzled receptorok hatása a Wnt/ β katenin target gének kifejeződésére Xenopus embriókban. RT-PCR vizsgálatok alapján látható, hogy a Fz2-2-1-es kiméra kifejeződése nem aktiválja a *Sia* és *Xnr-3* géneket, míg a Fz1-1-2 kiméra jelentősen emeli azok mRNS szintjét. Az *EF-1* α mRNS szint mérése loading kontrollként szolgált, α -myc festéssel pedig a túltermelt kiméra Fz receptorok szintjét detektáltuk Western blot analízissel.

Következtetések: A *Drosophila* Fz és Fz2 receptorok imaginális eredetű szövetekben és *Xenopus* embriókban való túltermelése alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a két receptor jelentősen különböző mértékben képes a Wnt/β-katenin, ill. a Wnt/PCP jelátviteli utak aktiválására. Nevezetesen a Fz2 jóval erősebben aktiválja Wnt/β-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. Fontos azonban látnunk, hogy a GOF és LOF adatok egybevetése alapján a citoplazmatikus domén minőségén túl egyéb faktorok is hozzájárulnak az in vivo specificitás meghatározásához. Így például a Wnt/PCP jelátviteli út vad típusra jellemző aktiválódása csak a Fz ligand-kötő doménjének jelenlétében következik be. Ez azt sugallja, hogy a jelátviteli specificitás meghatározásához hozzájárul egy olyan molekula is, ami a CRD doménen keresztül hat, legegyszerűbb esetben ahhoz kötődik. Ez az ismeretlen faktor lehet egy eddig nem azonosított Wnt vagy más típusú ligand, de lehet egy stimuláló vagy gátló mechanizmussal működő ko-receptor is. Ha mindehhez azt is hozzávesszük, hogy ismert, hogy a Fz és Fz2 receptorok jelentősen eltérő affinitással kötik a Wg fehérjét [201,202], nyilvánvalóvá válik, hogy a jelátviteli specifictás meghatározása több fontos tényezőtől is függ. Ezek közül mi egyet azonosítottunk, a citoplazmatikus doméntől függő jelátviteli hatékonyságot, de a ligand affinitásbeli különbségek, a szöveti szinten eltérő receptor és ligandum eloszlás, és az esetleges ko-receptorok jelenléte vagy hiánya szintén jelentősen befolyásolhatja, hogy egy adott sejtben melyik Wnt/Fz jelátviteli modul aktiválódik.

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

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) alapján

Háttér: 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 szemen, az ommatídiumon belül [203,204]. Korábbi kísérletek bizonyították, hogy az R3-R4 sejtsors meghatározás a polarizálódás kulcslépése, melynek során a Fz/PCP jelátviteli út az R3, míg a Notch jelátviteli út az R4 sejtsors determinálódását segíti elő [205,206]. A jól ismert elsődleges PCP faktorokon kívül, ebben az esetben alsóbb elemként azonosították még a Rho GTPázok bizonyos típusait, az Msn kinázt és a JNK/p38 típusú kinázokat is [45,56,57]. Mivel

a Jun kinázok transzkripciós szabályozó elemek, ezek az eredmények azt sugallták, hogy a szemben a sejtváz reguláción kívül a transzkripciós szintű szabályozásnak is szerepe lehet a szöveti polarizálódásban, pl. a sejtsors meghatározás folyamata során. Ezzel összhangban sikerült kimutatni, hogy az AP-1 transzkripciós faktor egyik komponensét alkotó Jun fehérje részt vesz a PCP jelátvitelben [57]. A *jun* null mutánsok azonban csak nagyon gyenge PCP fenotípust mutatnak a szemben, ami felvetette annak a lehetőségét, hogy a Jun-on kívül egyéb transzkripciós faktorok is hozzájárulnak az R3/R4 sejtsors meghatározásához.

Az AP-1 transzkripciós faktort a Jun és a Fos családba tartozó fehérjék homo- vagy heterodimerjei építik fel [207], ezért az egyik jelölt a *Drosophila kayak (kay)* gén által kódolt egyetlen muslica Fos homológ volt [208,209]. Az is ismert volt ugyanakkor, hogy a receptor tirozin kinázoktól (RTK) alsóbb szinten működő ETS transzkripciós faktorok gyakran kölcsönhatásba lépnek az AP-1-gyel, ill. DNS kötő helyük gyakran AP-1 kötőhelyek közvetlen szomszédságában helyezkedik el [210,211]. Ezért elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk a *Drosophila kay*, és az ETS faktorokat kódoló *yan* és *pointed (pnt)* gének szerepét a fejlődő szem szöveti polaritási mintájának kialakításában.

Eredmények: A Fos transzkripciós faktor szerepének tanulmányozását a korábban izolált hipomorf kav^2 allél vizsgálatával kezdtük, ez a mutáns azonban nem mutatott PCP hibákat egyetlen szövetben sem. Tekintve, hogy a jun null mutánsok is csak enyhe PCP fenotípust okoznak a szemben, kettős mutáns analízissel próbáltuk a *jun* és a *kay* közötti redundanciát tesztelni. A jun; kay kettős mutánsok azonban sejthalált eredményeztek, ami megerősítette ugyan a legalább részlegesen redundáns működésmódra vonatkozó elképzeléseket, de lehetetlenné tette a polaritási fenotípusok elemzését. Mivel a kay null mutánsok (kay^{I}) viszont súlyos sejtosztódási hibákat okoznak [212], vizsgálataink elvégzése érdekében olyan kay allélok előállítására volt szükség, amelyek nem akadályozzák meg a sejtek osztódását és túlélését, de erősebbek a kay^2 allélnál. Ennek érdekében létrehoztunk egy deléciós kay allélt (kay^{ED6315}) és jellemeztünk két korábban ismeretlen inszerciós allélt is $(kay^{P54}$ és $kay^{1644})$ (Flybase), amelyek mindegyike a lókusz 5' régióját érinti (23. ábra). Homozigóta mutáns szövetekben az új allélok mindegyike csökkentette a Fos fehérje szintjét [213], emellett a mutánsok tipikus kay funkcióvesztéses fenotípusokat mutatták, úgy mint embrionális háti záródási hibákat (24. ábra) és a tor záródási hibáját az adult egyedek esetén. Ezeket a fenotípus komponenseket összehasonlítva egy allélerősségi sort tudtunk felállítani: kay^{l} $kav^{ED6315} > kav^{P54} > kav^{1644} > kav^2$, és az is kiderült, hogy az új allélok alkalmasak a PCP fenotípusok vizsgálatára.



23. ábra: A fos/kay lókusz és az új kay allélok elhelyezkedése.



24. ábra: A *kay* mutánsok allélerősségi sorrendje. (A-E) Embrionális kutikula preparátumok oldalnézetből; balra az anterior, jobbra a poszterior oldal esik. (A) Vad típusú embrió a hátoldalon tökéletesen záródott kutikulával. (B) A *kay*^{2/ED6315} embriók kisebb hát oldali lyukat mutatnak, mint a *kay*^{1644/ED6315} (C) embriók, vagy a még erősebb háti záródási hibákat mutató $kay^{P54/ED6315}$ (D) és $kay^{1/ED6315}$ (E), amelyek háti oldala teljesen nyitott.

Az új kay allélok PCP funkciójának vizsgálata érdekében homozigóta mutáns sejtklónokat indukáltunk a szemben és a szárnyon. Ez az analízis azt mutatta, hogy a kay mutációk a szemben kiralitási hibákat (inverziókat vagy a kiralitás elvesztését), ommatídium rotációs hibákat és bizonyos gyakorisággal a fotoreceptor sejtek elvesztését eredményezik (25. ábra C, D), míg a szárnyon nincs hatásuk a szöveti polarizálódásra. A PCP fenotípus pontosabb jellemzése érdekében megvizsgáltuk, hogy a *kay* mutánsok hogyan befolyásolják az R3/R4 sejtsors kialakulását. Ezt a kérdést a fejlődő szem-antenna imágó korongban vizsgáltuk, mert egyrészt erre a korai fejlődési stádiumra még nem jellemző a kay mutáns sejtek elvesztése, másrészt az R3/R4 sejtpárt jelölő psq>GFP marker segítségével azok sejtsorsa könnyen nyomon követhető, mert az R3 sejtre jóval magasabb GFP expresszió jellemző, mint az R4-re (**25. ábra B, B'**). A *psq>GFP* kifejeződési mintája megmutatta, hogy a kay mutáns ommatídiumokban sérül az R3/R4 sejtsors determinációja (26. ábra). Olyan mozaikos ommatídiumok vizsgálata pedig, amelyekben az R3/R4 sejtpárnak csak az egyik tagja volt mutáns, arra világított rá, hogy a Fos, a Fz-hez hasonlóan az R3 sejtsors kialakításához szükséges. Ezek alapján tehát a Fos egy szem-specifikus PCP effektor fehérje, ami az R3/R4 sejtsors meghatározásán keresztül vesz részt a PCP minta kifejlődésében.



25. ábra: A *kay* gén szükséges a szem szöveti polarizálódásához. (A) Az ommatídiumok rotációja egy sematikusan ábrázolt vad típusú szem diszkuszban. Az R3 (zöld) és R4 (halvány sárga) fotoreceptor sejtek aszimmetrikus pozíciót foglalnak el a sejtcsoporton belül. (**B**, **B**') A rotáció folyamata egy vad típusú szem diszkuszban ahol a *psq*>*GFP* marker (zöld a B panelen, monokróm a B'-őn) jelöli az R3/R4 sejtpárt. Figyeljük meg, hogy az elülső oldalon elhelyezkedő R3 sejtben jóval magasabb a GFP szint, mint az R4 sejtben. A **B** panelen anti-Bar festés (piros szín) jelöli az R1/R6 sejtpárt, míg az anti-Elav festés (kék szín) az összes fotoreceptor sejtet megjelöli. (**C**) Egy vad típusú szem tangenciális metszete, az egyenlítő (sárga vonal) két oldalán elhelyezkedő ommatídiumok egymás tükörképi párjai. A dorzális ommtídiumokat fekete, a ventrális ommatídiumokat piros szín jelöli az alsó sémán. (**D**) Egy *kay*^{P54} homozigóta mutáns klónban (a mutáns területet a narancssárga pigment hiánya jelöli) rotációs és kiralitási hibákat (sematizálva a jobb oldalon) vehetünk észre, továbbá fotoreceptor sejt hiányokat is detektálhatunk (fekete pöttyök a sémán).



26. ábra: A kay részt vesz az R3/R4 sejtsors meghatározásában. (A-D') Lárvális szem diszkusz festések. Anti-Elav festés (kék) jelöli az összes fotoreceptort, psq>GFP (zöld, illetve monokróm az A',B',C',D' paneleken) az R3/R4 sejtpárt, míg az ALZ (piros) hiánya a mutáns klónokat jelöli a B,C,D paneleken. (A) Vad típusú diszkuszban a GFP jel mindig erősebb az R3 sejtben, mint az R4-ben. (**B**) fz^{R52} mutáns klónokban számos olyan fejlődő ommatídiumot látunk, ahol az R3/R4 sejtpár azonos szinten fejezi ki a psq>GFPmarkert (csillaggal és háromszöggel jelölve), ami PCP hibára utal. Rotációs defektusok szintén

detektálhatók. (C-D) A *kay* mutáns klónokban szintén megfigyelhetjük az R3/R4 sejtsors meghatározási hibákat és a rotációs defektusokat.

A Yan és Pnt ETS transzkripciós faktorokról korábbról ismert volt, hogy egymással ellentétes módon működnek a RTK jelátviteli folyamatok során és szerepük van többek között a fotoreceptor sejtek kialakulásában [214,215]. Genetikai interakciós kísérletek során azt találtuk, hogy a *yan* és *pnt* mutációk domináns módon erősítették a *kay*, ill. *jun* mutánsok kiralitási hibáit (**27. ábra A-C**), ami arra utalt, hogy a Yan és Pnt együttműködhet az AP-1 faktorokkal az R3/R4 specifikáció során. Ezt a hipotézist megerősítette a *yan* és *pnt* mutánsok saját fenotípusának vizsgálata, ami feltárta, hogy hipomorf *yan* és *pnt* allél kombinációk szem diszkuszai kiralitási hibákat mutatnak (**27. ábra D-E**). A *kay* allélok elemzéséhez hasonlóan, a *yan* és *pnt* mutánsok esetében is elvégeztük azokat a mozaik analíziseket amelyek lehetővé tették annak eldöntését, hogy az ommatídiumokon belül melyik sejtekben játszanak szerepet az ETS faktorok a szöveti polarizálódás során. Eredményeink azt jelezték, hogy a Yan az R3 sejtekben szükséges az R4 sejtsors gátlásához, míg a Pnt az R4 sejtsors kialakulásához szükséges. Együttesen ezek a megfigyelések bizonyították, hogy a Yan és Pnt valóban hozzájárulnak az R3/R4 sejtsors meghatározásához.



27. ábra: A yan és pointed mutációk erősítik az AP-1 mutánsok fenotípusát és maguk is PCP hibákat mutatnak. (A-B) A kay^2 mutánsok szem fenotípusát (A) dominánsan erősíti a yan mutáció (B) erős rotációs hibákat és szimmetrikus ommatídiumok megjelenését okozva. (C) A *jun* mutáns klónok fenotípusát dominánsan erősíti a *pnt* mutáció. (D, D') A *pnt*^{1277/1230} mutánsok a *psq*>*GFP* (zöld a D-én, ill. lásd a D' panelen) kifejeződése alapján R3/R4 sejtsors meghatározási hibákat mutatnak. (E) Az R4 sejtekben kifejeződő $m\delta$ >*GFP* alapján a *yan*^{1/E2d} mutánsok is kiralitási hibákat mutatnak.

Miután az eddig bemutatott eredmények alapján levonhattuk a konklúziót, hogy az AP-1, a Yan és a Pnt transzkripciós faktorok is szerepet játszanak az ommatídiális polaritás kialakításában, meg akartuk határozni mely jelátviteli utakhoz kapcsolódnak ezek az effektorok. Mivel előző publikációk alapján ismert volt, hogy a Jun a Fz/Dsh/JNK útvonal

alsóbb eleme, megvizsgáltuk kimutatható-e genetikai kapcsolat a Fos, Pnt és Yan, illetve a Fz/Dsh útvonal között. A Dsh fehérje túltermelése az R3/R4 prekurzor sejtekben olyan adult ommatídiumokat eredményez, amelyek 42%-a akirális, vagyis elveszíti az aszimmetriáját (**28. ábra A**). Ezt a fenotípust a *jun* és *kay* allélok erősen, a *yan* allélok pedig részlegesen szupresszálják (**28. ábra**), míg a *pnt* allélok nem módosítják szignifikáns mértékben (**28. ábra D**). Ezek a megfigyelések a sejtsors specifikációra vonatkozó adatokkal együtt azt sugallják, hogy a Jun és a Fos valószínűleg a Fz/Dsh útvonal alsóbb elemeként járul hozzá az R3 sejtsors kialakításához, míg a Pnt egy másik útvonal effektor eleme. A Yan vonatkozásában pedig az a következtetés adódik, hogy azt a Fz/Dsh modul és más útvonalak egyaránt szabályozhatják.



28. ábra: Sev-Dsh interakciók. (A-C) Tangenciális szem metszetek. (A) A Dsh fehérjét szem specifikusan túltermelő sev-Dsh törzsben az ommatídiumok nagy része vagy szimmetrikussá válik, vagy kiralitási hibát mutat. (**B**) A sev-Dsh/+; $kay^{l}/+$ kombinációban a PCP hibák jelentősen mérséklődnek, míg a van mutáció csak részlegesen szupresszálja a sev-Dsh fenotípust (C). (D) A sev-Dsh genetikai interakciók számszerűsítése. Bordó oszlopok jelölik a szimmetrikus ommatídiumok arányát, zöld a királis ommatídiumok arányát, szürke a fotoreceptor sejtek számának csökkenését. А allélok pnt önmagukban jelentősen növelték a sejthalált, ami megakadályozta az analízist, de az apoptózis inhibitor p35 fehérje túltermelése gátolta ezt a hatást és ilyen körülmények között a pnt nem befolvásolta a PCP fenotípust.

A Pnt és Yan fehérjékről korábban kimutatták, hogy az embrionális- és a szemfejlődés során több esetben is részt vesznek az Egfr jelátviteli folyamatokban [216]. Ezért kíváncsiak voltunk arra, vajon részt vesz-e az Egfr a PCP szabályozásában. Tekintve, hogy az Egfr modul több szinten is hozzájárul a szemfejlődéshez [216], az erős *Egfr* allélok fenotípusának vizsgálata nem volt lehetséges. Így elsőként genetikai interakciós vizsgálatokat végeztünk a Fz és az Egfr utakat érintő mutánsok között. Érdekes módon az *Egfr* mutánsok erősen szupresszálták a fz^{P21}/fz^{J22} LOF allél kombináció PCP fenotípusát (**29. ábra B**), ugyanakkor a gyenge hipomorf $Egfr^{3C81}/Egfr^{top1}$ allél kombináció gyenge PCP fenotípusát dominánsan szupresszálták a fz null allélok (**29. ábra A**). Ezek az eredmények azt jelezték, hogy az Egfr jelátviteli rendszer részt vesz a szöveti polarizálódás szabályozásában is, és ott a Fz modulhoz képest ellentétes funkcióval bír.



29. ábra: Az Egfr az R4 meghatározásában sejtsors vesz részt. (A-B) Az Egfr és a fz kölcsönösen mutánsok egymás szupresszálják PCP fenotípusát a szemben. (A) A fz mutánsok emelik az Egfr mutánsban megfigyelhető vad típusú ommatídiumok számát, míg az Egfr LOF allélok csökkentik a fz mutánsokra jellemző szimmetrikus facetták számát (B). (C) Egy sep-Gal4, UAS-Egfr^{DN/+;} $m\delta > lacZ/+$ szem diszkusz konfokális képe. Anti-Elav (piros) festés jelöli az összes fotoreceptort, anti-Sens (kék) festés az R8-as sejtet, lacZ (zöld) az R4-es sejtet. A nyilakkal jelölt sejtcsoportokban az R4-es festés nem detektálható. (**D-F**) Az Egfr^{DN} (zöld) és az R4 marker $m\delta > lacZ$ (kék) mozaikos túltermelése a szem diszkuszban. A D',E',F' panelek a lacZ csatornát mutatják. Sárga nyílhegyek jelölik az R3, fehérek az R4 sejteket. Látható, hogy az Egfr^{DN} kifejeződése az R4 prekurzor sejtben gátolja a lacZ kifejeződést (D, E), míg az R3-as túltermelés nem befolyásolja az

 $m\delta$ >lacZ expressziót (F). (G) A mozaik analízis számszerűsítése. Látható, hogy csak az R4 sejtsors érzékeny az Egfr^{DN} kifejeződésére.

Annak érdekében, hogy sejtes szinten is bepillantást nyerjünk az Egfr PCP funkciójába, egy domináns negatív hatással rendelkező Egfr izoforma segítségével inaktiváltuk az Egfr jelátviteli utat az R3/R4 prekurzor sejtekben, ill. egyedi sejt szinten is. Ezek a vizsgálatok megmutatták, hogy az Egfr jelátviteli rendszer hibás működése kiralitási hibákat okoz, és az Egfr ép funkciójára az R4-es fotoreceptor sejtben van szükség, míg az R3-as sejt differenciálódását az Egfr út nem befolyásolja (**29. ábra D-G**). Mindezt előbbi irodalmi adatokkal és a fent bemutatott kísérletekkel összevetve azt mondhatjuk, hogy az R4-es sejtsors meghatározásában a korábban leírt Notch útvonalon kívül [205,206] az Egfr modul is szerepet játszik, feltételezhetően a szintén R4 determináns Pnt transzkripciós faktoron keresztül.

Következtetések: 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 sejtsorsokat. Eredményeink alapján azt a modellt állítottuk fel miszerint az AP-1 komplex a Fz/PCP úttól alsóbb szinten működve az R3 sejtsors determinációját segíti elő, míg ezzel egy időben a Yan aktivitása gátolja az R4 specifikus gének bekapcsolódását az R3 sejtben (**30. ábra**). 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 (**30. ábra**). A jelátviteli utak közötti kapcsolatokat ugyan még csak részben sikerült megérteni [205,206], de eddigi ismereteink jelzik, hogy a szem polarizálódásának kritikus lépése több jelátviteli



30. ábra: Az R3/R4 sejtsors determináció kombinatórikus modellje. Elképzelésünk szerint az AP-1 (Fos/Jun) faktor és a Yan az R3 sejtsors kialakulását segítik elő, míg a Notch és az Egfr a Su(H)-en és a Pnt-on keresztül az R4 sorsot.

rendszer összehangolt működésén alapul. Egy ilyen finoman és precízen hangolható szabályozási rendszer valószínűleg előfeltétele annak, hogy az imágó korongok rendkívül dinamikusan fejlődő sejtcsoportjai hibátlanul végre tudják hajtani a fejlődési programjukat.

3.3. A Drosophila TAK homológ funkcionális vizsgálata

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) alapján

Háttér: Az előző alfejezetben bemutatott, ill. más korábbi eredmények alapján azt gondoljuk, hogy a *Drosophila basket (bsk)* gén által kódolt JNK szerepet játszik az összetett szem PCP mintájának kialakításában [45,56]. A JNK azonban maga is egy kináz kaszkád alsó elemeként funkcionál és aktiválódásához szükség van egy JNK kinázra (JNKK), amit viszont egy JNKK kináz (JNKKK) aktivál. Munkánk kezdetén már ismert volt egy *Drosophila* JNKK molekula, amit a *hemipterous (hep)* gén kódol [217], de abban az időben JNKKK típusú kinázt ecetmuslicában még nem írtak le és nem jellemeztek funkcionálisan. Ellenben gerinces modell rendszereken elvégzett kísérletek alapján ismertté vált egy olyan emlős MAPKKK típusú kináz, amelyet először ugyan mint TGF-β által aktiválódó kinázt (TAK) írtak le [218], de később bebizonyosodott, hogy a p38, a JNK és az NLK (Nemo-szerű kináz) útvonalak aktiválódásában is szerepet játszik [219,220,221,222]. Az emlős sejtekben leírt JNK kapcsolat alapján felmerült, hogy érdemes lenne megvizsgálni részt vesz-e a *Drosophila* TAK homológ a JNK útvonal és specifikusan a PCP szabályozásában.

Eredmények: Szekvencia összehasonlító elemzések alapján a *Drosophila* genom egyetlen TAK homológot kódol, amit *dTAK*-nak neveztünk el. A *dTAK* gén funkcionális analízisének első lépéseként UAS-dTAK konstrukciókat hordozó transzgénikus muslicákat állítottunk elő és megvizsgáltuk befolyásolja-e a vad típusú dTAK fehérje túltermelése az ismert JNK célgének kifejeződését. Modell rendszerül a *Drosophila* embrionális háti záródási folyamatát választottuk. Ez az embriogenezis egyik fontos lépése, melynek során a kezdetekben még nyitott, ill. a háti oldalon csak amnioszeróza sejtekkel borított embrió laterális epidermisz sejtjei mindkét oldalon a háti középvonal felé mozdulnak el, ahol találkoznak és ily módon bezárják a háti epidermiszt [223]. A JNK jelátviteli út, azon belül a Jun és a Fos transzkripciós faktorok is szerepet játszanak a háti záródásban, így a homozigóta mutáns *jun* és *kay/Fos* embriók hátul nyitottak maradnak és elpusztulnak [208,209,224,225]. Korábbi

vizsgálatok azt is megállapították, hogy a JNK jelátviteli út mutánsaiban a laterális epidermiszben erősen lecsökken a *decapentaplegic (dpp)* és *puckered (puc)* gének expressziója [209,226,227,228], így azokat JNK target génnek tekintjük. Ezzel összhangban, az aktivált Jun fehérje túltermelése az epidermisz sejtekben jelentősen emeli a *dpp* és *puc* gének kifejeződés szintjét [226]. Ezek alapján megvizsgáltuk hogyan befolyásolja a dTAK túltermelés a JNK target gének kifejeződését. Azt találtuk, hogy a dTAK túltermelés mindkét ismert célgén kifejeződési szintjét nagymértékben megemeli (**31. és 32. ábra**). Tekintve, hogy ez a hatás teljesen összevethető erősségű a JNKK vagy a Jun túltermelés hatásával, kezdeti eredményeink azt jelezték, hogy a dTAK a JNK modulon keresztül fejti ki hatását a háti záródás során.



31. ábra: A dTAK túltermelés indukálja a JNK target gén *dpp* kifejeződését a muslica embrióban. (A-F) Vad típusú, 11., 12. és 14. stádiumú embriók dpp kifejeződési mintája. A *dpp* kifejeződik a laterális epidermisz ún. leading edge sejtjeiben. A D-F panelek az A-C panelek nagyobb nagyítású, laterális epidermiszre fókuszált részletei. (G-L) *en-Gal4*, *UAS-dTAK* embriók, amelyekben az *engrailed* (*en*) expressziós doménben mindenhol megjelenik a *dpp* mRNS. A J-L panelek a G-I panelek nagyobb nagyítású részletei. (M-O) A leading edge mentén széles sávban kifejeződő *pnr-Gal4* UAS-dTAK jelenlétében szintén aktiválja a *dpp* kifejeződését.



32. ábra: A dTAK túltermelés hatása a JNK target gén *puc* kifejeződésére. A *puc* gén kifejeződését egy *puc-lacZ* enhancer csapdázó vonallal követjük 11. és 14. stádiumú embriókban.
(A, B) Vad típusban a *puc* a leading edge mentén fejeződik ki. (C-D) *en-Gal4*, *UAS-dTAK* embriókban a *puc* expresszió megjelenik az *en* sávokban is (kinagyítva az E és F paneleken).

Következő lépésként a túltermelésen alapuló, tehát GOF típusú adatainkat LOF adatokkal is meg akartuk erősíteni. Ennek érdekében *dTAK* funkcióvesztéses allélokat akartunk azonosítani, ilyet azonban a *Drosophila* mutánsgyűjteményekben nem találtunk. Ily módon két alternatív módszerrel próbáltuk pótolni a klasszikus dTAK mutáns hiányát, egyrészt domináns negatív formákat állítottunk elő, másrészt az RNS interferencia módszerét alkalmaztuk. A DN dTAK formák embrionális kifejeződése azonban nem befolyásolta lényegesen az embriók fejlődését. Ezzel szemben, a kettős-szálú csendesítő RNS-k korai embriókba történő injektálása után az embriók kb. 20%-a kutikula záródási hibákat mutatott, bár csak 3%-ukra volt jellemző a háti záródási fenotípus, a többi esetben az elülső, feji területre eső kutikula betűrődése volt hibás (**33. ábra**). Kontroll kísérletként a *jun* gén csendesítését is elvégeztük, ebben az esetben az embriók kb. 90%-a háti záródási defektusokat mutatott, ami azt jelezte, hogy az RNS interferencia hatékony módszer a háti záródás folyamatának vizsgálatára. Összességükben az embrionális LOF kísérleteink azt sugallták,



33. ábra: A *dTAK* csendesítése **RNS interferenciával.** Embrionális kutikula preparátumok ventrális (A,C,E) és laterális nézetből (B,D,F). (A, B) Vad típusú embrió a ventrális horog sorokkal. (C, D) Egy *dTAK* RNSi embrió fejbetűrődési hibával és enyhe háti záródási hibával. (E, F) Egy *dJun* RNAi embrió erős háti záródási hibával.

hogy a *dTAK* gén, a JNK modullal ellentétben, nem játszik jelentős szerepet az embrionális háti epidermisz záródásában. Tekintve azonban, hogy a GOF kísérletek alapján a JNK target gének igen jelentős mértékben emelkedett kifejeződést mutattak, azt a lehetőséget sem zárhattuk ki teljesen, hogy a dTAK a háti záródás során redundáns módon működik más JNKKK típusú kinázokkal, amelyek szinte teljes mértékben helyettesíteni tudják.

Az embrionális háti záródás folyamatán kívül a *Drosophila* JNK modul egyéb fejlődési folyamatok szabályozásában is részt vesz. Ezek egyike az embrionális epidermiszben végbemenő záródási folyamathoz részben hasonló ún. torzáródás, amikor is a bábállapot során a két szárny diszkuszból származó sejtek mozognak egymás felé és hozzák létre az egységes tor kutikulát. A *hep* és *kay* mutánsok megakadályozzák a szárny diszkuszok fűzióját, ami a felnőtt állatok torán egy jellegzetes bemélyedés, árok kialakulását eredményezi a középvonal mentén [229]. A dTAK domináns negatív formájának tor specifikus kifejeződése a hipomorf *hep* és *kay* mutánsok fenotípusához hasonlatos gyenge torzáródási hibákat okozott (**34. ábra**). Ez tehát egy alacsony expresszivitású, de magas (91%-os) penetranciájú fenotípus, ami a JNK LOF fenotípusokon kívül nagyon hasonlít a JNK negatív regulátor Puc fehérje túltermelése által kiváltott hatáshoz (**34. ábra**). Ezek alapján a *dTAK* génnek a JNK jelátvitelen keresztül nem redundáns szerepe lehet a torfejlődést kísérő morfogenetikus sejtmozgások szabályozásában.



34. ábra: A *dTAK* befolyásolja a tor záródást. (A) Egy vad típusú, tökéletesen záródott tor dorzális nézetben. (B) A *dTAK* domináns negatív formájának túltermelése enyhe tor záródási hibát mutat (nyíl) a tor középvonala mentén. Ez hasonlatos a hep^1 mutánsokban (C) és a Puc fehérjét túltermelő (D) egyedekben megfigyelhető fenotípushoz (nyilak).

Végezetül azt akartuk megvizsgálni befolyásolja-e a *dTAK* gén az összetett szem fejlődését, azon belül is a JNK-függő szöveti polarizálódás folyamatát. Ennek érdekében is túltermeléses kísérleteket végeztünk, amelyek során a differenciálódó fotoreceptor sejtekben *sev-Gal4* segítségével fejeztettük ki a vad típusú dTAK fehérjét. Amennyiben 25 °C-on, tehát magas expressziós szint mellett hajtottuk végre a kísérletet, azt tapasztaltuk, hogy a dTAK

hatására jelentősen csökken az állatok szemének mérete (**35. ábra A-D**), szemmetszeteken pedig kimutatható volt a fotoreceptor sejtek hiánya. Mivel ez a fenotípus egyértelműen sejthalál előidézésével magyarázható, és mert a JNK utat az apoptózissal is kapcsolatba hozták [230], megvizsgáltuk a sejthalál mértékét a dTAK-ot kifejező szem diszkuszokban. Az apoptotikus sejteket jelölő Acridine Orange festéseink alapján, a dTAK masszív sejthalált indukál a diszkuszt két részre osztó morfogenetikus árok (MF) mögött, ami megfelel a *sev-Gal4* kifejeződési területének, de nincs hatása az MF előtti területre (**35. ábra E-H**). Amikor az apoptotikus kaszpáz inhibitor p35 fehérjével együtt fejeztük a dTAK-ot, a sejthalál mértéke jelentősen csökkent, jelezve, hogy a dTAK valószínűleg a kaszpáz-függő apoptotikus útvonalon keresztül idézte elő a sejthalált.



35. dTAK ábra: A túltermelés sejthalált okoz a szem imágó korongban. (A-D) SEM felvételek adult szemekről. A vad típusú (A) szemekhez képest a sev-Gal4, UAS-dTAK (**B-D**) legyek szeme jelentősen kisebb. (E-H) Lárvális szem diszkuszok Acridine Orange festése. Α festékkel detektálható apoptotikus sejtek száma jelentősen magasabb a sev-Gal4, UAS-dTAK (F, G) diszkuszokban, mint a vad típusban (E). A p35 fehérje túltermelése részlegesen menekíti a dTAK által indukált sejthalált **(H)**.

A magas szintű dTAK túltermelés által okozott sejthalál tehát nem tette lehetővé a PCP fenotípusok vizsgálatát, ezért a túltermeléses kísérleteket az alacsonyabb kifejeződési szintet eredményező 18 °C-on is elvégeztük. Ilyen körülmények között az ommatídiumok többsége normális sejtszámot mutatott, az apoptózis mértéke a 25 °C-os kísérletekhez képest jelentősen csökkent. Ellenben az alacsony szintű dTAK túltermelés tipikus PCP hibákat eredményezett, hiszen kiralitási és rotációs hibákat is megfigyeltünk az összetett szemben (**36. ábra A**), melyek összegészében egybevethetőek a Fz vagy Dsh túltermelés hatásával. Mivel a dTAK által okozott PCP defektusok már a lárvális imágó korongokban is kimutathatóak voltak, eredményeink azt sugallták, hogy ezek elsődlegesen PCP hibák és nem késői differenciálódási/degenerálódási problémák.

A dTAK GOF fenotípus lehetőséget teremtett arra, hogy genetikai interakciós vizsgálatokat végezzünk a dTAK-kal együttműködő jelátviteli utak azonosítása érdekében.

Ennek során kimutattuk, hogy a *hep*, *bsk* és *jun* mutánsok erősen szupresszálják a dTAK GOF fenotípusát (**36. ábra**), ami összhangban van azzal az elképzeléssel, hogy a dTAK a JNK útvonal fölső szabályozó eleme. Egyéb potenciálisan kölcsönható jelátviteli utak vizsgálatát elvégezve azt találtuk, hogy amíg a Dpp/TGF-β jelátviteli út mutánsai nem módosítják a dTAK GOF hatását, a *nemo* és a p38 kinázok génjeit kitakaró deléciók hasonlóan erős domináns visszaszorító hatással rendelkeznek mint a JNK mutánsok (**36. ábra E és 1. Táblázat**).



36. ábra: A dTAK túltermelés hatása az összetett szemben. Tangenciális szem metszetek (A) *sev-Gal4*, *UAS-dTAK*, (B) *sev-Gal4*, *UAS-dTAK*; *hep⁻/+*, (C) *sev-Gal4*, *UAS-dTAK*; *bsk⁻/+*, (D) *sev-Gal4*, *UAS-dTAK*; *jun⁻/+* és (E) *sev-Gal4*, *UAS-dTAK*; *nmo⁻/+* 18 °C-on nevelt legyekből. A dTAK túltermelés által okozott PCP defektusokat (főként rotációs hibák és szimmetrikus ommatídiumok megjelenése) a JNK jelátviteli út mutánsai (*hep/JNKK*, *bsk/JNK* és *jun*), valamint a *nmo* mutáció is erősen szupresszálja (lásd alsó sémák, ahol fekete nyilak jelzik a vad típusú facettákat).

Következtetések: 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.

1. Táblázat. A *sevGAL4>UAS-dTAK* interakciók számszerűsítése.

Minden genotípus esetében 187-548 ommatídiumot vizsgáltunk meg 3-6 egyedből. A szignifikáns interakciókat csillaggal jelöltük (student t teszt alapján p > 0.001).

Genotípus	Vad típusú ommatidium (% ±SD)	Rotációs hiba (% ±S)
sev-GAL4, UAS-dTAK;		
+/+	49.48 (±3.2)	27.7 (± 5.04)
<i>bsk</i> ^{170B}	80.35 (± 3.07)*	14.46 (± 1.53)
UAS - bsk^{DN}	89.17 (± 6.16)*	6.91 (± 6.46)
hep ^{R75}	68.3 (± 8.12)*	16.8 (± 4.1)
jun ³	77.55 (± 2.43)*	17.68 (± 2.80)
msn^{172}	54.4 (± 4.2)	30.38 (± 2.7)
nmo ^{j147}	81.17 (± 0.79)*	13.8 (± 1.46)
Df(3R)crb87-4(p38a ⁻)	84.84 (± 3.2)*	10.02 (± 2.1)
Df(2L)b87e25(p38b-)	78.76 (± 4.06)*	14.26 (± 0.28)
dpp^{D12}	44.76 (± 6.04)	35.4 (± 3.6)
tkv ^{a12}	43.58 (± 4.2)	34.7 (± 4.1)
Mad^{12}	47.03 (± 8.9)	34.74 (± 2.97)

Figyelemreméltó módon, emlős sejteken végzett kísérletek alapján a JNK modul is részt vesz a stressz-indukált apoptózisban [231,232], az aktivált *Drosophila* Hep és Jun fehérjék szemspecifikus túltermelése pedig hasonlóan erősen csökkenti a szem méretét [56,57] mint a dTAK. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a dTAK és a JNK modul az apoptózis szabályozása során is együttműködik. 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.

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 szupresszálható a JNK útvonal mutánsaival, ez az adatsor támogatta a dTAK-JNK kapcsolat PCP szabályozásban betöltött funkcionális jelentőségét. Ezeken 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. A *nemo* maga is egy PCP gén [58], és eredményeinkkel egybevágó módon egyéb modell rendszerekben is kimutatták, hogy a TAK családba tartozó kinázok aktiválják a Nemo-szerű kinázokat

[219,220]. Ezek alapján elképzelhető, hogy a TAK-Nemo kapcsolat evolúciósan erősen konzervált, a szöveti polarizálódás vonatkozásában pedig mindenképpen érdekes lehet a TAK-Nemo-JNK kapcsolatok részletesebb analízise.

Annak ellenére, hogy a TAK kinázokat gerinces modell rendszerekben a TGF-β jelátviteli úthoz kötötték [218], kísérleteink alapján ecetmuslicákban ezt a kapcsolatot nem tudtuk megerősíteni. Úgy tűnik tehát, hogy a TGF-β/TAK kapcsolat evolúciósan később alakult ki, mint a TAK/JNK vagy TAK/Nemo kapcsolatok. Fontos azonban látnunk, hogy ezt a hipotézist és egyéb következtetéseink egy részét csak klasszikus dTAK LOF mutánsok vizsgálatával lehet majd igazolni.

3.4. Új szöveti polaritási mutánsok azonosítása és genetikai térképezése

Pataki Csilla és Matusek Tamás nem közölt eredményei alapján.

Háttér: Az eddig bemutatott eredményekből kiderült, hogy kezdetekben olyan gének PCP funkcióját vizsgáltuk, amelyeket már ismert polaritási génekként kezdtünk el részletesen is analizálni (mint pl. a *fz* és a *kay/Fos*). Annak ellenére azonban, hogy az ezredforduló időszakában már több tucat PCP gént ismertünk, világos volt, hogy a PCP szabályozásában sokkal több gén vesz részt. Ezért elhatároztuk, hogy az ismertek jellemzése mellett új PCP géneket is megpróbálunk azonosítani. Így került sor elméleti alapon kiválasztott jelölt gének (pl. a *yan, pnt* és *dTAK*) feltételezett PCP szerepének vizsgálatára, de ezzel párhuzamosan nagyléptékű mutagenezis kísérleteket is terveztünk az új polaritási gének azonosítása érdekében. 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.

Eredmények: Muslicában homozigóta mutáns sejtklónokat legnagyobb hatékonysággal az FRT/Flp (eredetileg élesztőben leírt) helyspecifikus rekombinációs rendszer segítségével indukálhatunk [233]. Tekintve, hogy a PCP fenotípusok rutinszerűen csak a felnőtt állatok szárnyán és notumán vizsgálhatóak, kísérleteink során egy olyan Flp rekombináz forrást (Ubx-Flp) használunk, amely legerősebben a szárny imágó korongban fejeződik ki [234], és

így a belőle kifejlődő szárny-, ill. notumsejtekben képes rekombinációt előidézni. A PCP fenotípusok felismeréséhez az is elengedhetetlenül fontos, hogy kellően nagyszámú sejtből álljon a mutáns folt. Ezt úgy biztosítottuk, hogy az ún. ikerfolt sejteket a sejt-letális technika [235] segítségével kiküszöböltük. A mutagenezis kísérlet érzékenységét és megbízhatóságát növelendő, egy F2 sémát alkalmaztunk (**37. ábra**), ami ugyan munkaigényes, de előnye, hogy az alacsony penetranciájú és/vagy expresszivitású fenotípusok vizsgálatát is lehetővé teszi, továbbá kiküszöböli az F1 kísérletek során gyakran jelentkező fertilitási problémákat. A második kromoszóma jobb (2R) és bal (2L) karjának mutagenizésére EMS-t (etil-metán-szulfonátot) használtunk, míg a harmadik kromoszóma jobb karját (3R) ENU-val (etil-nitrozoureával) mutagenizáltuk. Összesen kb. 23.000 F2 keresztezés analízise után 58 polaritási mutánst izoláltunk, közülük 23 a 2R, 8 a 2L, 27 pedig a 3R kromoszóma karra esett.



37. ábra: Az új PCP mutánsok előállításának keresztezési sémája. A második kromoszóma jobb karjának (2R) példáján látható a keresztezési séma. Piros csillag jelöli az indukált mutációt, cl(2)-vel a recesszív sejtletális mutációt jelöltem. Az F₁ keresztezésekben egyedi hímeket kereszteztünk. A 2L és a 3R esetében hasonló sémát követtünk a megfelelő FRT és balanszer kromoszómák alkalmazásával.

Következő célunk a mutánsok térképezése volt, ennek érdekében először komplementációs analízissel meghatároztuk, hogy az új mutánsok közül melyik azonosít már korábbról ismert PCP gént és melyik addig ismeretlent. Ezek alapján a 2R és 2L karokon 3-3, a 3R kromoszóma karon pedig 27 új PCP mutánst izoláltunk, amelyek mindegyike homozigóta letális mutációnak bizonyult. A letalitás alapján egymás közötti komplementációs analízist is

végezetünk, ami feltárta, hogy a második kromoszómális mutációk egyedi komplementációs csoportokat alkotnak, míg a 27 3R-en lévő mutáns 22 komplementációs csoportba sorolható, egy öttagú, egy kéttagú és húsz egyedi csoportba. Mivel ez összesen 28, tehát viszonylag nagyszámú új gént jelentett, a szemre és a szárnyra kiterjedő részletesebb fenotípus vizsgálatok után elkezdtük a legérdekesebbnek ítélt néhány mutáns génszintű térképezését. Ennek eredményeként deléciós és rekombinációs, ill. DNS szekvenáláson és RNSi vonalak használatán alapuló térképezési módszerekkel két komplementációs csoportot sikerült gén szinten térképezni, amelyek egyike a *Kuzbanian-like (Kul)* gén volt, a másik pedig a *Drosophila Rab23* ortológ. Az alábbiakban röviden összefoglalom a *Kul* mutánsok jellemzését, a *Rab23* részletes boncolását pedig dolgozatom következő fő fejezetében fogom bemutatni.

Új PCP mutánsaink közül a 3R kromoszóma karra térképeződő öttagú komplementációs csoport tagjai érintették a *Kul* gént, amit végső soron a teljes *Kul* gént hordozó genomikus menekítő konstrukciók segítségével bizonyítottunk. A *Kul* mutánsok minden általunk vizsgált szövetben PCP hibákat okoztak, így a szemben rotációs hibákat és szimmetrikus ommatídiumokat láttunk, a szárnyon enyhe szőr orientációs hibákat és többes szárnyszőrök megjelenését vehettük észre, míg a notumon az érzékszőrök egy részének rövidülése mellett, orientációs hibákat is detektálni tudtunk (**38. ábra**).

A *Drosophila Kul* gén egy ADAM típusú, transzmembrán metalloproteázt kódol, amelyben a proteáz és a membránt áthidaló doméneken kívül azonosítható egy N-terminális szignál peptid, egy ún. Pro-domén és egy Desintegrin homológia domén (**39. ábra**) [236]. Szekvencia analízissel meghatároztuk, hogy új *Kul* mutánsaink mindegyike a metalloproteáz domént érinti, azon belül is négy mutánsunk cisztein/arginin aminosav cserét okozott a 481-es pozícióban, míg ötödik allélunk a 603-as pozíciójú valint változtatta alaninra. Figyelembe véve, hogy a C481-es és V603-as amonisavak erős konzerváltságot mutatnak a különböző metalloproteázok között, mutánsaink nagy valószínűséggel csökkent proteáz aktivitást és ezzel erős funkcióvesztést eredményeznek.

Korábban közölt eredmények alapján a *Drosophila* Kul a Notch receptor ligandját, a Delta fehérjét képes hasítani a szárnysejtekben [236], ami elősegíti a Notch útvonal aktiválódását. A *Kul* mutánsok a szárnyon többes szőr kinövéseket eredményeztek, és a szárnyvénák részleges hiányát is meg lehetett figyelni. Ez utóbbi fenotípus komponens köthető a Notch/Delta jelátviteli folyamatokhoz, de az intenzív vizsgálatok ellenére semmilyen korábbi adat nem támasztja alá, hogy a Notch részt venne a sejtenkénti szőrszám

64

dc_21_10



38. ábra: A *Kul* mutánsok PCP fenotípusai. (A) Vad típusú szárnylemez disztális irányba mutató trichómákkal. (A') *Kul* mutáns sejtklónokat hordozó szárnylemez, többes szőrkinövésekkel és enyhe trichóma orientációs hibákkal. (B) Vad típusú notum poszterior irányba mutató szőrökkel. (B') *Kul* mutáns sejtklónokat hordozó notum szőr orientációs hibákkal. (C) Vad típusú összetett szem tangenciális metszete. (C') A *Kul* mutáns szem klónokban szimmetrikus ommatídiumok (sárga nyilak) és rotációs hibák (piros nyíl) figyelhetők meg.



39. ábra: A Kul protein szerkezete. Az ábra fölső részén a Kul protein domén szerkezete látható. Az ábra alsó része mutatja, hogy az általunk izolált öt *Kul* mutáns mindegyike a metalloproteáz domént érinti. Közülük négy a C481-es aminosavat, míg az ötödik mutáció a V603-ast.

meghatározásában. Ezzel ellentétben az összetett szem esetében ismert, hogy a Notch/Delta modul szerepet játszik az ommatídiális polaritás kialakulásában [205,206]. A Notch és Kul

mutánsok szem fenotípusa azonban eltér egymástól, mert amíg a *Notch* mutánsokban főként kiralitási hibákat és szimmetrikus ommatídiumokat figyelhetünk meg, a *Kul* mutánsok a kiralitási hibák mellett erős rotációs hibákat is okoznak. Ezek a megfigyelések együttesen azt sugallják, hogy a Kul a Notch/Delta rendszertől független módon járul hozzá a PCP szabályozásához, tehát egy új kapcsolatot fedeztünk fel az ADAM metalloproteázok és a szöveti polarizálódás között. A Kul proteáz PCP szubsztrátjának azonosítására azonban egyelőre nem került sor, így a Kul PCP funkciójának molekuláris szinten való megértéséhez további kísérletekre lesz szükség.

Következtetések: 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. Ebben az alfejezetben bemutattuk, hogy egy nagyléptékű mutagenezis 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.

3.5. A Drosophila Rab23 szöveti polaritási funkciójának jellemzése

Pataki C, Matusek 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) alapján

Háttér: A nagyléptékű mutagenezis 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 [237]. 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 sejtsors kialakulását segíti elő a velőcsőben [238]. Az is bebizonyosodott, hogy a Rab23 a ventrális determinációt elősegítő Sonic hedgehog (Shh) jelátviteli út gátlásán keresztül fejti ki hatását [238], bár ennek a gátlásnak a molekuláris mechanizmusát egyelőre nem ismerjük. A BHK-21, szíriai

aranyhörcsögből származó, vese fibroblaszt sejteken végzett kísérletek azt sugallták, hogy a Rab23 fehérje a korai endoszómás vezikulákon halmozódik fel [239]. Ezzel ellentétben HeLa sejtekben azt találták, hogy a Rab23 fehérje elősegíti a fagoszóma-lizoszóma fúziót [240], így a Rab23 membrántranszport folyamatokban betöltött pontos szerepe is kérdésesnek tekinthető. Saját vizsgálataink kezdetén a *Drosophila Rab23* ortológról pedig még egyáltalán nem jelent meg funkcionális adat a szakirodalomban.

Eredmények: A nagyléptékű mutagenezis kísérletünk során azonosított Drosophila Rab23 mutánsunk homozigóta mutáns szárnyklónokban többes szőrkinövéseket és enyhe szőrorientációs hibákat mutatott, amelyeket tipikus szárny PCP fenotípusnak tekintünk. Az allél szekvenálása azt jelezte, hogy egy treonin-alanin aminosav cserét okozó pontmutáció következett be a 69-es pozícióban, ezért allélunk a *Rab23^{T69A}* nevet kapta (**40. ábra**). A 69-es pozícióban elhelyezkedő treonin aminosav teljes mértékben konzervált az összes ismert kis mólsúlyú GTPázban, és a fehérje GTPáz doménjének ún. Switch I régiójában található, ami kritikus szerepet játszik a GDP-GTP cserében és ezzel a fehérje aktiválódásában [241]. Az eredetileg izolált Rab23 allél homozigóta formában letális volt, de később a rekombináción alapuló genetikai térképezés során olyan változatokat is izoláltunk, amelyek már homozigóta formában is életképesek voltak jelezvén, hogy eredeti allélunk egy másodlagos letális mutációt is hordozott. A Rab23^{T69A} homozigóta formában is hasonló szárny PCP fenotípusokat mutatott (41. ábra A-F), mint mutáns klónokban, de mivel független Rab23 allél nem állt rendelkezésünkre, a genetikai elemzések megkönnyítése és egyben megbízhatóbbá tétele érdekében új Rab23 allélt is izoláltunk P-elem remobilizáció segítségével. A gén 5' régióját érintő Rab23⁵¹ allél (40. ábra B) homozigóta formában életképes és a másik Rab23 alléllal megegyező PCP hibákat mutat a szárnyon (41. ábra). A homozigóta mutánsok és a Rab23^{T69A}/Rab23⁵¹ transzheterozigóták fenotípusának erőssége megegyezik a hemizigóták (deléció fölötti mutánsok) fenotípusával (41. ábra), így Rab23 mutánsaink genetikai értelemben null mutánsnak tekinthetők. Ezzel összhangban, a T69-es pozíciónak megfelelő egyéb GTPáz mutánsok is erős funkcióvesztést mutatnak [242], a Rab23⁵¹ klónozása pedig jelezte, hogy a mutánsban képződő hibrid transzkriptumról nem képződhet funkcionálisan ép fehérje (40. ábra).



40. ábra: A Rab GTPázok szerkezete és konzervált a Rab23 Drosophila gén szerkezete. (A) Kis mólsúlyú GTPázok illesztése, szürke vonal jelzi a GTPáz domén határait. A $Rab23^{T69A}$ mutáció egy teljes mértékben konzervált treonin aminosavat érint. (B) A Drosophila *Rab23* gén genomiális régiója és az RH23273 jelű EST klón szerkezete látható a panel fölső részén. A Rab23⁵¹ allél előállítására а P(RS5)5-Sz-3123 inszerciós vonalat használtuk. A Rab23⁵¹ allél a prediktált transzlációs starthelyet deléciót is érintő hordoz. ugyanakkor kb. 1.7 kilobázisnyi Pelem eredetű idegen DNS is található benne. A *Rab23⁵¹* allélról lehetséges transzkript képződő szerkezetét mutatja a panel legalsó része. Látható, hogy erről az funkcionális mRNS-ről Rab23 fehérje korai termináció miatt nem képződhet.

A *Rab23* mutánsok szárnyfenotípusa tökéletesen menekíthető a gén egyetlen transzgénikus kópiájával, ill. az YFP::Rab23 fúziós fehérje kifejeztetésével is (**41. ábra K,L**). Ily módon a mutáns analízis és a menekítési kísérletek együttesen jelzik, hogy a *Drosophila Rab23* gén ugyan nem esszenciális az életképesség szempontjából, de szerepet játszik a szárny sejtek szöveti polarizálódásában. Ezt a *Rab23* génre specifikus RNS interferencián alapuló kísérletek is megerősítik, amennyiben egy minden szövetre kiterjedő csendesítés sem befolyásolja az életképességet, de PCP hibákat okoz (**41. ábra J**).



41. ábra: A *Rab23* mutánsok PCP fenotípusa a szárnyon. (A) Egy sematikus szárnyábrázolás ami mutatja a szárnyvénák által határolt szárnyszektorokat (A-E), ill. négyzettel kiemelve a fotózott szárny területeket. Minden ábrán fölül van az elülső irány, és jobbra esik a disztális irány. A vad típusú szárnysejtek egyetlen disztális irányba mutató trichómát hordoznak (B, D), míg $Rab23^{7694}$ (C, D, F) és $Rab23^{51}$ (G) homozigóta mutáns szárnyakon többes szőrkinövéseket és trichóma orientációs hibákat figyelhetünk meg minden szárnyszektorban. A B-C panelek az A régiót mutatják, a D panel a C régióról, az E-L panelek pedig a D régióról készült képet mutatnak. A $Rab23^{7694}/Df(3R)BSC47$ (H), a $Rab23^{51}/Df(3R)BSC47$ (I) és a Rab23 RNSi (J) legyek szárnyai szintén többes szőrkinövéseket és trichóma orientációs hibákat mutatnak. (K, L) A Rab23 mutánsok PCP fenotípusa teljes mértékben menekíthető a Rab23 gén egyetlen genomiális kópiájával (Rab23-GR) (K) és az UAS-YFP::Rab23 transzgénnel is (L).

Tekintve, hogy a szövetek síkbeli polarizálódása nemcsak a szárnyra jellemző, megvizsgáltuk a *Rab23* mutánsok egyéb szöveteit is és azt tapasztaltuk, hogy amíg az összetett szem és a kutikulát borító valódi érzékszőrök PCP mintája vad típusú volt, addig a lábat és az abdoment borító kutikula trichómái erős polaritási hibákat mutattak. Nevezetesen, trichóma orientációs hibákat figyeltünk meg és a trichómák számának nagymértékű emelkedése, többszöröződése is kimutatható volt a láb és a potroh kutikula háti és hasi oldalán is (**42. ábra**). A PCP fenotípusok összessége alapján a *Rab23* egy egyedi hatású PCP gén,

amely minden vizsgált szövetben szükséges a trichómák polarizálódásához, de nem vesz részt a többsejtű struktúrák, így a szem és az érzékszőr-szerv síkbeli orientációjában.



42. ábra: Rab23 mutánsok PCP fenotípusa láb a és a potroh kutikulán. (A) Egy vad típusú láb kutikuláját disztális irányba (az A-B paneleken jobbra) mutató trichómák és Rab23⁵¹ borítják. érzékszőrök **(B)** mutánsokban az érzékszőrök orientációja nem változik a lábon, de a trichómák száma jelentősen megnő és azok irányultsága is randomizálódik. Hasonló fenotipikus hatást figyelhetünk meg a potroh kutikulán is. Itt a sternit és tergit lemezeket a vad típus esetében poszterior irányba mutató trichómák és érzékszőrök borítják (C, E), míg a Rab23⁵¹ mutánsokban (D, F) a trichómák száma jelentősen megnő és azok orientációja is gyakran eltér a poszterior iránytól.

A továbbiakban a Rab23 sejten belüli funkciójának megértése érdekében a szárnyat használtuk modell rendszerül, ami sokkal alkalmasabb sejtszintű vizsgálatokra, mint a fejlődő abdomen kutikula. Elsőként a trichóma iniciáció folyamatát vizsgáltuk 30-32 órás *Rab23* mutáns bábszárnyakban. Megállapítottuk, hogy a mutánsokban az iniciáció első jelének tekinthető aktin felhalmozódás nem korlátozódik a sejtek disztális-apikális részébe, hanem nagymértékű diffúz aktin polimerizálódás jeleit láttuk a teljes apikális régióban (**43. ábra**). Minden bizonnyal ennek következtében sok mutáns sejtben a trichóma iniciáció egynél több helyen is megindulhatott, ami végső soron többes szőrkinövéseket eredményezett az adult szárnyon. Ezen felül azt is megfigyeltük, hogy a *Rab23* mutáns sejtklónokban kb. egy órával késik a trichóma iniciáció a szomszédos nem mutáns sejtekhez képest (**43. ábra**). Végezetül a

mutáns sejtklónok vizsgálata azt is megmutatta, hogy a treihóma iniciációs hibák minden esetben a mutáns területre esnek (**43. ábra**). Ezek alapján a *Rab23* sejt-autonóm módon működik és ily módon nem valószínű, hogy szerepe lenne a PCP szabályozási rendszer sejt-sejt kommunikációs folyamatokra épülő lépéseiben.



43. ábra: Rab23 mutánsok hatása trichóma a iniciációra. (A-A") Trichóma iniciáció 31 órás vad típusú bábszárnyban. Látható, hogy az aktin (pirossal jelölve az A-D paneleken) felhalmozódás a sejtek disztális (jobbra eső) csúcsában indul meg. (B-B") Rab23⁵¹ mutánsokban sokkal nagyobb mértékű és diffúzabb aktin felhalmozódás figyelhető meg az apikális zónában. (C-C") Rab23^{T69A} mutáns sejtklónokban az aktin felhalmozódás később indul meg. mint a szomszédos heterozigóta sejtekben. А homozigóta mutáns területet a β-gal (kék) festés hiánya jelöli a C és D paneleken. (D-D") Rab23^{T69A} mutáns sejtklónok indukálása esetén többes szőr iniciáció csak a homozigóta mutáns területen figyelhető meg. A sejthatárokat Fmi (zöld) festéssel jelöltük az összes panelen. A skála mérete 10 µm.

Nemrégiben leírták, hogy a fejlődő szárnysejtek a lárvális stádium és a korai bábállapot során még változatos, több-szögletű alakot mutatnak és csak a trichóma iniciációt közvetlenül megelőző időszakban jelenik meg jellegzetes hatszög alakjuk [77]. Figyelemre méltó módon a PCP gének is részt vesznek ennek az érdekes sejtcsomagolódási folyamatnak a szabályozásában, mert az elsődleges PCP gének mutánsai csomagolódási hibákat okoznak [77]. A *Rab23* mutáns bábszárnyak vizsgálata során észrevettük, hogy a *Rab23* is részt vesz a szárnysejtek alakjának a meghatározásában és az elsődleges PCP génekhez hasonló erősségű csomagolódási hibákat okoz (**44. ábra**). Ezek fényében kíváncsiak voltunk arra, hogy a *Rab23* mutánsokra jellemző többes szőrkinövési fenotípus összefüggésbe hozható-e a sejtalak változásokkal. 32 órás bábszárny sejtek vizsgálata alapján azonban nem találtunk korrelációt a sejtalak és a szőrszám között, mert a hexagonális és nem-hexagonális sejtek nagyon hasonló

arányban mutattak többes szőr iniciációt (**44. ábra**). Ezzel összhangban a *Rab23*-hoz képest valamelyest gyengébb csomagolódási hibákat mutató, de erős többes szőr fenotípusú *in* és *frtz* mutánsokban sem találtunk összefüggést (**44. ábra**). Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a szárnysejtek trichóma iniciációját közvetlenül megelőző alakváltozási folyamatnak nincs direkt hatása az iniciációs helyek számának meghatározására.



44. ábra: A Rab23 befolyásolja a szárnysejtek csomagolódását. (A-B) DE-kadherin festés 30 órás vad típusú (A) és *Rab23^{T69A}* mutáns (B) bábszárnyakban. Vad típusban a szárnysejtek többsége hexagonális alakú, míg a Rab23 mutánsban jóval több nem-hexagonális alakú sejtet (fehér pöttyel jelölve az A és B paneleken) látunk. (C) A nemhexagonális alakú sejtek számának aránya Rab23 és egyéb PCP mutánsokban. **(D)** többes А szőrkinövést mutató sejtek aránya hexagonális (üres oszlopok) és nemhexagonális alakú (szürke oszlopok) sejtekben Rab23^{T694}, frtz¹ és in¹ mutánsokban. A skálák mérete 5 μm.

A szöveti polarizálódás egyik első ismert jele a szárnysejtekben a PCP fehérjék aszimmetrikus sejten belüli felhalmozódása. Mivel a *Rab23* mutánsok nyilvánvaló polaritási hibákat mutatnak, megvizsgáltuk a PCP fehérjék lokalizációját. Ez az elemzés megállapította, hogy az elsődleges PCP fehérjék apikális felhalmozódása ugyan nem sérül a *Rab23* mutánsokban, de 24-30 órás bábszárnyakban a sejten belüli polarizálódásuk eltér a vad típustól. Sok esetben a PCP fehérjék nem távolítódnak el tökéletesen az A-P membránokról, vagy ha a sejten belüli aszimmetria ki is alakul, a polarizálódás tengelye sem a sejtek között sem a D-V tengellyel nem koordinálódik tökéletesen (**45. ábra**). Ennek következtében a vad típusú sejtekre jellemző "zig-zag" eloszlási minta részlegesen sérül a mutáns sejtklónokban (**45. ábra**). Az elsődleges polaritási fehérjéken kívül az In lokalizációját is megvizsgáltuk, ami azokkal a korábbi adatokkal összhangban, miszerint az In eloszlása függ az elsődleges
PCP fehérjék lokalizációjától [79], hasonló változásokat mutatott, mint a "core" fehérjék (**45. ábra**). Eredményeink tehát jelezték, hogy a Rab23 fehérje bizonyos mértékben hozzájárul a PCP fehérjék aszimmetrikus felhalmozódásához, ami a fontos szereppel bír a szőr iniciáció helyének kijelölésében.



45. ábra: PCP fehérjék eloszlása Rab23 mutáns szárnysejtekben. (A-D') $Rab23^{T69A}$ mutáns szárnyklónok a β gal (kék) festés hiányával jelölve 30 órás bábszárnyakban. A Pk (zöld az A, A' paneleken), Stbm/Vang (zöld a B, B' paneleken), Fmi/Stan (zöld a C, C' paneleken) és In (zöld a D, D' paneleken) fehérjék proximodisztális polarizációja sérül a mutáns klónokban. A fehérjék gyakran nem távolítódnak el tökéletesen az A-P membránokról és a vad típusra jellemző "zig-zag" minta nem alakul ki (különösen jól látható a B és C panelek mutáns területein). A skála mérete 10 µm.

Ezek után arra voltunk kíváncsiak milyen sejten belüli eloszlást mutat a Rab23 fehérje. Mivel mind az általunk készített *Drosophila*, mind pedig a kereskedelemben kapható humán Rab23 ellenanyag esetében is magas háttérfestődést tapasztaltunk immunfestési kísérletekben, kérdésünk megválaszolása érdekében az YFP-vel jelölt Rab23 fehérje lokalizációját vizsgáltuk meg fejlődő pupális szárnyakban. Az YFP::Rab23 fúziós fehérje képes volt

menekíteni a *Rab23* gén hiányát (**41. ábra L**), tehát funkcionálisan (legalább részben) ép fehérjeként viselkedett, ami alkalmas a lokalizációs kísérletekre. Az YFP::Rab23 fehérjét bábszárny sejtekben túltermelve a bábozódás után 24-32 órával a fehérje egységes plazmamembrán asszociációt mutatott az apikális és a bazolaterális zónában is (**46. ábra**), ezen kívül pedig a szubapikális régióban olyan citoplazmatikus rögökben is felhalmozódott a fehérje, amelyek méretük alapján membránvezikulák is lehetnek. Összegészében hasonló sejten belüli eloszlást tapasztaltunk 24 óránál fiatalabb és 36 órás bábszárnyakban is, és ún. flip-out klónokban is, amelyek egyedi sejtszintű felbontást tesznek lehetővé (**46. ábra**). Ezek alapján a Rab23 fehérje nem mutat polarizált sejten belüli felhalmozódást sem a trichóma iniciáció időszakában sem azt megelőzően vagy közvetlenül utána.



46. ábra: Az YFP::Rab23 fehérje sejten belüli lokalizációja. (A-A") Az adherens junciók zónájában az YFP::Rab23 fúziós fehérje feldúsul a plazmamembránban, emellett citoplazmatikus rögökben is kimutatható. (B-B") A bazolaterális zónában is kimutatható az erős membrán felhalmozódás, míg а citoplazmatikus festődés gyengébb mint az apikális régióban. (C-D") Az YFP::Rab23-at flip-out klónokban kifejezve hasonló minta detektálható, mint az általános túltermelés esetében: proximo-disztális sejten belüli

polarizáció nem mutatható ki, de az adhéziós zónában egyértelmű az átfedés a DE-kadherinnel (pirossal jelölve) és a citoplazmatikus kifejeződés is látható. A D-D" panelek a C-C" paneleken bemutatott szárny Z metszeteit mutatják a vékony szürke vonal mentén. A skála mérete 5 µm az A-B paneleken, 20 µm a C-én.

Az előzőekben bemutatott kísérletek alapján a Rab23 fehérje ugyan nem mutat aszimmetrikus sejten belüli eloszlást, de befolyásolja a polarizált lokalizációjú elsődleges PCP fehérjék felhalmozódását. Ezért megvizsgáltuk van-e olyan polaritási fehérje, aminek a lokalizációját közvetlenül szabályozza a Rab23. Elsőként kolokalizációs vizsgálatokat terveztünk, minthogy azonban bábszárny sejtekben a Rab23 egységes membrán felhalmozódást mutat, a kezdeti lokalizációs tesztek nem adtak informatív eredményt. Ennélfogva a kolokalizációs kísérletekre olyan *Drosophila* S2 sejtkultúrát használtunk,

amelyikben normálisan nem vagy csak nagyon alacsony szinten fejeződik ki a Rab23 és az egyéb polaritási fehérjék [40]. Az S2 sejteket Rab23 hiányában és azzal együtt is transzfektáltuk a Fz, Dsh, Pk, Dgo vagy Stbm/Vang fehérjéket kifejező konstrukciókkal, majd összehasonlítottuk a sejten belüli eloszlási mintájukat. Mivel bizonyos PCP fehérjék membránasszociációja más PCP fehérjéktől függ, a Fz-Dsh és Stbm-Pk párok együttes mintáját is megvizsgáltuk Rab23 jelenlétében és hiányában. Megfigyeléseink szerint a Rab23 fehérje jelenléte ilyen körülmények között nem befolyásolja az elsődleges polaritási fehérjék sejten belüli eloszlását. Feltűnő volt azonban, hogy míg a Fz, Dsh és Dgo fehérjék nem mutattak kolokalizációt a Rab23-mal, a Pk és Stbm fehérjék részlegesen átfedő eloszlási mintát adnak (47. ábra) (a Fz esetében 0% volt a kolokalizációt mutató sejtek aránya, n=29; a Pk esetében viszont 96% mutatott részleges átfedést, n=54). Tekintve, hogy a Pk és Stbm fehérjék ebben a rendszerben nem rekrutálódtak a plazmamembránba (még együttesen sem), nem volt eldönthető van-e a Rab23-tól függő vezikulatranszport folyamatoknak közvetlen hatása a Pk és Stbm fehérjék sejten belüli eloszlására. Mindettől függetlenül eredményeink azt jelezték, hogy a Rab23 a Pk és Stbm fehérjék eloszlásának szabályozásán keresztül befolyásolhatja az elsődleges polaritási fehérjék lokalizációját. Ezt a hipotézist megrősítette az a tény is, hogy a Rab23 aktivált formája erős kolokalizációt mutatott a Pk fehérjével, míg a T69A mutáns változat gyakorlatilag nem mutatott kolokalizációt (47. ábra).

Az S2 sejtekben tapasztalt Pk/Rab23 és Stbm/Rab23 kapcsolatok további alátámasztása érdekében koimmunoprecipitációs kísérleteket végeztünk. Western blot analízis alapján Rab23 ellenanyagunk, a preimmun szérummal ellentétben, S2 sejtek fehérje kivonatában felismerte a HA::Rab23 fehérjét (**47. ábra G**), így alkalmasnak látszott biokémiai kísérletekre. Ennek megfelelően az anti-Rab23 ellenanyag vad típusú 28-30 órás pupális fehérje kivonatokból koprecipitálta a Pk fehérjét, míg ez *Rab23⁵¹* homozigóta mutánsok esetében nem következett be (**47. ábra H**). Ezzel párhuzamosan a Stbm és Fmi fehérjéket nem lehetett kimutatni a Rab23 komplexben (**47. ábra H**). Ily módon eredményeink azt jelzik, hogy a Rab23 *in vivo* is együttműködik a Pk fehérjével, ami magyarázatot ad a *Rab23* mutánsokban megfigyelhető Pk lokalizációs hibákra, és közvetett módon a többi PCP fehérje eloszlási hibáira is.

Amennyiben a *Rab23* egyetlen PCP-hez köthető funkciója a Pk és rajta keresztül egyéb PCP fehérjék lokalizációjának szabályozása lenne, azt várnánk, hogy a *Rab23* mutánsok hasonló fenotípust mutatnak mint a *pk* és egyéb elsődleges PCP mutánsok. A *Rab23* mutánsok azonban gyengébb trichóma orientációs hibákat okoznak, mint az elsődleges PCP mutánsok, ellenben azoknál jóval erősebb többes szőrkinövéses fenotípusuk van. Ezek

alapján úgy tűnik tehát, hogy a *Rab23* kettős funkcióval bír, mert egyrészt hozzájárul a PCP fehérjék polarizációjához, másrészt részt vesz a szőr iniciációs helyek számának meghatározásában, ill. korlátozásában. Ezt az elképzelést támogatják genetikai interakciós



47. ábra: A Rab23 és a Pk fehérje együttműködése. (A-F") Drosophila S2 sejtek ko-transzfektálási kísérlete: (A-A") Rab23 és Fz, (B-B") Rab23 és Dsh, (C-C") Rab23 és Stbm/Vang, (D-D") Rab23 és Pk, (E-E") Rab23Q96A (aktivált Rab23) és Pk, (F-F") Rab23T69A és Pk együttes kifejeződése. A Fz és Dsh fehérjék nem mutatnak szignifikáns mértékű kolokalizációt a Rab23 fehérjével (A-B"), míg a Stbm/Vang és Pk fehérjék részleges kolokalizációt mutatnak (C-D"). A kolokalizáció még erősebb az aktivált Rab23 és a Pk között (E-E"), de szinte kimutathatatlan a Rab23T69A mutáns és a Pk vonatkozásában (F-F"). (G) Western blot analízis normál S2 sejtekkel és HA-Rab23-mal transzfektált S2 sejtekkel. A HA-Rab23 fehérjét specifikusan felismeri a Rab23 ellenanyag és az anti-HA ellenanyag is, míg a preimmun szérum nem mutatja ki. A vad típusú Rab23 fehérje prediktált relatív mól súlya 30 kDa, a HA-Rab23 fehérjéé 40 kDa. (H) Immunoprecipitációs kísérletek 30 órás vad típusú és *Rab⁵¹* homozigóta mutáns bábokkal. Az anti-Rab23 ellenanyaggal való precipitálás után α-Rab23, α-Pk, α-Vang és α-Stan ellenanyagokkal végeztük a Western analízist. Látható, hogy vad típusban a Rab23 ellenanyag koprecipitálta a Pk fehérjét, míg a Vang/Stbm és Stan/Fmi fehérjéket nem lehetett kimutatni a Rab23 komplexben. *Rab23⁵¹* homozigóta mutánsok esetében a Rab23-Pk koprecipitáció nem következett be. A skála mérete 5 μm.

kísérleteink is, amelyek megmutatták, hogy a *Rab23* mutánsok domináns módon erősítik az elsődleges PCP mutánsok gyenge többes szőr fenotípusát (**48. ábra A-E'**), míg a *Rab23* mutánsok fenotípusát erősítik az In csoportba tartozó mutációk és a *mwh* (**48. ábra F-I**). Velük ellentétben, a sejtváz regulátorokat érintő *RhoA* és *drok* mutánsok nem mutatnak domináns interakciót a *Rab23*-mal (**49. ábra C**). Következtetésképpen eredményeink azt jelzik, hogy a Rab23 fehérje az elsődleges polaritási fehérjékkel, az In komplex-szel és az Mwh-val együttműködve szabályozza a sejtenkénti trichómák számát.



48. ábra: Genetikai interakciós vizsgálatok a *Rab23* és más PCP gének között. (A) Vad típusú szárnylemez disztális irányú egyedi trichómákkal. (B) A *Rab23⁵¹* mutánsban moderált számú többes szőrkinövések figyelhetők meg. A fz^{21} (C), $stbm^{6}$ (D) és pk^{pk30} (E) mutánsokban elvétve látunk többes szőröket, viszont erős trichóma orientációs hibák detektálhatók. A *Rab23⁵¹* mutáció dominánsan erősíti a többes szőr fenotípust a fz^{21}/fz^{21} , Rab23⁵¹ (C'), a $stbm^{6}$; $Rab23^{51/+}$ (D') és a pk^{pk30} ; $Rab23^{51/+}$ (E') mutáns kombinációkban. (F) A $Rab23^{51}/Rab23^{769A}$ allél kombináció teljesen hasonló PCP hibákat mutat, mint a $Rab23^{51}$ homozigóta mutánsok (B). Ez a moderált többes szőrkinövéses fenotípus jelentősen erősödik az $in^{1/+}$; $Rab23^{51}$ (G), a $frtz^{1/+}$; $Rab23^{51}$ (H) és az mwh^{1} , $Rab23^{51}/Rab23^{51}$ (I) mutáns kombinációkban. Az ábrán bemutatott összes kép a D szárnyszektorról készült, minden ábrán balra esik a proximális, jobbra a disztális irány. A fenotípusok számszerű összehasonlítása megtalálható a **49. ábrán**.



49. ábra: A *Rab23* és más PCP gének közötti genetikai interakciós kísérletek számszerű analízise. (A) Egy szárnylemez sémája, a többes szőrkinövések számát a négyszöggel határolt régióban vizsgáltuk genotípusonként 10-22 szárnylemez dorzális oldalán. A többes szőrkinövések átlagos száma *Rab23* és elsődleges PCP mutáns kombinációkban (B), *Rab23* és polaritási effektor mutáns kombinációkban (C) és kettős homozigóta mutáns kombinációkban (D). Statisztikai tesztként a *t*-tesztet használtuk, P a valószínűséget jelöli.

Annak érdekében, hogy a *Rab23* gént pontosabban is elhelyezzük a PCP gének ismert genetikai hierarchiájában, kettős mutáns analízisre épülő episztázis kísérleteket végeztünk az elsődleges PCP génekkel, az In csoport tagjaival és az *mwh*-val. A *Rab23* és *fz*, *stbm*, ill. *pk* kettős mutánsok hasonló trichóma orientációs hibákat mutattak, mint a megfelelő elsődleges PCP mutánsok önmagukban (**50. ábra**), azonban a trichóma szám tekintetében szinergisztikus kölcsönhatást találtunk, mert a kettős mutánsokra jellemző többes szőrkinövések száma jelentősen meghaladta az egyes mutánsokra jellemző számok összegét (**50. ábra**, kvantifikálva a **49. ábrán**). Érdekes módon ebben a tesztben a *pk* mutatta a legerősebb hatást, a *pk*; *Rab23* kettős mutánsok szárnyán szinte minden sejt több mint egy trichómát növesztett. Az *in*, *frtz* és *mwh* mutánsok esetében a kettős mutánsok fenotípusa megkülönböztethetetlen

volt az egyes *in*, *frtz* és *mwh* mutánsokétól (**51. ábra**). Ily módon a sejtenkénti trichóma szám korlátozása szempontjából az In csoport és az *mwh* episztatikus a *Rab23*-hoz képest, ami azt jelzi, hogy azok funkciójára később van szükség, ill. alsóbb szabályozási szinten hatnak, mint a *Rab23*. Az elsődleges PCP gének vonatkozásában a szinergisztikus interakció arra utal, hogy a *Rab23* egy azoktól független vagy (részben) redundáns jelátviteli útban vesz részt. Annak fényében azonban, hogy a Rab23 egy komplexben található a Pk-lel, továbbá a "core" mutánsok domináns genetikai interakciót mutatnak a *Rab23*-mal, és a *Rab23* befolyásolja az elsődleges fehérjék aszimmetrikus felhalmozódását, az egymástól teljesen független működésmód nagyon valószínűtlennek látszik.



50. ábra: Kettős mutáns analízis a *Rab23* és **az elsődleges PCP gének között.** (A) *Rab23^{769,4}* és (**B**) *Rab23⁵¹* mutáns szárnyak többes szőrkinövésekkel. (C) fz^{21} , (**D**) pk^{pk30} és $stbm^{6}$ (**E**) mutánsok szárnyak erős trichóma orientációs hibákkal. A fz^{21} , *Rab23⁵¹* (**C'**), a pk^{pk30} ; *Rab23⁵¹* (**D'**) és a $stbm^{6}$; *Rab23⁵¹* (**C'**), a pk^{pk30} ; *Rab23⁵¹* (**D'**) és a $stbm^{6}$; *Rab23⁵¹* (**C'**) kettős mutánsokban az erős orientációs hibák mellett jóval nagyobb számú többes szőrkinövést látunk, mint a *Rab23* egyes mutánsokban. A képek a D szárnyszektorról készültek, a disztális irány jobbra esik. Kvantifikáció a **49. ábrán**.



51. ábra: Kettős mutáns analízis a *Rab23* és a PCP effektor gének között. (A) *Rab23^{T69,4}* és (B) *Rab23⁵¹* mutáns szárnyak többes szőrkinövésekkel. Az *in*¹ (C), *frtz*¹ (D) és *mwh*¹ (E) mutáns szárnyak nagyszámú többes szőrkinövést hordoznak. Az *in*¹, *Rab23^{T69,4}* (C'), a *frtz*¹; *Rab23⁵¹* (D') és az *mwh*¹, *Rab23⁵¹* (E') kettős mutánsok gyakorlatilag azonos PCP fenotípust mutatnak, mint a megfelelő *in*¹, *frtz*¹ vagy *mwh*¹ mutánsok (C,D,E). A képek a D szárnyszektorról készültek, a disztális irány jobbra esik. Kvantifikáció a **49. ábrán**.

Tekintve, hogy az egér Rab23 ortológ a Shh jelátviteli út egyik esszenciális negatív szabályozó eleme [238,243], megvizsgáltuk köthető-e a *Drosophila Rab23* a Hedgehog (Hh) szignalizációs folyamatokhoz. Homozigóta *Rab23* mutáns embrionális és adult szövetek tanulmányozása után, azt a következtetést tudtuk levonni, hogy ezekben a mutánsokban sem az embrionális kutikulán, sem az embrionális központi idegrendszerben, sem az adult szárnyon nem mutathatók ki olyan defektusok, amelyek a jól jellemzett *hh* mutánsokra hasonlítanának [244]. Annak ellenére tehát, hogy a Rab23 fehérje evolúciósan erősen konzervált, a Rab23-Hh jelátviteli kapcsolat valószínűleg csak a gerinces fajokra jellemző.

Következtetések: 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 szárnyszőrök 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. Ugyanakkor számos korábbi megfigyelés azt jelzi, hogy a PCP fehérjék kortikális polarizációja döntő szerepet játszik a trichóma orientáció kijelölésében [8]. Mindezt egybevetve, a szárnyszőrök irányultságában megnyilvánuló gyenge fenotípus jól magyarázható a PCP fehérje eloszlásra gyakorolt hasonlóan gyenge hatással. Mivel a Pk fehérje egy komplexben található a Rab23-mal, az a következtetés adódik, hogy a Rab23 valószínűleg 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 [88]. A szárny és a potroh kutikula példáját összevetve érdekes látni, hogy az abdomenen a szárnnyal ellentétben erős trichóma orientációs hibákat figyelhetünk meg. Az abdomen esetében a sejten 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 [52]. A gátlás mechanizmusáról azt gondoljuk, hogy a proximális membrándoménben felhalmozódó Stbm és Pk fehérjék rekrutálják a In komplexet, ami viszont szabályozza az Mwh fehérje sejten 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 [52]. 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 In komplex molekuláris működésmódja azonban egyelőre ismeretlen, következésképpen a Rab23-tól függő In aktiváció és a Rab23/Pk kölcsönhatás természete az In aktiváció során szintén felderítésre vár.

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 sejten 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 [239,245]. 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 [238,246,247,248,249,250], és mindkét gén mutációi előidézhetik a *spina bifida* fenotípust [238,246,248,250]. Ezek az adatok együttesen felvetik annak a lehetőségét, hogy a Rab23-Hh kapcsolattal ellentétben, a Rab23-Pk kapcsolat evolúciósan a rovaroktól a gerincesekig konzervált.

3.6. Drosophila DAAM mutánsok előállítása és a PCP funkció vizsgálata

Matusek, 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), ill. Matusek Tamás nem közölt adatai alapján

Háttér: Az előző fejezetekből kiviláglott, hogy egyik fontos törekvésünk azt volt, hogy új PCP gének azonosításával majd részletesebb jellemzésével járuljunk hozzá a szöveti polarizálódás jobb megértéséhez. 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 [123]. 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.

Eredmények: A *dDAAM gén* az X kromoszómán, az 1F2-3 citológiai pozícióban helyezkedik el, és egy 1153 aminosavból álló fehérjét kódol. A prediktált fehérjén belül szekvenciahomológia alapján jól felismerhetők a forminokra általánosan jellemző FH1 és FH2 domének, illetve a DRF forminokra jellemző GBD, DID, DD, CC és DAD domének is (**52. ábra B**). A *dDAAM* gén genetikai analíziséhez szükséges *dDAAM* mutáns allélokat a lókusz közvetlen közelébe térképeződő P-elem inszerciós allélok, az EP(1)1336 és az EP(1)1542 segítségével állítottuk elő (**52. ábra A**). Mivel ezek az inszerciók önmagukban nem mutattak fenotípust, az inszerciókat újramobilizáltuk annak érdekében, hogy a *dDAAM* gén funkcióvesztéses alléljait állíthassuk elő. A P-elem kiugrasztások eredményeként izoláltunk egy deléció sorozatot, mely a gén 5' és 3' végét eltávolító deléciókat egyaránt tartalmazott (**52. ábra**). Az 5' deléciók nagy kiterjedésűek, és az 5' nemtranszlálódó exonokat, valamint intronikus szekvenciákat érintenek, míg a 3' deléciók kisebb méretűek (965-2538

bp), de mindannyian érintik a dDAAM nyitott leolvasási keretét. Legnagyobb 3' deléciónk, a $dDAAM^{Ex68}$ összesen 457 aminosavat távolít el a prediktált fehérjéből (**52. ábra**).



52. ábra: A *dDAAM* lókusz szerkezete és az új *dDAAM* allélok pozíciója. (A) Az 1F2-3 citológiai pozícióban található a *Drosophila* DAAM ortológ (*dDAAM*), amely a CG14622 Flybase annotációs számot kapta. A funkcióvesztéses allélok 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. Alul a nagyméretű 5' deléciók pozíciója látható. (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 (GBD, DID, DD, CC, FH1 és FH2, illetve DAD domének). A cDNS sémája alatt a 3' deléciók pozíciója látható.

Az 5' és 3' deléciók homozigóta formában (a legkisebb méretű 3' deléció, a $dDAAM^{Ex1}$ kivételével) letálisak voltak, és sem egymást, sem a dDAAM lókuszt kitakaró Df(1)AD11, Df(1)AC7 és Df(1)sta deléciókat nem komplementálták. Delécióink homozigóta letális fenotípusa 100%-ban menekíthető volt olyan genotípusú állatokban, melyek a dDAAM lókuszt transzpozíciós duplikáció (Dp(1;3)sta vagy Dp(1;Y)Sz280) formájában hordozták. A $dDAAM^{Ex1}$ mutáció szemiletálisnak bizonyult, belőle homozigóta életképes törzset lehetett alapítani, melynek életképessége a vad típushoz viszonyítva 17% volt a kikelő felnőtt legyek tekintetében. Vad típusú kromoszóma fölött, tehát heterozigóta formában a dDAAM deléciók egyike sem mutatott mutáns fenotípust. Kísérleteink alapján a dDAAM gén esszenciális szereppel bír az egyedfejlődés során, a dDAAM deléciói pedig recesszív hatású mutációkat okoznak.

Annak bizonyítására, hogy a deléciós alléljainkhoz köthető letalitás valóban a *dDAAM* gén funkcióvesztéséhez köthető, menekítési kísérleteket végeztünk. 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 letalitás minden esetben szignifikánsan menekíthető volt. A *dDAAM*^{Ex68} esetében a menekülő állatok 25,8%-a érte el a felnőttkort, a második legkisebb deléciót hordozó *dDAAM*^{Ex65} esetében ez az arány 93,6%-nak adódott. Kísérleteink alapján a menekítésekben, és a *dDAAM*^{Ex1}-gyel elvégzett komplementációs tesztekben tapasztalt túlélési arányok alapján egy allélerősségi sort lehetett felállítani. Eszerint minél nagyobb a *dDAAM*-ot érintő 3' deléció mérete, genetikai értelemben annál erősebb az adott *dDAAM* allél. Kísérleteink azt is igazolták továbbá, hogy a *dDAAM* lókuszban izolált deléciók valóban a *dDAAM* új alléljai, és nem érintenek más esszenciális genetikai elemet.

A dDAAM gén funkcionális jellemzése érdekében előállítottunk egy dDAAM specifikus ellenanyagot, amelyet felhasználtunk a dDAAM allélok jellemzésére is. Western blot alapján az ellenanyag vad típusú 15. stádiumban lévő embriókból, illetve L2 stádiumban lévő lárvákból készült fehérjekivonatban felismert egy 130 kDa-os sávot (**53. ábra**), ami megfelelt a dDAAM fehérje prediktált mólsúlyának. Ez a sáv $dDAAM^{Ex68}$ homozigóta mutáns L2 lárvákból készült fehérjekivonatban nem volt kimutatható, valamint nem kaptunk csonkolt fehérje termékre utaló sávot sem (**53. ábra**). Ezek alapján a $dDAAM^{Ex68}$ null mutáns allélnak tekinthető.



53. ábra: Az α-dDAAM ellenagyag. Vad típus L2 lárvákból (wt) az anti-dDAAM szérummal kimutatható egy 130 kDa-os sáv, ami megfelel a fehérje prediktált mólsúlyának. *dDAAM* mutánsokból csonkolt fehérje Western-blotton nem kimutatható L2 lárvákból készül fehérje kivonatból. A fehérjemennyiség kontrollja a Western-blotton az α-DAAM ellenanyag által jelölt ~100kDa méretű aspecifikus sáv.

A *dDAAM* mutánsok részletesebb analízise előtt kíváncsiak voltunk a gén kifejeződési mintájára is, hiszen az informatív lehet a funkcionális vizsgálatok szempontjából. A *dDAAM* kifejeződési mintájának meghatározására RNS *in situ* hibridizációt végeztünk különböző stádiumokban fixált vad típusú embriókon. Kísérleti eredményeink azt jelezték, hogy a *dDAAM* mRNS kifejeződik a fejlődő embrionális központi idegrendszerben (KIR) a 9. embrionális stádiumtól kezdődően, az embrionális trachearendszerben a 13. stádiumtól

kezdve, valamint a fejlődő szívcső kardioblaszt sejtjeiben is a 12. stádiumtól (**54. ábra**). A *dDAAM* mRNS korai 5. stádiumban lévő embriókban is kimutatható (**54. ábra**), ami anyai hatású transzkriptek jelenlétére utalt.



54. ábra: A *dDAAM* gén stádium és szövetspecifikus embrionális kifejeződési mintázata. A *dDAAM* gén embrionális kifejeződési mintája mRNS *in situ* hibridizációs kísérletek alapján. A legfontosabb specifikus expressziós doméneket zöld nyilak jelzik. A "sense" irányú kontroll RNS próba csak aspecifikusnak látszó nyálmirigy festődést mutatott (az ábrán egy 15. stádiumú embrió látható).

A dDAAM általános genetikai és molekuláris jellemzése után megvizsgáltuk okoz-e PCP defektusokat a gén hiánya. Ennek érdekében az összetett szemben és a szárnyakon az FRT/Flp rendszer [233], illetve a $dDAAM^{Ex68}$ null allél felhasználásával mitotikus rekombináció útján homozigóta mutáns klónokat hoztunk létre. Azonban 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 egyedek szövetein nem tapasztaltunk polaritási fenotípusokat. Ezek után megvizsgáltuk azt is, hogy a $dDAAM^{Ex68}$ egy kópiájának jelenléte módosítja-e a Fz és Dsh fehérjék túltermelésével előidézhető PCP fenotípusokat [45,56], de azt találtuk, hogy a $dDAAM^{Ex68}$ nem befolyásolja sem a *sev-fz*, sem *sev-dsh* okozta túltermeléses fenotípusokat az összetett szemben. Megfigyeléseink együttesen arra engednek következtetni, hogy a dDAAM gén vagy egyáltalán nem eleme a PCP jelátviteli útnak *Drosophila*-ban, vagy a funkciója teljesen redundáns ebben a rendszerben.

Következtetések: A *Drosophila* DAAM ortológ későbbi funkcionális analízise 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.

3.7. A dDAAM formin homológia doménjeinek biokémiai jellemzése

Barko S, Bugyi B, Carlier MF, Gombos R, Matusek 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) alapján

Háttér: A *Drosophila DAAM* tehát úgy tűnt nem játszik lényeges szerepet a planáris polaritás kialakításában, ugyanakkor a formin típusú sejtváz regulátorok *in vivo* funkcióiról komplex, többsejtű modellrendszerekben csak keveset tudtunk. Ezért elhatároztuk, hogy részletesen is megvizsgáljuk milyen fejlődésbiológiai funkciókkal bír a *dDAAM*. Ezzel párhuzamosan 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 sejtváz szabályozó funkciókkal. Mivel az aktin összeszerelődésben közvetlenül az FH1 és FH2 domének vesznek részt, kísérleteinket ennek a két doménnek a biofizikai és biokémiai vizsgálatára fókuszáltuk.

Eredmények: A tervezett kísérletek elvégzése érdekében bakteriális rendszerben előállítottuk a dDAAM FH2 és FH1-FH2 doménjeit tisztított fehérje formájában, majd először pyrene-aktin *in vitro* aktin polimerizációs tesztben hasonlítottuk össze az aktivitásukat. Mindkét fragmentum jelentősen növelte a polimerizált aktin mennyiségét, és ilyen körülmények között nem volt jelentős különbség a hatékonyságukban (**55. ábra A**). Ismert, hogy a forminok két fontos aktivitással rendelkeznek, egyrészt aktin nukleáló faktorok, másrészt a filamentumok növekedését is elősegítik [170]. A pyrene-aktin teszt azonban nem alkalmas ennek a két aktivitásnak a megkülönböztetésére, mert csak a nettó F-aktin képződést méri. Ezért következő lépésként az egyedi aktin filamentumok követésére alkalmas TIRFM (teljes belső visszaverődéses fluoreszcencia mikroszkópia) vizsgálatokat végeztük. Megállapítottuk, hogy az FH2 és az FH1-FH2 fragmentumok jelenlétében sokkal több aktin filamentum nukleálódik, mint spontán módon (**55. ábra B**), míg a filametumok

elongációs sebessége csökkent a dDAAM fragmentumok jelenlétében. Ez azt jelezte, hogy az FH2 és FH1-FH2 domének önmagukban a magas nukleáló aktivitásuk miatt képesek növelni az F-aktin szintet a pyrene-aktin polimerizációs tesztben.



55. ábra: A dDAAM-FH2 és dDAAM-FH1-FH2 hatása az aktin polimerizációra. (A) Pyrenil aktin polimerizációs teszt (3.5 μM aktin, 5% pyrenil jelölt). A dDAAM-FH2 és dDAAM-FH1-FH2 1 μM-os koncentrációban eléri a maximális hatását a polimerizáció sebességére. A belső ábrán az aktin beépülési ráta időbeli változása látható emelkedő dDAAM-FH2 koncentráció mellett. Az FH2 domén nyilvánvalóan gyorsítja a polimerizáció sebességét. (B) TIRFM mikroszkópia mutatja, hogy a jelzett aktin és dDAAM-FH2, ill. FH1-FH2 koncentráció mellett a dDAAM fragmentumok jelenlétében jelentősen több, de jóval rövidebb aktin filamentum képződik, mint spontán módon. A dDAAM ilyen körülmények között tehát a nukleációs aktivitásán keresztül növeli az F-aktin mennyiséget. A skála mérete: 10 μm.

In vivo körülmények között a forminok hatékonyan képesek beépíteni a profilinaktinként tárolt aktin monomereket a növekvő filamentumokba [170]. Ezt a folyamatot nagymértékben elősegíti a profilin kötésre képes FH1 domén. Emiatt megvizsgáltuk hogyan

befolyásolja a profilin fehérje jelenléte az FH2, ill. FH1-FH2 fragmentumok polimerizációs tulajdonságait. Azt találtuk, hogy *in vitro* rendszerünkben a profilin jelenléte gátolta az FH2 domén aktivitását, viszont jelentősen növelte az FH1-FH2 aktivitását (**56. ábra A**). Ezzel összhangban TIRFM mikroszkópiával megmutattuk, hogy profilin hatására a filamentum szöges végén jelentősen csökken az FH2 doménnel mérhető növekedési sebesség, míg az FH1-FH2 esetében számottevően növekszik az elongációs ráta (**56. ábra B**). Ezek a kísérletek tehát megerősítették, hogy az FH1 domén mediálja a profilin és a formin közötti



56. ábra: A profilin hatása a dDAAM aktin polimerizációs tulajdonságaira. (A) Pyrenil aktin (3.5 μ M aktin, 5% pyrenil jelölt) polimerizációs teszt profilin jelenlétében (5 μ M) vagy hiányában. A profilin jelentősen emeli a dDAAM-FH1-FH2 polimerizációs sebességét, de erősen gátolja a dDAAM-FH2-ét. (B) Valós idejű TIRFM mikroszkópiával egyedi aktin filamentumok növekedési sebességét követtük állandó aktin és profilin koncentráció mellett. Az FH-FH2 fragmentum elősegítette a növekedést, míg az FH2 domén jelentős mértékben gátolta azt. A sebességeket (v) a jobb oldali panelek mutatják. A skála mérete: 10 μ m.

kölcsönhatást, továbbá azt is, hogy a dDAAM FH1-FH2 fragmentum elősegíti a filamentumok profilin-aktinból történő polimerizálódását.

A forminok működésmódjára jellemző, hogy az aktin filamentumok szöges végéhez folyamatosan kötődve maradnak a polimerizáció során és ily módon processzív elongációs faktorként működnek [251,252,253]. Ezt az aktivitást *in vitro* rekonstruált biomimetikus mozgás tesztekben [253] egyértelműen ki tudtuk mutatni profilin-aktin és az FH1-FH2 fragmentum jelenlétében, míg profilin hiányában mozgást nem detektáltunk [254]. Az FH2 domén sem profilin jelenlétében sem annak hiányában nem mutatott processzív elongációs aktivitást. Ezek alapján a dDAAM FH1-FH2 fragment képes kötődni az aktin filamentumok szöges végéhez, ko-szedimentációs kísérletekkel azt is megvizsgáltuk azonban, hogy kizárólag oda tud-e kötődni vagy a filamentum más részeihez is. Vizsgálataink alapján mind az FH2, mind pedig az FH1-FH2 fragmentumok együtt ülepedtek az aktin filamentumokkal, de a pelletben mért magas koncentrációjuk jelezte, hogy nem csak a filamentumok végéhez képesek kötődni, hanem a filamentumok oldalához is [254]. Ezzel összhangban fluoreszcensen jelölt aktin filamentumok és dDAAM FH2, ill. FH1-FH2 fehérjék jelenlétében azt is meg tudtuk mutatni, hogy a dDAAM fragmentumok elősegítik a filamentumok keresztkötését (**57. ábra**).



A dDAAM formin 57. ábra: homológia domének aktin keresztkötő hatása. (A) Rhodamine phalloidinnel jelölt aktin filamentumok amelyek 1 µM aktin és 500 nM dDAAM-FH2 vagy dDAAM-FH1-FH2 jelenlétében polimerizálódtak. (B) dDAAM-FH2 dDAAM-FH1-FH2 vagy jelenlétében polimerizált egyedi aktin filamentumok vastagságának eloszlása. Látható, hogy az FH domének vastagabb filamentumok képződését segítik elő, mint a spontán képződő filamentumok.

Az eddig bemutatott *in vitro* adatok alapján a dDAAM FH1-FH2 fragmentumával rekonstruálni lehetett a DRF család más tagjaira is jellemző tulajdonságokat, többek között bizonyítani tudtuk, hogy a profilin-kötő domén, ill. a profilin-aktin kötődés fontos szerepet

játszik a fehérje aktivitásában. Ezt a fontos megállapítást *in vivo* kísérletekkel is igazolni akartuk. Ennek érdekében az FH2 és FH1-FH2 doméneket YFP-vel jelöltük és Drosophila S2 sejtek transzfektálására alkalmas konstrukciókba építettük. A dDAAM fehérjét kimutatható mértékben nem expresszáló S2 sejtek transzfekciója után azt tapasztaltuk, hogy az YFP::FH2 és az YFP::FH1-FH2 fehérjék is nagy mennyiségben kimutathatók a transzfektált sejtek citoplazmájában és sejtmembránjában (**58. ábra**). Míg azonban az FH2 domén nem okoz változásokat sem az aktin filamentumok szintjén, sem a sejtalakban, az FH1-FH2 fragmentumot kifejező sejtek gyakran erősen megnövekedett F-aktin szintet mutattak, és kb. 25 %-uk kiterült és lamellipódiális és/vagy filopódiális sejtnyúlványokat növesztett (**58. ábra**).



58. ábra: A dDAAM-FH2 és FH1-FH2 túltermelése Drosophila S2 sejtekben. (A-C)YFP::FH2-vel transzfektált S2 sejtek. Látható, hogy a fúziós fehérjét kifejező sejtek (A panel, ill. zölddel jelölve a C panelen) alakja és aktin mintája (B) azonos a nem transzfektált sejtekkel (nyilak a B és C paneleken). (D-F) YFP::FH1-FH2-vel transzfektált S2 sejtek. Az FH1-FH2-őt kifejező sejtek (D panel, ill. zölddel jelölve az F panelen) gyakran filopódium-szerű nyúlványokat növesztenek, továbbá aktin szintjük jelentősen magasabb (E) és méretük jóval nagyobb, mint a nem transzfektált sejteké (nyilak az E és F paneleken). A skála mérete: 5 µm. (G) Az FH2 és FH1fragmentumok által előidézett FH2 sejtalak változások előfordulási gyakorisága. (H) Az FH1-FH2 által előidézett sejtalak változások előfordulási gyakorisága profilin (chic) specifikus dsRNS jelenlétében ill. hiányában.

Megfigyeléseink tehát jelezték, hogy az FH1 domén jelenléte drámaian megváltoztatja az FH2 domén *in vivo* aktivitását, és együttesen olyan aktivált forminként viselkednek, ami aktin sejtváz alapú motilis sejtnyúlványok képződését segíti elő. Az FH2 és FH1-FH2 domének eltérő *in vivo* viselkedése molekuláris szinten többféle modellel magyarázható, a legkézenfekvőbb elképzelés azonban az, hogy az FH1 domén a profilin-aktin kötésen

keresztül biztosítja az FH2 domén aktin összeszerelő aktivitásához szükséges aktin monomereket. Ezt a hipotézist oly módon teszteltük, hogy megvizsgáltuk a dDAAM FH1-FH2 fragmentuma által indukált sejtalak változások profilin függését. Az egyetlen *Drosophila* profilin gént RNS interferenciával csendesítettük. Az erős csendesítés sejthalált eredményezett, ami jelzi, hogy a profilin esszenciális fehérje. Moderáltabb szintű csendesítés mellett viszont a sejtek többsége életben maradt és kimutattuk, hogy az FH1-FH2 ebben az esetben csak csökkent mértékben volt képes sejtalak változásokat előidézni (**58. ábra H**). *In vivo* adataink tehát megerősítették az *in vitro* kísérletek alapján levont következtetésünket miszerint a dDAAM FH1-FH2 fehérje profilin-függő módon működik.

Következtetések: A Drosophila DAAM fehérje formin homológia doménjeinek biokémiai vizsgálata során bebizonyítottuk, hogy az FH2 domén magában, ill. az FH1 doménnel kiegészülve is *bona fide* forminként 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 sejtes 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. Hasonló viselkedést ugyan más forminok esetében is leírtak már [255,256], de ezek a megfigyelések is jól jelzik, hogy a forminok az aktin nukleáción túl egyéb módon is hozzájárulhatnak az aktin sejtváz szabályozásához.

91

3.8. A *dDAAM* szerepe a *Drosophila* trachearendszerben

Matusek, 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) alapján

Háttér: 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 sejtváz szabályozásában. A *Drosophila* trachearendszere az embrionális ektodermából lefűződő, összesen húsz primordiális sejtcsoportból alakul ki. 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 trachea primordiális sejtek a lefűződés után intenzív vándorláson (migráció) és megnyúláson mennek keresztül, amelyek következtében a 13. embrionális stádium végére kialakulnak az elsődleges és a másodlagos trachea elágazódások a metamerikus egységekben [257,258,259]. Később megtörténik a metamerikus egységekben kialakult ágrendszer összekapcsolása a szegment határokon (**59. ábra**), és differenciálódnak a terminális elágazódások is. Ennek következtében kialakul az embrionális légcsőrendszer végső ágrendszere, amelyet sejtes felépítése alapján



59. ábra: A kifejlett embrionális trachearendszer. (A) Lumenális antigénnel (2A12) 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 metamer hasonló elágazásmintát mutat. A primer elágazások multicelluláris felépítésűek, melyeket reguláris tracheasejtek építenek fel (szürke). Róluk unicelluláris II. típusú elágazások, majd azokból terminális végződések ágaznak le (kék). A metamerikus egységeket speciális fúziós sejtek (piros) kapcsolják össze a szegment határokon így biztosítva a légcsőrendszer folyamatosságát. Az eredeti ábra forrása: Uv et al., 2003.

három ágtípusra oszthatunk. Az első típusba a két hátoldali fő légvezeték tartozik, amelyekben a lument 2-5 ellaposodott, egymáshoz szorosan kapcsolódó sejt határolja (**60**. **ábra**). A második ágtípusba a dorzális, viszcerális és ganglionikus elágazások tartoznak, amelyek szintén multicellulárisak, de bennük a sejtek egymás után sorban helyezkednek el fejtől-farokig ("head-to-tail") formációban, és így a másodlagos elágazódások üregét egy-egy autocelluláris adherens junkciókat tartalmazó sejt határolja (**60**. **ábra**). A harmadik ágtípusba a terminális végződések sorolhatóak. Ezek egyetlen sejten belül alakulnak ki és tulajdonképpen sejten belüli kapilláris-szerű elágazódások (**60**. **ábra**), amelyek felszínén megtörténik a gázcsere. Végezetül említést érdemel még, hogy az egységes trachea ágrendszer kialakulásában fontos szereppel bírnak az ún. kapcsolósejtek vagy fúziós sejtek. Morfológiájukat tekintve ezek lapos, lyukas korongra emlékeztető sejtek, melyek a szegment határokon párosan kapcsolódva szoros sejt-sejt kölcsönhatások révén biztosítják a légcsőrendszer folyamatosságát (**60. ábra**) [260].



60. ábra: A légcsőrendszert felépítő sejtek típusai. A légcsőrendszer felépítésben négy sejttípus játszik szerepet, ezek elektronmikroszkópos képe látható a fölső, míg sematikus ábrázolásuk az alsó paneleken. A fő légcsövek lumenét 2-5 egymáshoz szorosan kapcsolódó sejt határolja. A másodlagos elágazások területén cső alakú, autocelluláris junkcióval záródó sejteket találunk. A szegment határokon a fő és mellékágak folytonosságát párosával kapcsolódó gyűrű alakú fúziós sejtek biztosítják. A terminális végződéseket sejten belüli nyúlványokat növesztő sejtek alkotják. AJ: adherens junkció, SJ: rés kapcsolat. Az eredeti ábra forrása: Uv et al., 2003.

A légcsőrendszer differenciálódásának utolsó fontos lépései a kutikula szekréció és az üreg kialakulása, ill. levegővel való feltöltődése. A kutikula szekréció az embrionális fejlődés 15. stádiumát követően indul meg a tracheasejtek lumenális, apikális felszínén. Érdekes módon a tracheakutikula felépítése eltér az ecetmuslica többi testtáját borító szőrökkel borított, de egyébként sima felszínű kutikula szerkezetétől, mert a légvezetékekben a kutikula

bordázott felszínű (**61. ábra A-C**). A légcsövek hosszmetszetére merőleges lefutású kutikulabordák (taenidial folds) sűrűn egymás mellett állnak, és ez a porszívócsőre emlékeztető mintázat azt sugallta, hogy a kutikulabordák hozzájárulnak ahhoz, hogy hosszanti irányban kellően flexibilisek, míg merőleges irányban kellően merevek legyenek a légcsövek. 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 [257,258,259], elhatároztuk, hogy részletesebben is megvizsgáljuk milyen szerepet játszhat egy formin típusú aktin sejtváz regulátor a trachearendszer fejlődése során.

Annak érdekében, hogy felderítsük szerepet játszik-e a dDAAM a Eredmények: tracheafejlődésben, *dDAAM^{Ex68}* zigótikus null mutáns embriók és lárvák légcsöveit vizsgáltuk meg. A dDAAM mutáns embriók légcsőrendszere az elágazások alapján szerkezetileg vad típusú volt, megfigyeltük azonban, hogy a lárvális légcsövek kutikula mintája jelentősen eltér a vad típustól (61. ábra). A mutánsokban a kutikulabordák lefutása nem merőleges a tracheacsövek hossztengelyére és egymással sem párhuzamos, hanem véletlenszerű, de kisebb területeken lokálisan rendezett mintát mutatnak a trachearendszer teljes területén (61. ábra). Ezen kívül a fő tracheaágakon benyomódásokat, idősebb lárvákban pedig akár szakadásokat is látni lehet (61. ábra D). A normál tracheasejtekre jellemző hibákkal ellentétben, a kapcsolósejtek kutikula mintáját nem befolyásolta a *dDAAM* gén hiánya, ami jó összhangban van azzal a megfigyelésünkkel, hogy a dDAAM fehérje immunfestések alapján nem mutatható ki a fúziós sejtekben, kizárólag a többi tracheasejtben fejeződik ki (62. ábra). A dDAAM mutánsra jellemző trachea fenotípus részlegesen menekíthető a dDAAM cDNS-t hordozó konstrukció (UAS-FL-DAAM) általános (act-Gal4-es), illetve trachea specifikus (btl-Gal4-es) túltermelésével (61. ábra), míg a dDAAM lókuszt is hordozó Dp(1;Y)Sz280 transzpozíciós duplikációval tökéletesen menekíthető. Kísérleti eredményeink tehát arra utaltak, hogy a dDAAM gén funkciója a légcsőrendszerben a megfelelő kutikula mintázat kialakításához, a kutikulabordák rendezéséhez kötődik.

Mivel a forminok egyik fő funkciója az aktin citoszkeleton nem-elágazó kötegeinek kialakítása, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy *dDAAM* mutáns állatokban kialakuló abnormális kutikula minta összefüggésbe hozható-e az aktin sejtvázat érintő változásokkal.

94



61. ábra: Vad típusú és *dDAAM* mutáns tracheák kutikula szerkezete. Az (A) panel egy sematikus tracheát ábrázol, ahol a tracheasejtek belső, lumen felé eső apikális felszínén egy speciális szerkezetű kutikula alakul ki. A trachea kutikulában a légcső hossztengelyére merőleges lefutású bordák találhatóak, melyek L3 stádiumban (B) a kiboncolt fő légvezetéken is megfigyelhetőek. A vad típussal (C) összehasonlítva a $dDAAM^{Ex68}$ homozigóta mutáns lárvák (D) légcsövein benyomódások és szakadások figyelhetőek meg (piros nyilak). (E) A $dDAAM^{Ex68}$ homozigóta mutáns állatokban sérült a kutikulabordák szerkezete. (F) A *btl-Gal4* forrás segítségével meghajtott *UAS-FL-DAAM* transzgén részlegesen menekíti a kutikula defektusokat $dDAAM^{Ex68}$ háttéren. A skála mérete: 50 µm.

Ehhez szükség volt arra, hogy sejtszinten is megvizsgáljuk a tracheasejtek aktinvázának szerkezetét, illetve a dDAAM fehérje lokalizációját a légcsőrendszer sejtjeiben. Ennek során megfigyeltük, hogy az embrionális élet folyamán a trachea hossztengelyére merőlegesen, a tracheasejtek apikális felszínén vastag aktinkötegek alakulnak ki, melyek lefutása hasonló a kutikulabordákéhoz (**62. ábra**). Fluoreszcensen jelölt aktint (*UAS-Actin::GFP*) trachea specifikusan túltermelve, élő embriókban azt találtuk, hogy ezek az aktinkötegek még a trachea kutikula szekréciója előtt (a késői 15. embrionális stádiumot megelőzően) jönnek létre (**62. ábra N**). Az apikális aktinkötegeket a lárvális légcsőrendszer sejtjeiben szintén ki lehetett mutatni, ahol a kötegek lefutása és száma egyértelműen megfeleltethető volt a kutikulabordák számának és lefutási mintájának (**62. ábra A-D**). Vad típusú embriókon elvégzett immunfestéseink pedig feltárták, hogy a dDAAM fehérje erős kolokalizációt mutat az aktingyűrűkkel a trachearendszer sejtjeinek apikális felszínén (**62. ábra E-J**).

dc_21_10



62. ábra: A dDAAM párhuzamos lefutású aktinkábeleket alakít ki a trachea sejtjeiben. (A) Vad típusú lárvális tracheasejtekben az aktin párhuzamosan futó kötegekbe rendeződik, melyek lefutása merőleges a légcső hossztengelyére. (B) A kábelek száma és lefutási mintája tökéletesen megfeleltethető a kutikulabordák számának és mintázatának. (C,D) A sejtekben a kábelek az adherens junkciók (AJ) régiójában futnak. (C) Konfokális mikroszkóppal készült Z-tengely irányú projekció, ahol az aktin piros színnel jelölt, a DE-kadherin 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 GFPvel jelölt (zöld csatorna), az aktin piros, a dDAAM fehérje pedig kék színben látszik. Az F panelen a nyíl egy fúziós sejtpárt jelöl a szegment határon, 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 légcsövek apikális membránján a dDAAM szorosan kolokalizálódik az aktinnal. dDAAM^{Ex68} mutáns tracheákban mind a kutikulaminta (K), mind az aktinkötegek lefutása súlyosan károsodik a lárvális (L) és az embrionális légcsövekben is (M). A kialakuló aktin filamentumok vékonyabbak és rövidebbek, mint a vad típusban, és nem rendeződnek párhuzamos lefutású kötegekbe. (N) Az aktinkötegek először a korai 15. embrionális stádiumban vehetőek észre élő embrióban GFP-vel jelölt aktint (aktin::GFP) használva. A skálák mérete: 20 µm az A panelen, 50 µm a C és az L paneleken; 10 µm az E-G, M paneleken.

Ezek után kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen szerkezetű az aktin sejtváz $dDAAM^{Ex68}$ 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 tracheasejtekben (**62. ábra L,M**). Az aktinkötegek lefutása $dDAAM^{Ex68}$ homozigóta mutánsokban a vad típushoz hasonlóan egybeesett a kutikulabordák mintázatával (**62. 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 funkcióvesztéses mutánsok vizsgálata után túltermeléses kísérleteket végeztünk. Elsőként a teljes hosszúságú fehérjét teszteltük és megállapítottuk, hogy az UAS-FL-DAAM konstrukció tracheaspecifikus túltermelésének nincs hatása a kutikulamintára sem a reguláris tracheasejtekben, sem pedig a kapcsolósejtekben (ahol a dDAAM fehérje endogén módon nem is fejeződik ki). Következő kérdésünk az volt, hogy a dDAAM aktivált formái milyen módon befolyásolják a tracheasejtek fejlődését. Két aktivált formát is vizsgáltunk, egyrészt az FH1-FH2 doméneket hordozó konstrukciót, ami S2 sejtekben egyértelműen aktivált forminként viselkedett (58. ábra) [254], másrészt az ún. C-DAAM konstrukciót, ami a fehérje teljes C-terminális felét tartalmazta. Kontrollként felhasználtuk a legjobban jellemzett *Drosophila* DRF formin, a Diaphanous (Dia) konstitutívan aktív formáját is (dia^{CA}) [261]. Az FH1-FH2 és C-DAAM túltermelése esetében a reguláris tracheasejtekben a funkcióvesztéses fenotípushoz nagyban hasonlító randomizált borda lefutási mintát láttunk. A sejtekben az aktingyűrűk lefutása is követte ezt az abnormális kutikulamintát (63. ábra A,B). A kapcsolósejtekben azonban szintén erős fenotipikus hatásokat figyeltünk meg. Vad típus esetében a kapcsolósejtek kutikulája és aktin sejtváza eltér a reguláris tracheasejtekre jellemző mintától. A fúziós sejtek ugyanis kicsik, korong alakúak, kutikulájuk pöttyözött, szemben az elnyúlt reguláris tracheasejtek bordázatos mintájával (63. ábra C,D). Ezzel szemközt a C-DAAM-ot kifejező kapcsolósejtek morfológiájukban a normális tracheasejtekhez kezdtek hasonlítani. Kutikulájukból és aktin sejtvázukból részben eltűnt a pöttyözött minta, helyette egy inkább hosszanti lefutású, a normális tracheasejtekre jellemző kutikula minta jelent meg. Az ilyen fúziós sejtekben képződő aktinkötegek nem rendezettek, lefutásuk véletlenszerű volt (63. ábra E,F), emellett vad típusú kapcsoló sejtekkel összehasonlítva a mutáns kapcsoló sejtekben nagyban megnövekedett az F-aktin mennyisége. Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy a C-DAAM aktivált fehérjeként működve katalizálja az új aktinláncok képződését, de a kész filamentumok rendezésére képtelen.



63. 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 sejtváz 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, a pöttyözött kutikula-, és aktinminta részben eltűnik (E,F), bizonyos területeken hosszanti lefutású bordák jelennek meg rajta, ami emlékeztet a taenidia mintára (E). Ezen felül a C-DAAM-ot kifejező fúziós sejtekben erős aktin feldúsulás figyelhető meg, és gyakran láthatóak bennük egyedi, hosszanti lefutású aktin filamentumok (F). A fluoreszcens festéseket tartalmazó paneleken (B,D,F) a sejthatárokat DE-kadherin festéssel jelöltük (zöld), a kapcsolósejteket a D és F paneleken fehér nyilak mutatják. (G) A C-DAAM túltermelés nem befolyásolja a légcsőrendszer általános szerkezetét, míg a (H) Dia^{CA} (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 2A12 lumenális ellenanyag segítségével tettük láthatóvá. A skálák mérete: 50 μm a B;10 μm a D, F, G és H paneleken.

Tekintve, hogy a DRF családba tartozó forminok nagyfokú hasonlóságot mutatnak az FH2 doménben, megvizsgáltuk, hogy az aktivált dDAAM formákhoz köthető fenotípusok specifikusak-e erre a forminra vagy egy általános formin funkciót tükröznek. Azt tapasztaltuk,

hogy az *UAS-C-DAAM* túltermelése nem befolyásolja az ágrendszer kialakulását az embrionális tracheában, ellenben a Dia^{CA} túltermelés szakadásokat, fúziós hibákat eredményezett (**63. ábra G,H**). Ez arra utalt, hogy a Dia^{CA} túltermelés, a C-DAAM-mal ellentétben, már a trachea differenciálódás korai lépéseit is megzavarja, egyúttal jelzi, hogy a dDAAM specifikus trachea funkcióval bír az apikális aktinkábelek összeszerelésén és elrendezésén keresztül.

A reguláris tracheasejtek esetében a C-DAAM túltermelés hatása a *dDAAM* funkcióvesztéses fenotípusára emlékeztetett. Mi lehet ennek a magyarázata? Az irodalomból ismert, hogy a DRF forminok dimerként működnek [179,181], elképzelhető tehát az a modell, miszerint az aktivált DAAM fragmentumok az endogén dDAAM-mal összekapcsolódva heterodimer formában kimerítik a vad dDAAM mennyiséget, ami antimorf hatásként funkcióvesztéses fenotípusok kialakulásához vezet. Ugyanakkor az aktinkábelek lefutásából az is nyilvánvaló, hogy az N-terminálisan csonkolt aktivált DAAM fehérjék önmagukban képtelenek biztosítani az aktinkábelek normális elrendeződését a megfelelő helyen. Ez arra utal, hogy a dDAAM fehérje N-terminális része, a fehérje inaktív állapotának fenntartásán kívül, fontos lehet a fehérje megfelelő sejten belüli lokalizációjában is. A kapcsolósejtek vad típusban az endogén dDAAM fehérjét nem fejezik ki, tehát itt az ektopikus expresszió a kapcsolósejtek fenotípusa alapján egy neomorf hatást eredményezett.

Amennyiben a C-DAAM valóban képes közvetlenül kapcsolódni az endogén dDAAM fehérjéhez és gátolni annak aktivitását, azt várnánk, hogy a C-DAAM és a teljes hosszúságú dDAAM fehérje együttes túltermelése gyengébb kutikula fenotípust eredményez, mint a C-DAAM túltermelés önmagában. Ebben az elrendezésben ugyanis visszapótoljuk a rendszerbe a teljes hosszúságú dDAAM fehérjét, ami növeli az FL-DAAM típusú dimerek keletkezésének esélyét. Elvégezve az együttes túltermelést valóban azt tapasztaltuk, hogy az FL-DAAM jelenléte gyengítette a C-DAAM túltermeléses mutáns fenotípusát a normál tracheasejtekben, ugyanakkor a kapcsolósejtek fenotípusára nem volt semmilyen hatással (**65. ábra E**). Ez az eredmény tehát alátámasztja azt a hipotézist, hogy az aktivált DAAM fehérje antimorf hatású és képes akadályozni a vad típusú fehérje működését.

Kísérleteink további iránya az volt, hogy meghatározzuk melyek azok a faktorok amelyek együttműködnek a dDAAM fehérjével a trachearendszer területén. Ennek érdekében ismert aktin citoszkeleton regulátorok mutánsait vizsgáltuk domináns genetikai interakciókban a trachearendszerben $dDAAM^{Ex1}$ mutáns háttéren. A $dDAAM^{Ex1}$ hipomorf mutáció tracheakutikula fenotípusa moderált mértékű (**64. ábra A,E**), ami alkalmassá teszi potenciális kölcsönható partnerek tesztelésére a trachearendszerben. Munkánk során három

erős kölcsönható partnert azonosítottunk, amelyek a RhoA-t és az Src-család két tagját, az Src42A-t és a *Drosophila Btk* homológ Tec29-et érintik. $dDAAM^{Ex1}$ -es háttéren egy kópia *RhoA*^{72F}, *Src42A*^{E1}, illetve *Tec29*⁵⁶¹⁰ mutáció jelenléte szignifikánsan erősítette a $dDAAM^{Ex1}$ -es mutáns kutikula fenotípusát (**64. ábra B-D**). Ezek után kíváncsiak voltunk arra, hogy a kölcsönható jelöltek közül melyiknek van saját kutikula fenotípusa a tracheában. A *RhoA* esetében ez a vizsgálat nem volt lehetséges, mert a *RhoA*^{72F} homozigóta mutánsok a *RhoA* pleiotróp volta miatt még jóval a kutikulaszekréció előtt elpusztulnak. Az *Src42A*^{E1} és a *Tec29*⁵⁶¹⁰ allélok esetében a legkésőbbi letálfázis az L1-es lárvastádiumra esik, így ezekben a ritkán megjelenő homozigóta mutáns lárvákban már vizsgálni tudtuk a tracheakutikula szerkezetét. Az L1-es stádiumig túlélő homozigóta *Src42A*^{E1} és *Tec29*⁵⁶¹⁰ mutáns lárvák tracheakutikula mintája erősen emlékeztetett a $dDAAM^{Ex1}$ -es mutánsok fenotípusára (**64. ábra G,H**), ami jelezte, hogy valódi *in vivo* kölcsönható partnerek lehetnek.



64. ábra: A *dDAAM* kölcsönható partnerei a trachearendszerben. **(A)** А DAAM^{Ex1} 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 trachea fenotípusai már L1-es lárvális stádiumban is jól megfigyelhetőek. (G,H) A $Tec29^{5610}$ és az $Src42^{E1}$ homozigóta mutáns L1 lárvák légcsövein egy közepesen erős, a *dDAAM*^{Ex1}-hez hasonló kutikula fenotípus látható. Ezzel összhangban ezekben а mutánsokban az apikális aktinkábel struktúra is részlegesen sérült (I,J). A skálák mérete: 50 µm az A-H; 10 um az I,J paneleken.

Végezetül arra voltunk kíváncsiak, milyen szabályozási kapcsolatban állhatnak a potenciális együttműködő partnerek a *dDAAM*-mal, hol helyezkedik el a *RhoA*, az *Src42* és a *Tec29* 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 trachea fenotípust. A *RhoA*^{72F} mutáció nem volt hatással a C-DAAM túltermelés trachea fenotípusára (**65. ábra B**), míg az *Src42A*^{E1} és a *Tec29*⁵⁶¹⁰ mutációk jelenlétében a C-DAAM fenotípus jelentősen meggyengült (**65. ábra C,D**). Ezek az eredmények alátámasztották az irodalomban is elfogadott modellt, miszerint a Rho GTP-ázok családjába tartozó fehérjék a DRF forminok aktivátorai [170,188], a szabályozási hierarchiában tehát magasabb szinten hatnak, míg az Src család tagjai a forminoktól alsóbb szinten ható elemek [176,262].



65. ábra: Episztázis kísérletek C-DAAM-mal. (A) A C-DAAM túltermelés okozta kutikula fenotípus a trachea sejtjeiben, **(B)** melyre egy kópia *RhoA* hiánya nincs hatással, de egy kópia *Src42* **(C)** vagy *Tec29* **(D)** hiánya és a teljes hosszúságú dDAAM forma (FL-DAAM^{13.59}) együttes túltermelése **(E)** erősen szupresszálja azt. A skálák mérete: 50 μm.

Következtetések: 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 nem meglepő egy formin esetében, 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 valószínűleg a RhoA GTP-áz szabályozza. Megfigyeléseink szerint a dDAAM egyértelműen az autoinhibícióval szabályozódó forminok közé tartozik, és aktivitása a DRF forminokhoz hasonló módon szabályozódik, azaz a dDAAM-ot a Rho GTP-áz család tagjai aktiválják, nem pedig fordítva. Ily módon eredményeink cáfolni látszanak a Habas és munkatársai által bemutatott modellt, amelyben a DAAM a Rho GTP-ázoktól magasabb szabályozási szinten helyezkedik el [123]. Ebben a pillanatban nem világos ennek az ellentmondásnak a feloldása, de elképzelhető, hogy ellentétben a *Drosophila* DAAM-mal, ami nem vesz részt a PCP jelátvitelben, a gerinces DAAM ortológok eltérő módon szabályozódhatnak, ha egyszer már beépültek egy Dsh/PCP fehérje komplexbe.

A *RhoA* génen kívül két másik potenciális együttműködő partnert is azonosítottunk, és megmutattuk, hogy az *Src42A* és *Tec29* gének is hozzájárulnak a trachea kutikula minta kialakulásához. Szakirodalmi adatok alapján a forminok képesek közvetlen fizikai kölcsönhatásba lépni az SH3 domén tartalmú fehérjékkel [174,175,176,263]. Aspenström és

102

munkatársai kimutatták, hogy a hDaam1 GST pull-down kísérletekben képes az Src és a Btk (Tec29 humán homológ) tirozin kinázok SH3 doménjének kötésére [190]. Leírták ezen felül azt is, hogy a hDaam1 koimmunoprecipitációs kísérletekben fizikailag is kölcsönhat az Src fehérjével, ill. kolokalizálódik vele a sejtkitűremkedésekben [190]. 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 [176]. Ezen túlmenően arra is fény derült, hogy a humán DIA2C is Src aktiváción keresztül szabályozza az endoszómális vezikulák dinamikáját [262]. 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.

3.9. A dDAAM fehérje szerepe az embrionális axon növekedés szabályozásában

Matusek, 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) alapján

Háttér: A központi idegrendszer (KIR) fejlődése során a növekedési kúp esszenciális szerepet játszik az axonok megfelelő projekciójában. A környezet jelmolekuláira reagálva egy irányított növekedési kúp-mozgás jön létre, melyben a perifériális aktinnak és a központi mikrotubulus hálózatnak kiemelkedő szerep jut. A perifériális F-aktin párhuzamos lefutású filamentumokból álló kötegekbe rendeződik a filopódiumokban, míg a lamellipódiális területen egy diffúz filamentum hálózat figyelhető meg (**66. ábra**). Korábbi vizsgálatok során már számos olyan jelátviteli utat azonosítottak melyek részt vesznek az axon növekedés szabályozásában, és több olyan fehérjét is leírtak, melyek közvetlen szerepet játszanak a növekedési kúp aktin dinamikájának szabályozásában [264]. Közéjük tartozik a profilin, az elongációs faktorként működő Ena/VASP fehérje és a filamentumok lebomlását katalizáló kofilin.

Jól ismert ugyanakkor az is, hogy az axon növekedés új aktin filamentumok képződését is igényli, tehát minden bizonnyal aktin nukleáló faktorokra is szükség van. Mindezidáig azonban ellentmondásos kép bontakozott ki arról, hogy mely nukleáló faktorok játszanak szerepet az axon növekedés során. *Drosophila*-ban pl. az *Arp2/3* komplex szerepet

játszik az embrionális nyúlványnövekedésben [265], és bizonyos gerinces idegsejtekben is kimutatták a szerepét [266,267], de más adatok azt bizonyítják, hogy ez sem ecetmuslicában



66. ábra: A növekedési kúp sematikus szerkezete. A növekedési kúp sematikus rajzán láthatjuk, hogy a centrális régió mikrotubulusokban gazdag. а filopódiumokat (MT) míg és lamellipódiumokat tartalmazó perifériás régió főként aktin sejtváz elemeket tartalmaz. A filopódiumok párhuzamos lefutású F-aktin kötegeket tartalmaznak, míg a lamellipódiális részekre a hálózatos aktin jellemző. A mikrotubulusok egy populációja dinamikus, amelyek a megfelelő irányba növekvő filopódium mentén stabilizálódhatnak, ami a kúp előrehaladásának elengedhetetlen feltétele. Az eredeti ábra forrása: Dickson 2002

sem gerincesekben nem érvényes minden idegsejtre [268,269]. Ezen kívül az Arp2/3 komplex az elágazó-láncú filamentumok képződéséért felelős, ilyen struktúrákat azonban a növekedés szempontjából esszenciális filopódiumokban egyáltalán nem találunk, sőt a legújabb eredmények alapján, migráló sejtek lamellipódiumaiban sem [270]. A másik nukleáló faktor család, a forminok vonatkozásában hasonlóan ellentmondásos volt a kép. Az mDia1-ről kimutatták, hogy szövetkultúrában nevelt granuláris kisagyi sejtekben befolyásolja a nyúlványképződést [271], ugyanakkor ismert, hogy az mDial knock-out egér tökéletesen életképes és nem mutat idegrendszer fejlődési hibákat [272,273,274]. Az mDia2-ről leírták, hogy képes menekíteni Ena/Vasp deficiens idegrendszeri sejtvonalban a filopódium képződés defektusait, azonban ez a gén nem expresszálódik a fejlődő idegrendszerben a nyúlványnövekedés időszakában [275]. Ezek alapján nem valószínű tehát, hogy a központi idegrendszer nyúlványainak növekedését az mDia1 vagy az mDia2 in vivo befolyásolná. Ezzel szemben a gerinces DAAM ortológokról leírták, hogy génjeik kifejeződnek a fejlődő központi idegrendszerben [191,192], de funkcionális vizsgálatokat nem végeztek. Tekintve, hogy a *dDAAM* embrionális kifejeződési mintájának tanulmányozása során azt találtuk, hogy az egyetlen Drosophila DAAM ortológ is pán-neuronális kifejeződési mintát mutat, és a dDAAM FH1-FH2 fragmentuma S2 sejtekben filopódiális nyúlványok képződést indukálta [254], kiváló jelöltnek tűnt az axon növekedés szabályozására. Elhatároztuk tehát, hogy

funkcióvesztéses mutánsaink birtokában feltérképezzük milyen szerepet játszik a *dDAAM* gén a központi idegrendszer fejlődésében.

Eredmények: A transzkriptum szinten kapott kifejeződési minta igazolása érdekében protein szinten is megvizsgáltuk a *dDAAM* idegrendszeri kifejeződését. Immunfestéses kísérleteink bizonyították, hogy a dDAAM fehérje magas szinten expresszálódik a teljes embrionális KIRben és azon belül is felhalmozódik az idegsejtek nyúlványaiban, ahol kolokalizálódik az aktinnal (**67. ábra**). A fehérje az embriogenezis 12. stádiumától kezdődően kimutatható az idegrendszerben, ami egybeesik azzal az időszakkal, amikor elkezdődik az embrionális axonok növekedése [276]. A dDAAM fehérje sejten belüli eloszlását 11. stádiumú embriókból származó primer idegsejt kultúrákban tanulmányoztuk [277]. Megállapítottuk, hogy a dDAAM ezekben a sejtekben is kifejeződik, felhalmozódik a nyúlványokban, különösen a növekedési kúp területén, ahol főként a filopódiumokban mutatható ki (**67. ábra E-G**). A filopódiális festés apró rögökre, pöttyökre emlékeztet és kiemelendő, hogy a dDAAM fehérje gyakran kimutatható a filopódiumok csúcsában ahol az aktin filamentumok szöges vége található.



67. ábra: A dDAAM kifejeződése az embrionális KIR-ben. (A) RNS *in situ* hibridizáció alapján a *dDAAM* erősen expresszálódik a fejlődő neuroektodermában. (B-D) A dDAAM fehérje (piros a B,D paneleken) felhalmozódik a hasi idegkötegben a fő idegpályák mentén, ahol erős kolokalizációt mutat az aktinnal (zöld a C,D paneleken). (E-G) Primer idegsejt kultúrából származó neuronban a dDAAM fehérje (piros) kimutatható a növekedési kúpban, ahol főként a filopódiumokban található. Zöld az aktint jelöli, kék pedig a mikrotubulusokat. A skálák mérete: 50 μm.

Miután a fehérje lokalizációs kísérletek nagymértékben támogatták azt az elképzelést, hogy a dDAAM egy olyan aktin nukleáló faktor lehet, amelyik részt vesz a neuronális nyúlványok növekedésében, következő célunk a *dDAAM* mutánsok idegrendszerének vizsgálata volt. Kísérleteinkben az α -BP102 és α -FasII ellenanyagokat, mint idegrendszeri markereket használtuk. Az α -BP102 ellenanyag minden idegsejt nyúlványt megjelöl a központi idegrendszerben, míg az α -FasII ellenanyag a jobb és bal oldali hosszanti kötegeken belül 3-3 idegköteget jelöl ki (**68. ábra**). A mutáns analízis első fázisában $dDAAM^{Ex68}$ homozigóta mutáns embriók idegrendszerét vizsgáltuk meg, azonban ezek a zigótikus null mutáns embriók nem mutattak jelentős eltérést a vad típusú központi idegrendszerekhez képest (**68. ábra A,B**). Csupán az embriók 1,5%-ánál figyeltünk meg szakadásokat és



68. ábra: Axon növekedési rendellenességek a *dDAAM* mutáns embriókban. (A) Vad típusban a hasi idegkötegben az α-BP102 ellenanyag a teljes neuropilt festi, mely egy létraszerű struktúrát alkot. A hosszanti lefutású kötegek mellett a mintában szegmentenként két komisszúrális köteg található. (C,D) Az α-FasII ellenanyag a hosszanti kötegek csak egy karakterisztikus csoportját jelöli meg. (B) $dDAAM^{Ex68}$ zigotikus null embriókban csak gyenge KIR defektusok tapasztalhatóak, a hosszanti kötegekben α-BP102 festésen elvékonyodások, ritkán szakadások látszanak (nyilak). (E) Az α-FasII festésen a leglaterálisabb hosszanti kötegekben hiányok figyelhetőek meg. (F–H) A $dDAAM^{mat/zyg}$ embriókban megfigyelt fenotípus osztályok: I. típus, gyenge; II. típus, közepes; III. típus, erős fenotípus osztály. (I) A kapott KIR fenotípuok penetranciájának számszerű ábrázolása, valamit az UAS-FL-DAAM transzgén menekítő hatása a $dDAAM^{mat/zyg}$ fenotípusára. A skálák mérete 50 μm.

elvékonyodásokat a hosszanti idegkötegekben, ill. az embriók közel 40%-ában a laterális FasII-pozitív kötegekben hiányokat tapasztaltunk (68. ábra C-E). Mivel a dDAAM gén korábbi kísérleteink alapján maternálisan is kifejeződik, feltételeztük, hogy a gyenge fenotípusok oka a maternális géntermék menekítő hatása lehet. Ennek kiküszöbölése érdekében csíravonal klón kísérletekben maternálisan és zigotikusan is null mutáns embriókat hoztunk létre. Ezek az embriók azonban korai cellularizációs hibákat mutattak, és elpusztultak a KIR nyúlványainak kialakulása előtt, ezért alkalmatlanok voltak a további vizsgálatokra. További kísérleteinkben ezért $dDAAM^{Ex1}$ anyáktól származó maternálisan és zigotikusan is gyengített $dDAAM^{Ex1}/dDAAM^{Ex68}$ transzheterozigóta embriókat hoztunk létre (a továbbiakban $dDAAM^{mat/zyg}$). A $dDAAM^{Ex1}$ anyák és $dDAAM^{Ex68}/Y^{Dp(1;Y)SZ280}$ apák keresztezéséből származó teljes embriópopuláció 34%-ában szakadásokat láttunk a hasi idegköteg interszegmentális kötegeiben, ill. a keresztkötegekben (komisszúrákban), extrém esetekben a teljes interszegmentális köteg, valamint a komisszúrák is hiányoztak, emellett rossz irányba projektáló axonokat is ki lehetett mutatni (68. ábra F-H). A *dDAAM^{mat/zyg}* mutáns embriókban megfigyelhető nyúlványnövekedési defektusokat a minden sejtet érintő act-Gal4<UAS-FL-DAAM túltermelés 100%-ban, míg a KIR specifikus elav-Gal4<UAS-FL-DAAM túltermelés 95,8%-ban menekítette (68. ábra I). Ezek a kísérletek tehát igazolták, hogy a dDAAM valóban anyai hatású gén, és funkciója elengedhetetlen az embrionális idegkötegek kialakulásához.

Annak érdekében, hogy kizárjuk azt a lehetőséget, hogy a $dDAAM^{mat/zyg}$ mutánsokban megfigyelhető KIR fenotípusok nem sejthalálra vagy egyéb degenerációs folyamatokra vezethetők vissza, szükség volt néhány egyéb kontroll kísérletre is. Ezek során az általános idegrendszeri marker, α -Elav ellenanyaggal és a szegmentenként csak egy jól körülhatárolható számú idegsejtet jelölő α -Eve és α -En [278,279] ellenanyagok segítségével összehasonlítottuk a $dDAAM^{mat/zyg}$ mutáns és vad típusú embriók idegrendszerét. Az idegsejtek számát tekintve egyik ellenanyaggal sem tapasztaltunk különbséget a vad típusú és a dDAAM mutáns idegrendszerek között (**69. ábra**), tehát nem valószínű, hogy a dDAAM fenotípusok elsődleges oka az idegsejtek pusztulásával függ össze. A degenerációs folyamatok kizárása érdekében korai 12. stádiumban lévő embriókon elvégzett α -FasII festés segítségével, ami 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 (**70. ábra**). Ezek az eredmények együttesen azt tanúsítják, hogy a dDAAM nem a sejtsors meghatározásában vesz részt, és a dDAAM

107

mutációk okozta idegrendszeri fenotípusok nem sejthalál, vagy utólagos degenerációs folyamatok következtében alakulnak ki.



69. ábra: A *dDAAM* mutánsokban normális a neuronok száma. (A,B) Vad típusban a 16. embrionális stádiumban az α -En ellenanyag (zöld csatorna) 36-40 idegsejtet jelöl meg szegmentenként. (C,D) *dDAAM*^{mat/zyg} embriókban ez a szám nem változik. (G-J) Az α -Eve ellenanyag (zöld csatorna) által festett minta szintén identikus a vad típusban és a *dDAAM* mutánsban. Az A,C paneleken aktin festés (piros) jelöli a fő idegkötegeket, míg a G,I paneleken α -FasII festés (piros) segít tájékozódni. A skálák mérete 50 µm.



70. ábra: Axon növekedési defektusok 12. és 13. stádiumban lévő $dDAAM^{mat/zyg}$ embriókban. A korai 12. (A,B) illetve 13. stádiumokban (C,D) elvégzett α -FasII festés megmutatta, hogy a $dDAAM^{mat/zyg}$ embriókban (B,D) már az axonok képződésének korai szakaszában növekedési defektusok fedezhetőek fel (fehér nyilak) a vad típussal (A,C) összehasonlítva.

A dDAAM sejten belüli funkciójának meghatározása érdekében *dDAAM^{mat/zyg}* mutáns embriókból készített primer idegsejt kultúrákban vizsgáltuk az axonok és a növekedési kúpok szerkezetét vad típusú kontroll mellett. Azt tapasztaltuk, hogy a mutáns idegsejtekben hasonló hosszúságú axonok képződtek, mint a vad típusban, de bennük 62%-kal csökkent a képződő filopódiumok száma a vad típushoz képest, a filopódiumok hossza pedig 26%-kal lett
rövidebb (**71. ábra**). A LOF kísérletek tehát arra utalnak, hogy a dDAAM fehérje sejtes szinten a filopódium képződés szabályozásában vesz részt az axonok növekedési kúpjában.



71. ábra: Α dDAAM szerepe a filopódiumok kia la ku lásában a növekedési kúpokban. (A–I) Primer idegsejt kultúrák vad típusú (A, D-F), dDAAM^{mat/zyg} (**B**) és Sca-Gal4;UAS-DADm-DAAM::EGFP (C, G-I) embriókból. Festések: aktin (A-C, I fehér; G, kék csatornák), α-Ena (D, kék; F, fehér csatornák), α-dDAAM (D, zöld; E, fehér csatornák), α-HRP (D, kék csatorna), illetve α-GFP (G, zöld; H, fehér csatornák). A vad típushoz (A) képest a dDAAM^{mat/zyg} mutáns neuronokban **(B)** kevesebb és rövidebb filopódium képződik, míg а Sca-Gal4; UAS-DADm-DAAM::EGFP neuronokban (C) több filopódium alakul ki. endogén dDAAM **(D–F)** Az az axon nyúlványban és a filopódiumok mentén is megfigyelhető, ahol a filopódiumok csúcsán az Ena fehérjével részleges kolokalizációt mutat. (G-I) А 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, axon-szerű nyúlványok képződését indukálja. A fehérje gyakran dúsul fel a kitüremkedések csúcsán (J és K, nyilak), ahol az Ena fehérjével (M, piros; O, fehér csatornák) részleges kolokalizációt mutat (M-O, nyilak). (P) A vad típusú, a Sca-Gal4; UAS-DADm-DAAM::EGFP, a dDAAM^{mat/zyg} és a $dDAAM^{Ex68}$ neuron kultúrákban kapott filopódium számok és filopódium hosszok statisztikai összehasonlítása, számszerűsítése. A skálák mérete 5 µm.

Korábbi kísérleteinkből kiderült, hogy az N-terminális szabályozó doméneket nem tartalmazó C-DAAM izoforma a tracheában a dDAAM konstitutívan aktív formájaként viselkedik [280]. Kíváncsiak voltunk okoz-e a C-DAAM túltermelés fenotipikus változásokat az idegrendszer területén is. Kísérleteinkben kontrollként ismét a Diaphanous konstitutívan

aktív formáját, a *dia^{CA}*-t használtuk. A C-DAAM idegrendszeri túltermelése az embriók 78%ában nyúlványnövekedési hibákat eredményezett a hasi idegkötegekben (**72. ábra B,C,F**). 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 megnövekedett nyúlványszám tehát éppen ellentétes a LOF mutánsok által okozott fenotípussal, és így egy klasszikus funkciónyeréses hatásnak tekinthető. Ez a hatás dDAAM specifikusnak bizonyult, mert az *UAS-dia^{CA}* idegrendszer specifikus túltermelése szakadásokat és axonhiányokat eredményezett mind a hosszanti, mind a komisszúrális idegkötegekben (**72. ábra G**), tehát a megnövekedett nyúlványszám nem a formin aktiváció általános hatásához köthető.



72. 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 α -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^{CA} túltermelése ettől jelentősen eltérő fenotípusokat okoz, a longitudinális kötegekben és a keresztkötegekben is szakadások jelennek meg (nyilak). A (H) panelen a kísérleteink során aktivált formaként használt C-DAAM és DADm-DAAM konstrukciók szerkezete látható a teljes hosszúságú cDNS-hez képest. A skála mérete az A, B és G esetében 50 µm; az E, F paneleken 25 µm.

Az aktivált dDAAM formák további analízise érdekében sejtes rendszerekben vizsgáltuk egy DAD domént nem tartalmazó dDAAM izoforma, az ún. DADm-DAAM GFPvel jelölt változatának az aktivitását. Embrionális idegsejt kultúrákban az *UAS-DADm-DAAM*-ot kifejező idegsejtekben 73%-kal több filopódium képződött a növekedési kúpok területén, változatlan központi nyúlványhossz mellett, mint a vad típusban (**71. ábra C,P**). Emellett a DADm-DAAM::GFP fúziós fehérje a vad típusú dDAAM fehérjéhez hasonló lokalizációt mutatott az axonokban, beleértve a perifériális filopódiumokat és azok csúcsi részét is (**71. ábra G-I**). *Drosophila* S2 sejtekben a DADm-DAAM::GFP-vel transzfektált sejtek 75%-ában hosszú, több sejtátmérőjű, aktinban és mikrotubulusokban gazdag nyúlványok jelentek meg (**71. ábra J-O**). A transzfektált sejtekben a fúziós fehérje a sejtmembrán mentén és a nyúlványokban halmozódott fel, beleértve azok disztális csúcsát is (**71. ábra**). A GOF kísérletek együttesen tehát azt jelezték, hogy a dDAAM elősegíti a neuronális nyúlványok képződését és igen hatásos módon járul hozzá filopódiumok, ill. axon-szerű sejtnyúlványok képződéséhez.

Következő kérdésünk az volt, melyek lehetnek azok a fehérjék/gének amelyekkel a dDAAM együttműködik a növekedési kúpok területén. Mivel korábbi munkák során több olyan faktort is azonosítottak, amelyek együttműködnek más forminokkal, és közülük néhányat az idegi differenciálódással is kapcsolatba hoztak, vizsgálatainkat jelölt gének egy csoportjára koncentráltuk. Közülük elsődleges szűrőként genetikai interakciós tesztekben választottuk ki a potenciális együttműködő partnereket. Elsőként a DRF forminok ismert aktivátorait, a Rho GTPázokat vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a tracheával ellentétben, a RhoA mutáció csak kis mértékben súlyosbítja a *dDAAM*^{Ex68} zigótikus null mutáns embriók KIR fenotípusát (73. ábra A), ami azt sugallta, hogy a KIR-ben a dDAAM aktivitását nem a RhoA vagy nem csak a RhoA szabályozza. Ugyanakkor a három Drosophila Rac GTPázról (Rac1, Rac2 és Mtl) ismert volt, hogy egymással majdnem teljesen kicserélhető módon, de esszenciális elemei az axon növekedésnek [281,282]. A Rac gének dózisának csökkentése egyértelműen erősítette a dDAAM^{Ex68} mutánsok fenotípusát, és vice versa a dDAAM^{Ex68} mutáns is dominánsan erősítette a Rac mutánsok axon növekedési defektusát (73. ábra A,B). Tekintve hogy az elav-Gal4/+;UAS-C-DAAM/+ funkciónyeréses fenotípus Rac mutánsok jelenlétében nem módosult (73. ábra C), eredményeink összhangban állnak azzal a hipotézissel, hogy az embrionális KIR-ben a Rac GPTázok a dDAAM fölső szabályozó faktorai.



73. ábra: A dDAAM genetikai és biokémiai kölcsönhatásai. (A) Az axon növekedési defektusok számszerűsítése $dDAAM^{Ex68}$ homozigóta mutáns háttéren heterozigóta *RhoA*, *Rac*, *ena* és *chic* mutációk jelenlétében. (B) Az axon növekedési defektusok számszerűsítése olyan embriókban, amelyek homozigóták az A panelen bemutatott *RhoA*, *Rac*, *ena* vagy *chic* mutációkra és heterozigóták a $dDAAM^{Ex68}$ mutációra. (C) A C-DAAM túltermelésre jellemző axon növekedési defektusok (keresztköteg megvastagodások) számszerűsítése *elav-Gal4*; *UAS-DAAM*/+ embriókban, amelyek heterozigóták az A panelen bemutatott *RhoA*, *Rac*, *ena* vagy *chic* mutációkra. Az A-C paneleken "n" jelöli a vizsgált embriók számát. (D) 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 oldali panel, α-DAAM Western-blot). Az α-ena IP-ban mind az aktivált dDAAM, mind a Profilin kimutatható Western-blot (WB) analízissel (jobb oldali panelek, α-chic és α-dDAAM Western-blot-ok).

A Rac géneken kívül a profilint kódoló *chickadee* (*chic*) mutánsok és az egyetlen *Drosophila* Ena/VASP homológot kódoló *enabled* (*ena*) mutánsok is domináns genetikai kölcsönhatást mutattak a *dDAAM*^{Ex68} mutánssal (**73. ábra A,B**). Mindkét fehérjéről ismert volt, hogy a növekedési kúpok csúcsi részén lokalizálódnak, és mutánsaik befolyásolják a növekedési kúpok szerkezetét [268,283,284]. A C-DAAM GOF fenotípusán alapuló episztázis kísérleteink alapján, az *ena* valószínűleg a *dDAAM*-tól alsóbb szinten hat, mert erősen szupresszálja a GOF hatást, míg a profilin szint csökkenése nem befolyásolja a C-DAAM hatását (**73. ábra C**). Vad típusú embrionális idegsejt kultúrában a dDAAM és Ena fehérjék részlegesen átfedő festődési mintát adtak a növekedési kúpok perifériális részén (**71. ábra D-F**). Ugyancsak részleges átfedést figyeltünk meg a DADm-DAAM-mal transzfektált

S2 sejtek hosszú nyúlványaiban az Ena és profilin fehérjék és a DADm-DAAM::GFP fúziós fehérje között a nyúlványok csúcsi részén (**71. ábra M-O**), ami megerősítette a genetikai interakciós kísérletek konklúzióját. Annak bizonyítására, hogy ezek a fehérjék *in vivo* valóban egymás fizikai közelségében vannak, koimmunoprecipitációs kísérleteket végeztünk DADm-DAAM-mal transzfektált S2 sejtekből származó lizátumokon. Amikor α -Chic vagy α -Ena ellenanyaggal immunoprecipitációt végeztünk, a precipitátumban mindkét esetben kimutatható volt az aktivált dDAAM fehérje (**73. ábra D**), és az α -Ena koprecipitálta a profilint is (**73. ábra D**). Ezek az eredmények egyértelműen megerősítik azt az elképzelést, hogy *in vivo* a dDAAM az Ena és profilin fehérjékkel szoros kölcsönhatásban működik.

Következtetések: Annak ellenére, hogy régóta ismert, hogy az aktin dinamika szabályozása kritikus szerepet játszik az axonok megfelelő irányba történő növekedésében, mindezidáig viszonylag kevés olyan fehérjét azonosítottak, amelyek közvetlenül befolyásolják az aktin sejtváz dinamikus változásait a növekedési kúpban. Ennek megfelelően arról is hiányos és ellentmondásos irodalmi adatok jelentek meg, hogy az aktin nukleáló faktorok közül melyek vehetnek részt az idegsejt nyúlványok növekedésében [266,269,285]. Munkánk során LOF és GOF analízis segítségével elsőként bizonyítottuk, hogy az egyetlen pán-neurális kifejeződési mintát mutató Drosophila formin, a dDAAM meghatározó szerepet játszik az embrionális központi idegrendszeri axonok növekedésében. 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 [286]. 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 a 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 [281,282] és más

organizmusokban is [287], továbbá azzal a ténnyel, hogy néhány gerinces DAAM ortológról kimutatták, hogy Rac GTPázokhoz képesek kötődni [190,288]. A dDAAM szabályozása a Rac fehérjén keresztül kapcsolatban állhat a Trio RhoGEF fehérjével és azon keresztül a navigáció szabályozásában résztvevő Frazzled receptorral [289,290], de ezek a kapcsolatok pillanatnyilag kísérletes bizonyításra várnak.

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 sejtváz átrendeződések kritikus szabályozó eleme. Az Ena/Profilin/dDAAM komplex pontos molekuláris működésmódját 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 elképzelhetőek, hiszen az Ena/VASP fehérje család tagjai az elongációt is segítik [138,139], míg saját eredményeink alapján a dDAAM is rendelkezhet kötegformáló aktivitással [254]. Ettől függetlenül figyelemreméltó, hogy Schirenbeck és mtsai szerint *Dyctiostelium*-ban is egy hasonló, formin/VASP-függő mechanizmus szabályozza a filopódium képződést [291].

3.10. A dDAAM szerepe az adult központi idegrendszerben

Gombos Rita nem közölt eredményei alapján

Háttér: A teljes átalakulással fejlődő rovarok közé tartozó ecetmuslicák egyedfejlődésére jellemző, hogy a felnőtt állatok szöveteinek többsége *de novo* alakul ki a lárvális imágó korongokból, míg néhány más szövet, mint pl. a központi idegrendszer, alapvetően embrionális eredetű, de a bábállapot során ezek a szövetek is átalakulásokon mennek keresztül. Ez azt jelenti, hogy az adult állatok agyában található sejtek egy része már az embrióban neuronná differenciálódott, míg más adult idegsejtek a lárvális és báb stádiumok során keletkeznek és illeszkednek be a neuronális hálózatokba [292]. Az előző fejezetben bemutatott eredményeink alapján azt találtuk, hogy a *dDAAM* szerepet játszik az embrionális idegkötegek kialakulásában. Következő lépésben meg akartuk vizsgálni, hogy mennyire

általános jelentőségű ez a *dDAAM* funkció, szükség van-e a *dDAAM* génre az adult idegrendszerben újonnan képződő neuronok fejlődése során is?

Eredmények: Az adult idegrendszert érintő vizsgálataink kezdetén elsőként arra voltunk kíváncsiak milyen a dDAAM kifejeződési mintája az adult agyban. Immunfestéseink alapján a dDAAM fehérje az embrionális KIR-hez hasonlóan magas szinten fejeződik ki az adult idegrendszerben is (**74. ábra**). Az agyban a dDAAM jól kimutatható a teljes neuripil régióban (**74. ábra**), melyet az idegsejtek nyúlványai és a gliasejtek alkotnak, ami szintén jól megfeleltethető az embrionális KIR-ben detektálható mintának. Az is szembetűnő volt az első festéseken, hogy a dDAAM festés jól kijelöli a gombatestek (MB) axonjait (**74. ábra B,C**). A gombatest fontos szerepet játszik az adult állatok szaglással összefüggő tanulási és memória folyamataiban [293,294,295]. A *Drosophila* adult agyban ez az egyik legjobban jellemzett agyterület, és ismert, hogy a gombatestben található idegsejtek és nyúlványaik többsége nem az embrióban jön létre, hanem a lárvális, ill. pupális élet során keletkezik [296]. Ezen előnyös tulajdonságok miatt részletesebb vizsgálatainkra a gombatestet választottuk.



74. ábra: dDAAM kifejeződés az adult agyban. (A) dDAAM (piros) és Elav (zöld) festés adult agyban, konfokális metszet. Az idegsejt specifikus Elav a sejtmagokban halmozódik fel, míg a dDAAM a neuropile régióban található. (B) Egy másik síkban készült konfokális metszeten jól látható, hogy a dDAAM (piros) felhalmozódik a gombatest (zöld pöttyökkel határolt terület, kinagyítva a C panelen) axon kötegeiben.

A gombatestet felépítő ún. Kenyon sejtek axonjai jól definiált pályák mentén haladnak, melyek a felnőtt agyban öt jól elkülönülő lebenyt alkotnak, ezek az α/α' , β/β' és γ



75. ábra: A gombatest felépítése. (A) Az adult gombatest egyik fele α -FasII ellenanyaggal (piros) festve. Jól látszanak az erősen festődő a és ß lebenyek, továbbá a gyengén festődő y lebeny. (B) A teljes gombatest mCD8-GFP-vel (zöld) és α -FasII-vel (piros) festve. Az mCD8-GFP a gombatest minden sejtjében kifejeződik és az α, α' , kijelöli β, β' és γ lebenyekben futó összes axont ill. a dendriteket is. A sejttestek területe (a szaggatott vonallal határolt terület felső része) nem festődik. A FasII hasonló mintát mutat, mint az A panelen. (C) A gombatest lebenyeinek kialakulási sémája korai 3. stádiumú lárvától az adultig.

lebenyek (**75. ábra**) [296,297]. A lebenyeket alkotó axonok egy az L1-es lárva stádiumtól a bábállapot végéig tartó jól jellemzett fejlődési folyamat során alakulnak ki és érik el végső target területüket (**75. ábra**) [297]. Kimutattuk, hogy a dDAAM protein az L1-es stádiumtól kezdődően a báb stádiumokon keresztül a fiatal adultakig kimutatható az MB-ben (**76. ábra**), később az adult MB-ben mennyisége fokozatosan csökken. Azt is detektálni tudtuk, hogy a fejlődő lebenyeken belül a centrális elhelyezkedésű, frissen képződő axonokban sokkal



76. ábra: *dDAAM* expresszió a gombatestben L1-es lárva stádiumtól adultig. (A-A") A dDAAM expresszió (zöld) már az L1-es stádium során létrejövő y lebenyekben megfigyelhető. A lebenyek belő részén futó nyúlványokban erősebb felhalmozódás látszik. (B-B") Az L3-as lárva stádiumban a y lebenyek centrális részén projektáló α'/β' nyúlványokban is megfigyelhető dDAAM felhalmozódás. (C-C") Ez a központi felhalmozódás az α/β lebenyek keletkezése során is végig megfigyelhető a báb stádiumokban. (D-F) Frissen kikelt egyedekben a felhalmozódás még néhány napig erős, majd idővel eltűnik. (D) Néhány órás, (E) egy napos (F) két napos állat agyának dDAAM festése. A FasII festés a γ lebenyt és az α/β lebenyeket jelöli ki (piros csatorna az A'-C" paneleken).

jobban felhalmozódik a fehérje, mint a már korábban keletkezett perifériális helyzetű axonokban (**77. ábra**) [298], ami azt sugallta, hogy az intenzív axon növekedés helye korrelál a dDAAM protein lokalizációjával.



dDAAM felhalmozódás az 77. ábra: újonnan létrejövő, centrális nyúlványokban. A gombatest lebenyeiről készült keresztmetszeti képeken jól látszik, hogy a dDAAM kifejeződés (zöld) mind az α (A-A'), mind a β (**B-B'**) lebenyekben a központi részen futó nyúlványokban a legerősebb. (C-C') A nyél esetében az újonnan létrejövő nyúlványok két elkülönített kötegben futnak, melyben szintén jól követhető a központi felhalmozódás. A a és a ß nyúlványokat FasII festés (piros) jelöli. (D) Az A-C paneleken bemutatott ábrák metszési síkját különböző színű szaggatott vonalak jelölik a gombatest elölnézeti képén.

Tekintve, hogy a dDAAM null mutánsok legkésőbb a 3. lárvális stádiumban elpusztulnak, adult életképes $dDAAM^{Ex1}$ hipomorf mutánsok vizsgálatával próbáltunk megállapítani, hogy befolyásolja-e a dDAAM a gombatestek fejlődését. Immunhisztokémiai és Western-blot kísérleteink alapján ezekben a mutánsokban erősen lecsökken a dDAAM fehérje szintje (**78. ábra**), ami jelezte, hogy alkalmasak lehetnek kísérleti céljainkra. Az α és β axonok lefutását nagyszámú $dDAAM^{Ex1}$ mutáns állatban részletesen analizálva arra a következtetésre jutottunk, hogy a dDAAM szükséges a gombatest axonok növekedéséhez, mert változatos nyúlványnövekedési defektusokat tudtunk kimutatni a mutánsok kb. 30-60%-







78. ábra: A dDAAM mennyisége *Ex1* mutáns állatokban. A dDAAM fehérje erősen redukált mennyiségben van jelen a felnőtt $dDAAM^{Ex1}$ (*Ex1*) mutáns állatok agyában a vad típushoz (WT) képest. Ez jól kimutatható mind immunhisztokémiai festéssel (jobb oldal), mind Western-blot-tal (bal oldal). A Western-blot-on a dDAAM fehérjét a 130 kDa-nál lévő sáv jelöli. Belső kontrolként a 100 kDa-nál futó glikogén-foszforiláz-t (p94) használtuk.

ában (az állatok nemétől, a hőmérséklettől és a lebeny típusától függően) (**79. és 80. ábra**). Ezt a fenotípust majdnem tökéletes hatékonysággal menekíteni lehetett az UAS-FL-DAAM transzgénnel (**80. ábra**), ezért eredményeink arra utaltak, hogy a dDAAM nem csupán az embrionális axonok növekedését segíti elő, hanem az egyedfejlődés során később kialakuló nyúlványok képződésében is szerepet játszik.



79. $dDAAM^{Ex1}$ ábra: mutánsok gombatestén megfigyelhető fenotípus $dDAAM^{Ex1}$ kategóriák. А mutánsok gombatestének α és β megfigyelhető lebenyein különböző típusú nyúlványnövekedési és projekciós hibák bemutatása FasII festés alapján. A fölső panel a vad típust mutatja, míg az alsó panelek az α és β lebenyekben detektálható fenotípus kategóriákat reprezentálják.

A $dDAAM^{Ex1}$ mutánsok 80. ábra: gombatestén megfigyelhető axon növekedési hibák számszerűsítése. A $dDAAM^{Ex1}$ mutánsok gombatestének megfigyelhető lebenyein nyúlványnövekedési és projekciós hibák aránya az α (fölső grafikon) és a β (alsó grafikon) lebenyek esetében. A mutáns fenotípust az UAS-FL-DAAM transzgén tökéletesen, míg UAS-mDaam1 konstrukció az részlegesen képes menekíteni. A vizsgált fenotípus kategóriák a jobb oldali négyszögben vannak jelölve.





A *dDAAM*^{Ex1} mutánsokban megfigyelhető MB fenotípus közepesen erős jellege ebben az esetben is lehetőséget adott genetikai interakciós partnerek azonosítására. Mindezidáig elsősorban azokat a jelölt géneket vizsgáltuk amelyek az embrionális KIR-ben is kölcsönható partnernek bizonyultak. Megállapítottuk, hogy amíg a *RhoA* mutánsok részlegesen szupresszálják, a *Rac* mutánsok jelentősen erősítik a *dDAAM*^{Ex1} fenotipikus hatását (**81. ábra**), ami erősíti azt az elképzelést, hogy a központi idegrendszerben a Rac GTPázok a dDAAM fő aktiváló faktorai. Az általunk tesztelt *ena* és *chic* (profilin) mutánsok közül csak a *chic* mutatott domináns genetikai kölcsönhatást ebben a szövetben (**81. ábra**), de mindkét fehérje erősen átfedő kifejeződési mintát mutat a dDAAM-mal a gombatest területén (**82. ábra**). A profilin tehát itt is együttműködő partner lehet, míg az interakció hiánya az *ena*-val arra utalhat, hogy ebben a szövetben az Ena fehérje mennyisége nem limitált olyan mértékben, hogy a géndózis maximum felére történő csökkentése érzékelhető fenotipikus hatással járna. Elképzelhető ugyanakkor az is, hogy a gombatestben a dDAAM más fehérjék közreműködését igényli, mint az embrionális KIR-ben, ezért további kísérleteket tervezünk a kérdés tisztázása érdekében.



rossz helyre projektál
hiányzik
vastagabb
vékonyabb
rövidebb
vad

dDAAM^{Ex1} 81. ábra: А genetikai kölcsönhatásai я $dDAAM^{Exl}$ gombatestben. А mutánsok gombatestének ß lebenveiben megfigyelhető axon növekedési hibák aránya chic/+ és Rac mutáns háttereken növekszik, ena mutánsok míg az nem befolyásolják azt. A számszerűsítés szolgáló alapjául fenotípus kategóriákat a jobb oldalon láthatjuk.

82. ábra: A dDAAM kolokalizációja a profilin és az Ena fehérjével. (A-A") A dDAAM (piros) kolokalizációt mutat a profilin fehérjével (zöld) néhány órás adultak gombatestében a centrális futó újonnan képződött részen (B-B") nyúlványokban. Hasonló kolokalizációt lehet megfigyelni а dDAAM és az Ena viszonylatában is.



Következtetések: 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 dDAAMfunkciónak tekinthető, a dDAAM valószínűleg az egyedfejlődés minden stádiumában részt vesz az axonok növekedésében és ezzel az idegkötegek kialakulásában. Ezen túlmenően az adult idegrendszert érintő vizsgálataink megerősítették, hogy a dDAAM fehérje legfontosabb aktivátorai a központi idegrendszerben a Rac családba tartozó GTPázok, amelyek mutánsai az adult agyban erős, dózis függő genetikai kölcsönhatást mutatnak a $dDAAM^{Ex1}$ hipomorf mutánssal.

3.11. A forminok DAAM alcsaládja evolúciósan konzervált szerepet játszik az axon növekedés során

Matusek, 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) alapján

Háttér: A gerinces *DAAM* gének expressziós mintázatának vizsgálata során leírták, hogy a *Xenopus*, a csirke és az egér *DAAM* gének egyik fő kifejeződési helye a fejlődő központi idegrendszer [191,192]. Ez arra utalt, hogy a munkánk során talált dDAAM axon növekedési funkció a DAAM formin alcsalád evolúciósan konzervált funkciója lehet. A potenciális evolúciós konzerváltság igazolása 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. Másodsorban megvizsgáltuk, hogy az egér *mDaam1* gén képes-e helyettesíteni a *Drosophila dDAAM* funkcióját az embrionális KIR-ben.

Eredmények: A P19 egy pluripotens sejtvonal, ami reténsav (RA) hatására képes neuronális irányba differenciálódni [299]. 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, ill. immunhisztokémiai festésekkel követtük nyomon. Kísérleteink során neuronális markerként a

β-tubulinIII-at és az intermedier filamentum NF-M fehérjét használtuk [300,301], míg az α-SSEA1 ellenanyaggal a differenciálatlan sejteket tudtuk detektálni [302]. A dDAAM-ot stabilan kifejező P19 sejtek 21%-ában RA indukció nélkül is neuritszerű kitüremkedéseket figyeltünk meg (**83. ábra D-G**). Ezekről a sejtekről hiányzott az SSEA1 antigén, míg mind a β-tubulinIII, mind az NF-M megtalálható volt a nyúlványaikban (**83. ábra**). Az RT-PCR analízis megmutatta, hogy bennük az RA indukció során is megemelkedett szintet mutató NF-M mRNS szintje közel ötszöröse, míg a β-tubulinIII mRNS szinje közel háromszorosa a kontroll P19 sejtekben mért szintnek. A dDAAM-ot kifejező P19 sejteket 10^{-7} M RA



83. ábra: A dDAAM kifejeztetése egér P19 sejtekben. (A–C) A nem differenciált P19 sejtek kifejezik az SSEA-1 antigént (A, zöld csatorna), de az NF-M és β-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 β-tubIII markereket (E és F, zöld és piros csatornák). Az NF-M és β-tubIII pozitív sejteken hosszú, axonszerű kitüremkedések jelennek meg. A sejtmagokat az A-D paneleken DAPI festés (kék csatorna) jelöli. (H) Az NF-M, β-tubIII és mDaam1 relatív mRNS szintjének összehasonlítása kontroll P19, RA-val kezelt, FL-DAAM-ot kifejező RA-val kezelt és EGFP-ét kifejező sejtekben. A skála mérete 50 μm.

hozzáadásával idegi irányba differenciáltatva azt találtuk, hogy az NF-M mRNS szintje még inkább megemelkedik a kontrollként differenciáltatott nem transzfektált P19-hez képest (**83. ábra H**), míg a β-tubulinIII mRNS szintjében nem volt jelentős különbség. Végezetül vizsgáltuk az endogén mDaam1 RNS szintjének változását az RA-val indukált idegi irányú differenciáció során, és azt tapasztaltuk, hogy az mDaam1 mRNS szintje jelentősen megemelkedik a differenciálatlan P19 kontrollhoz képest (**83. ábra H**), ami jelzi, hogy az mDaam1 valóban részt vehet az idegi differenciálódás folyamatában.

Drosophila tesztjeink elvégzése érdekében elkészítettük az egér mDaam1 túltermelésére alkalmas *UAS-mDaam1::GFP* konstrukciót, majd a transzgént vad típusú és $dDAAM^{mat/zyg}$ mutáns genetikai háttereken idegrendszer specifikusan termeltettük túl. Az mDaam1::GFP transzgenikus fehérjét α -GFP ellenanyaggal detektálva azt láttuk, hogy az az endogén dDAAM-mal megegyező lokalizációs mintát mutat a központi idegrendszer nyúlványaiban (**84. ábra**). A túltermelés vad típusú háttéren nem okozott látható fenotípusos elváltozásokat a KIR-ben. $dDAAM^{mat/zyg}$ háttéren az elav-Gal4 < UAS-mDaam1::GFP túltermelés 70%-ban vad típusú idegrendszereket eredményezett, azaz szignifikánsan menekítette a dDAAM mutánsra jellemző axonális defektusokat (**84. ábra D**).



84. ábra: Az egér mDaam1 kifejeztetése a *Drosophila* embrionális idegrendszerében. (A–C) Az *UAS-EGFP::mDaam1* transzgén kifejeződési mintázata a *Drosophila* embrionális KIR-ben. A transzgenikus fehérje (B,C zöld csatorna) szoros kolokalizációt mutat a hasi idegköteg nyúlványaiban az α -BP102 axonális markerrel (A,C piros csatorna). (D) Az *UAS-mDaam1::GFP* transzgén menekítő hatása a *dDAAM^{mat/zyg}* fenotípusra. A fenotípus erősség hasonló módon lett osztályozva, mint a **68. ábrán**.

Következtetések: Összességében kísérleteink feltárták, 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.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

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 a polaritási effektor fehérjék működéséről is. Úgy gondoltuk a lényeges kérdések egy részének megoldásához fontos lehet a már ismert PCP gének működésmódjának 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 mutagenezis kísérlet során három autoszómális kromoszóma karon izoláltunk nagyszámú új polaritási mutánst. A PCP gének vizsgálata során főbb eredményeink a következők voltak:

(1) A Frizzled receptor család több jelátviteli folyamat (pl. a PCP és a Wnt/ β -katenin útvonal) szabályozásában is kitüntetett szereppel bír, azonban a jelátviteli specificitás molekuláris alapjai ismeretlenek voltak. A *Drosophila* Fz és Fz2 receptorok összehasonlító vizsgálata alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a két receptor jelentősen különböző mértékben képes a Wnt/ β -katenin, ill. a Wnt/PCP jelátviteli utak aktiválására: a Fz2 jóval erősebben aktiválja Wnt/ β -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 sejtpár 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 sejtsorsot.

(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 fehérjéivel 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 sejtváz 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 szövet specifikus funkciókkal bír az egyedfejlődés során. A *dDAAM* funkcionális analízise során legfontosabb eredményeink a következők voltak:

(1) A *Drosophila* DAAM fehérje formin homológia doménjeinek biokémiai vizsgálata során bebizonyítottuk, hogy az FH2 domén önmagában, ill. az FH1 doménnel kiegészülve is *bona fide* forminként viselkedik, tehát mutatja az egyéb forminokra is jellemző legfontosabb tulajdonságokat. Ezek közül kiemelendő, 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 forminként viselkednek, ami aktin sejtváz alapú motilis sejtnyúlványok képződését segíti elő.

(2) *dDAAM* mutánsok vizsgálatával feltártuk, hogy a gén hiánya súlyos defektusokat okoz a légcsőrendszer 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 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 Tec29 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 az embrionális 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 sejtváz átrendeződések irányításában.

(4) A *dDAAM* adult idegrendszeri funkciójának vizsgálata tisztázta, hogy az embrionális idegrendszeren kívül a *dDAAM* a felnőtt agyban található idegsejtek axonjainak növekedését is elősegíti. 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. Az adult idegrendszert érintő vizsgálataink azt is megerősítették, hogy a dDAAM fehérje legfontosabb aktivátorai a központi idegrendszerben a Rac családba tartozó GTPázok.

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 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.

Eredményeink kapcsán gyakran újabb megválaszolandó kérdések merültek fel. Ezek egy részén jelenleg is dolgozunk. Ezen témák közül kiemelkedik a *dDAAM* izomrost kialakulásban játszott szerepének vizsgálata. Már korai megfigyeléseink jelezték, hogy a dDAAM kifejeződik az embrionális kardioblasztokban, később bebizonyítottuk, hogy a lárvális testfal izmokban és a repülőizomban is jelen van mint szarkomerikus fehérje. Ezzel összhangban pár napos egér embriók immunhisztokémiai vizsgálatával kimutattuk, hogy az mDaam1 erősen felhalmozódik a szívizomban és a harántcsíkolt izmokban, ahol hasonló szarkomerikus festődést mutat, mint a dDAAM *Drosophila* izmokban. Még folyamatban lévő

127

kísérleteink alapján a *dDAAM* alapvető szerepet tölt be a szarkomerek vékony filamentumainak a kialakításában, és azt reméljük, hogy a *dDAAM* mutánsok, ill. a kölcsönható partnerek vizsgálata fontos új információkat szolgáltat majd az izomfejlődés ezen döntő jelentőségű, de ma még részleteiben alig ismert lépéséről.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- 1. Lawrence PA, Shelton PM (1975) The determination of polarity in the developing insect retina. J Embryol Exp Morphol 33: 471-486.
- Gubb D, Garcia-Bellido A (1982) A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in Drosophila melanogaster. J Embryol Exp Morphol 68: 37-57.
- 3. Adler PN (2002) Planar signaling and morphogenesis in Drosophila. Dev Cell 2: 525-535.
- 4. Gubb D (1993) Genes controlling cellular polarity in Drosophila. Dev Suppl: 269-277.
- 5. Vinson CR, Conover S, Adler PN (1989) A Drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. Nature 338: 263-264.
- 6. Seifert JR, Mlodzik M (2007) Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. Nat Rev Genet 8: 126-138.
- 7. Wang Y, Nathans J (2007) Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. Development 134: 647-658.
- 8. Strutt D (2003) Frizzled signalling and cell polarisation in Drosophila and vertebrates. Development 130: 4501-4513.
- 9. Simons M, Mlodzik M (2008) Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. Annu Rev Genet 42: 517-540.
- 10. Wong LL, Adler PN (1993) Tissue polarity genes of Drosophila regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. J Cell Biol 123: 209-221.
- 11. Casal J, Struhl G, Lawrence PA (2002) Developmental compartments and planar polarity in Drosophila. Curr Biol 12: 1189-1198.
- Le Borgne R, Bellaiche Y, Schweisguth F (2002) Drosophila E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. Curr Biol 12: 95-104.
- Roegiers F, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN (2001) Two types of asymmetric divisions in the Drosophila sensory organ precursor cell lineage. Nat Cell Biol 3: 58-67.
- 14. Bellaiche Y, Radovic A, Woods DF, Hough CD, Parmentier ML, et al. (2001) The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in Drosophila. Cell 106: 355-366.
- 15. Wolff TaR, D.F. (1993) Pattern formation in the Drosophila retina. In: Bate MaM-A, A., editor. The development of Drosophila melanogaster. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press. pp. 1277-1326.

- 16. Tomlinson A, Struhl G (1999) Decoding vectorial information from a gradient: sequential roles of the receptors Frizzled and Notch in establishing planar polarity in the Drosophila eye. Development 126: 5725-5738.
- 17. Zheng L, Zhang J, Carthew RW (1995) frizzled regulates mirror-symmetric pattern formation in the Drosophila eye. Development 121: 3045-3055.
- 18. Strutt D (2008) The planar polarity pathway. Curr Biol 18: R898-902.
- 19. Tree DR, Ma D, Axelrod JD (2002) A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity. Semin Cell Dev Biol 13: 217-224.
- 20. Mlodzik M (2000) Spiny legs and prickled bodies: new insights and complexities in planar polarity establishment. Bioessays 22: 311-315.
- 21. Adler PN, Charlton J, Liu J (1998) Mutations in the cadherin superfamily member gene dachsous cause a tissue polarity phenotype by altering frizzled signaling. Development 125: 959-968.
- 22. Clark HF, Brentrup D, Schneitz K, Bieber A, Goodman C, et al. (1995) Dachsous encodes a member of the cadherin superfamily that controls imaginal disc morphogenesis in Drosophila. Genes Dev 9: 1530-1542.
- 23. Fanto M, Clayton L, Meredith J, Hardiman K, Charroux B, et al. (2003) The tumorsuppressor and cell adhesion molecule Fat controls planar polarity via physical interactions with Atrophin, a transcriptional co-repressor. Development 130: 763-774.
- 24. Strutt H, Mundy J, Hofstra K, Strutt D (2004) Cleavage and secretion is not required for Four-jointed function in Drosophila patterning. Development 131: 881-890.
- 25. Villano JL, Katz FN (1995) four-jointed is required for intermediate growth in the proximal-distal axis in Drosophila. Development 121: 2767-2777.
- 26. Mahoney PA, Weber U, Onofrechuk P, Biessmann H, Bryant PJ, et al. (1991) The fat tumor suppressor gene in Drosophila encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. Cell 67: 853-868.
- 27. Zhang S, Xu L, Lee J, Xu T (2002) Drosophila atrophin homolog functions as a transcriptional corepressor in multiple developmental processes. Cell 108: 45-56.
- 28. Rawls AS, Guinto JB, Wolff T (2002) The cadherins fat and dachsous regulate dorsal/ventral signaling in the Drosophila eye. Curr Biol 12: 1021-1026.
- 29. Yang CH, Axelrod JD, Simon MA (2002) Regulation of Frizzled by fat-like cadherins during planar polarity signaling in the Drosophila compound eye. Cell 108: 675-688.
- 30. Zeidler MP, Perrimon N, Strutt DI (1999) The four-jointed gene is required in the Drosophila eye for ommatidial polarity specification. Curr Biol 9: 1363-1372.

- 31. Zeidler MP, Perrimon N, Strutt DI (2000) Multiple roles for four-jointed in planar polarity and limb patterning. Dev Biol 228: 181-196.
- 32. Chae J, Kim MJ, Goo JH, Collier S, Gubb D, et al. (1999) The Drosophila tissue polarity gene starry night encodes a member of the protocadherin family. Development 126: 5421-5429.
- 33. Feiguin F, Hannus M, Mlodzik M, Eaton S (2001) The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. Dev Cell 1: 93-101.
- 34. Gubb D, Green C, Huen D, Coulson D, Johnson G, et al. (1999) The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in Drosophila imaginal discs. Genes Dev 13: 2315-2327.
- 35. Klingensmith J, Nusse R, Perrimon N (1994) The Drosophila segment polarity gene dishevelled encodes a novel protein required for response to the wingless signal. Genes Dev 8: 118-130.
- 36. Taylor J, Abramova N, Charlton J, Adler PN (1998) Van Gogh: a new Drosophila tissue polarity gene. Genetics 150: 199-210.
- Theisen H, Purcell J, Bennett M, Kansagara D, Syed A, et al. (1994) dishevelled is required during wingless signaling to establish both cell polarity and cell identity. Development 120: 347-360.
- 38. Usui T, Shima Y, Shimada Y, Hirano S, Burgess RW, et al. (1999) Flamingo, a sevenpass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. Cell 98: 585-595.
- 39. Wolff T, Rubin GM (1998) Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in Drosophila. Development 125: 1149-1159.
- 40. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, et al. (1996) A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. Nature 382: 225-230.
- 41. Bhat KM (1998) frizzled and frizzled 2 play a partially redundant role in wingless signaling and have similar requirements to wingless in neurogenesis. Cell 95: 1027-1036.
- 42. Chen CM, Struhl G (1999) Wingless transduction by the Frizzled and Frizzled2 proteins of Drosophila. Development 126: 5441-5452.
- 43. Strutt DI, Weber U, Mlodzik M (1997) The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. Nature 387: 292-295.
- 44. Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N (1998) Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. Genes Dev 12: 2610-2622.

- 45. Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M (1998) Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. Cell 94: 109-118.
- 46. Strutt H, Strutt D (2002) Nonautonomous planar polarity patterning in Drosophila: dishevelled-independent functions of frizzled. Dev Cell 3: 851-863.
- 47. Strutt H, Strutt D (2005) Long-range coordination of planar polarity in Drosophila. Bioessays 27: 1218-1227.
- 48. Lee H, Adler PN (2002) The function of the frizzled pathway in the Drosophila wing is dependent on inturned and fuzzy. Genetics 160: 1535-1547.
- 49. Collier S, Gubb D (1997) Drosophila tissue polarity requires the cell-autonomous activity of the fuzzy gene, which encodes a novel transmembrane protein. Development 124: 4029-4037.
- 50. Collier S, Lee H, Burgess R, Adler P (2005) The WD40 repeat protein fritz links cytoskeletal planar polarity to frizzled subcellular localization in the Drosophila epidermis. Genetics 169: 2035-2045.
- 51. Park WJ, Liu J, Sharp EJ, Adler PN (1996) The Drosophila tissue polarity gene inturned acts cell autonomously and encodes a novel protein. Development 122: 961-969.
- 52. Strutt D, Warrington SJ (2008) Planar polarity genes in the Drosophila wing regulate the localisation of the FH3-domain protein Multiple Wing Hairs to control the site of hair production. Development 135: 3103-3111.
- 53. Yan J, Huen D, Morely T, Johnson G, Gubb D, et al. (2008) The multiple wing hairs gene encodes a novel GBD-FH3 domain containing protein that functions both prior to and after wing hair initiation. Genetics.
- 54. Winter CG, Wang B, Ballew A, Royou A, Karess R, et al. (2001) Drosophila Rhoassociated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. Cell 105: 81-91.
- 55. Fanto M, Weber U, Strutt DI, Mlodzik M (2000) Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the Drosophila eye. Curr Biol 10: 979-988.
- 56. Paricio N, Feiguin F, Boutros M, Eaton S, Mlodzik M (1999) The Drosophila STE20-like kinase misshapen is required downstream of the Frizzled receptor in planar polarity signaling. Embo J 18: 4669-4678.
- 57. Weber U, Paricio N, Mlodzik M (2000) Jun mediates Frizzled-induced R3/R4 cell fate distinction and planar polarity determination in the Drosophila eye. Development 127: 3619-3629.
- 58. Choi KW, Benzer S (1994) Rotation of photoreceptor clusters in the developing Drosophila eye requires the nemo gene. Cell 78: 125-136.

- 59. Axelrod JD (2001) Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. Genes Dev 15: 1182-1187.
- 60. Bastock R, Strutt H, Strutt D (2003) Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during Drosophila planar polarity patterning. Development 130: 3007-3014.
- 61. Das G, Jenny A, Klein TJ, Eaton S, Mlodzik M (2004) Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes. Development 131: 4467-4476.
- 62. Das G, Reynolds-Kenneally J, Mlodzik M (2002) The atypical cadherin Flamingo links Frizzled and Notch signaling in planar polarity establishment in the Drosophila eye. Dev Cell 2: 655-666.
- 63. Jenny A, Darken RS, Wilson PA, Mlodzik M (2003) Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. Embo J 22: 4409-4420.
- 64. Rawls AS, Wolff T (2003) Strabismus requires Flamingo and Prickle function to regulate tissue polarity in the Drosophila eye. Development 130: 1877-1887.
- 65. Shimada Y, Usui T, Yanagawa S, Takeichi M, Uemura T (2001) Asymmetric colocalization of Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, and Dishevelled in planar cell polarization. Curr Biol 11: 859-863.
- 66. Strutt D, Johnson R, Cooper K, Bray S (2002) Asymmetric localization of frizzled and the determination of notch-dependent cell fate in the Drosophila eye. Curr Biol 12: 813-824.
- 67. Strutt DI (2001) Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the Drosophila wing. Mol Cell 7: 367-375.
- Tree DR, Shulman JM, Rousset R, Scott MP, Gubb D, et al. (2002) Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. Cell 109: 371-381.
- 69. Bellaiche Y, Beaudoin-Massiani O, Stuttem I, Schweisguth F (2004) The planar cell polarity protein Strabismus promotes Pins anterior localization during asymmetric division of sensory organ precursor cells in Drosophila. Development 131: 469-478.
- 70. Bellaiche Y, Gho M, Kaltschmidt JA, Brand AH, Schweisguth F (2001) Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. Nat Cell Biol 3: 50-57.
- Lu B, Usui T, Uemura T, Jan L, Jan YN (1999) Flamingo controls the planar polarity of sensory bristles and asymmetric division of sensory organ precursors in Drosophila. Curr Biol 9: 1247-1250.

- 72. Wu J, Klein TJ, Mlodzik M (2004) Subcellular localization of frizzled receptors, mediated by their cytoplasmic tails, regulates signaling pathway specificity. PLoS Biol 2: E158.
- 73. Strutt DI (2002) The asymmetric subcellular localisation of components of the planar polarity pathway. Semin Cell Dev Biol 13: 225-231.
- 74. Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, et al. (2003) Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. Mol Cell 12: 1251-1260.
- 75. Mihaly J, Matusek T, Pataki C (2005) Diego and friends play again. Febs J 272: 3241-3252.
- 76. Strutt D, Strutt H (2007) Differential activities of the core planar polarity proteins during Drosophila wing patterning. Dev Biol 302: 181-194.
- 77. Classen AK, Anderson KI, Marois E, Eaton S (2005) Hexagonal packing of Drosophila wing epithelial cells by the planar cell polarity pathway. Dev Cell 9: 805-817.
- Hannus M, Feiguin F, Heisenberg CP, Eaton S (2002) Planar cell polarization requires Widerborst, a B' regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Development 129: 3493-3503.
- 79. Adler PN, Zhu C, Stone D (2004) Inturned localizes to the proximal side of wing cells under the instruction of upstream planar polarity proteins. Curr Biol 14: 2046-2051.
- 80. Matakatsu H, Blair SS (2004) Interactions between Fat and Dachsous and the regulation of planar cell polarity in the Drosophila wing. Development 131: 3785-3794.
- 81. Matakatsu H, Blair SS (2006) Separating the adhesive and signaling functions of the Fat and Dachsous protocadherins. Development 133: 2315-2324.
- 82. Ishikawa HO, Takeuchi H, Haltiwanger RS, Irvine KD (2008) Four-jointed is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. Science 321: 401-404.
- 83. Simon MA (2004) Planar cell polarity in the Drosophila eye is directed by graded Fourjointed and Dachsous expression. Development 131: 6175-6184.
- 84. Axelrod JD (2009) Progress and challenges in understanding planar cell polarity signaling. Semin Cell Dev Biol 20: 964-971.
- 85. Strutt H, Strutt D (2009) Asymmetric localisation of planar polarity proteins: Mechanisms and consequences. Semin Cell Dev Biol 20: 957-963.
- Wu J, Mlodzik M (2009) A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues. Trends Cell Biol 19: 295-305.
- 87. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, et al. (2004) Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. Cell 116: 883-895.

- Shimada Y, Yonemura S, Ohkura H, Strutt D, Uemura T (2006) Polarized transport of Frizzled along the planar microtubule arrays in Drosophila wing epithelium. Dev Cell 10: 209-222.
- 89. Casal J, Lawrence PA, Struhl G (2006) Two separate molecular systems, Dachsous/Fat and Starry night/Frizzled, act independently to confer planar cell polarity. Development 133: 4561-4572.
- 90. Lawrence PA, Struhl G, Casal J (2007) Planar cell polarity: one or two pathways? Nat Rev Genet 8: 555-563.
- 91. Lawrence PA, Struhl G, Casal J (2008) Do the protocadherins Fat and Dachsous link up to determine both planar cell polarity and the dimensions of organs? Nat Cell Biol 10: 1379-1382.
- 92. Guo N, Hawkins C, Nathans J (2004) Frizzled6 controls hair patterning in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 9277-9281.
- 93. Keller R (2002) Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. Science 298: 1950-1954.
- 94. Chen P, Johnson JE, Zoghbi HY, Segil N (2002) The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. Development 129: 2495-2505.
- 95. Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, et al. (2003) Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. Nature 423: 173-177.
- 96. Antic D, Stubbs JL, Suyama K, Kintner C, Scott MP, et al. (2010) Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and Xenopus embryogenesis. PLoS One 5: e8999.
- 97. Song H, Hu J, Chen W, Elliott G, Andre P, et al. (2010) Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. Nature 466: 378-382.
- 98. Hashimoto M, Hamada H (2010) Translation of anterior-posterior polarity into left-right polarity in the mouse embryo. Curr Opin Genet Dev 20: 433-437.
- 99. Park TJ, Haigo SL, Wallingford JB (2006) Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. Nat Genet 38: 303-311.
- 100. Saburi S, Hester I, Fischer E, Pontoglio M, Eremina V, et al. (2008) Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. Nat Genet 40: 1010-1015.
- 101. Curtin JA, Quint E, Tsipouri V, Arkell RM, Cattanach B, et al. (2003) Mutation of Celsr1 disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. Curr Biol 13: 1129-1133.

- 102. Wang J, Hamblet NS, Mark S, Dickinson ME, Brinkman BC, et al. (2006) Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. Development 133: 1767-1778.
- 103. Wang J, Mark S, Zhang X, Qian D, Yoo SJ, et al. (2005) Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. Nat Genet 37: 980-985.
- 104. Wang Y, Guo N, Nathans J (2006) The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. J Neurosci 26: 2147-2156.
- 105. Eaton S (1997) Planar polarization of Drosophila and vertebrate epithelia. Curr Opin Cell Biol 9: 860-866.
- 106. Davies A, Formstone C, Mason I, Lewis J (2005) Planar polarity of hair cells in the chick inner ear is correlated with polarized distribution of c-flamingo-1 protein. Dev Dyn 233: 998-1005.
- 107. Wang Y, Zhang J, Mori S, Nathans J (2006) Axonal growth and guidance defects in Frizzled3 knock-out mice: a comparison of diffusion tensor magnetic resonance imaging, neurofilament staining, and genetically directed cell labeling. J Neurosci 26: 355-364.
- 108. Deans MR, Antic D, Suyama K, Scott MP, Axelrod JD, et al. (2007) Asymmetric distribution of prickle-like 2 reveals an early underlying polarization of vestibular sensory epithelia in the inner ear. J Neurosci 27: 3139-3147.
- 109. Ciruna B, Jenny A, Lee D, Mlodzik M, Schier AF (2006) Planar cell polarity signalling couples cell division and morphogenesis during neurulation. Nature 439: 220-224.
- 110. Wilson PD (2004) Polycystic kidney disease. N Engl J Med 350: 151-164.
- 111. Fischer E, Legue E, Doyen A, Nato F, Nicolas JF, et al. (2006) Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. Nat Genet 38: 21-23.
- 112. Gong Y, Mo C, Fraser SE (2004) Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. Nature 430: 689-693.
- 113. Davis EE, Brueckner M, Katsanis N (2006) The emerging complexity of the vertebrate cilium: new functional roles for an ancient organelle. Dev Cell 11: 9-19.
- 114. Singla V, Reiter JF (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. Science 313: 629-633.
- 115. Nachury MV, Loktev AV, Zhang Q, Westlake CJ, Peranen J, et al. (2007) A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. Cell 129: 1201-1213.

- 116. Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, Kai M, Hill J, et al. (2005) Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. Nat Genet 37: 1135-1140.
- 117. Jones C, Roper VC, Foucher I, Qian D, Banizs B, et al. (2008) Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. Nat Genet 40: 69-77.
- 118. Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S (2006) Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. Cell 125: 33-45.
- 119. Okada Y, Takeda S, Tanaka Y, Belmonte JC, Hirokawa N (2005) Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. Cell 121: 633-644.
- 120. Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, Reynolds A, Berghout J, et al. (2007) Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. N Engl J Med 356: 1432-1437.
- 121. Habas R, Dawid IB, He X (2003) Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. Genes Dev 17: 295-309.
- 122. Marlow F, Topczewski J, Sepich D, Solnica-Krezel L (2002) Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. Curr Biol 12: 876-884.
- 123. Habas R, Kato Y, He X (2001) Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. Cell 107: 843-854.
- 124. Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, et al. (1997) p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. Embo J 16: 3044-3056.
- 125. Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. Annu Rev Biophys Biomol Struct 29: 545-576.
- 126. Carlier MF (1990) Actin polymerization and ATP hydrolysis. Adv Biophys 26: 51-73.
- 127. Revenu C, Athman R, Robine S, Louvard D (2004) The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 635-646.
- 128. Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Goonesekere NC, Lindberg U (1993) The structure of crystalline profilin-beta-actin. Nature 365: 810-816.
- 129. Pantaloni D, Carlier MF (1993) How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. Cell 75: 1007-1014.
- Safer D, Nachmias VT (1994) Beta thymosins as actin binding peptides. Bioessays 16: 590.

- 131. Safer D, Sosnick TR, Elzinga M (1997) Thymosin beta 4 binds actin in an extended conformation and contacts both the barbed and pointed ends. Biochemistry 36: 5806-5816.
- 132. Carlier MF, Jean C, Rieger KJ, Lenfant M, Pantaloni D (1993) Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 5034-5038.
- 133. Schafer DA, Jennings PB, Cooper JA (1996) Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. J Cell Biol 135: 169-179.
- 134. Fowler VM (1997) Capping actin filament growth: tropomodulin in muscle and nonmuscle cells. Soc Gen Physiol Ser 52: 79-89.
- 135. Fischer RS, Fowler VM (2003) Tropomodulins: life at the slow end. Trends Cell Biol 13: 593-601.
- 136. Bear JE, Gertler FB (2009) Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. J Cell Sci 122: 1947-1953.
- 137. Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB (2003) Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. Annu Rev Cell Dev Biol 19: 541-564.
- 138. Barzik M, Kotova TI, Higgs HN, Hazelwood L, Hanein D, et al. (2005) Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. J Biol Chem 280: 28653-28662.
- 139. Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, et al. (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. Cell 109: 509-521.
- 140. Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P (1996) Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. Cell 87: 227-239.
- 141. Nishida E, Maekawa S, Sakai H (1984) Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. Biochemistry 23: 5307-5313.
- 142. Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, et al. (1997) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. J Cell Biol 136: 1307-1322.
- 143. Janmey PA, Chaponnier C, Lind SE, Zaner KS, Stossel TP, et al. (1985) Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking. Biochemistry 24: 3714-3723.

- 144. Gunning PW, Schevzov G, Kee AJ, Hardeman EC (2005) Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. Trends Cell Biol 15: 333-341.
- 145. Flanagan LA, Chou J, Falet H, Neujahr R, Hartwig JH, et al. (2001) Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells. J Cell Biol 155: 511-517.
- 146. Viel A, Branton D (1996) Spectrin: on the path from structure to function. Curr Opin Cell Biol 8: 49-55.
- 147. Bretscher A, Weber K (1979) Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 2321-2325.
- 148. Bretscher A, Weber K (1980) Fimbrin, a new microfilament-associated protein present in microvilli and other cell surface structures. J Cell Biol 86: 335-340.
- 149. Tilney LG, Tilney MS, Guild GM (1995) F actin bundles in Drosophila bristles. I. Two filament cross-links are involved in bundling. J Cell Biol 130: 629-638.
- 150. Chesarone MA, Goode BL (2009) Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. Curr Opin Cell Biol 21: 28-37.
- 151. Mullins RD, Stafford WF, Pollard TD (1997) Structure, subunit topology, and actinbinding activity of the Arp2/3 complex from Acanthamoeba. J Cell Biol 136: 331-343.
- 152. Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997) The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. J Cell Biol 138: 375-384.
- 153. Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, et al. (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. Science 297: 612-615.
- 154. Sagot I, Rodal AA, Moseley J, Goode BL, Pellman D (2002) An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. Nat Cell Biol 4: 626-631.
- 155. Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, Mullins RD (2005) Drosophila Spire is an actin nucleation factor. Nature 433: 382-388.
- 156. Ahuja R, Pinyol R, Reichenbach N, Custer L, Klingensmith J, et al. (2007) Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. Cell 131: 337-350.
- Chereau D, Boczkowska M, Skwarek-Maruszewska A, Fujiwara I, Hayes DB, et al. (2008) Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. Science 320: 239-243.
- 158. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD (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: 6181-6186.

- 159. Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of Listeria monocytogenes. Nature 385: 265-269.
- 160. Iwasa JH, Mullins RD (2007) Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. Curr Biol 17: 395-406.
- 161. Machesky LM, Insall RH (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. Curr Biol 8: 1347-1356.
- 162. Insall R, Muller-Taubenberger A, Machesky L, Kohler J, Simmeth E, et al. (2001) Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. Cell Motil Cytoskeleton 50: 115-128.
- 163. Campellone KG, Welch MD (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. Nat Rev Mol Cell Biol 11: 237-251.
- 164. Pollard TD (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. Annu Rev Biophys Biomol Struct 36: 451-477.
- 165. Manseau LJ, Schupbach T (1989) cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the Drosophila embryo. Genes Dev 3: 1437-1452.
- 166. Carroll EA, Gerrelli D, Gasca S, Berg E, Beier DR, et al. (2003) Cordon-bleu is a conserved gene involved in neural tube formation. Dev Biol 262: 16-31.
- 167. Woychik RP, Maas RL, Zeller R, Vogt TF, Leder P (1990) 'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene. Nature 346: 850-853.
- 168. Zuniga A, Michos O, Spitz F, Haramis AP, Panman L, et al. (2004) Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. Genes Dev 18: 1553-1564.
- 169. Higgs HN, Peterson KJ (2005) Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. Mol Biol Cell 16: 1-13.
- 170. Goode BL, Eck MJ (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. Annu Rev Biochem 76: 593-627.
- 171. Chang F (1999) Movement of a cytokinesis factor cdc12p to the site of cell division. Curr Biol 9: 849-852.
- 172. Evangelista M, Blundell K, Longtine MS, Chow CJ, Adames N, et al. (1997) Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. Science 276: 118-122.

- 173. Imamura H, Tanaka K, Hihara T, Umikawa M, Kamei T, et al. (1997) Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae. Embo J 16: 2745-2755.
- 174. Chan DC, Bedford MT, Leder P (1996) Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. Embo J 15: 1045-1054.
- 175. Kamei T, Tanaka K, Hihara T, Umikawa M, Imamura H, et al. (1998) Interaction of Bnr1p with a novel Src homology 3 domain-containing Hof1p. Implication in cytokinesis in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 273: 28341-28345.
- 176. Tominaga T, Sahai E, Chardin P, McCormick F, Courtneidge SA, et al. (2000) Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. Mol Cell 5: 13-25.
- 177. Uetz P, Fumagalli S, James D, Zeller R (1996) Molecular interaction between limb deformity proteins (formins) and Src family kinases. J Biol Chem 271: 33525-33530.
- 178. Pring M, Evangelista M, Boone C, Yang C, Zigmond SH (2003) Mechanism of formininduced nucleation of actin filaments. Biochemistry 42: 486-496.
- 179. Otomo T, Tomchick DR, Otomo C, Panchal SC, Machius M, et al. (2005) Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. Nature 433: 488-494.
- 180. Shimada A, Nyitrai M, Vetter IR, Kuhlmann D, Bugyi B, et al. (2004) The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. Mol Cell 13: 511-522.
- 181. Xu Y, Moseley JB, Sagot I, Poy F, Pellman D, et al. (2004) Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. Cell 116: 711-723.
- 182. Moseley JB, Sagot I, Manning AL, Xu Y, Eck MJ, et al. (2004) A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. Mol Biol Cell 15: 896-907.
- 183. Alberts AS (2001) Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. J Biol Chem 276: 2824-2830.
- 184. Nezami AG, Poy F, Eck MJ (2006) Structure of the autoinhibitory switch in formin mDia1. Structure 14: 257-263.
- 185. Otomo T, Otomo C, Tomchick DR, Machius M, Rosen MK (2005) Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1. Mol Cell 18: 273-281.
- 186. Rose R, Weyand M, Lammers M, Ishizaki T, Ahmadian MR, et al. (2005) Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. Nature 435: 513-518.

- 187. Higgs HN (2005) Formin proteins: a domain-based approach. Trends Biochem Sci 30: 342-353.
- 188. Wallar BJ, Alberts AS (2003) The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. Trends Cell Biol 13: 435-446.
- 189. Higashi T, Ikeda T, Shirakawa R, Kondo H, Kawato M, et al. (2008) Biochemical characterization of the Rho GTPase-regulated actin assembly by diaphanous-related formins, mDia1 and Daam1, in platelets. J Biol Chem 283: 8746-8755.
- 190. Aspenstrom P, Richnau N, Johansson AS (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: 2180-2194.
- 191. Kida Y, Shiraishi T, Ogura T (2004) Identification of chick and mouse Daam1 and Daam2 genes and their expression patterns in the central nervous system. Brain Res Dev Brain Res 153: 143-150.
- 192. Nakaya MA, Habas R, Biris K, Dunty WC, Jr., Kato Y, et al. (2004) Identification and comparative expression analyses of Daam genes in mouse and Xenopus. Gene Expr Patterns 5: 97-105.
- 193. Barker N, Clevers H (2000) Catenins, Wnt signaling and cancer. Bioessays 22: 961-965.
- 194. Klingensmith J, Nusse R (1994) Signaling by wingless in Drosophila. Dev Biol 166: 396-414.
- 195. Boutros M, Mlodzik M (1999) Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. Mech Dev 83: 27-37.
- 196. Wodarz A, Nusse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. Annu Rev Cell Dev Biol 14: 59-88.
- 197. McEwen DG, Peifer M (2000) Wnt signaling: Moving in a new direction. Curr Biol 10: R562-564.
- 198. Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT (2000) The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. Trends Genet 16: 279-283.
- 199. Yang-Snyder J, Miller JR, Brown JD, Lai CJ, Moon RT (1996) A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. Curr Biol 6: 1302-1306.
- 200. Romani S, Campuzano S, Macagno ER, Modolell J (1989) Expression of achaete and scute genes in Drosophila imaginal discs and their function in sensory organ development. Genes Dev 3: 997-1007.
- 201. Bhanot P, Fish M, Jemison JA, Nusse R, Nathans J, et al. (1999) Frizzled and Dfrizzled-2 function as redundant receptors for Wingless during Drosophila embryonic development. Development 126: 4175-4186.

- 202. Cadigan KM, Fish MP, Rulifson EJ, Nusse R (1998) Wingless repression of Drosophila frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. Cell 93: 767-777.
- 203. Mlodzik M (1999) Planar polarity in the Drosophila eye: a multifaceted view of signaling specificity and cross-talk. EMBO J 18: 6873-6879.
- 204. Strutt H, Strutt D (1999) Polarity determination in the Drosophila eye. Curr Opin Genet Dev 9: 442-446.
- 205. Cooper MT, Bray SJ (1999) Frizzled regulation of Notch signalling polarizes cell fate in the Drosophila eye. Nature 397: 526-530.
- 206. Fanto M, Mlodzik M (1999) Asymmetric Notch activation specifies photoreceptors R3 and R4 and planar polarity in the Drosophila eye. Nature 397: 523-526.
- 207. Jochum W, Passegue E, Wagner EF (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. Oncogene 20: 2401-2412.
- 208. Riesgo-Escovar JR, Hafen E (1997) Common and distinct roles of DFos and DJun during Drosophila development. Science 278: 669-672.
- 209. Zeitlinger J, Kockel L, Peverali FA, Jackson DB, Mlodzik M, et al. (1997) Defective dorsal closure and loss of epidermal decapentaplegic expression in Drosophila fos mutants. EMBO J 16: 7393-7401.
- 210. Bassuk AG, Leiden JM (1995) A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. Immunity 3: 223-237.
- 211. Chinenov Y, Kerppola TK (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. Oncogene 20: 2438-2452.
- 212. Hyun J, Becam I, Yanicostas C, Bohmann D (2006) Control of G2/M transition by Drosophila Fos. Mol Cell Biol 26: 8293-8302.
- 213. Weber U, Pataki C, Mihaly J, Mlodzik M (2008) Combinatorial signaling by the Frizzled/PCP and Egfr pathways during planar cell polarity establishment in the Drosophila eye. Dev Biol 316: 110-123.
- 214. Simon MA (2000) Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. Cell 103: 13-15.
- 215. Vivekanand P, Tootle TL, Rebay I (2004) MAE, a dual regulator of the EGFR signaling pathway, is a target of the Ets transcription factors PNT and YAN. Mech Dev 121: 1469-1479.
- 216. Casci T, Freeman M (1999) Control of EGF receptor signalling: lessons from fruitflies. Cancer Metastasis Rev 18: 181-201.

- 217. Glise B, Bourbon H, Noselli S (1995) hemipterous encodes a novel Drosophila MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. Cell 83: 451-461.
- 218. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, et al. (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. Science 270: 2008-2011.
- 219. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, et al. (1999) The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. Nature 399: 798-802.
- 220. Meneghini MD, Ishitani T, Carter JC, Hisamoto N, Ninomiya-Tsuji J, et al. (1999) MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in Caenorhabditis elegans. Nature 399: 793-797.
- 221. Moriguchi T, Kuroyanagi N, Yamaguchi K, Gotoh Y, Irie K, et al. (1996) A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. J Biol Chem 271: 13675-13679.
- 222. Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Matsuda S, et al. (1997) TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. J Biol Chem 272: 8141-8144.
- 223. Noselli S (1998) JNK signaling and morphogenesis in Drosophila. Trends Genet 14: 33-38.
- 224. Kockel L, Zeitlinger J, Staszewski LM, Mlodzik M, Bohmann D (1997) Jun in Drosophila development: redundant and nonredundant functions and regulation by two MAPK signal transduction pathways. Genes Dev 11: 1748-1758.
- 225. Riesgo-Escovar JR, Jenni M, Fritz A, Hafen E (1996) The Drosophila Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. Genes Dev 10: 2759-2768.
- 226. Glise B, Noselli S (1997) Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in Drosophila morphogenesis. Genes Dev 11: 1738-1747.
- 227. Hou XS, Goldstein ES, Perrimon N (1997) Drosophila Jun relays the Jun amino-terminal kinase signal transduction pathway to the Decapentaplegic signal transduction pathway in regulating epithelial cell sheet movement. Genes Dev 11: 1728-1737.
- 228. Riesgo-Escovar JR, Hafen E (1997) Drosophila Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. Genes Dev 11: 1717-1727.
- 229. Zeitlinger J, Bohmann D (1999) Thorax closure in Drosophila: involvement of Fos and the JNK pathway. Development 126: 3947-3956.
- 230. Adachi-Yamada T, Fujimura-Kamada K, Nishida Y, Matsumoto K (1999) Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in Drosophila wing. Nature 400: 166-169.
- 231. Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, et al. (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. Neuron 22: 667-676.
- 232. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, et al. (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. Science 288: 870-874.
- 233. Xu T, Rubin GM (1993) Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. Development 117: 1223-1237.
- 234. Emery G, Hutterer A, Berdnik D, Mayer B, Wirtz-Peitz F, et al. (2005) Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the Drosophila nervous system. Cell 122: 763-773.
- 235. Newsome TP, Asling B, Dickson BJ (2000) Analysis of Drosophila photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. Development 127: 851-860.
- 236. Sapir A, Assa-Kunik E, Tsruya R, Schejter E, Shilo BZ (2005) Unidirectional Notch signaling depends on continuous cleavage of Delta. Development 132: 123-132.
- 237. Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 107-117.
- 238. Eggenschwiler JT, Espinoza E, Anderson KV (2001) Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. Nature 412: 194-198.
- 239. Evans TM, Ferguson C, Wainwright BJ, Parton RG, Wicking C (2003) Rab23, a negative regulator of hedgehog signaling, localizes to the plasma membrane and the endocytic pathway. Traffic 4: 869-884.
- 240. Smith AC, Heo WD, Braun V, Jiang X, Macrae C, et al. (2007) A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by Salmonella enterica serovar Typhimurium. J Cell Biol 176: 263-268.
- 241. Vetter IR, Wittinghofer A (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science 294: 1299-1304.
- 242. Spoerner M, Herrmann C, Vetter IR, Kalbitzer HR, Wittinghofer A (2001) Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 4944-4949.
- 243. Eggenschwiler JT, Bulgakov OV, Qin J, Li T, Anderson KV (2006) Mouse Rab23 regulates hedgehog signaling from smoothened to Gli proteins. Dev Biol 290: 1-12.

- 244. Ingham PW, McMahon AP (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. Genes Dev 15: 3059-3087.
- 245. Wang Y, Ng EL, Tang BL (2006) Rab23: what exactly does it traffic? Traffic 7: 746-750.
- 246. Li N, Volff JN, Wizenmann A (2007) Rab23 GTPase is expressed asymmetrically in Hensen's node and plays a role in the dorsoventral patterning of the chick neural tube. Dev Dyn 236: 2993-3006.
- 247. Cooper O, Sweetman D, Wagstaff L, Munsterberg A (2008) Expression of avian prickle genes during early development and organogenesis. Dev Dyn 237: 1442-1448.
- 248. Takeuchi M, Nakabayashi J, Sakaguchi T, Yamamoto TS, Takahashi H, et al. (2003) The prickle-related gene in vertebrates is essential for gastrulation cell movements. Curr Biol 13: 674-679.
- 249. Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT (2003) Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. Curr Biol 13: 680-685.
- 250. Wallingford JB, Goto T, Keller R, Harland RM (2002) Cloning and expression of Xenopus Prickle, an orthologue of a Drosophila planar cell polarity gene. Mech Dev 116: 183-186.
- 251. Higashida C, Miyoshi T, Fujita A, Oceguera-Yanez F, Monypenny J, et al. (2004) Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. Science 303: 2007-2010.
- 252. Kovar DR, Pollard TD (2004) Progressing actin: Formin as a processive elongation machine. Nat Cell Biol 6: 1158-1159.
- 253. Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D, et al. (2004) Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. Cell 119: 419-429.
- 254. Barko S, Bugyi B, Carlier MF, Gombos R, Matusek T, et al. (2010) Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of Drosophila DAAM. J Biol Chem 285: 13154-13169.
- 255. Harris ES, Rouiller I, Hanein D, Higgs HN (2006) Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2. J Biol Chem 281: 14383-14392.
- 256. Moseley JB, Goode BL (2005) Differential activities and regulation of Saccharomyces cerevisiae formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. J Biol Chem 280: 28023-28033.
- 257. Affolter M, Bellusci S, Itoh N, Shilo B, Thiery JP, et al. (2003) Tube or not tube: remodeling epithelial tissues by branching morphogenesis. Dev Cell 4: 11-18.

- 258. Shilo BZ, Gabay L, Glazer L, Reichman-Fried M, Wappner P, et al. (1997) Branching morphogenesis in the Drosophila tracheal system. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 62: 241-247.
- 259. Uv A, Cantera R, Samakovlis C (2003) Drosophila tracheal morphogenesis: intricate cellular solutions to basic plumbing problems. Trends Cell Biol 13: 301-309.
- 260. Samakovlis C, Manning G, Steneberg P, Hacohen N, Cantera R, et al. (1996) Genetic control of epithelial tube fusion during Drosophila tracheal development. Development 122: 3531-3536.
- 261. Somogyi K, Rorth P (2004) Evidence for tension-based regulation of Drosophila MAL and SRF during invasive cell migration. Dev Cell 7: 85-93.
- 262. Gasman S, Kalaidzidis Y, Zerial M (2003) RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. Nat Cell Biol 5: 195-204.
- 263. Vallen EA, Caviston J, Bi E (2000) Roles of Hof1p, Bni1p, Bnr1p, and myo1p in cytokinesis in Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell 11: 593-611.
- 264. Pak CW, Flynn KC, Bamburg JR (2008) Actin-binding proteins take the reins in growth cones. Nat Rev Neurosci 9: 136-147.
- 265. Zallen JA, Cohen Y, Hudson AM, Cooley L, Wieschaus E, et al. (2002) SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in Drosophila. J Cell Biol 156: 689-701.
- 266. Korobova F, Svitkina T (2008) Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. Mol Biol Cell 19: 1561-1574.
- 267. Mongiu AK, Weitzke EL, Chaga OY, Borisy GG (2007) Kinetic-structural analysis of neuronal growth cone veil motility. J Cell Sci 120: 1113-1125.
- 268. Ng J, Luo L (2004) Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. Neuron 44: 779-793.
- 269. Strasser GA, Rahim NA, VanderWaal KE, Gertler FB, Lanier LM (2004) Arp2/3 is a negative regulator of growth cone translocation. Neuron 43: 81-94.
- 270. Urban E, Jacob S, Nemethova M, Resch GP, Small JV (2010) Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. Nat Cell Biol 12: 429-435.
- 271. Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, et al. (2003) Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. J Cell Biol 161: 381-391.

- 272. Eisenmann KM, West RA, Hildebrand D, Kitchen SM, Peng J, et al. (2007) T cell responses in mammalian diaphanous-related formin mDia1 knock-out mice. J Biol Chem 282: 25152-25158.
- 273. Peng J, Kitchen SM, West RA, Sigler R, Eisenmann KM, et al. (2007) Myeloproliferative defects following targeting of the Drf1 gene encoding the mammalian diaphanous related formin mDia1. Cancer Res 67: 7565-7571.
- 274. Sakata D, Taniguchi H, Yasuda S, Adachi-Morishima A, Hamazaki Y, et al. (2007) Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. J Exp Med 204: 2031-2038.
- 275. Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, Philippar U, Barzik M, et al. (2007) Filopodia are required for cortical neurite initiation. Nat Cell Biol 9: 1347-1359.
- 276. Klambt C, Jacobs JR, Goodman CS (1991) The midline of the Drosophila central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. Cell 64: 801-815.
- 277. Sanchez-Soriano N, Goncalves-Pimentel C, Beaven R, Haessler U, Ofner-Ziegenfuss L, et al. (2010) Drosophila growth cones: a genetically tractable platform for the analysis of axonal growth dynamics. Dev Neurobiol 70: 58-71.
- 278. Patel NH, Martin-Blanco E, Coleman KG, Poole SJ, Ellis MC, et al. (1989) Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. Cell 58: 955-968.
- 279. Patel NH, Schafer B, Goodman CS, Holmgren R (1989) The role of segment polarity genes during Drosophila neurogenesis. Genes Dev 3: 890-904.
- 280. Matusek T, Djiane A, Jankovics F, Brunner D, Mlodzik M, et al. (2006) The Drosophila formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton. Development 133: 957-966.
- 281. Hakeda-Suzuki S, Ng J, Tzu J, Dietzl G, Sun Y, et al. (2002) Rac function and regulation during Drosophila development. Nature 416: 438-442.
- 282. Ng J, Nardine T, Harms M, Tzu J, Goldstein A, et al. (2002) Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. Nature 416: 442-447.
- 283. Wills Z, Bateman J, Korey CA, Comer A, Van Vactor D (1999) The tyrosine kinase Abl and its substrate enabled collaborate with the receptor phosphatase Dlar to control motor axon guidance. Neuron 22: 301-312.
- 284. Wills Z, Marr L, Zinn K, Goodman CS, Van Vactor D (1999) Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the Drosophila embryo. Neuron 22: 291-299.
- 285. Sanchez-Soriano N, Tear G, Whitington P, Prokop A (2007) Drosophila as a genetic and cellular model for studies on axonal growth. Neural Develop 2: 9.

- 286. Dickson BJ (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. Science 298: 1959-1964.
- 287. Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. Genes Dev 19: 1-49.
- 288. Liu W, Sato A, Khadka D, Bharti R, Diaz H, et al. (2008) Mechanism of activation of the Formin protein Daam1. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 210-215.
- 289. Bateman J, Shu H, Van Vactor D (2000) The guanine nucleotide exchange factor trio mediates axonal development in the Drosophila embryo. Neuron 26: 93-106.
- 290. Forsthoefel DJ, Liebl EC, Kolodziej PA, Seeger MA (2005) The Abelson tyrosine kinase, the Trio GEF and Enabled interact with the Netrin receptor Frazzled in Drosophila. Development 132: 1983-1994.
- 291. Schirenbeck A, Arasada R, Bretschneider T, Stradal TE, Schleicher M, et al. (2006) The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 7694-7699.
- 292. Truman JW (1990) Metamorphosis of the central nervous system of Drosophila. J Neurobiol 21: 1072-1084.
- 293. Roman G, Davis RL (2001) Molecular biology and anatomy of Drosophila olfactory associative learning. Bioessays 23: 571-581.
- 294. Ito K, Hotta Y (1992) Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of Drosophila melanogaster. Dev Biol 149: 134-148.
- 295. Yang MY, Armstrong JD, Vilinsky I, Strausfeld NJ, Kaiser K (1995) Subdivision of the Drosophila mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. Neuron 15: 45-54.
- 296. Jefferis GS, Marin EC, Watts RJ, Luo L (2002) Development of neuronal connectivity in Drosophila antennal lobes and mushroom bodies. Curr Opin Neurobiol 12: 80-86.
- 297. Lee T, Lee A, Luo L (1999) Development of the Drosophila mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. Development 126: 4065-4076.
- 298. Kurusu M, Awasaki T, Masuda-Nakagawa LM, Kawauchi H, Ito K, et al. (2002) Embryonic and larval development of the Drosophila mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of fasciclin II. Development 129: 409-419.
- 299. McBurney MW, Jones-Villeneuve EM, Edwards MK, Anderson PJ (1982) Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. Nature 299: 165-167.
- 300. Fanarraga ML, Avila J, Zabala JC (1999) Expression of unphosphorylated class III betatubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. Eur J Neurosci 11: 517-527.

- 301. Paterno GD, Gillespie LL, Julien JP, Skup D (1997) Regulation of neurofilament L, M and H gene expression during retinoic acid-induced neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. Brain Res Mol Brain Res 49: 247-254.
- 302. Knowles BB, Aden DP, Solter D (1978) Monoclonal antibody detecting a stage-specific embryonic antigen (SSEA-1) on preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma cells. Curr Top Microbiol Immunol 81: 51-53.

6. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

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

- 1. Boutros, M., **Mihaly, J.**, Bouwmeester, T. and Mlodzik, M. Signaling specicity 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.**, Matusek 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. Matusek, 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)
- Matusek, 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, Matusek 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, Matusek 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

6.2. 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)

- 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 mot in *Polycomb*-response elements. Molecular Cell 1, 1065-1066 (1998), (IF: 12.400)
- 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., Belecz, 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-b. **Genetics** 156, 1889-900 (2000), (IF: 4.687)
- 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)
- 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

** Ez az adat eltér az MTMT adataitól, mert ott nem veszik figyelembe, hogy a Mishra et al., 2001 (*MCB*) (IF: 9.836) közleményben megosztott első szerző vagyok (ez a tény a cikk Acknowledgement szekciójában jelezve van).

7. FÜGGELÉKEK

7.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Terjedelmi okok miatt a vizsgálataink során felhasznált anyagok és módszerek közül elsősorban azok bemutatására törekedtem, amelyek *Drosophila* specifikusak vagy azon belül is egy adott szövet vizsgálata szempontjából egyedi módszerek. A széleskörűen alkalmazott molekuláris biológiai metodikák részletes leírásától itt eltekintek, azokat az általános szabályok és leírások szerint alkalmaztuk.

Drosophila tenyészet és törzsek

A *Drosophila* törzsek fenntartásához standard muslica-táptalajt használtunk, amelyben kukoricaliszt, szárított élesztő, agar és cukor a főbb komponensek. Kísérleteinket általában 25°C-on *en masse* végeztük, az ettől való eltérést az adott kísérlet leírásánál külön jeleztem. A felhasznált igen nagyszámú muslica törzs leírása megtalálható az integrált *Drosophila* adatbázisban (Flybase, http://flybase.org), ill. az értekezés alapjául szolgáló közleményekben.

Sejtkultúra

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

EMS és ENU mutagenezis

Az új PCP mutánsok előállítása érdekében elvégzett mutagenezis kísérletek során *Ubx-Flp*; *FRT40* vagy *Ubx-Flp*; *FRT42* homozigóta hímeket 6 óra éheztetés után 0,030 M etil-metán-szulfonátot (EMS) tartalmazó 1%-os cukoroldattal etettünk öt órán át. Az *Ubx-Flp*; *FRT82* hímeket hasonló körülmények között 1,6 mM-os N-etil-N-nitrozourea (ENU) oldattal kezeltük. A kezelés után a hímeket 100-as csoportokban megfelelő genotípusú 80 szűz nőstényhez kereszteztük. Az utódgenerációból egyedi hímeket kereszteztünk tovább a megfelelő genotípusú nőstényekhez (a keresztezési séma megtalálható a **37. ábrán**).

Embrionális kutikula preparátum készítése

A petéztetés kezdete után 22 órával az embriókat nedves ecsettel eltávolítottuk a táptalaj felszínéről, egy kisméretű szitában gyűjtöttük össze és csapvízzel tisztára mostuk,

majd 0,5%-os Chlorox oldattal (10-szeres hígítás) fél percig dekorionizáltuk, hosszan folyó csapvízzel öblítettük. A felesleges vizet leitattuk az embriókról, majd alig nedves ecsettel kb. 50-es csoportokban, tárgylemezre csöppentett tejsavas Hoyers-médiumba (1: 1 tejsav:Hoyers) helyeztük át. A preparátumot lefedtük és 65°C-os termosztált lapon feltisztulásig inkubáltuk, majd 200-szoros nagyításnál, fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk.

Adult szárnypreparátumok készítése

A preparátumok készítése előtt az adult állatokat legalább egy napig glicerin és etanol 3:1 arányú elegyében tároltuk. A szárnyakat ebben az oldatban boncolócsipesszel leválasztottuk, desztillált vízben mostuk, majd tárgylemezen Hoyer's oldatba helyeztük és lefedtük, végül kb. 12 órán át 60 °C-on inkubáltuk. Statisztikai összehasonlításra a legtöbb esetben az A szárnyszektor dorzális oldalát használtuk. A szárnyakat Zeiss Axiocam MOT2 mikroszkóppal fotóztuk.

Adult kutikula preparátumok készítése

A preparálásra szánt állatokat glicerin és 96%-os etil-alkohol 3:1 arányú keverékében tároltuk. A preparálás megkezdése előtt a potrohról eltávolítottuk a fejet és a tort, majd legalább 5 percre 96%-os alkoholba helyeztük. A kutikula megkeményedése után az abdoment egy éles hagyományos borotvapengével a háti oldalon óvatosan kettévágtuk anélkül, hogy a sterniteket átvágtuk volna, majd a kettévágott abdomeneket legalább 10 percre glicerinbe helyeztük. Az ily módon megpuhított, kettévágott kitines kültakaróról eltávolítottuk a beleket és tracheákat, majd óvatosan szétterítettük a kutikulát és a preparátumot egy tárgylemezen 10%-os KOH-ba helyeztük át. Gondos kiigazítás után az abdominális kültakarót lefedtük, és fél órára 51°C-os termosztált lapra helyeztük. Ezután a feltisztult preparátumot desztillált vízzel óvatosan leáztattuk egy kisméretű Petri csészébe. A leúsztatott, kisimult kültakarót az eredetileg külső oldallal felfelé egy csepp Hoyersmédiumba helyeztük át, lenyomtuk a csepp aljára, buborékmentesen lefedtük, majd 12 órára 60 °C-os termosztátba helyeztük. A kész preparátumokat Zeiss Axiocam MOT2 mikroszkóppal vizsgáltuk és fotóztuk.

Adult szemek fixálása, beágyazása és szemmetszetek készítése

A vizsgálni kívánt adult egyedek fejét altatásban szikével levágtuk majd az egyik szemen is metszést ejtettünk, ami biztosítja a fixáló szer behatolását a feji szövetekbe. Az így előkészített fejek fixálását 2%-os glutáraldehid PBS-es oldatában végeztük 15 percig jégbe

helyezett Eppendorf csövekben. Utána a szemeket centrifugálással összegyűjtöttük a cső alján, majd a fixáló oldatot OsO₄ és glutáraldehid 1:1 arányú elegyére cseréltük 1-6 órára. Ezek után a dehidrálás következett 30, 50, 70, 90 és 96%-os etanolban történő 10 perces inkubálásokkal. A dehidrálás végén az etanolt 10 percre propilén-oxidra cseréltük, majd a fejeket propilén-oxid és műgyanta (Durcupan, Fluka) 1:1 arányú keverékében egy éjszakán át inkubáltuk. A következő napon a fejeket 4 órára műgyantába helyeztük, majd egyesével friss műgyantát tartalmazó öntőmintába helyeztük át őket, ahol pozícionálás után egy éjszakán át 70 °C-on inkubáltuk őket. Metszés előtt a felesleges műgyantát pengével eltávolítottuk, majd mikrotommal félvékony metszeteket készítettünk. A metszeteket egy csepp vízben tárgylemezre helyeztük majd 65 °C-on 2 percig szárítottuk őket. Lefedés előtt, a klón analízisek kivételével, 1% bórsav és 1% toluidin-kék oldatában 1-5 percig festettük a metszeteket.

Drosophila embriók fixálása

A szülői törzset vagy keresztezést 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 dekorionizáltuk, 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 órán át 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 dekorionizációs lépés megegyezett a metanolos fixálás során leírtakkal.

Ezután az embriókat egy előre (1-7 nappal hamarabb) elkészített fixáló reagensbe (37%-os formaldehiddel telített n-heptán) tettük. A fixálási lépés 40 percig tartott, majd az embriókat műanyag Petri-csészére 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 1 órán át PBS-BT-vel blokkoltuk.

Imágó korongok fixálása

A szem-antenna, ill. a szárny diszkuszokat jéghideg PBS-ben kiboncoltuk a lárvákból, oly módon, hogy a szem-antenna diszkusz a kitines szájszervhez, míg a szárny diszkusz a lárva elülső felének kifordítása és kitisztítása után a lárvális epidermiszhez kötődve maradjon. A fixálást 2% paraformaldehid frissen készített PBS-es oldatában végeztük 30-45 percig szobahőn (Wg festés előtt 4%-os oldatot használtunk). A festés és másodlagos ellenanyaggal való inkubálás után 1%-os paraformaldehiddel poszt-fixálást is végeztünk.

Lárvális trachea fixálás

A lárvákat szilikonlemezen rovartűk segítségével rögzítettük, majd egy csepp PBSben 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 szobahőn blokkoltuk.

Adult agy fixálása

Az adult állatokat CO₂-dal altattuk, majd fejüket szikével levágtuk, jéghideg PBS-ben összegyűjtöttük és az agyakat csipesszel kiboncoltuk. A kiboncolt agyakat 4%-os paraformaldehid PBS-es oldatában 20 percig fixáltuk szobahőn, majd a preparátumokat 3x mostuk PBST-vel, végül Eppendorf csőbe helyeztük, és PBS-BT-ben 1 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk.

Bábszárny boncolás és fixálás

A bábszárny boncolások előtt a fehér báb állapotban legyűjtöttük a bábokat, majd azokat a szükséges hőmérsékleten (általában 25 °C-on) neveltük a boncolás kezdetéig. A

boncolás során a bábokat kibontottuk a bábbőrből, majd mindkét végükön vágást ejtettünk és azokon keresztül kitisztítottunk belőlük minden nem epidermális szövetet. Ezek után a fixálást 4%-os formaldehid PBS-es oldatában végeztük 30 percig szobahőn. Az In festések előtt a fixálás 4% paraformaldehid PBS-es oldatában történt 30 percig 4 °C-on. Fixálás után a szárnyakat kibontottuk az őket körülvevő epidermális tasakból és a fixáló szer kimosását, ill. a blokkolást hasonló módon végeztük, mint az egyéb szövetek esetében.

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.

Elsődleges ellenanyag készítés

Az α-dDAAM ellenanyag készítéséhez az FH1-FH2 fragmentumot kódoló cDNS darabot pGEX-2T vektorba klónoztuk. A GST::dDAAM fúziós fehérjét E. coli-ban termeltettük, majd GSH oszlopon (Amersham Biosciences) affinitáskromatográfiával tisztítottuk. Thrombinos hasítás után gélfiltrációs kromatográfiával tisztítottuk tovább. A tisztított fehérjét (100 μg) négy hónapos nyulakba szubkután injektáltuk. Három immunizálás után a szérumot immunfestések és Western-blot analízis segítségével teszteltük.

Az α-Rab23 ellenanyag készítéséhez a teljes hosszúságú Rab23 cDNS-t klónoztuk pDEST17 vektorba. A His-tagelt fehérjét BD-Talon gyöngyökön tisztítottuk. A tisztított fehérjét szubkután injektáltuk három hónapos Balb/c egerekbe. A szérumot 4 immunizálás után teszteltük és használtuk.

Immunhisztokémia

A fixált embriókat, lárvális szöveteket és bábszárnyakat 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, gicerin :PBS (4:1)-re cseréltük. Az ily módon előkészített embriókat és lárvális tracheákat tárgylemezekre helyeztük, és lefedtük.

A csapadék-képződéses festéseknél a másodlagos ellenanyagos inkubálást követő utolsó 30 perccel a mosás lejárta előtt előkészítettük a Vectastain ABC reagenst, majd az embriókat 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk ABC reagensben. Az inkubációt követően az embriókat 5x10 percig PBS-T-vel mostuk, majd egy előre összemért DAB-H₂O₂ 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 glycerin:PBS 4:1 oldatában rovartűk segítségével boncoltuk ki mikroszkóp alatt.

Az S2 és P19 sejtek immunhiszokémiai 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

α-DAAM: 1:4000 (immunfestésen), 1:500 (Western-blotton) α-BP102: 1:5 (DSHB) α-FasII: 1:50 (DSHB) anti-β-galaktozidáz: 1:1000 (Promega) egér-anti-β-tubulinIII:1:1000 (Millipore) nyúl-anti-β-tubulinIII:1:1000 (SIGMA) α-NF-M:1:10 (DSHB) α-ena:1:500 (DSHB) α-ena:1:500 (DSHB) α-chic:1:10 (immunfestésen), 1:1 (Western-blotton) (DSHB) α-En:1:10 (DSHB) α-Eve:1:1000 (M. Frasch jóvoltából) α-DCAD2: 1:10 (DSHB) α-m2A12: 1:5 (M. Krasnow jóvoltából) α-EGFP: 1:1000 (Invitrogen)

α-myc: 1:400 (Roche) α-Fz: 1:10 (DSHB) α-Wg: 1:10 (S. Cohen jóvoltából) α-Ac: 1:200 (S. Carroll jóvoltából) α-Elav: 1:300 (DSHB) α-Fos: 1:500 (D. Bohmann jóvoltából) α-Sens: 1:1000 (H. Bellen jóvoltából) α-Bar: 1:100 (K. Saigo jóvoltából) α-Rab23: 1:100 (saját ellenanyag) α-Dgo: 1:200 (S. Eaton jóvoltából) α-Stbm: 1:500 (T. Wolff jóvoltából) α-In: 1:1000 (P. Adler jóvoltából) α-Pk: 1:2000 (D. Gubb jóvoltából) α-HA: 1:400 (Roche) α-Fmi: 1:10 (T. Uemura jóvoltából)

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, QIAGEN 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), metanol:PBS hígítási sorozatban (metanol: 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 H₂O) 1:1 arányú keverékével mostuk. Ezek után hibridizációs pufferben egy éjszakán át 48 °C-on prehibridizáltuk, majd a hibridizációs puffer taz elkészíttett próbával kiegészítve további 24h-n át hibridizáltuk. A hibridizációs lépést követően az embriókat 5x15 percig PBS-T-vel mostuk, majd 1:10000 α -DIG (ROCHE) ellenagyaggal festettük.

Western-blot

A Western-blot kísérleteket alapvetően standard körülmények között végeztük, a megfelelő módon feltárt mintákhoz 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

1 óráig 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 órát szobahőn inkubáltuk. Ezek után a membránokat 3x20 percig TBST-ben mostuk, majd Millipore Immobilon kemilumineszcens detekciós reagenssel előhívtuk.

Immunprecipitáció

A dDAAM analíziséhez köthető koimmunoprecipitációs kísérletek során 6x10⁶ 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 kimerítései lépés alatt 50-50µl ProteinA Sepharose gyöngyöt a precipitációkhoz használni kívánt elsődleges ellenanyagokkal lízis pufferben telítettünk (az α -ena esetében 250 μ l ellenanyag, míg az α -chic esetében 500 μ l ellenanyag került felhasználásra 1ml végtérfogatban). 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 (25-25µl) 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 kapillárissal óvatosan leszívtuk, a továbbiakban ezt használtuk a Western-blot analízisek során (a gélekre a precipitátumok 2/5 részét vittük fel).

A Rab23 analíziséhez köthető koimmunoprecipitációs kísérletek során 100 darab (28-30 órás) bábot homogenizáltunk lízis pufferben (lásd fönt) 1 órán át 4°C-on. A nem szolubilis anyagot centrifugálással (15000 rpm, 15 perc 4°C-on) távolítottuk el és a további kísérletekre a tiszta felülúszót használtuk. A lizátum 1/10 részét Western-blot kontrollként használtuk. A lizátumokat az aspecifikus kötődések csökkentésének érdekében 100µl IgG mentes ProteinA-Sepharose gyöngyökkel inkubáltuk (CL4B, Pharmacia) 1 órán keresztül 4°C-on. Az

161

immunoprecipitáció során a preinkubált gyöngyökből 60µl-t inkubáltunk 30µl α-Rab23 ellenanyaggal 2 órán keresztül 1 ml lízis bufferben. Az ily módon elkészített prekomplexeket rövid ideig (3x5percig) lízis pufferrel mostuk, majd az ellenanyagokkal telített gyöngyök egy részét félretettük, ez a továbbiakban IgG kontrollként szolgált. A prekomplex maradékával az immunoprecipitációt 4°C-on egy éjszakán át folytattuk, majd a felülúszó eltávolítása után a gyöngyöket 3x20 percig lízis pufferrel mostuk. A kötődött fehérjéket 2xLaemmli pufferben eluáltuk és Western-blot kísérletekkel analizáltuk.

Drosophila	Gerinces	Molekuláris adatok	Erintett	szövet/folyamat
gén	gén		muslicában	gerinces állatban
Elsödleges P	CP gének			
frizzled (fz)	Fz3 (egér)	7-TM receptor, Wnt/Wg	minden	belső fül,
	Fz0 (eger) $E=7$ (V_{c} la quia)	ligandokat kot; koti a Dsh-t;	szovet	epidermis,
	F27 (A. $iuevis$)	Dgo-t a membránhoz		CE
dishevelled (dsh)	Dvl2 (egér)	Citoplazmatikus fehérje DIX,	minden	belső fül,
	XDsh (X. laevis)	PDZ és DEP doménekkel. In	szövet	CE
		vitro köti a Pk, Fz, Stbm és Dgo		
		fehérjéket.		
prickle (pk)	pk1, pk2	Citoplazmatikus fehérje 3 LIM	minden	CE
	(zebrahal)	és egy PET doménnel. A Stbm	szövet	
		rekrutalja a membrannoz. In		
		fehériéket a Doo-val kompetál		
		a Dsh kötésért.		
strabismus (stbm) /	Vang-like 1	4-TM protein, köti a Pk, Dsh és	minden	belső fül,
Van Gogh (Vang)	(Vangl1);	Dgo fehérjéket. Rekrutálja a Pk	szövet	CE,
	Vang-like 2	fehérjét.		vese,
	(Vangl2);			bilaterális
	trilobite (tri;			szimmetria
	zebrahal)			
flamingo (fmi) /	Celsr1 (egér)	7-TM kadherin, elősegíti a	minden	belső fül,
starry night (stan)		homofilikus sejtadhéziót.	szövet	CE
diego (dgo)	Diversin	Citoplazmatikus fehérje	minden	CE,
	(ankrd6);	ismétlődő ankyrin doménekkel.	szövet	bilaterális
	inversin (invs)	In vitro köti a Dsh, Stbm és Pk		szimmetria
		fehérjéket, a Pk-lel kompetál a		
		Dsh kötésért.		

7.2. Összefoglaló táblázat a dolgozatban bemutatott PCP génekről

Polaritási e	ffektorok			
inturned (in)	X. leavis inturned (XInt)	Citoplazmatikus fehérje PDZ homológia doménnel. Szárnyban a proximális oldalon halmozódik fel a Stbm és Pk fehérjékkel együtt.	szárny, CE notum	
fuzzy (fy)	X. leavis fuzzy (XFy)	4-TM fehérje, egy komplexet alkot az In és Frtz fehérjékkel.	szárny, CE notum	
fritz (frtz)	?	Coiled-coil WD40 fehérje. Szekvenciája konzervált gerincesekben is.	szárny, ? notum	
multiple wing hairs (mwh)	?	GBD és FH3 doméneket tartalmazó citoplazmatikus fehérje. Szárnysejtekben a proximális oldalról induló grádiens eloszlást mutat.	szárny ?	

widerborst (wdb) ?	PP2A szabályozó alegység	szárny	9
	112A szabal yöző alegyseg	szamy,	1
NT 1'1		notum	CE
<i>nemo</i> Nemo-like	Szerin/treonin kinaz	szem	CE
kinase (Nlk	.)		~~
Racl XRacl (X.	Kis GTPáz, a Dsh-tól alsóbb	o szárny,	CE
leavis)	szinten hat.	szem	
RhoA RhoA	Kis GTPáz, a Dsh-tól alsóbb	o szárny,	CE
	szinten hat.	szem	
Rho kinase (rok) rho kinas	se 2 Rho effektor, szerin/treonin	szárny,	CE
(rok; zebral	hal) kináz	szem	
misshapen (<i>msn</i>) ?	A Dsh-tól alsóbb szinten ható	szárny,	?
1 ()	STE-20 típusú szerin/treonin	n szem.	
	kináz	notum	
Eat/Ds asonowt			
			11. "
fat (ft) Fat4 (eger)	A kadherin szupercsalad tagja,	, minden	belso ful,
	heterofilikus interakciót mutat a	ı szövet	CE,
	Ds-sel.		vese
dachsous (ds) Dchs1	A kadherin szupercsalád tagja,	, minden	?
Dchs2	heterofilikus interakciót mutat a	a szövet	
	Ft-tel.		
four-jointed (fj) Fjxl (egér)	II típusú TM protein, Golgi	minden	vese
	asszociált kináz, ismert	szövet	
	szubsztrátjai a Ft és a Ds.		
Atrophin (Atro) /	Transzkripcionális ko-	- szárny.	?
Grunge (Gug)	represszor	szem	

Grunge (Gug)

CE: konvergens extenzió;

?: nincs meghatározva

7.3. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

act-Gal4	actin5C-Gal4
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADF	Actin Depolymerizing Factor
ADP	Adenozin Difoszfát
AP-1	Activator Protein 1
APF	After Puparium Formation
arm-Gal4	armadillo-Gal4
ATP	Adenozin Trifoszfát
bp	bázispár
Bni1	Bud Neck Involved 1
Bnr1	Bni1 Related
DEP	Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin homológia domén
DIX	Dishevelled, Axin homológia domén
DN	Domináns Negatív
Egfr	Epidermal Growth Factor Receptor
Elav	Embryonic lethal abnormal vision
En	Engrailed
Ena/VASP	Enabled/Vasodilator-stimulated Phosphoprotein
ETS	E-twenty-six transzkripciós faktorok
Eve	Even-skipped
F-aktin	Filamentous-actin
FasII	Fasciclin-II
FH3	Formin homológia domén 3
FRT/Flp	FLP Recognition Target/Flippase
FYVE	Fab 1, YOTB, Vac 1, EEA1 homológia domén
G-aktin	Globular-actin
Gal4	UAS elemhez kötődő transzkripciós faktor
GBD	GTPase binding domain
GDP	Guanozin Difoszfát
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GOF	Gain of function

GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanozin Trifoszfát
HA	Hemagglutinin
kDa	kiloDalton
KIND	Kinase non-catalytic C-lobe domén
LIM	Lin11, Isl-1, Mec-3 homológia domén
LOF	Loss of function
MRLC	Myosin Regulatory Light Chain
mRNS	hírvivő Ribonukleinsav
Mtl	Mig-2-like
NF-M	Neurofilament-M
PCP	Planar Cell Polarity
PDZ	PSD95, DlgA, Zo-1 homológia domén
PEE	PCP effector element
PET	Prickle, Espinas, Testin homológia domén
РКС	Protein Kinase C
pnr	pannier
psq	pipsqueak
RNSi	RNS interferencia
RTK	Receptor tyrosine kinase
sca-Gal4	scabrous-Gal4
Scar	Suppressor of cAMP receptor
sev	sevenless
SH3	Src Homológia domén 3
SOP	Sensory Organ Precursor
Sqh	Spagetti squash
Src	Sarcoma protein, RTK a Rous sarcoma vírusból
Su(H)	Suppressor of Hairless
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TIRFM	Total Internal Reflection Fluorescent Microscopy
tub-Gal4	tubulin-Gal4
UAS	Upstream Activating Sequence
Ubx	Ultrabithorax
UTR	nem transzlálódó régió

WASP	Wiscott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE	WASP family Verprolin-homologous protein
WH2	WASP homology 2 domén
Wnt	Wingless-int1 homológ fehérje
Xnr-3	Xenopus nodal-related-3 gene
YFP	Yellow Fluorescent Protein