

***A DROSOPHILA DAAM* AXON NÖVEKEDÉSBEN
BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA**

Ph.D. értekezés

Készítette: Gombos Rita

Témavezető: Dr. Mihály József

**Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet
SZTE TTIK**

Szeged, 2012.

TARTALOMJEGYZÉK

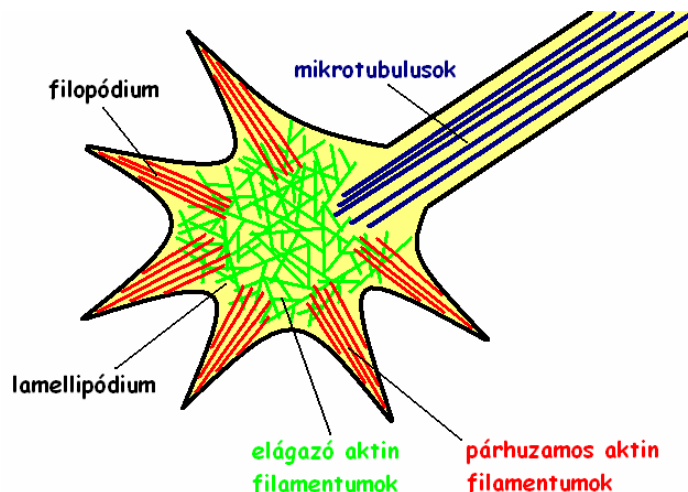
BEVEZETÉS	3
Az axonnövekedés és a növekedési kúp általános jellemzése	3
<i>A növekedési kúp szerkezete és szerepe</i>	4
<i>A sejtvezeték felépítése és dinamikája a növekedési kúpon belül</i>	7
<i>Az axonális növekedés molekuláris mechanizmusa</i>	10
Az aktin nukleációban szerepet játszó fehérjék	12
<i>Az Arp2/3 komplex működése</i>	14
<i>WH2 domén tartalmú aktin nukleátorok</i>	15
<i>Forminok</i>	17
Aktin nukleáció a központi idegrendszerben	21
A DAAM és a nem kanonikus Wnt jelátviteli út kapcsolata	22
CÉLKITŰZÉSEK	27
EREDMÉNYEK	29
A <i>Drosophila</i> embrionális központi idegrendszer szerkezete és fejlődése	29
Az embrionális idegrendszeri vizsgálatok kísérletes előzményei	31
A <i>Drosophila</i> DAAM szükséges az idegsejt nyúlványok megfelelő projekciójához az embrionális központi idegrendszerben	33
A dDAAM konstitutívan aktív formája is hatással van a nyúlványok növekedésére	38
A dDAAM fehérje elősegíti a filopódiumok képződését az axon növekedési kúpjában	41
A dDAAM aktivátorai a Rac típusú kisGTPázok	43
A dDAAM az embrionális nyúlványmintázat kialakítása során együttműködik az Ena és a Profilin fehérjékkel	45
A dDAAM fehérje lokalizációja az adult agyban	47

<i>A gombatest szerkezete és kialakulása</i>	48
<i>A dDAAM kifejeződésének vizsgálata a gombatestben</i>	51
A dDAAM hipomorf mutánsok gombatestében axonnövekedési és navigálási hibák figyelhetők meg	54
A dDAAM RNSi mutánsok fenotípusa	59
A Drosophila Diaphanous és a dDAAM kifejeződési mintájának összehasonlítása az adult agyban	60
A Dia szerepe a Kenyon-sejtekben	64
A formin típusú fehérjék közül a dDAAM az egyetlen, amely a gombatest nyúlványok növekedésének pozitív szabályozója	66
A funkcionyeréses vizsgálatok is alátámasztják, hogy a dDAAM a Kenyon sejt nyúlványok növekedésének pozitív regulátora	68
A Rho típusú kisGTPázok szerepének vizsgálata a gombatestben domináns negatív formáik szövetspecifikus túltermelésével	70
A Rac kisGTPázok domináns genetikai interakciót mutatnak a <i>DAAM^{Ex1}</i> alléllal	73
A dDAAM a Profilinnal és az Ena-val együttműködve szabályozza a nyúlványok növekedését a gombatestben	75
A dDAAM és a szöveti polaritási gének kölcsönhatása az axonnövekedés során	76
A dDAAM nyúlváynövekedésben és navigációban betöltött szerepe az aktin polimerizációs képességéhez kapcsolható	82
<u>EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA</u>	84
<u>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u>	91
<u>FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK</u>	100
<u>ÖSSZEFOGLALÁS</u>	102
<u>SUMMARY</u>	107
<u>IRODALOMJEGYZÉK</u>	112

BEVEZETÉS

Az axonnövekedés és a növekedési kúp általános jellemzése

A komplex idegi működés alapja a megfelelő idegsejtek közötti kapcsolatok kialakulása. Ennek feltétele, hogy az idegsejtek nyúlványai megfelelő minta szerint projektáljanak, megtalálva a célsejtjüket. A növekvő axonok a környezeti jelek alapján választják ki növekedésük irányát, ami egy a növekvő axon és a környezete közötti kölcsönhatást feltételez. Ebben a folyamatban döntő szerepet játszanak az axonok végén differenciálódó növekedési kúpok (growth cone), melyek a növekvő axonvég kitágult képletei (1. ábra). A növekedési kúpok területén lamellipódiumokat találunk, melyek között vékony filopódiumok nyúlnak ki (1. ábra). A periférián található filopódiumok mintegy „csápként” tapogatják le a környezetüket, és a különböző vonzó és taszító jelekre reagálva határozzák meg az axon növekedési irányát. Ezt teszi lehetővé, hogy egyrészt minden sejt felszínén megtalálhatóak a felismerésüket szolgáló adhéziós molekulák, másrészt az idegsejt nyúlványok célsejtjei a növekedési kúp által érzékelhető navigációs jeleket termelnek.

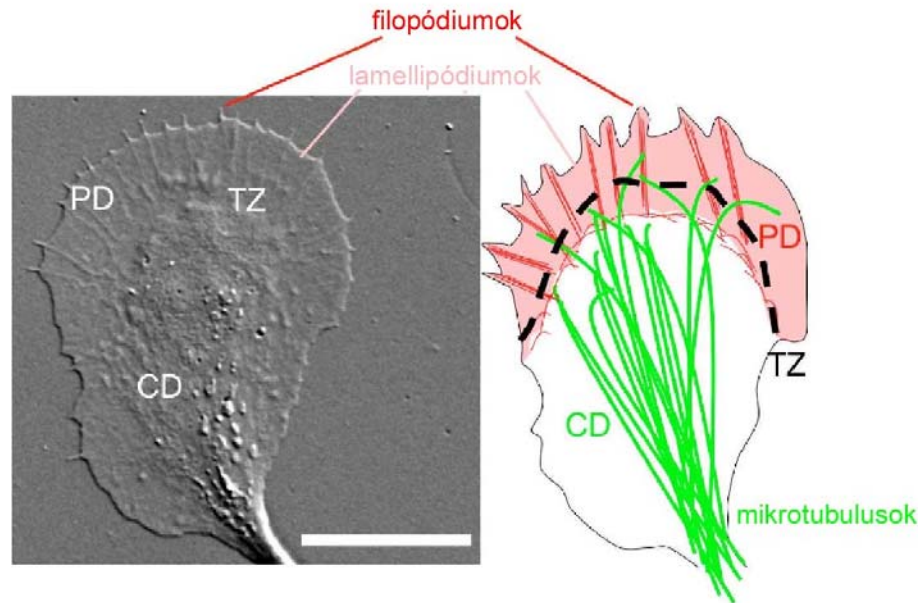


1. ábra A növekedési kúp sematikus ábrája.

A navigációs jelek általában egy koncentráció grádiens mentén oszlanak el, és ily módon irányítják a növekvő axonokat. A vonzó és taszító navigációs jelek „tengerében” a növekedési kúpok képesek a számukra fontos jeleket érzékelni és dinamikus sejthalak, illetve sejtvál átrendeződésekkel aktív mozgást végezni akár több centiméteres távolságokra is, ami a funkcionális idegrendszer kialakulásának az alapja.

A növekedési kúp szerkezete és szerepe

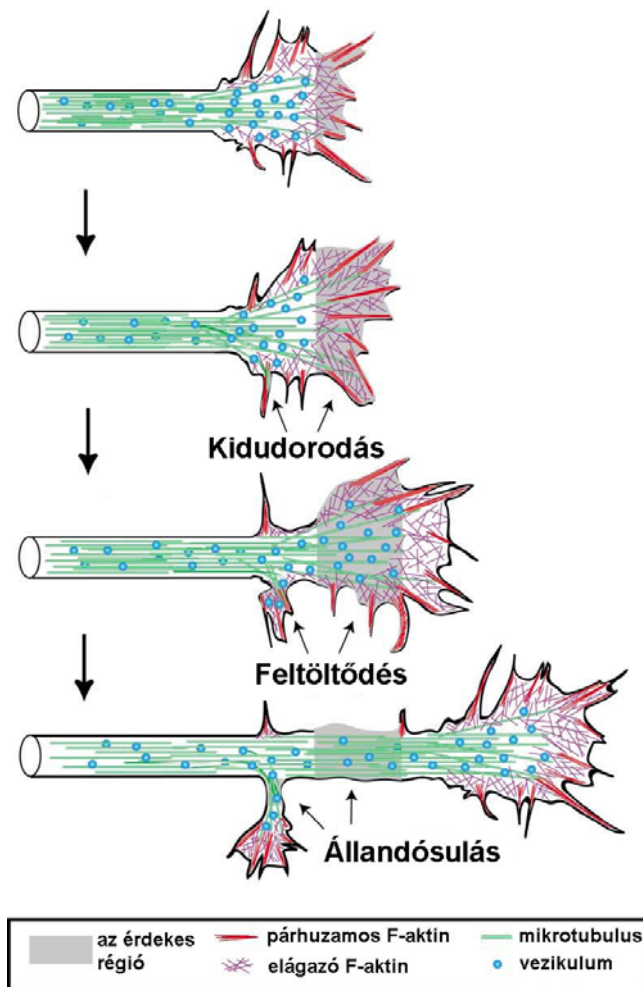
A növekedési kúp az axonok disztális (a sejttesttől távol eső) végén található, alakját tekintve igen dinamikus változó legyező-szerű képlet, melynek funkciója a környezetből érkező jelek érzékelése, és ennek megfelelően a helyes idegi projekció biztosítása. Az axon növekedési kúpja három fő régióra tagolható, egyrészt a központi citoplazmikus állományra, mely organellekben gazdag, egy átmeneti régióra és a perifériás részre, ahol lamellipódiumok és filopódiumok találhatóak (2. ábra) (Luo, L., 2002). Az axonok növekedése során az ujszerű (filopodiumok) és lemezszerű membránkitüremkedések (lamellipodiumok), illetve az ezeken elhelyezkedő receptorok játsszák a fő szerepet a jelemolekulák érzékelésében. Attól függően, hogy vonzó vagy taszító jellegű faktorral érintkeznek, változik a növekedési kúp aktuális alakja és növekszik az axon egy meghatározott irányba. A növekedési kúp másik fontos része a kevésbé dinamikus változó centrális régió. Az átmeneti zóna az aktin-gazdag perifériás és a mikrotubulus-gazdag centrális régió között húzódó keskeny zóna. Ezen a területen zajlik az aktin depolimerizációja, itt találhatóak meg legnagyobb mennyiségben az aktin depolimerizáló faktorok, mint például a Cofilin és a Gelsolin.



2. ábra A növekedési kúp régiói. A növekedési kúpon belül megkülönböztetünk egy aktin-gazdag perifériális régiót (PD), egy mikrotubulus-gazdag centrális régiót (CD) és a kettő között húzódó átmeneti zónát (TZ).

A nyúlvány növekedése során a növekedési kúp egy szabályos érési folyamaton megy keresztül, amely többszörösen ismétlődik, egészen addig míg az axon teljesen ki nem alakul. Ezt a folyamatot három szakaszra lehet osztani, mégpedig a kidudorodás (protusion), a feltöltődés (engorgement) és az állandósulás (consolidation) szakaszaira (Dent és Gertler 2003; Goldberg és Burmeister, 1986). A kidudorodás szakasza alatt a növekedési kúp membránja kitüremkedik, megjelennek új filopódiumok és lamellipódiumok, amiben fontos szerepet játszik a növekedési kúp aktin sejtvezének átalakulása az aktin filamentumok polimerizációja által (Letourneau, 1983; Okabe és Hirokawa, 1991). Ha a filopódium egy olyan jelet érzékel, mely számára taszító, akkor a növekedési kúpban a jeltől távoli helyen kezdődik az aktin polimerizáció, míg a taszító jel oldalán a filopódiumok és lamellipódiumok leépülnek (Bentley és O'Connor, 1994; Dent és Gertler, 2003; Lin és mtsi, 1993). A következő fázis a feltöltődés (engorgement), melynek folyamán a kidudorodott részek a Brown-mozgás és a mikrotubulus alapú transzport folyamatok következtében feltöltődnek vezikulumokkal és sejtoranellumokkal. Végül az utolsó fázis, az állandósulás

(consolidation) során a növekedési kúp proximális része hengeres alakot vesz fel, az organelum transzport kétirányúvá válik, és kialakul egy új disztális rész az axonon (Dent és Gertler, 2003) (3. ábra). Ezeknek a lépéseknek a ciklikus ismétlődése addig tart, míg a nyúlvány el nem éri a célsejtet, ahol végül szinapszist képez, és terminálódik.



3. ábra Az axonnövekedés fázisai

Ez a folyamat három ismétlődő szakaszból áll, a kidudorodás, a feltöltődés és az állandósulás szakaszaiból, ezt a három fázist szemlélteti az ábra. A kidudorodás során a növekedési kúp membránja kitüremkedik, új filopódiumok és lamellipódiumok képződnek. A feltöltődés során a kidudorodott részek feltöltődnek vezikulumokkal és sejtorganelumokkal. Végül az állandósulás során a növekedési kúp proximális része hengeres alakot vesz fel, miközben kialakul egy új disztális terület az axonon.

Eredeti ábra: Dent és Gertler, 2003

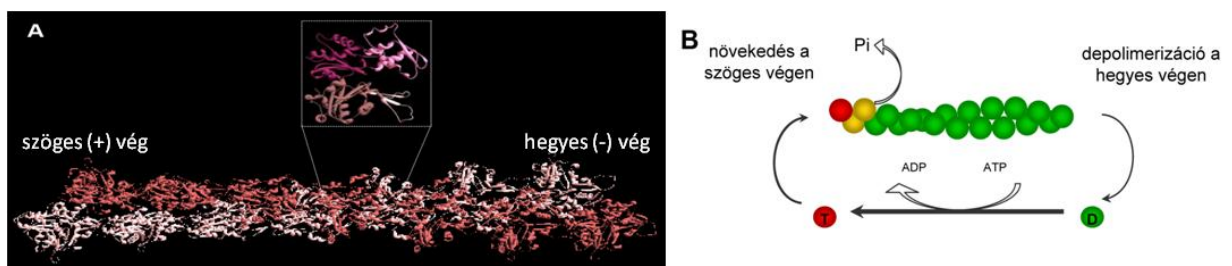
A sejtvez felépítése és dinamikája a növekedési kúpon belül

A növekvő axonvég jellegzetes sejtvez elemekkel rendelkezik, amelyek a sejtvez két fő alkotóeleméből, mikrotubulusokból és aktin filamentumokból állnak. A perifériás részen a membránnal szoros kapcsolatban egy aktin kéreg figyelhető meg, míg központi része mikrotubulusokban gazdag. Az aktin és a tubulin monomerek a sejttestben szintetizálódnak, és transzport útján jutnak az axon végződésbe. A növekedési kúpon található sejtvez elemek dinamikus változó polimerek, melyek polimerizációs és depolimerizációs sebessége állandóan változik, alkalmazkodva a környezeti jelekhez. A fonalas szerkezetű aktin a filopódiumokban kötegekbe rendeződik, míg a lamellipodiumokban laza, sugaras hálózatot alkot. A központi állomány lényegesen kevesebb aktint tartalmaz. Ezzel szemben, a mikrotubulusok az axonokban párhuzamos kötegekbe rendeződnek, és a növekedési kúp területén elsősorban a központi állományba koncentrálnak, bár a mikrotubulusok disztális végei belenyúlhatnak a lamellipódiumokba és néha a filopódiumokba is.

A mikrotubulusok egyik általános szerepe a nyúlványok stabilitásának biztosítása, emellett mintegy „pálya”-ként is funkcionálnak, melyek mentén a szállító fehérjék, a dinein és kinezin által a sejtalkotók szállítódnak a növekedési kúp, majd később a szinapszis felé (Hirokawa és Takemura, 2004). A mikrotubulusok polaritással rendelkező makromolekulák, új monomerek szterikus okok miatt csak az egyik végükön tudnak beépülni a láncba, így polimerizáció kizárólag ezen a pozitív végen folyik. Ezzel szemben depolimerizáció csak az ellentétes, negatív végen következik be. Növekvő axonokban a mikrotubulusok pozitív vége mindig a disztális irányba esik. A tubulin monomerek beépülését a mikrotubulusokba, ill. onnan való felszabadulásukat, számos tényező befolyásolja. Ilyen szabályozó faktor pl. az oldott Ca^{2+} ionok mennyisége és a mikrotubulusokhoz kötődő fehérjék (MAP-ok) aktivitása. Ezeknek a szabályozó elemeknek a működése még csak részben ismert (Matus, 1991; Cassimeris és Spittle, 2001; Bixby, J.L. és Spitzer, N.C., 1984; Kater, S.B., és mtsi., 1988;

Gu,X. és Spitzer, N.C. 1995; Takei, K., és mtsi., 1998; Gomez,T.M., Spitzer, N.C.,1999; Zheng, J.Q., 2000; Gomez,T.M. és mtsi., 2001), az azonban bizonyos, hogy a mikrotubulusok az axonnövekedés elengedhetetlen elemei közé tartoznak, hiszen a tubulusok polimerizációját gátló szerek az axonnövekedést is meggátolják (Yamada és mtsi.,1970; Yamada és mtsi.,1971).

A növekedési kúp másik fontos sejtváza alkotói az aktin filamentumok (F-aktin), melyek globuláris aktin monomerekből (G-aktin) felépülő polimerek. A 6-7 nm átmérőjű filamentumok önmagukban nem rendelkeznek megfelelő szilárdító funkcióval, ám kötegekbe rendeződve, illetve hálózatot alkotva kellő támasztó erőt biztosítanak. Az aktin filamentumok kettős helikális struktúrák, bennük két parallel lefutású G-aktinból álló lánc tekeredik egymásra oly módon, hogy a monomerek egymáshoz képest fej-farok orientációban helyezkednek el (4. ábra).



4. 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 depolimerizáció helye, a leváló ADP-aktin monomerek pedig újra ATP-aktinná alakulhatnak.

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

monomereknek ATP-áz aktivitást mutatnak, amely 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 (Carlier, 1990). 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 végén jelentősen eltérő. Az ún. szöges (+) végén, ahol elsősorban ATP-aktint találunk kb. 10-szer gyorsabb a beépülés sebessége, mint az ún. hegyes (-) végén, amire az ADP-aktin jelenléte a jellemző (Pollard et al., 2000). Ez a különbség *in vivo* körülmények között az aktin monomer kötő fehérjéknek köszönhetően nagyságrendekkel nagyobb lehet, ezért növekedés gyakorlatilag csak a szöges végén történhet, míg a hegyes vég a depolimerizáció helye (4. ábra). A filopódiumokon belül az aktin filamentumok pozitív, növekvő vége a filopódium csúcsa felé néz.

Régóta ismert, hogy az aktin monomerek spontán módon is képesek filamentumokba 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 szerepűek az aktin kötő fehérjék. 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. Aktivitásuk alapján megkülönböztetjük a polimerizációt gátló, a polimerizációt elősegítő, a depolimerizációt elősegítő, a fragmentációt elősegítő, a filamentumot stabilizáló, a filamentumokat keresztkötő gél és kötegformáló fehérjéket, a motorfehérjéket és az új filamentumok képződését elősegítő,

ún. aktin összeszerelő faktorokat. Tekintve, hogy az axonális növekedés folyamata dinamikus aktin sejtváz átrendeződéseken alapul, előre látható volt, hogy az aktin kötő fehérjék fontos szerepet játszanak az idegsejt nyúlványok kialakulásában.

Az axonális növekedés molekuláris mechanizmusa

Az utóbbi években számos, az axonális növekedésben szerepet játszó fehérjét azonosítottak (Goodman 1996; Tessier-Lavigne és Goodman 1996). Ezeknek a vizsgálatoknak a fókuszában hosszú ideig a navigációs jelek álltak, így számos vonzó és taszító jelet, illetve hozzájuk kapcsolódó jelátviteli utat azonosítottak, így pl. az Ephrin, Slit, Robo, Netrin, Sema receptorokhoz köthető navigációs rendszereket (Dickson, B., 2002). Természetesen ezek a vizsgálatok óriási mértékben növelték az axonnövekedés mechanizmusáról szerzett ismereteinket, dolgozatom központi témája azonban egy aktin sejtváz szabályozó fehérje jellemzése lesz, így az alábbiakban főként azokat az ismereteket fogom összefoglalni, amelyek az axonnövekedésben szerepet játszó aktin sejtváz szabályozó fehérjék szerepével kapcsolatosak. Meglepő módon, annak ellenére, hogy az aktin sejtváz axonnövekedésben játszott esszenciális szerepe régóta ismert, viszonylag kevés olyan fehérjét azonosítottak, amelyek közvetlen szerepet játszanak a növekedési kúp aktin dinamikájának szabályozásában. Közéjük tartozik a G-aktin kötő Profilin, az elongációs faktorként működő Ena/VASP fehérje, a depolimerizáló faktor Cofilin és a Rho családba tartozó kis mólsúlyú GTPázok.

Tekintve, hogy az élő sejtekben a szabad G-aktin koncentráció rendkívül alacsony, az aktin sejtváz dinamikus átrendeződésében rendkívül fontos szerepet játszanak az aktin monomer kötő fehérjék, mint például a Profilin, a Thymosin β -4 és a Twinfilin. Ezek a fehérjék biztosítják ugyanis - direkt vagy indirekt módon - a polimerizáció kompetens, tehát a növekvő aktin filamentumokba beépülni képes aktin monomereket. Közülük a *Drosophila*

Profilint a *chickadee* (*chic*) gén kódolja, amit a neuron nyúlványnövekedés pozitív regulátoraként írtak le. A *chic* gén funkcióvesztéses mutánsaiból származó embrionális hasi idegköteg kultúrák vizsgálata során úgy találták, hogy sérül a motoros idegek regenerációja, illetve növekedése (Wills, Marr és mtsai, 1999).

Az Ena/Mena/VASP fehérjék többféle aktivitással rendelkeznek, egyrészt képesek antagonizálni a filamentumok (+) végéhez kötődő - és ezáltal az aktin filamentum növekedését gátló - „sapkázó” (capping) fehérjék hatását, emellett képesek az aktin láncok kötegekbe rendezését és polimerizációját elősegíteni (Bachmann és mtsai, 1999). *Drosophilában* végzett vizsgálatok alapján az Ena-nak szerepe van a növekedési kúpok filopódiumainak kialakításában (Gertler és mtsai., 1995). Hiányában a hasi idegkötegben megjelenő szakadások és projekciós hibák figyelhetők meg (Wills et al., 1999). Ezen kívül egér sejteken is belátták, hogy szerepe van a filopódiumok kialakításában *in vitro* kísérleti rendszerben, ahol a mindhárom emlős Ena génre (ENA/VASP/MENA) mutáns neuronokban nem képződtek filopódiumok (Kwiatkowski és mtsai., 2007).

Érdekes megfigyelés volt, hogy az aktin polimerizáció fokozódása mellett a depolimerizáció is esszenciális folyamat a nyúlványnövekedés szempontjából, mert az aktin filamentumok lebomlásában fontos szerepet játszó AC (ADF/Cofilin) fehérjék hiányában az axonnövekedés gátlódik (Fass, J., és mtsi., 2004). Ez tehát azt jelenti, hogy az aktin sejtvezeték dinamikus változása kulcsfontosságú a nyúlványnövekedés és a célsejtek megtalálása szempontjából. Ezt a dinamikát szabályozzák a Rho családba tartozó kis mólsúlyú GTPázok is, így a RhoA, a Cdc42 és a Rac alcsaládok tagjai. Ismert, hogy ezek a fehérjék szükségesek a növekedési kúp kialakulásához, a nyúlványnövekedéshez és a megfelelő navigáláshoz is (Ng és Luo, 2004). A Rac kisGTPázok és a Cdc42 az axonnövekedés pozitív regulátorai, míg a RhoA-t a nyúlványnövekedés negatív regulátoraként írták le, illetve azt találták, hogy fontos szerepet játszik a neuroblasztok osztódásában a *Drosophila* agy egyik legjobban

tanulmányozott struktúrájában, a gombatestben (Lee és mtsai, 2000). A *Drosophila* genom három *Rac* gént kódol, ezek a *Rac1*, a *Rac2* és az *Mtl* gének. A *Rac* gének szerepe az embrionális központi idegrendszerben redundáns a nyúlványnövekedés szabályozásában, mivel úgy találták, hogy a hasi idegkötegben megjelenő nyúlványnövekedési hibák erőssége függ a hiányzó *Rac* gének dózisától. A *Rac1* és *Rac2* egyes mutánsokban csak néhány százalékban figyelhetünk meg átkereszteződési hibákat a hasi idegköteg területén, míg az *Mtl*Δ homozigóta állatok központi idegrendszerének 30%-ára jellemző ez a projekciós hiba. A *Rac1*, *Mtl* kettős mutánsokban ez az érték 75%-ra, míg a *Rac2*, *Mtl* mutánsokban 42%-ra nőtt. Ha mindhárom *Rac* típusú kis GTPáz hiányzott az embrióból, akkor az erős nyúlványnövekedési defektusok következtében a nyúlványmintázat nagymértékben sérült (Hakeda-Suzuki és mtsai., 2002). A Cdc42-vel kapcsolatban is kimutatták, hogy szükséges a filopódiumok kialakításához egér fibroblaszt sejtekben (Nobes és Hall, 1995). Ezzel szemben azonban úgy találták, hogy a *Drosophila* embrionális központi idegrendszerben nem esszenciális a nyúlványok projekciójához, hiányában csak elhanyagolható százalékban jelennek meg szakadások a hasi idegköteg hosszanti lefutású nyúlványaiban (Genova és mtsai., 2000), ezért a Cdc42 szerepe az axonnövekedésben egyelőre ellentmondásosnak látszik.

Az aktin nukleációban szerepet játszó fehérjék

A növekedési kúp előrehaladására vonatkozó ismeretek alapján nyilvánvalónak látszik, hogy az axonnövekedéshez új aktin filamentumok képződésére is szükség van, ezért a következőkben azokra az aktin összeszerelő faktorokra vonatkozó ismereteket foglalom össze, melyek kulcsfontosságú szerepet játszanak az aktin filamentumok növekedésében.

Az aktin az eukarióta sejtekben a legnagyobb mennyiségben jelen levő fehérje, amely képes spontán polimerizálódni. *In vivo* körülmények között azonban a spontán aktin

polimerizáció gátolt, ami minden bizonnyal az anarchikus filamentum képződés elkerülése miatt van így. A spontán polimerizáció helyett az evolúció során olyan fehérjék alakultak ki, amelyek elősegítik („katalizálják”) az új filamentumok képződését és egyben biztosítják az aktin összeszerelődés térbeli és időbeli szabályozását. Ezeket a fehérjéket aktin nukleáló faktoroknak nevezzük, és szerepük elengedhetetlen az új filamentumok kialakításához. Az első nukleáló faktor, melyet sikerült kitisztítani, az Arp2/3 komplex volt (Machesky és mtsai, 1994). Ez a komplex az elágazó aktin filamentumok kialakítását katalizálja, de a nem elágazó, hosszanti lefutású filamentumok nukleálásában nem játszik szerepet (Welch és mtsai, 1997a,b). Az aktin nukleáló faktorok következő csoportjába a formin fehérjék tartoznak, amelyek nemcsak elősegítik az aktin nukleációt, hanem a filamentum szöges (+) végéhez kapcsolódva az aktin monomerek beépítésén keresztül az aktin filamentum növekedésében is szerepet játszanak (Goode és Eck, 2007; Higgs, 2005; Pollard, 2007; Pruyne és mtsai., 2002; Zigmond és mtsai., 2003). A legintenzívebben tanulmányozott Arp2/3 komplex és a forminok mellett az elmúlt években néhány egyéb nukleáló faktort is azonosítottak eukariótákban, úgy mint a Spire (Quinlan és mtsai., 2005), a Cobl (Cordon-bleu) (Ahuja és mtsai., 2007) és a Lmod (Leiomodin) (Chereau és mtsai., 2008). Ezeknek a nukleáló faktoroknak közös jellemzője, hogy a forminokhoz hasonlóan szintén a nem elágazó aktin filamentumok kialakításában vesznek részt, és hogy WASP-Homológia 2 (WH2) doméneket tartalmaznak, melyek képesek az aktin monomerek kötésére. Ezek a domének igen rövid, 17-27 aminosavból álló, kevésbé homológ régiók, ami néha megnehezíti az egyszerű szekvencia analízissel való azonosításukat (Dominguez, 2007). A WH2 domének gyakran tandem ismétlődésekként jelennek meg, ilyen aktin-kötő szakaszokat tartalmaznak a Spire (Quinlan és mtsai., 2005) és a Cordon-bleu (Ahuja és mtsai., 2007) fehérjék. A Leiomodin szintén több aktin kötő domént tartalmaz, ezek közül azonban csak az egyik WH2 típusú domén (Chereau és mtsai., 2008). A teljesség kedvéért hozzá kell tennünk, hogy a WH2 domén jelenléte egy

fehérjén belül korántsem jelenti azt, hogy ez a fehérje képes az aktin nukleálására, amint azt a *Drosophila* Ciboulot fehérje esete is jól példázza (Hertzog és mtsai, 2004).

Az Arp2/3 komplex működése

Az Arp2/3 komplexet hét protein építi fel, melyek közül kettő (az Arp2 és az Arp3) aktin-szerű fehérje. Nevük is ebből ered (Arp: actin-related protein). Ez a komplex önmagában nem képes aktin monomerekből egy új aktin filamentumot létrehozni, hanem egy már meglévő filamentum oldalához kapcsolódik, és ezzel a filamentummal 70°-os szöget bezárva indul meg az új aktinlánc kialakulása (Mullins és mtsai, 1998). Az Arp2/3 komplex működése során egy elágazó szerkezetű aktin-hálót hoz létre a sejtekben, mely a lamellipódiumok alapját képezi. Önmagában ez a komplex igen alacsony nukleációs aktivitással rendelkezik (Mullins és mtsai, 1998), így működéséhez aktivátor fehérjékre van szükség. Az alacsony aktivitás a komplex térszerkezetének a következménye, mivel aktivátorok nélkül olyan konformációjú, amely lehetetlenné teszi az aktin nukleálást. Az Arp2/3 komplex aktivátorai tartalmazznak egy CA régiót, mely egy bázikus (kapcsoló régió /Connector region/), és egy savas (savas régió /Acidic region) aminosavakból álló területre osztható. Az aktivátorok ezen a régión keresztül kötődnek a komplexhez (Hüfner és mtsai., 2001; Machesky és Insall, 1998). A kapcsolódás hatására a komplex térszerkezete megváltozik, így képes kötődni egy már meglévő aktin filamentumhoz, emellett a két Arp alegység is olyan viszonyba kerül, mely már jól imitálja egy aktin dimer konformációját. A CA régió önmagában azonban nem elég a nukleáló komplex aktiválására, emellett szükség van arra, hogy egy G-aktin monomer az Arp2/3 közelébe kerüljön. Ebből kifolyólag a komplex aktivátorai rendelkeznek egy vagy több aktin kötésre képes doménnel, ami legtöbb esetben egy WH2 domén. Ez a domén az Arp2 és Arp3 fehérjék közelébe szállítja az aktin monomert, aminek a bekötődésével létrejön egy trimer. Ez a trimer már megfelelő nukleációs magként szolgál az új aktin filamentum létrejöttéhez. Az

Arp2/3 komplex ismert aktivátorai közé tartoznak a WASP (Wiscott-Aldrich Syndrome Protein), az N-VASP, a Scar/WAVE és a Cortactin fehérjék.

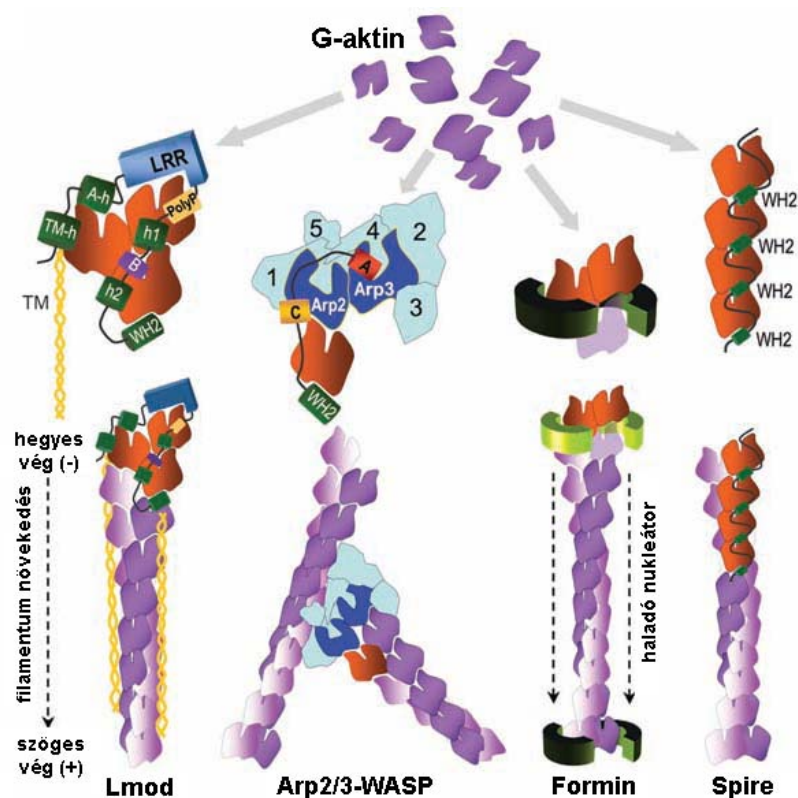
WH2 domén tartalmú aktin nukleátorok

Ebbe csoportba tartozik a Spire, a Cordon-bleu és a Leiomodin. Ezek közül a legkorábban a Spire-t azonosították, mint a *Drosophila* petesejt polaritásának kialakításáért felelős faktort. Ez a fehérje tartalmazza a legtöbb, szám szerint négy WH2 domént, amelyek közül már három jelenléte is elégséges az aktin nukleáláshoz, bár a négy domén együttesen nagyobb sebességet biztosít a nukleálás során. A feltételezések szerint a Spire úgy vesz részt az aktin nukleálásában, hogy a négy WH2 doménje aktin monomereket köt, melyek az aktin filamentum helikális szerkezetét utánzó nukleációs magot képeznek. A fehérje tartalmaz egy KIND domént is, mely képes a forminok (Cappuccino/Formin1) FH2 doménjéhez kapcsolódni, és gátolni azok aktin nukleáló aktivitását (Bosch és mtsai, 2007; Quinlan és mtsai, 2007). Emellett a KIND domén szerepet játszik az aktin és a mikrotubulus sejtváza összekapcsolásában is (Rosales-Nieves és mtsai, 2006).

A következő aktin nukleáló faktor, amely szintén tandem ismétlődésként tartalmaz WH2 doméneket, a Cobl. Ez a fehérje kizárólag gerincesekben található meg, és ott a központi idegrendszerben fejeződik ki. Hiányában velőcső záródási rendellenességek jelennek meg (Carroll és mtsai, 2003). Az aktin monomerek kötésére képes WH2 domének a fehérje C-terminálisán helyezkednek el. Ezen a területen található néhány prolin gazdag régió is, melyek képesek lehetnek az aktin monomert szállító Profilin fehérje kötésére. A Cobl mindhárom WH2 doménjére szükség van a fehérje nukleáló aktivitásához, ezen kívül a második és harmadik WH2 domén közötti linker megfelelő hosszúsága is elengedhetetlen. A hipotetikus modell szerint a Cobl első két WH2 doménjéhez kapcsolódó aktin monomer egymás mellé kerül, majd a flexibilis linkerrel elválasztott harmadik WH2 domén olyan

konformációt vesz fel, hogy az általa kötött aktin monomer a dimerrel együtt képes egy nukleációs magot létre hozni (Ahuja és mtsai, 2007).

Az előző két aktin nukleáló faktortól legjobban különböző fehérje a Leiomodin, melyet nemrégiben azonosítottak, mint izom-specifikus aktin-összeszerelő faktort. Ez a fehérje is három aktin kötő régiót tartalmaz, azonban ezek közül csak az egyik WH2 típusú domén. Működéséről azt feltételezik, hogy hasonlóan a Cobl-hoz, a három aktin monomer-kötő doménjén keresztül hoz létre egy nukleációs magot (Chereau és mtsai., 2008).



5. ábra Az aktin nukleáló faktorok működési mechanizmusai. Az Lmod az aktin-kötő doménjei segítségével létrehoz egy 3 aktin monomerből álló nukleációs magot, majd a kialakuló aktin filamentum hegyes végéhez kötődve marad. Az Arp2 és Arp3 fehérjék létrehoznak egy aktin dimerre emlékeztető struktúrát, majd az Arp2/3 komplexhez bekötődött aktivátor (WASP) segítségével egy aktin monomer beépül az Arp2/3 dimerhez, és elkezdődik az aktin polimerizáció. A formin dimer létrehoz egy nukleációs magot, majd az aktin filamentum szöges végéhez kapcsolódva marad, és elősegíti a filament növekedését. A Spire fehérje a négy aktin kötő doménje segítségével hozza létre a négy aktin monomerből álló nukleációs magot, így segítve elő az aktin filamentum kialakulását. (Eredeti ábra: Chereau és mtsai., 2008)

Forminok

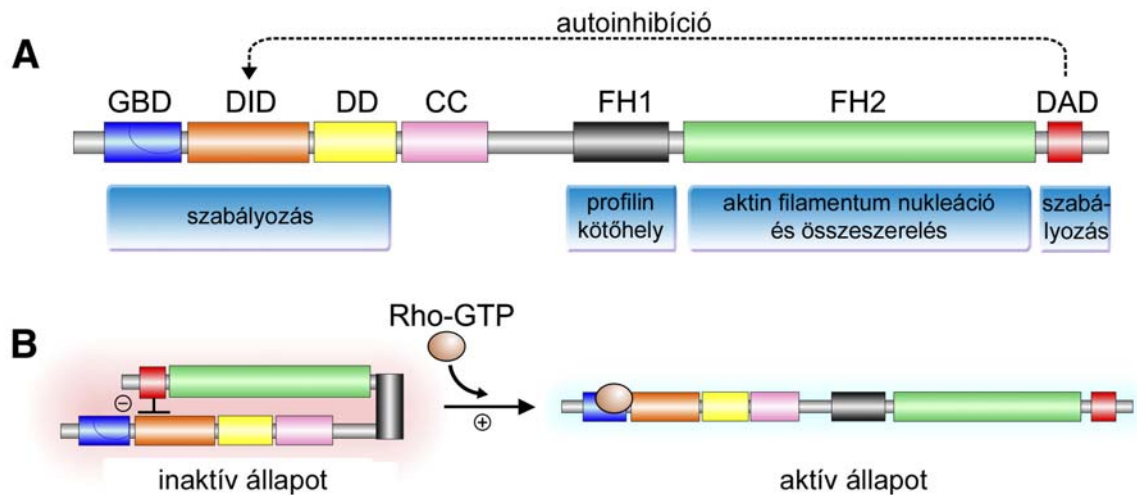
A formin fehérje család elsőként azonosított tagja az egér *Formin-1* gén volt. A *Formin-1* mutáns egerek végtag deformitási fenotípust mutattak, innen eredt a gén elnevezése. Későbbi vizsgálatok során azonban kimutatták, hogy a végtag fenotípust valójában nem a *Formin-1* gén mutációja okozza, hanem a szomszédos *gremlin* nevű gén hibás működésének a következménye. Ennek ellenére a formin elnevezés megmaradt, mivel ezek a fehérjék esszenciális szerepet játszanak a sejtek aktin-struktúrájának megformázásában.

A különböző fajok formin homológjainak vizsgálata során 3 konzervált régiót különítettek el, melyeknek a formin homológia (FH) domének nevet adták. Ezek a fehérjék általánosan fejeződnek ki különböző sejttypusokban és szövetekben, ez alapján több különböző sejt-komponens létrehozásában játszanak szerepet. Az Arp2/3 komplex-szel ellentétben a formin típusú fehérjék nem rendelkeznek aktin-szerű doménnel és a nem elágazó aktin filamentumok kialakulását segítik elő. Ilyen filamentumok találhatók például a filopódiumokban, a stressz-szálakban, az aktin gazdag sejt-adhéziókban és az osztódó sejtek citokinetikus aktin gyűrűiben.

Bioinformatikai vizsgálatok alapján az eukarióta sejtek több formin gént tartalmaznak. A *Saccharomyces cerevisiae*-ben 2, a *Schizosaccharomyces pombe*-ben 3, a *Drosophila melanogaster*-ben 6, a *Dictyostelium discoideum*-ban 10, míg az emlősökben 15 formin gén található. (Higgs és Peterson, 2005; Rivero és mtsai., 2005). Minden formin fehérje legjellemzőbb doménje az FH2 (formin homológia 2) domén, mely közvetlenül felelős az aktin összeszerelődéséért. Ez a domén funkcionálisan erősen konzervált, fehérje szekvenciája pedig alkalmasnak bizonyult a forminok összehasonlító filogenetikai analizisére. Ennek alapján elmondhatjuk, hogy az emlősök formin génjei 7 csoportba oszthatók. Ezek név szerint a Diaphanous forminok (mDia1, mDia2 és mDia3), a leukocitában azonosított formin-szerű fehérjék (formin-related proteins identified in leukocytes) (mFRL1, mFRL2, mFRL3), a

DAAM (Disheveled-associated activators of morphogenesis) fehérjék (mDAAM1 és mDAAM2), a Delphilin fehérje (mDelphilin), a fordított (inverted) forminok (INF1 és INF2), a formin homológia domént tartalmazó fehérjék (formin homology domain-containing proteins, FHOD) és az FMN (formin) fehérjék (Higgs and Peterson 2005).

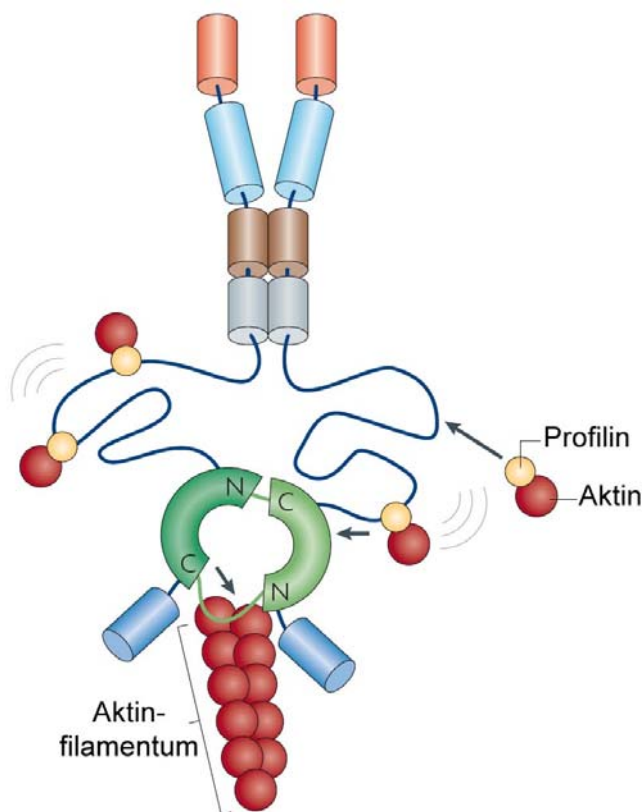
A legtöbb formin az FH2 doménon kívül más homológia doméneket is hordoz, melyek fontosak az aktin összeszerelődés szabályozásában, és a különböző együttműködő és aktiváló fehérjék kötésében. A legjobban tanulmányozott forminok a Diaphanous szerű forminok (DRFs), amelyek a Rho típusú GTPázok közvetlen effektoraiként is funkcionálhatnak. Ebbe a csoportba soroljuk a Dia, a DAAM és az FRL forminokat. A DRF fehérjéknek funkcionálisan két régióját különböztethetjük meg, az N- és a C-terminális régiót. Mindkét régió tartalmaz egy-egy, az autoinhibícióban szerepet játszó domént (diaphanous inhibíciós domén /DID/, ill. diaphanous autoinhibíciós domén /DAD/), melyek egymással összekapcsolódva kialakítják a DRF forminokra alapállapotban jellemző inaktív konformációt. Ezt a fizikai kapcsolatot egy aktivált kisGTP-áz bekötődése képes megszüntetni, így a formin aktív konformációba kerülhet (Alberts, 2001; Li és Higgs, 2005; Lammers és mtsai, 2005; Rose és mtsai, 2005). A DRF forminok C-terminálisán találjuk az aktin összeszerelődésért felelős régiót. Ezen a területen található a profilin-kötő FH1 domén, az aktin kötő FH2 domén, és a diaphanous autoregulációs domén (DAD). Az FH1 domén jelenléte minden forminra jellemző, és közvetlenül az FH2 domén mellett található N-terminális pozícióban. Az FH1 domén tartalmaz egy prolin gazdag régiót, amely képes a Profilin fehérje kötésére (Chang és mtsi., 1997; Evangelista és mtsi., 1997; Imamura és mtsi., 1997; Watanabe és mtsi., 1997), a Profilin viszont az ATP-kötött aktin monomereket köti, amelyek polimerizációra képes aktin formák. Az általánosan elfogadott elképzelések szerint az FH1 domén legfontosabb funkciója, hogy a Profilin-aktin kötésen keresztül aktin monomereket biztosít a nukleáló és polimerizáló lépésekhez.



6. ábra A Diaphanous szerű forminok doménszerkezete, és szabályozása. Az autoinhibíció a C-terminális DAD és az N-terminális DID domének kölcsönhatásával jön létre (A). Egy GTP-kötött Rho fehérje (Rho-GTP) GBD doménhez történő kapcsolódásával az autoinhibíciós kapcsolat megbomlik, a formin aktív állapotba kerül (B). Ezek után az FH2 domén új aktin filamentumok kialakítását indíthatja el új nukleációs magokat létrehozva, majd a polimerizáció során a gyorsan növekvő véggel asszociált marad. Az FH1 domén kölcsönhatása a Profilin fehérjével jelentősen gyorsíthatja az elongációt. 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; GBD, GTP-áz kötő domén.

A forminok aktin nukleációs és elongációs aktivitásában az FH2 domén játszik közvetlen szerepet. A forminok a többi nukleáló faktortól ellentétben a nukleáló lépés után az FH2 doménen keresztül az aktin filamentumok szöges végéhez kapcsolódva maradnak és ezáltal egyrészt megvédik a filamentum (+) végét a sapkázó fehérjék kötődésétől, másrészt további aktin monomerek beépülését segítik elő. Az FH2 doménről kimutatták, hogy *in vivo* körülmények között elősegíti az aktin összeszerelődést (Copeland és Treisman., 2002; Evangelista és mtsi., 2002; Pruyne és mtsi., 2002; Sagot és mtsi., 2002a; Sagot és mtsi., 2002b), *in vitro* pedig önmagában is képes az aktin nukleálását katalizálni (Pring és mtsi., 2003; Pruyne és mtsi., 2002; Sagot és mtsi., 2002b). Az FH2 domének csak homodimer formában aktívak, mivel a dimerizációt gátló mutációk megszüntetik az aktin összeszerelő aktivitást (Moseley, 2004). A kristályszerkezeti vizsgálatok alapján az FH2 domének

dimerizációjával egy gyűrű-szerű képlet jön létre. A működési modell szerint az FH2 dimer kezdetben két aktin monomert köt, mely a későbbiekben nukleációs magként szolgál. Zárt állapotban ez a kötődés olyan szoros, hogy lehetetlenné teszi további monomerek beépülését. Az FH2 dimer azonban képes nyitott állapotba kerülni azáltal, hogy a gyűrű felnyílik az egyik oldalon, így képes egy új aktin monomer beépülni. A monomer beépülése után azonban a gyűrű ismét zárt konformációt vesz fel. Ez a két állapot váltakozik az aktin polimerizáció folyamán, mely során a formin mintegy végig lépked a szöges végre beépülő G-aktin monomereken (7. ábra) (Otomo, Tomchick és mtsai, 2005). Ez a forminok aktin polimerizációjának egy általánosan elfogadott modellje, azonban a konformáció változás mechanizmusa egyelőre nem világos.



7. ábra A Diaphanous szerű forminok működési mechanizmusa. Az FH2 dimer az aktin-filamentum szöges végéhez kötődik, és a dimer két funkcionális fele váltakozva építi be az aktin monomereket a filamentum végére, mintegy végig lépkedve rajtuk. Az aktin polimerizációhoz szükséges monomereket a „kötél-szerű” FH1 domén biztosítja a Profilin-G-aktin megkötésével.

Eredeti ábra: (Chesarone és mtsai., 2010)

A DRF forminok funkcionálisan másik fontos része az N-terminális régió, amely jelentős szabályozó feladatokat lát el. Itt található a GTPáz kötő domén (GTPase binding domain - GBD), mely képes egy aktivált Rho típusú kisGTPáz kötésére, és a diaphanous

inhibíciós domén (DID), mely a C-terminálisan elhelyezkedő DAD doménnel kölcsönhatva létrehozza a fehérje inaktív formáját (6. ábra). Az N-terminális régióban található még a dimerizációs domén (DD) és a coiled-coil (CC) régió is, amelyek a fehérje N-terminális felének a dimerizációjában játszanak szerepet. Ennek a jelentősége egyelőre nem ismert, mint ahogy az sem teljesen világos, hogy pontosan melyik domének vesznek részt a forminok sejten belüli lokalizációjának a szabályozásában, az azonban bizonyos, hogy a szubcelluláris elhelyezkedés is elsősorban az N-terminális régió keresztül szabályozódik (Kato és mtsai., 2001).

Aktin nukleáció a központi idegrendszerben

A korábban ismertetett eredmények alapján egyértelműnek látszik, hogy az axonnövekedés új aktin filamentumok képződését is igényli, tehát minden bizonnyal aktin nukleáló faktorokra is szükség van. Mindeztidáig azonban ellentmondásos kép bontakozott ki arról, hogy mely nukleáló faktorok játszanak szerepet az axonnövekedés során. *Drosophila*-ban pl. az Arp2/3 komplex szerepet játszik az embrionális nyúlványnövekedésben (Zallen és mtsai., 2002), és bizonyos gerinces idegsejtekben is kimutatták a szerepét (Korobova és Svitkina, 2008; Mongiu és mtsai., 2007), de más adatok azt bizonyítják, hogy ez sem ecetmuslicában, sem gerincesekben nem érvényes minden idegsejtre (Ng és Luo, 2004; Strasser és mtsai., 2004). Ezen kívül az Arp2/3 komplex az elágazóláncú filamentumok képződéséért felelős, ilyen struktúrákat azonban a növekedés szempontjából esszenciális filopódiumokban egyáltalán nem találunk, sőt a legújabb eredmények alapján vándorló sejtek lamellipódiumaiban sem (Urban és mtsai., 2010). 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 (Arakawa és mtsai., 2003), ugyanakkor ismert, hogy az *mDia1* knock-out egér tökéletesen

életképes és nem mutat idegrendszer fejlődési hibákat (Eisenmann és mtsai., 2007; Peng és mtsai., 2007; Sakata és mtsai., 2007). Az *mDia2*-ről leírták, hogy képes menekíteni *Ena/Vasp* deficiens idegrendszeri sejtvonalban a filopodium képződés hibáit, azonban ez a gén nem fejeződik ki a fejlődő idegrendszerben a nyúlványnövekedés időszakában (Dent és mtsai., 2007). 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 (Kida és mtsai., 2004; Nakaya és mtsai., 2004), de funkcionális vizsgálatokat nem végeztek. Kutatócsoportunk néhány éve a *Drosophila DAAM* ortológ funkcionális jellemzésével kezdett el foglalkozni, és azt találtuk, hogy az egyetlen *Drosophila DAAM* ortológ is pán-neuronális kifejeződési mintát mutat, ezért kiváló jelöltnek tűnt az axonnövekedés szabályozására. Elhatároztuk tehát, hogy funkcióvesztéssel mutánsaink birtokában feltérképezzük, milyen szerepet játszik a *dDAAM* gén a központi idegrendszer fejlődésében. Eredményeink részletes bemutatása előtt azonban röviden összefoglalom a forminok *DAAM* alcsaládjára vonatkozó ismereteket.

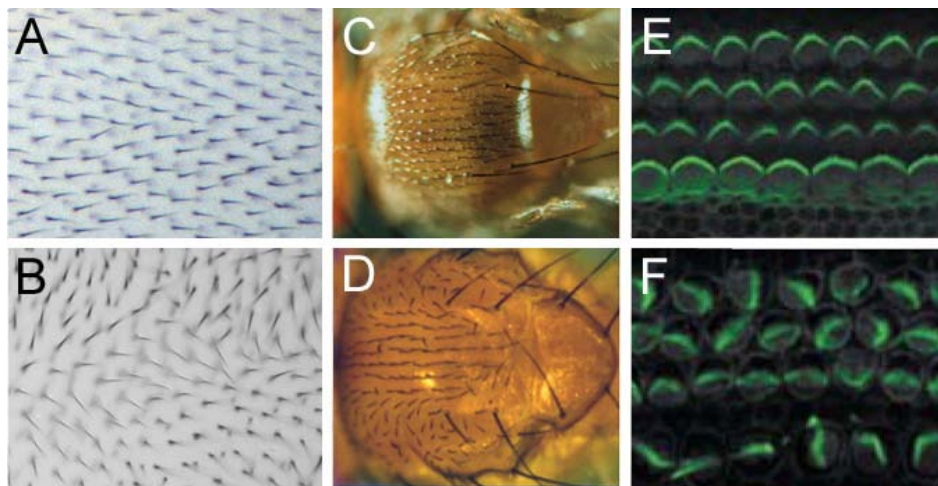
A DAAM és a nem kanonikus Wnt jelátviteli út kapcsolata

A *DAAM* alcsalád elsőként azonosított tagját 2001-ben írták le egy élesztő kéthibrid kísérlet során, mint a Dishevelled2 (*Dvl2*) fehérje PDZ doménjével kölcsönható partnert. Ezt a kapcsolatot koimmunoprecipitációs vizsgálatokkal is alátámasztották, mely során az egér *Dvl2* PDZ és DEP doménje is kölcsönhatott a teljes hosszúságú humán *Daam1*-el és a C-terminális régiójával (*C-Daam1*) is (Habas és mtsai 2001). A *Dvl2* PDZ és DEP doménjei fontos szerepet játszanak az ún. nem kanonikus Wnt (vagy Wnt/PCP) jelátviteli útvonalban. A *Daam* forminnak ebben a szignalizációban betöltött szerepét több vizsgálat igazolta (Kim és Han, 2007; Liu és mtsai, 2008; Sato és mtsai, 2006; Kida és mtsai, 2007), azonban

működésmódjáról eltérő vélemények jelentek meg az irodalomban. Habas és munkatársai a Daam-ot egy olyan jelátviteli fehérjeként írták le, mely a Rho kisGTPáz-t aktiválja, és ezáltal vesz részt a Wnt szignalizációban. Ez a hipotézis azonban ellentmond a DRF forminokra jellemző szabályozási modellnek, miszerint a DRF forminok aktiválódása egy kisGTPáz bekötődését igényli a fehérje N-terminálisán található GTP-áz kötő doménhez. Későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a hDaam1 Cos-7 sejtekben képes kötődni mind a RhoA-hoz, mind a Cdc42-höz, azonban itt nem tudtak kimutatni Daam-hoz köthető kisGTPáz aktivációt (Aspenstrom és mtsai, 2006). Más vizsgálatok alapján a hDaam1 csak a RhoA aktivált formáját képes kötni (Higashi és mtsai, 2008), ami szintén arra utal, hogy a kis GTPáz bekötődése szükséges a DAAM aktivációjához, nem pedig a DAAM aktiválja a RhoA-t. Ezek az eredmények ellentmondtak a Daam - Habas és mtsai által megfigyelt - kisGTPáz aktiváló hatásának, így funkciója nem tekinthető tisztázottnak. Ettől függetlenül az emlős DAAM fehérjék Wnt/PCP jelátviteli útvonalban betöltött fontos szerepe nem kérdőjeleződött meg, erre vonatkozóan több független kísérletes bizonyíték is van (Kim és Han, 2007; Liu és mtsai, 2008; Sato és mtsai, 2006; Kida és mtsai, 2007).

A funkcionális vizsgálatok mellett a *DAAM* ortológok expressziós mintázata is ismertté vált több gerinces fajban is. A *Xenopus*, csirke és egér modell rendszereken végzett vizsgálatok közös konklúziója, hogy a gerinces *DAAM* gének legfontosabb kifejeződési területe a fejlődő központi idegrendszer (Nakaya és mtsai, 2004; Kida és mtsai, 2004). Emellett egy nemrégiben megjelent cikk alapján a csirke Daam2 fontos szerepet játszik a gerincvelő fejlődése során. Meglepő módon ebben az esetben a Daam2 a kanonikus Wnt-jelátviteli útvonalon keresztül fejti ki hatását, azonban funkciója itt is a Dishevelled (Dsh) fehérjéhez köthető (Lee és Deneen, 2012), ami a kanonikus és nem kanonikus (Wnt/PCP) jelátviteli utak közös komponense (Boutros és Mlodzik, 1999).

Csoportunk is a Dsh-höz való kötődési képessége, és a nem kanonikus Wnt-szignalizációban leírt szerepe miatt kezdett érdeklődni a *Drosophila* DAAM ortológ iránt, mivel abban az időben a csoport fő kutatási iránya a PCP jelátvitel tanulmányozása volt. A PCP rövidítés az angol planar cell polarity kifejezésből származik, amit röviden szöveti polaritásnak is nevezünk. Ez a kifejezés arra a tényre utal, hogy a fejlődő szövetek gyakran polarizálódást mutatnak a szöveti síkban. Szemléletes példaként említhetjük erre a jelenségre a muslicák szárnyát, potrohát és notumát borító szőrök polarizált elhelyezkedését, vagy például az emlősök belső fülének érzékhámját, ahol az epitéliális szőrsejtek érzékelő nyúlványainak szigorúan rendezett, polarizált elrendeződése biztosítja a fül maximális hangérzékenységet (8. ábra) (Montcouquiol, 2007). Az elmúlt néhány évtized során bebizonyosodott, hogy ezeknek a polaritási mintáknak a kialakításában kitüntetett szereppel bír a Wnt/PCP jelátviteli rendszer.



8. ábra A PCP gének hiányában bekövetkező polaritási fenotípusok(B, D, F), a vad típushoz képest (A, C, E). *Drosophila* szárnyon (A és B) és notumon (C és D) megjelenő szőrorientációs hibák, illetve az egér belső fülének érzékhámját érintő PCP fenotípus.

A Wnt/PCP jelátviteli rendszer legfontosabb ismert elemei a Wnt típusú szekretálódó fehérjék, az ún. elsődleges (core) PCP fehérjék, amelyek közé tartozik a Wnt receptorként működő Frizzled (Fz), a Strabismus (Stbm), Flamingo (Fmi), Prickle (Pk), Diego (Dgo) és

Dsh fehérjék. A Dsh-től alsóbb szinten ismert elem a DAAM és a Rho GTPázok. A jelátviteli rendszer működésére vonatkozó elképzelések lényege, hogy az elsődleges PCP fehérjék egy részleteiben ismeretlen mechanizmus útján aszimmetrikusan dúsulnak fel a sejteken belül, ami polarizált Fz/Dsh jelátviteli aktiválódást eredményez. Ez az aktiválódás aztán a molekuláris effektornak tekinthető DAAM és Rho GTPáz fehérjéken keresztül sejten belüli morfológiai polarizálódást (pl. sejtvázas átrendeződést) vált ki, ami a sejtek összehangolt működése miatt a szöveti síkban megnyilvánuló polarizálódáshoz vezet.

Tekintve, hogy a szöveti polarizálódás megértése egy rendkívül érdekes sejtbiológiai probléma, a PCP gének fejlődésbiológiai szerepét hosszú ideig csak ebből a szempontból vizsgálták. Az elmúlt évek során azonban egyre több olyan publikáció jelent meg, ami azt jelezte, hogy Wnt/PCP jelátviteli rendszer nem kizárólag a szöveti polarizálódás szabályozásában vesz részt, hanem hozzájárul az idegrendszer fejlődéséhez is. Szerepe van a neuronális sejtosztódásokban (Gho és Schweisguth, 1998; Lake és Sokol, 2009), az axonok megnyúlása és visszahúzódása során (Kishida és mtsai., 2004; Okuda és mtsai., 2007; Shima és mtsai., 2007; Fujimura és mtsai., 2009), az axonok navigációja során (Wang és mtsai., 2002, 2006; Lyuksyutova és mtsai., 2003; Tissir és mtsai., 2005; Zhou és mtsai., 2008), a célsejt felismerése során (Lee és mtsai., 2003; Senti és mtsai., 2003; Chen és Clandinin, 2008) és a dendritikus növekedés során (Shima és mtsai., 2004, 2007). Ezekkel az eredményekkel összhangban *Drosophila*-ban is kimutatták, hogy a Fmi szerepet játszik a nyúlvány-növekedésben és navigációban (Gao és mtsai., 2000; Lee és mtsai., 2003; Senti és mtsai., 2003; Steinell és Whittington, 2009). Két egészen friss publikáció alapján pedig bebizonyosodott, hogy a Dgo kivételével az összes core PCP fehérje szerepet játszik a *Drosophila* agy gombatestét felépítő interneuronok projekciójában (Shimizu és mtsai., 2011; Ng, 2012). Ezek alapján a Wnt5 a meghatározó szignál a gombatest axonok projekciója során, amely az agy bizonyos területein felhalmozódva segíti a nyúlványok navigálódását. A Wnt5

képes a Fz receptorhoz kapcsolódni, ami a PCP jelátvitel aktiválódása útján citoszkeletális átrendeződéseket eredményezhet. Ennek a pontos mechanizmusa azonban egyelőre nem világos, mivel az idegrendszer területén a PCP fehérjék működéséről nagyon keveset tudunk, így például arra a rendkívül izgalmas kérdésre sem ismerjük a választ, hogy képesek-e aszimmetrikus fehérje eloszlás útján polarizált szubcelluláris komplexet formálni.

CÉLKITŰZÉSEK

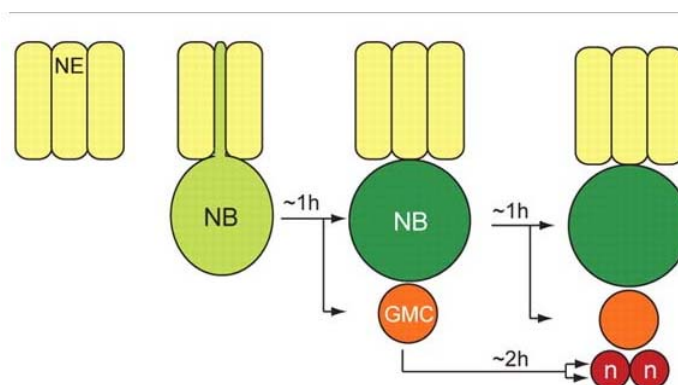
PhD munkám kezdete előtt csoportunk egyik érdeklődési területe a szöveti polarizáció vizsgálata volt. Munkatársaim ezzel kapcsolatosan kezdték el a *Drosophila* DAAM ortológ tanulmányozását, mert az emlős DAAM fehérjét a PCP jelátviteli út elemeiként írták le, ezért kíváncsiak voltak arra, hogy evolúciósan konzervált-e ez a funkció, és ha igen, milyen sejtes mechanizmusok köthetők a dDAAM működéséhez muslicákban. A funkcióvesztéses *dDAAM* mutánsok tanulmányozása azonban azt mutatta, hogy a DAAM fehérje *Drosophilában* nem vesz részt a szöveti polarizáció kialakításában, vagy szerepe teljes mértékben redundáns a vizsgált rendszerben. A továbbiakban azonban ennek ellenére is érdekesnek tűnt a fehérje szerepének megismerése, két fő okból. Egyrészt mert többsejtű organizmusokban a DAAM ortológok *in vivo* szerepét klasszikus genetikai analízissel még nem vizsgálták, másrészt pedig észrevettük, hogy a *dDAAM* erősen kifejeződik a fejlődő központi idegrendszerben, ahol vizsgálataink megkezdése előtt még ismeretlen volt, hogy melyik aktin összeszerelő faktor segíti elő az axonok növekedését, ami az idegrendszer differenciálódásának az egyik legfontosabb lépése. Ezért elsődleges célkitűzésünk az volt, hogy a *Drosophila* DAAM neuronális funkcióját *in vivo* rendszerben genetikai módszerek segítségével próbáljuk meghatározni. Ez azért is érdekesnek ígérkezett, mivel a gerinces homológok expressziója szintén megfigyelhető az idegi területeken (Nakaya és mtsai.2004; Kida és mtsai. 2004), így ott a DAAM alcsalád funkciója feltehetően konzervált lehet. Mivel kezdetben csak az embrionális kifejeződési mintát ismertük, eleinte az embrionális központi idegrendszer vizsgálatára koncentráltunk. Miután bebizonyítottuk, hogy embriókban a *dDAAM* az axonnövekedés kulcsfaktora, több párhuzamos kísérleti megközelítést is elindítottunk a fehérje működésének jobb megértése érdekében. Ezek közé tartozott annak vizsgálata, hogy mennyire általános a *dDAAM* szerepe az egyedfejlődés során, van-e

funkciója a lárvális és az adult idegrendszerben is. Azt is meg akartuk továbbá tudni, milyen fehérjékkel működik együtt a dDAAM az idegsejt nyúlványok növekedése során. Végezetül, mivel néhány nemrégiben megjelent új eredmény alapján a korábban csak a PCP szabályozásához kötött génekről kiderült, hogy szerepet játszanak az axonok navigálásában is, kíváncsiak lettünk arra, hogy részt vesznek-e a PCP gének a dDAAM szabályozásában az idegrendszer fejlődése során.

EREDMÉNYEK

A *Drosophila* embrionális központi idegrendszer szerkezete és fejlődése

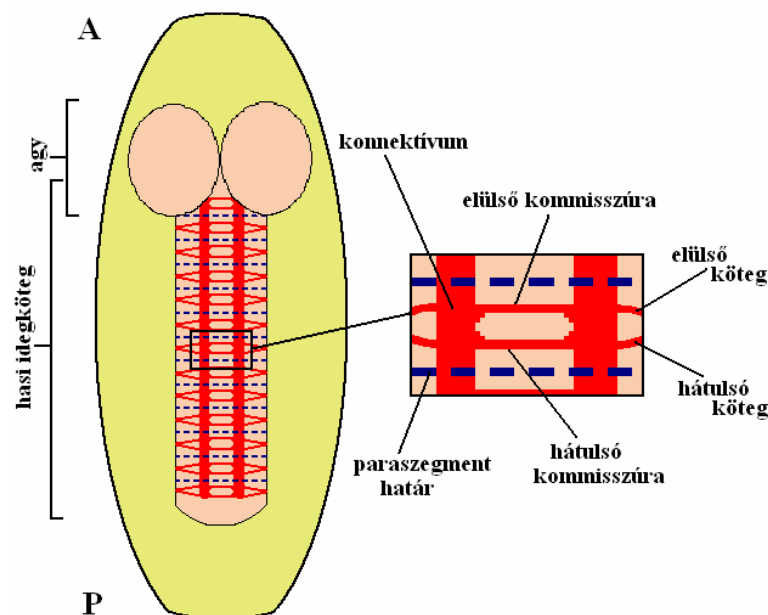
A muslicák embrionális idegrendszere a neuroektodermából alakul ki, olyan ektodermális sejtekből, melyeknek megvan a képességük arra, hogy idegsejteket és epidermiszt alakítsanak ki. A ventrális neurogén régió hozza létre a hasi idegköteg neuroblasztjait, mely a központi idegrendszer részeként a szegmentált csírasávhoz tartozik. Az agyi struktúra kialakításáért a procephalikus vagy feji neurogén régió a felelős. Az ektoderma neurogén régiója nemcsak neuroblasztokat, hanem epidermális prekursorokat is tartalmaz, melyek a későbbiekben a ventrális epidermiszt, és a fej epidermiszt alakítják ki. A hasi neurogén régió tekintetében a delaminációban hemisegmentenként 30 sejt vesz részt (neuroblasztok), a többi sejt a hasi epidermiszt alakítja ki. A neuroblasztok ős sejtként osztódva kb. öt osztódási cikluson mennek keresztül, létrehozva a ganglion anyasejteket. Minden ganglion anyasejt keresztülmegy egy ekvális osztódáson, melynek eredményeképpen 2 neuron jön létre, kialakítva ezzel a hemisegmentenkénti kb. 200 embrionális neuront (10. ábra).



10. ábra Neurogenesis a *Drosophila* embrióban. A neuroektoderma sejtek (NE, sárga) delaminációjával létrejönnek a neuroblasztok (NB, zöld). Minden NB ős sejt módjára osztódva ganglion anyasejteket (GMC/ganglion mother cells/, narancssárga) hoz létre, melyek osztódásával jönnek létre az idegsejtek (n, piros).

Az idegsejtek terminális differenciálódása az embriogenezis 13. stádiumában kezdődik. Neuronok egy csoportjában kialakulnak az első nyúlványok a központi idegrendszer felszínén. Később ezen pionír pályák mentén fognak futni a később differenciálódó neuronok axonjai. Ezek a nyúlványok rendkívül jellegzetes, létra alakú kötegekbe rendeződnek, melyek a szegmenteket összekötő hosszanti kötegekből, ill. az embrionális idegrendszer két oldalán kialakuló hosszanti kötegeket összekötő keresztkötegekből (kommisszúrákból) állnak (11. ábra). A keresztkötegek száma szegmentenként kettő, és mind a keresztkötegek, mind a hosszanti kötegek tartalmazzák interneuronok és motoneuronok nyúlványait is. A központi idegrendszer területéről kilépő motoneuron axonok minden szegmenten belül egy elülső (interszegmentális ideg) és egy hátulsó pálya (szegmentális ideg) mentén hagyják el a hasi idegkötegeket. A perifériáról a központba tartó érzőidegek szintén az imént említett pályák mentén haladnak.

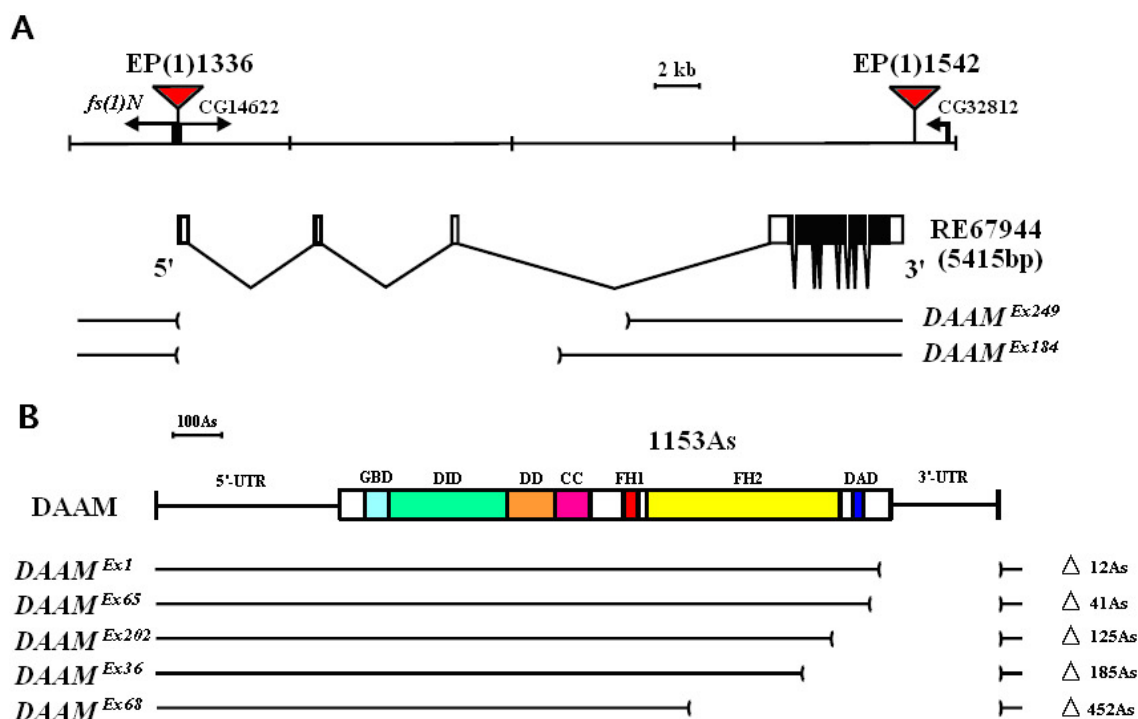
Az embriogenezis utolsó stádiumai során a hasi idegkötegek megrövidülnek és kondenzálódnak, így az embrionális fejlődés végén a központi idegrendszer egy agyi és egy az embrió teljes hosszát végig nem érő hasi idegkötegre különül (11. ábra) (összefoglalva: Campos-Ortega J.A. és Hartenstein, 1997; Goodman, C.S. és Doe, C.Q., 1993).



11. ábra 17.stádiumú *Drosophila* embrió központi idegrendszerének sematikus képe

Az embrionális idegrendszeri vizsgálatok kísérletes előzményei

Az elmúlt években csoportunk érdeklődése egy új formin alcsalád, a DAAM (Dishevelled associated activator of morphogenesis) *Drosophila* ortológjára irányult. Szekvencia analízis alapján megállapították, hogy a *Drosophila* genom egyetlen DAAM ortológot kódol, amely megfelel a CG14622 jelű annotált génnek.



12. ábra A *dDAAM* gén és a deléciós allélok

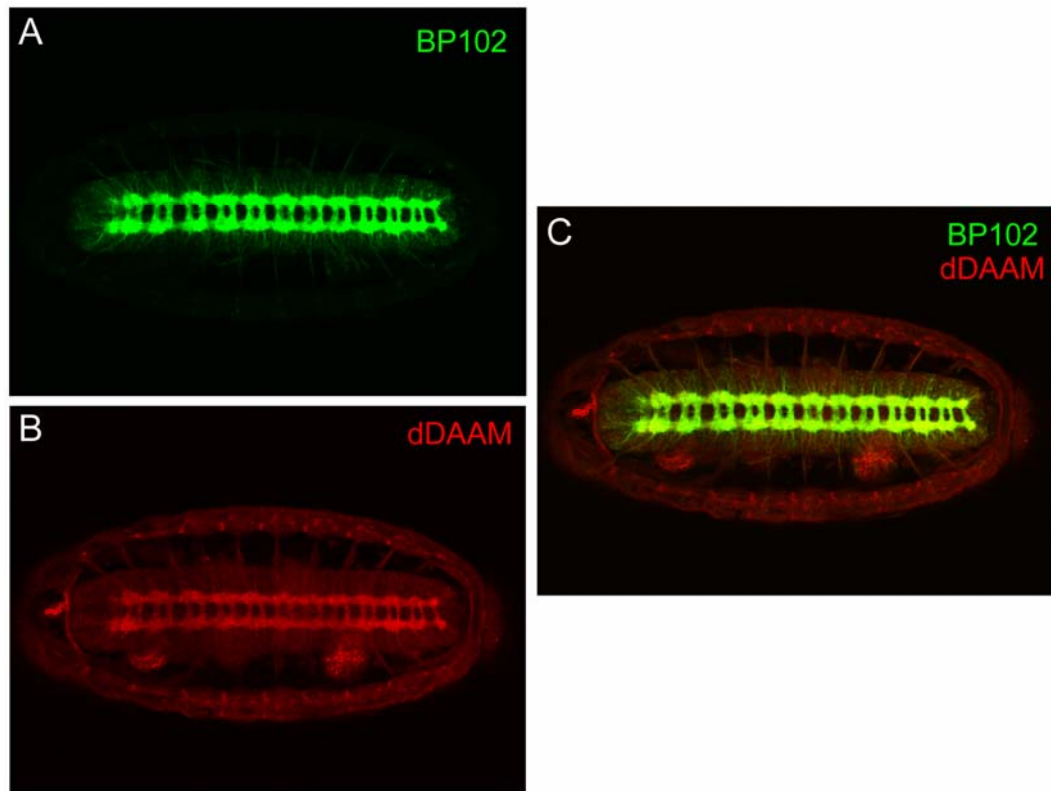
A *dDAAM* gén funkcionális analízise érdekében funkcióvesztéses mutánsokat hoztak létre, két transzpozon inszerciót felhasználva - *EP(1)1336* és *EP(1)1542* – melyek a *dDAAM* lokusz közvetlen közelében találhatók (12. ábra). Ezen inszerciók remobilizációjával sikerült deléciós alléleket izolálni, melyek közül kettő a *dDAAM* 5' régiójára térképeződött, míg öt a 3' régiót érintette. Mind az 5', mind a 3' deléciók homo-, ill. hemizigóta formában letálisak, kivéve a *dDAAM^{Ex1}*, mely életképes és fertilis (bár a vad típushoz viszonyított életképessége csupán 17%-os). A letális 5' és 3' deléciók nem komplementálják egymást és az e régiót

érintő deléciókat [*Df(1)AD11*, *Df(1)AC7*, és *Df(1)sta*], komplementálhatók azonban két transzpozíciós duplikációval [*Dp(1;3)sta* és *Dp(1;Y)Sz280*], melyek hordozzák az 1F2-3 citológiai régiót, ahová a *dDAAM* gén lokalizálódik.

Minden letális allél életképes a *dDAAM^{Ex1}* felett, kivéve a két leghosszabb deléciós allélt (*dDAAM^{Ex68}* és *dDAAM^{Ex36}*). Annak bizonyítására, hogy a letalitás a dDAAM hiányának köszönhető, létrehoztak olyan transzgenikus legyeket, melyek hordozzák az UAS-FL-DAAM konstrukciót – ez tartalmazza a teljes hosszúságú RE67944 cDNS klónt – és menekítési kísérletben tesztelték őket. Az UAS-FL-DAAM-ot általánosan - *Act-Gal4* vagy *tub-Gal4* szabályozás alatt - kifejezve mutáns háttéren a letalitás menekíthető volt még a *dDAAM^{Ex68}* esetében is. Összegezve, ezek az eredmények bizonyították, hogy minden letális allél *dDAAM* allél, és ezek a mutációk nem érintenek más genetikai elemet.

RNS in situ hibridizációs vizsgálatban a *dDAAM* egy dinamikusan változó, szövetspecifikus kifejeződési mintát mutatott az embriogenezis során. A legfontosabb expressziós domének közé tartozik a trachea, ill. a központi idegrendszer területe. Csoportunk a tracheán végzett vizsgálatok során kimutatta, hogy a trachea-hálózat megfelelő kialakításához - azon belül is a tracheális kutikula kialakításához - szükség van a dDAAM fehérje jelenlétére (Matusek és mtsi.,2006).

A tracheán kívül a dDAAM fehérje igen magas szinten expresszálódik az embrionális idegsejtekben és ott főként a nyúlványokban halmozódik fel (13. ábra). Ez a lokalizációs minta önmagában is azt sugallja, hogy a DAAM idegrendszeri funkciója a nyúlványok kialakulásával és/vagy működésével kapcsolatos.

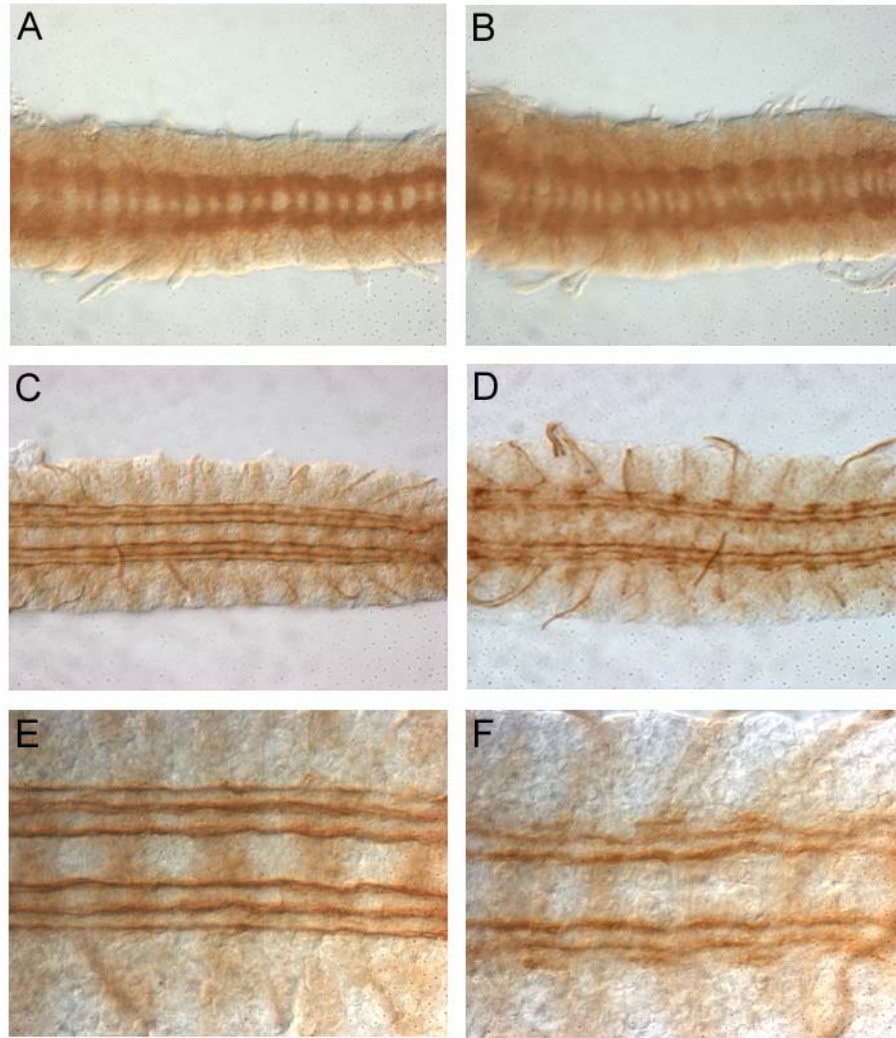


13. ábra A dDAAM fehérje lokalizációja az embrionális központi idegrendszer területén. A dDAAM a hasi idegköteg nyúlványaiban mutat feldúsulást, melyet az általános nyúlvány-specifikus marker (BP102) mintázatával való teljes átfedés igazol.

A *Drosophila* DAAM szükséges az idegsejt nyúlványok megfelelő projekciójához az embrionális központi idegrendszerben

A dDAAM idegrendszeri szerepének vizsgálata során először az embrionális központi idegrendszerre koncentráltunk, mivel a fehérje jelen van az embrionális központi idegrendszert felépítő nyúlványokban. Kísérleteink során két ellenanyagot (BP102 és FasII) használtunk markerként a hasi idegköteget alkotó nyúlványok nyomon követésére. A BP102 jelű ellenanyag az embrionális központi idegrendszer összes nyúlványát kijelöli, mely által kirajzolja a hasi idegkötegre jellemző létra-szerű nyúlványmintázatot. A FasII ellenanyag hemiszféránként 3 hosszanti lefutású idegkötegre specifikus, illetve a központi idegrendszerből kilépő fő motorneuronokat is kijelöli.

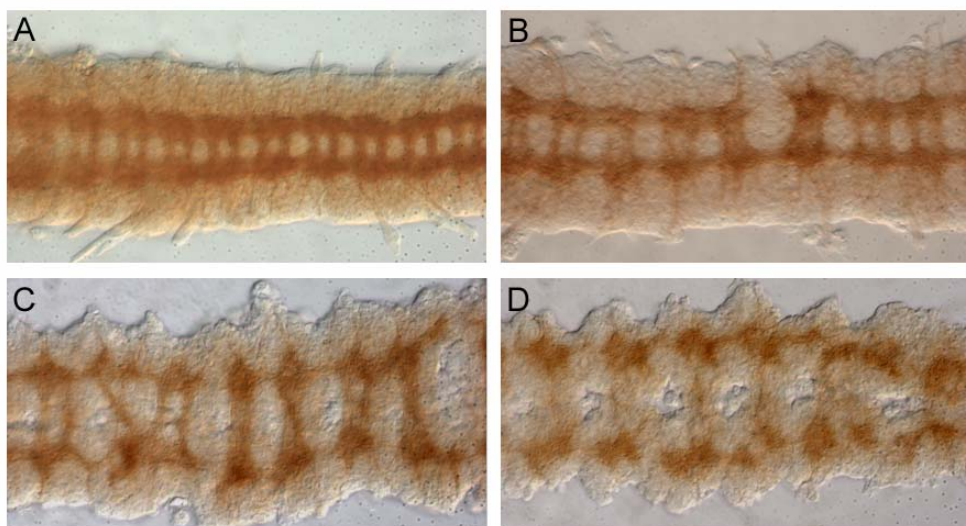
Első kísérleti megközelítésben a zigótikus null mutánsokat vizsgáltuk. Ezekhez a vizsgálatokhoz a $dDAAM^{Ex68}$ -as alléljét használtuk, amelyet null mutánsnak tekintünk, mert a benne található deléción eltávolítja az aktin polimerizációban fontos szerepet játszó FH2 domén nagy részét, és mind genetikai értelemben, mind pedig immunfestések alapján null allélként viselkedik (Matusek et al., 2006). Ez az allél homo- ill. hemizigóta formában letális, ezért törzsben való fenntartása balanszer kromoszómával, illetve a $dDAAM$ gént duplikáció formájában hordozó Y kromoszómával [$Dp(1;Y)Sz280$] oldható meg. Zigótikus null állatokat a balanszeres törzs felhasználásával generáltunk, melyek közül a hemizigóta null állatok kiválogatása nem jelentett gondot, mivel a balanszer kromoszóma hordozott egy $Ftz-lacZ$ transzgént. β -gal ellenanyagossal festéssel kiválogattuk a balanszer kromoszómát nem hordozó, tehát hemizigóta $dDAAM^{Ex68}$ állatokat, majd a továbbiakban a két marker ellenanyaggal (BP102, és FasII) vizsgáltuk a hasi idegkötegben haladó nyúlványok mintázatát. A $dDAAM^{Ex68}$ zigótikus null mutánsok BP102-es marker mellett nem mutattak jelentős eltérést a vad típusú idegrendszerhez képest. Ezekben a központi idegrendszerekben csak 1-2 %-ban tapasztaltunk szakadásokat a nyúlványkötegekben, azonban a létra szerű nyúlványminta ill. az egész hasi idegköteg kiszélesedett (14. ábra A és B). Ezzel szemben a FasII mintázatot vizsgálva látványosabb volt a különbség a vad típusú állatokhoz képest. A zigótikus null állatok mindegyikében megfigyelhető volt a külső nyúlványköteget érintő szakadozottság, mely az embrió idegrendszerének teljes hosszában jelen volt (14. ábra C, D, E és F).



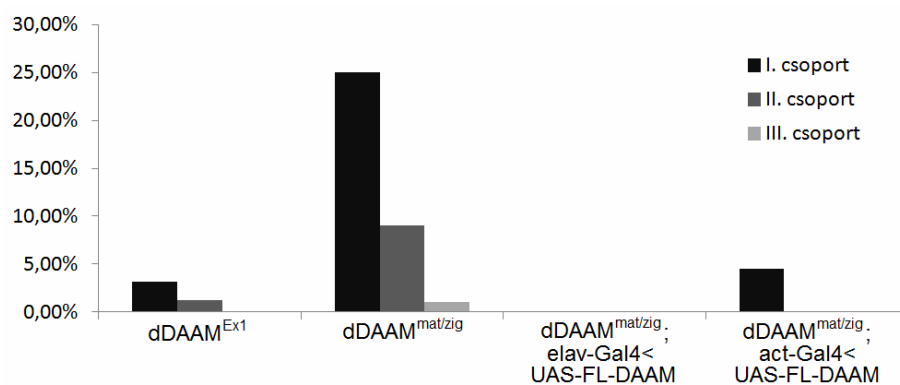
14. ábra A *dDAAM* zigótikus null mutáns embriók központi idegrendszeri mintázata (B, D és F) a vad típusú embriókhoz (A, C és E) képest. BP102-es ellenanyag festés mellett a *dDAAM*^{Ex68} hemizigóta állatok hasi idegkötege kiszélesedik (B), azonban a vad típushoz képest (A) jelentősebb eltérés nem tapasztalható. Ezzel szemben FasII festés mellett a külső kötegek szakadozottsága figyelhető meg a mutáns állatok központi idegrendszerében (D, F).

Ez utóbbi eredmény igazolni látszott a feltevésünket, miszerint a *dDAAM*-nak szerepe lehet az embrionális idegsejt nyúlványok kialakításában. A gyenge fenotípusok alapján azonban feltételeztük, hogy a *dDAAM* estében jelen lehet egy anyai hatás, mely során az anyától származó géntermék képes menekíteni a zigótikus *dDAAM* hiányát, így nem, vagy igen kis százalékban figyelhetünk meg nyúlványnövekedési fenotípusokat. Az anyai hatás igazolására, ill. a *dDAAM* idegrendszeri szerepének további vizsgálatához csíravonal klónok

indukálásával maternálisan és zigótikusan is null mutáns utódokat hoztunk létre a $dDAAM^{Ex68}$ allél segítségével. Ezek az embriók azonban már nagyon korai (blasztoderma) stádiumban fejlődési rendellenességeket mutattak és elpusztultak, így nem tudtuk elvégezni a mutánsok idegrendszeri vizsgálatát. A továbbiakban egy gyengített anyai hatás mellett próbáltuk vizsgálni a mutáns embriók központi idegrendszerét. Ehhez a kísérlethez transzheterozigóta $dDAAM^{Ex1}/dDAAM^{Ex68}$ embriókat hoztunk létre, melyeket homozigóta $dDAAM^{Ex1}$ -es nőstények és $dDAAM^{Ex68}/Y^{Sz280}$ hímek segítségével generáltunk. Az így létrehozott $dDAAM^{mat/zig}$ embriókon BP102 festést végeztünk. A $dDAAM^{mat/zig}$ embriók 35%-a axonnövekedési hibákat mutatott, további 34%-ukban pedig a nyúlvánnövekedési hibák mellett egyéb fejlődési rendellenességek is megjelentek. A nyúlvánnövekedési hibák különböző erősséggel jelentek meg, ez alapján 3 csoportba soroltuk őket. Az egyes csoportba soroltuk azokat az egyedeket, amelyek hasi idegkötegében csak egy vagy két szegmentben volt megfigyelhető szakadás (I. csoport: 25%), a kettes csoportba tartozó állatok szegmentjeinek maximum felében volt megfigyelhető szakadás vagy nyúlvány-hiány (II. csoport: 9%), és végül a hármas csoportba tartozó embriók szegmentjeinek több mint felét érintette a szakadásos fenotípus (III. csoport: 1%) (15. ábra). Annak bizonyítására, hogy ezek a fenotípusok valóban az anyai géntermék hiányának következményei, menekítési kísérleteket végeztünk, melyek során a teljes hosszúságú dDAAM fehérjét általános (*Act-Gal4*), ill. idegrendszer specifikus (*elav-Gal4*) driverrel termeltettük túl $dDAAM^{mat/zig}$ embriókban. Az idegrendszer specifikus túltermelés 100%-ban menekítette a fenotípust, míg az általános driverrel való túltermelés a nyúlvánnövekedési hibák arányát 4,5%-ra csökkentette (16. ábra). Ezek a kísérletek együttesen tehát azt bizonyítják, hogy egyrészt a dDAAM-nak kitüntetett szerepe van az embrionális központi idegrendszerben a neuron nyúlványok kialakításában, másrészt világosan utalnak az anyai hatás jelenlétére a dDAAM gén esetén.



15. ábra A $dDAAM^{mat/zig}$ embriók (B,C és D) központi idegrendszerének nyúlványmitázata a vad típusú embriókhoz (A) képest. Az axonnövekedési rendelleneségeket erősségük szerint három csoportba sorolhatjuk. Az I. csoport a leggyengébb (B), a II. csoport a közepesen erős (C), és a III. csoport a legerősebb nyúlvánnövekedési hibákat mutató hasi idegkötegeket tartalmazza (részletes leírás a szövegben). Az ábrán az általános nyúlvány-specifikus ellenanyag, a BP102 használatával tettük láthatóvá a nyúlványmintázatot.



16. ábra A $dDAAM$ maternálisan és zigótikusan mutáns állatok központi idegrendszerében tapasztalható nyúlvánnövekedési hibák gyakorisága. A mutáns embriók hasi idegkötegében megfigyelhető axonnövekedési hibák a teljes hosszúságú $dDAAM$ idegrendszer specifikus ($elav-Gal4$) driverrel való túltermelésével 100%-osan, míg általános driverrel ($act-Gal4$) részlegesen menekíthetőek voltak.

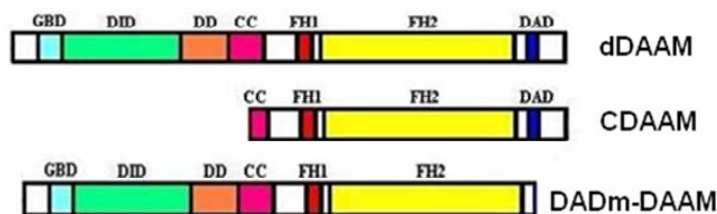
Annak kizárása érdekében, hogy a nyúlványmintázatban fellépő hibák nem az idegsejtek hiányának tudhatók be, a neuronok számának vizsgálatát terveztük. Elsőként anti-Elav festést

végeztünk *dDAAM^{mat/zig}* embriókon, amellyel minden idegsejtet kijelöltünk. A festés alapján úgy tűnt, hogy a mutáns embriók a vad típusúakhoz hasonló számú idegsejtet tartalmaznak. Az anti-Elav pozitív sejtek nagy száma miatt azonban ezzel a markerrel nem tudtuk megállapítani, hogy a sejtek száma pontosan azonos-e, ezért a későbbiekben a szegmentenként csupán néhány tucat sejtre specifikus anti-Eve és anti-En ellenanyagokkal is elvégeztük a vizsgálatokat. A festések alapján elmondhatjuk, hogy a mutáns állatok és a vad típusú állatok központi idegrendszerében közel azonos számú sejt van, a dDAAM fehérje hiánya tehát nem okoz sejt-letalitást és a mutánsokban megfigyelt nyúlványnövekedési hibák elsődleges oka nem a neuronok hiányára vezethető vissza.

A dDAAM konstitutívan aktív formája is hatással van a nyúlványok növekedésére

Funkcióvesztéses kísérleteink elvégzése után kíváncsiak voltunk arra, hogy a dDAAM konstitutívan aktív (CA) formájának túltermelése hatással van-e az embrionális nyúlványmintázatra. Ennek vizsgálatához idegrendszer specifikus driverrel termeltettük túl a CDAAM fehérjét. Ez a fehérje a dDAAM egy olyan formája, amely nem képes inaktív konformációt felvenni, mivel hiányzik az N-terminális régiója, ahol az autoregulációban kritikus szerepet játszó DID domén található. Tartalmazza azonban az aktin összeszerelődésben szerepet játszó FH1 és FH2 doméneket, így aktin polimerizációra képes (17. ábra). Ennek a formának az idegrendszer specifikus túltermelése keresztköteg (komisszúra) megvastagodásokat és laterális irányba kilépő extra nyúlványok képződését eredményezte, emellett az embriók többségében (kb. 70%-ában) egy, a vad típusénál jóval kompaktabb nyúlványminta alakult ki (18. ábra B és D). Tekintve, hogy a CDAAM izoforma nem tartalmazza a sejten belüli lokalizációban fontos szerepet játszó fehérje doméneket, megfigyeléseink legvalószínűbb magyarázata az lehet, hogy a megnövekedett nyúlványszám

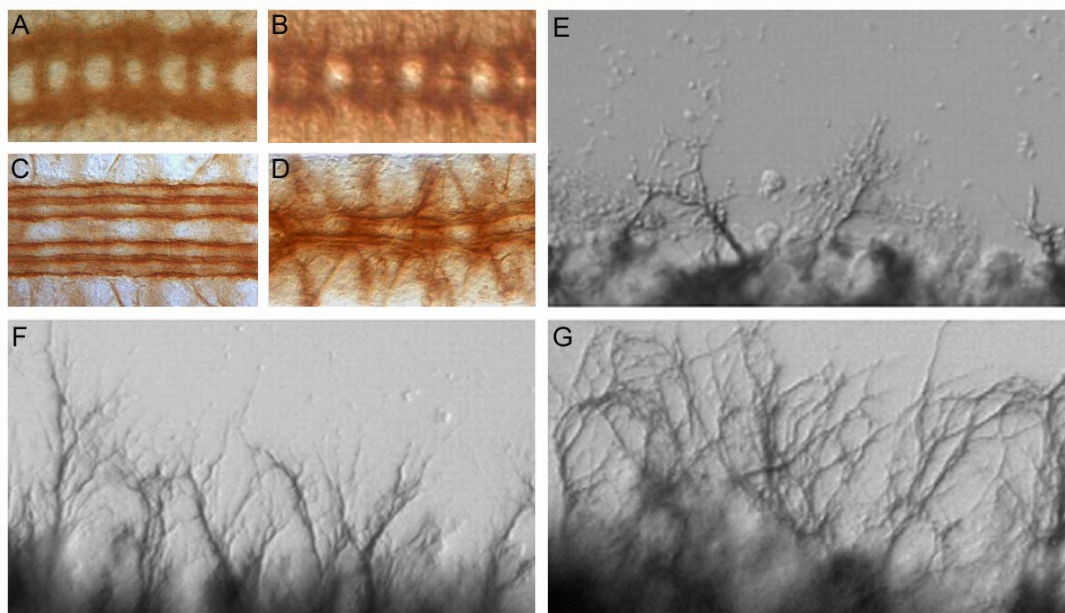
és/vagy a rossz irányba projektáló axonok megjelenése egy szabályozatlan aktin polimerizáció következményeként alakul ki.



17. ábra A dDAAM fehérje, és konstitutívan aktív formáinak doménszerkezete.

A rendelkezésünkre álló másik CA forma, a DADm-DAAM (17. ábra), állandóan aktivált állapotát annak köszönheti, hogy hiányzik belőle a C-terminálisán található DAD-domén, mely szintén fontos szerepet játszik az autoinhibícióban. Ez a forma azonban rendelkezik a lokalizációért felelős N-terminális doménnel, így valószínűsíthetően a megfelelő helyen fejti ki hatását. Meglepő módon ennek a formának az idegrendszer-specifikus túltermelése a funkcióvesztéses kísérletekhez hasonló fenotípust okoz, tehát szakadások jelennek meg a létra-szerű nyúlványmintázatban. Ha azonban az embrionális központi idegrendszert a saját szöveti környezetből kiemelve, egy *in vitro* nyúlványregenerációs tesztben vizsgáltuk, az előzőektől eltérő eredményt kaptunk, hiszen ilyen körülmények között a DADm-DAAM formát túltermelő hasi idegkötegekben a nyúlványregeneráció és nyúlványnövekedés határfoka jelentősen megnőtt (18. ábra G). Ebben a kísérleti elrendezésben jól látható különbség van a CDAAM és a DADm-DAAM izoformák hatása között, mert a CDAAM is képes ugyan növelni a nyúlványregeneráció mértékét a vad típusú állatokhoz képest, de jóval kisebb mértékben, mint a DADm-DAAM (18. ábra F). Ez a különbség feltételezhetően kapcsolatban áll a sejten belüli lokalizációs képességükkel, mert a DADm-DAAM, ellentétben a CDAAM-mal, valószínűleg képes a megfelelő helyen lokalizálódni, és ott aktivált állapota miatt jelentősen megnövelni az aktin filamentumok, ill. a

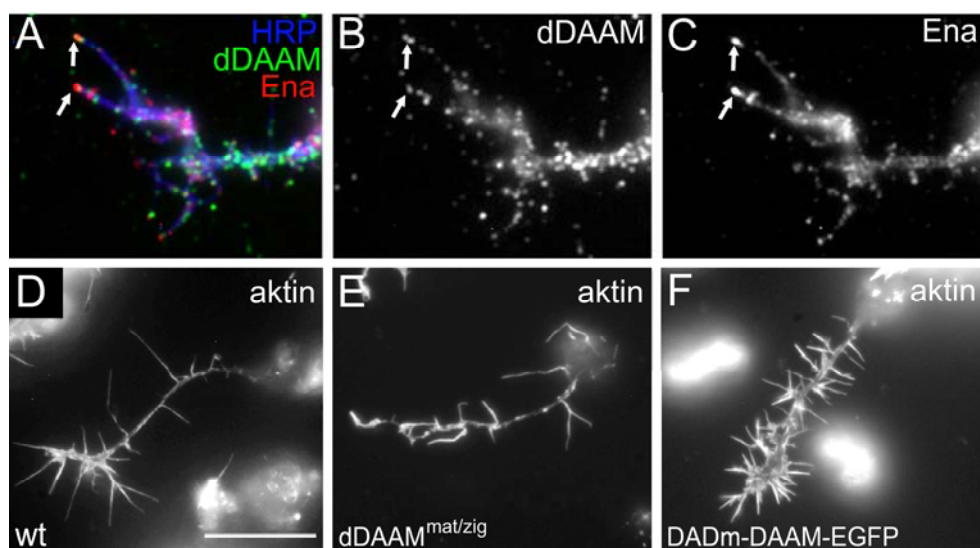
nyúlványok számát és hosszát (18. ábra G). Összegésében az aktivált formákkal végzett funkcionyeréses kísérletek rávilágítottak arra, hogy a dDAAM fehérje instruktív szerepet játszik a sejtes nyúlványok képződésében, és egyben megerősítették azt a hipotézisünket is, hogy a dDAAM az axonnövekedés egyik fontos faktora.



18. ábra Konstitutívan aktív dDAAM formák hatása az embrionális nyúlványmintázatra, és a hasi idegkötegből kilépő nyúlványok regenerációjára. A CDAAM idegrendszer-specifikus túltermelésének hatására a központi idegrendszerre jellemző létra-szerű nyúlványmintázat (A) sérül, kompaktálódik, keresztköteg megvastagodások, ill. a periféria felé kilépő extra nyúlványok láthatóak (B). A FasII ellenanyaggal kirajzolt 3 hosszanti lefutású köteg (C) mintázata is megváltozik a CDAAM túltermelésével. A kötegek lefutása sérül, átkereszteződéseket, és perifériális irányba kilépő nyúlványokat lehet megfigyelni (D). A szöveti környezetből kiemelt hasi idegköteg perifériális irányba futó nyúlványai képesek regenerálódni. (E) A konstitutvan aktív CDAAM idegrendszer-specifikus túltermelésének hatására ez a regenerációs képesség megnő (F), míg a másik konstitutívan aktív forma a DADm-DAAM a periféria felé futó nyúlványok számát drasztikusan megnöveli (G) .

A dDAAM fehérje elősegíti a filopódiumok képződését az axon növekedési kúpjában

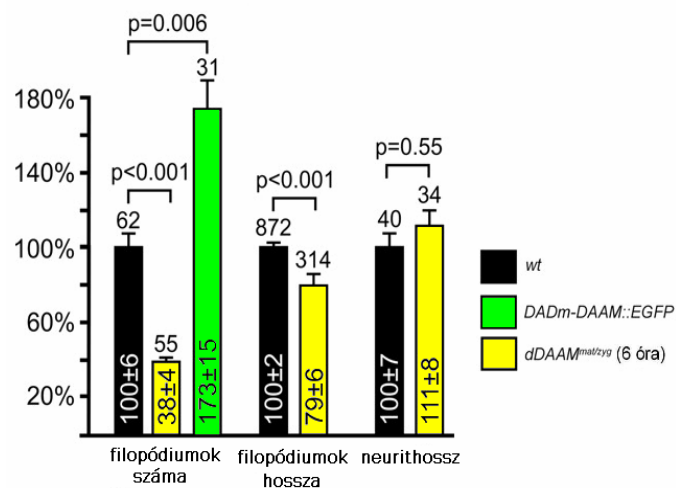
Az embrionális szöveteken végzett kísérletek mellett kíváncsiak voltunk arra, hogy a dDAAM szubcelluláris szinten hol helyezkedik el, ill. jelen van-e a nyúlványnövekedésben kitüntetett szerepet játszó képlet a növekedési kúp területén. Ennek vizsgálatához embrionális központi idegrendszerből származó elsődleges idegsejt kultúrákat használtunk. Ezeken a sejteken elvégezve az ellenanyagos festést, azt találtuk, hogy a dDAAM az egész növekedési kúp területén megtalálható, ezen belül felhalmozódik a növekedési kúp perifériális részén található filopódiumokban (19. ábra A-C), beleértve azok csúcsi részét is, ahol nagymértékű aktin-polimerizáció folyik. Tekintve, hogy a filopódiumok nem elágazó aktin filamentumokban gazdag struktúrák, nyilvánvalóan adódott a kérdés, hogy a dDAAM fehérje mint formin típusú aktin összeszerelő faktor szerepet játszik-e a filopódiumok képződésében vagy azok dinamikájának szabályozásában.



19. ábra A dDAAM szerepének vizsgálata a növekedési kúpok filopódiumainak kialakulásában.

Primer idegsejt kultúrában a dDaam és az Ena szubcelluláris lokalizációja részleges átfedést mutat (A-C), és mindkét fehérje megtalálható a filopódiumok csúcsain, ahol az aktin polimerizáció történik (nyilak). A zigótikus és maternálisan mutáns állatokból származó idegsejtek nyúlványain található filopódiumok száma kevesebb (E), mint a vad típusú sejteké (D), míg a DADm-DAAM konstitutívan aktív formát túltermelő sejtek axonjain jóval több filopódium található (F). HRP: torna-peroxidáz elleni ellenanyag, általános idegsejt-specifikus ellenanyag.

Ennek a kérdésnek a vizsgálatára dDAAM^{mat/zig} mutáns embriók központi idegrendszeréből származó primer idegsejt kultúrákat használtunk. A kísérlet során a filopódiumok számát, hosszát, ill. az idegsejt nyúlvány hosszát vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a dDAAM hiányos embriók filopódiumainak száma a vad típushoz képest 62%-kal lecsökkent, hosszuk 26%-kal rövidült. (19. ábra B és 20. ábra). Ezek a funkcióvesztéses kísérletek alátámasztják azt a hipotézisünket, hogy a dDAAM-nak a növekedési kúp filopódiumainak kialakításában van szerepe. Ezt az elméletet megerősíti a DADm-DAAM konstitutívan aktív forma túltermelése is, mivel jelenlétében a filopódiumok száma 73%-kal megnőtt (19. ábra C és 20. ábra). Ezen kísérletek alapján elmondható, hogy a dDAAM fontos szerepet játszik a növekedési kúpon található filopódiumok kialakításában. Tekintve, hogy a filopódiumok a nyúlványnövekedés esszenciális elemei, primer sejt kultúrák eredményeink nem csupán a dDAAM fehérje szubcelluláris funkcióját tárták fel, de jól magyarázzák a teljes idegrendszer szintjén megfigyelhető fenotípusokat is.

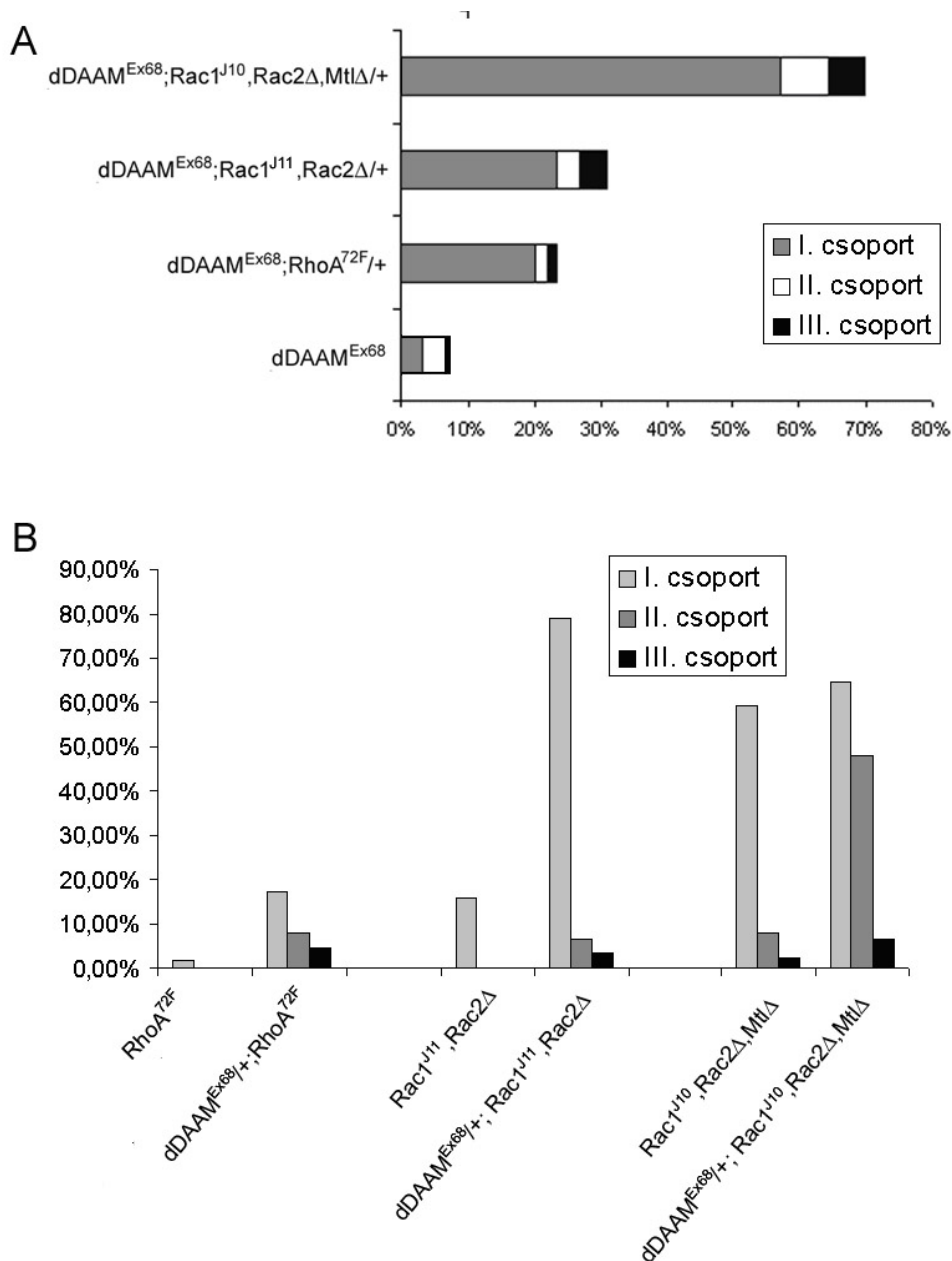


20. ábra A dDAAM filopódiumokra gyakorolt hatásának vizsgálata primer idegsejtkultúrákban. A zigótikusan és maternálisan mutáns állatokból származó idegsejtek nyúlványain található filopódiumok száma kevesebb és rövidebb, mint a vad típusú sejteké, míg a DADm-DAAM konstitutívan aktív formát túltermelő sejtek axonjain jóval több filopódium található.

A dDAAM aktivátorai a Rac típusú kisGTPázok

A funkcionális vizsgálatok után felmerült a kérdés, hogy a dDAAM milyen fehérjékkel működik együtt az axonnövekedés során. Az általánosan elfogadott elképzelések szerint a DRF forminok alap állapotban inaktív formában vannak jelen a sejtben, mely konformáció a fehérje N- és C-terminálisának összekapcsolódásával jön létre (Alberts, 2001). Ezt az autoinhibíciós kapcsolatot képes bontani, és így a fomit aktív állapotba hozni egy aktivált kisGTPáz bekötődése. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az idegrendszer területén melyik kisGTPáz(ok) felelős(ek) a dDAAM aktiválódásáért. Ennek eldöntésére domináns genetikai interakciós vizsgálatokat végeztünk a Rho kisGTPáz család ismert *Drosophila* tagjait érintő mutánsokkal. Először a *RhoA* null allélját teszteltük, amelyről korábban bebizonyosodott, hogy a trachea fejlődése során a dDAAM aktivátora (Matussek et al., 2006). Ez az allél csak kis mértékben erősítette a zigótikus null mutáns *dDAAM^{Ex68}* embrionális axonnövekedési fenotípusát, ami arra utalt, hogy az idegsejtekben valószínűleg nem a RhoA felelős a dDAAM aktiválásáért. Így a következőkben a Rac típusú kisGTPázok alléljeivel végeztük el az interakciós vizsgálatokat, amelyekről egyébként már korábban ismertté vált, hogy szerepet játszanak az axonnövekedésben (Ng és Luo, 2004). A *Drosophila* genom három Rac típusú GTPázot kódol (*Rac1*, *Rac2*, *Mtl*), amelyek az idegrendszerben nagymértékű funkcionális redundanciát mutatnak (Hakeda-Suzuki és mtsai, 2002). A Rac GTPázokat érintő mutánsokkal elvégezve a vizsgálatokat, erős, gén-dózis függő genetikai kölcsönhatást figyeltünk meg. Míg a *Rac1*, *Rac2* gén mutáns alléljai mellett a hemizigóta *dDAAM^{Ex68}*-as állatokban megjelenő nyúlványnövekedési hibák aránya 8%-ról csak 31%-ra, addig a *Rac1*, *Rac2*, *Mtl* hármas mutáns hatására 70%-ra nőtt (21. ábra). A funkcióvesztéses allélok között megfigyelhető domináns kölcsönhatással ellentétben, a konstitutívan aktív CDAAM izoforma által okozott funkciónyeréses fenotípust nem szupresszálta a Rac gének dózisének csökkenése, ami azt jelzi, hogy a Rac kisGTPázok a nyúlványnövekedést szabályozó

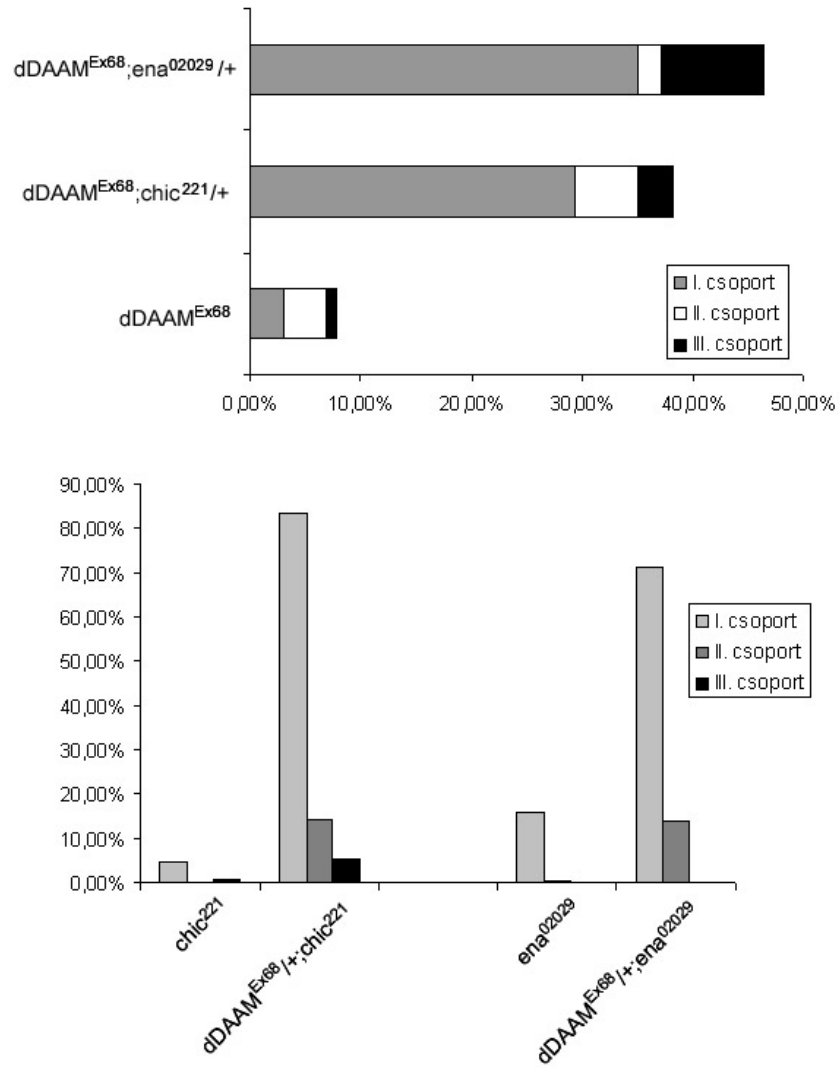
folyamatban vagy a dDAAM fölötti szinten helyezkednek el, vagy egy párhuzamos útban vesznek részt. Együttesen, a funkciónyerés és a funkcióvesztés interakciós vizsgálatok eredményei jó összhangban vannak azzal az elképzeléssel, hogy a dDAAM legfontosabb kisGTPáz típusú aktivátorai az axonnövekedés során a Rac család tagjai közül kerülnek ki.



21. ábra A dDAAM^{Ex68} domináns interakciós vizsgálata a Rho típusú kisGTPázok alléljeivel. A dDAAM^{Ex68} erős domináns interakciót mutat a Rac kisGTPázok alléljeivel.

A dDAAM az embrionális nyúlványmintázat kialakítása során együttműködik az Ena és a Profilin fehérjékkel

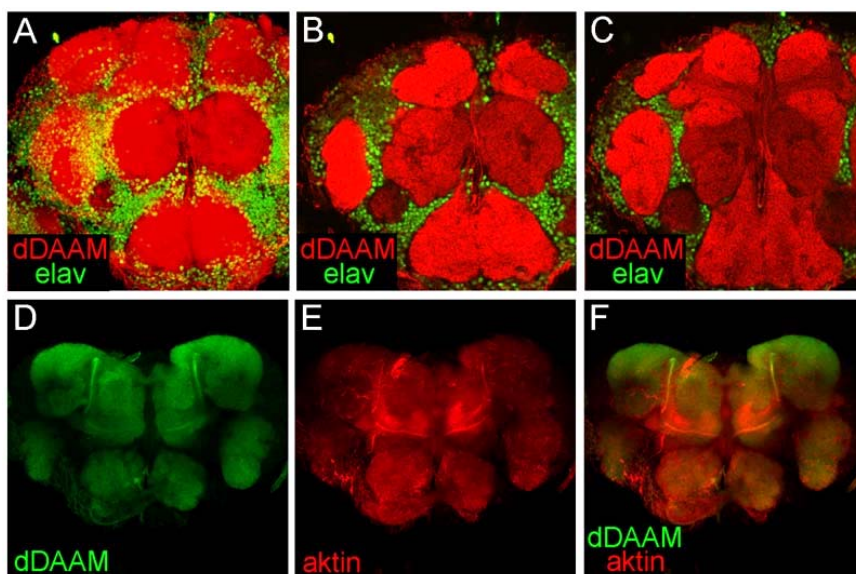
A dDAAM idegrendszeri szerepének vizsgálata során más interakciós partnereket is teszteltünk, melyekről feltételeztük, hogy együttműködnek ezzel a forminnal. Ezek közül az egyik a Profilin (a *chickadee* /*chic*/ gén terméke), egy G-aktin kötő fehérje, amely képes a forminok prolin-gazdag FH1 doménjéhez kötődni, és ily módon aktin monomereket biztosítani az aktin polimerizáció folyamán (Chang és mtsi., 1997; Evangelista és mtsi., 1997; Imamura és mtsi., 1997; Watanabe és mtsi., 1997). Egy másik érdekesnek talált fehérje az Enabled (Ena), melyről már korábban kimutatták, hogy jelen van a filopódiumokban, és azok csúcsi részén halmozódik fel (Lanier és mtsai., 1999). Idegrendszerben végzett vizsgálatokban kimutatták, hogy *ena* hiányában a *Drosophila* embrió hasi idegkötegében megfigyelhető szakadások és projekciós hibák jelennek meg (Wills és mtsai., 1999). Mivel mindkét fehérje sejten belüli lokalizációja részleges átfedést mutat a dDAAM mintázattal, és funkcionálisan feltételezhető közöttük együttműködés a nyúlványnövekedés során, genetikai interakciós vizsgálatban teszteltük e fehérjék génjeinek alléljeit. Az eredmények alapján elmondható, hogy mind a *chic*²²¹, mind az *ena*⁰²⁰²⁹ allél domináns interakciót mutatott a *dDAAM* null alléllal (22. ábra). Ezzel összhangban, ko-immunoprecipitáció segítségével közvetlen fizikai kapcsolatot is ki tudtunk mutatni a dDAAM és a Profilin, ill. az Ena között (Matusek Tamás személyes közlése). Ezek alapján elmondható, hogy a dDAAM az embrionális nyúlványmintázat kialakítása során együttműködik az Ena és a Profilin fehérjékkel.



22. ábra Domináns genetikai interakciós vizsgálat a *chic*, mind az *ena* gén alléljével. Mind az *ena*, mind a *chic* gén alléljének esetében domináns interakció volt megfigyelhető a *dDAAM^{Ex68}* alléllal

A dDAAM fehérje lokalizációja az adult agyban

Az embrionális kísérletek után érdeklődésünk a későbbi idegi fejlődésre irányult. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a dDAAM csak az embrionális idegrendszer differenciálódása során játszik szerepet, vagy a későbbi stádiumokban is hozzájárul az idegrendszer fejlődéséhez, ill. működéséhez. Első kérdésünk az volt, hogy vajon a *Drosophila* agyban/központi idegrendszerben jelen van-e a dDAAM fehérje a lárvális, a báb és az adult fejlődési stádiumokban, és ha igen, mely területekre jellemző a kifejeződése. Az idegsejtek magjára specifikus ellenanyag, az α -elav használata mellett vizsgáltuk a dDAAM lokalizációját és megállapítottuk, hogy a fehérje minden fejlődési stádiumban kimutatható a központi idegrendszerben, ahol jellemzően a nyúlvány-gazdag neuropil régiókban mutat erős felhalmozódást (23. ábra A-C, ill. nem bemutatott eredmény).



23. ábra A dDAAM lokalizációja az adult agyban. Az adult agy területén a dDAAM a neuropil (nyúlvány-gazdag régiókban) dúsul fel, míg a főleg sejtesteket tartalmazó kérgi területeken (elav festés) nem jellemző a kifejeződése (A-C). A neuropil régióon belül a dDAAM feldúsulást mutat a gombatest területén, azokban a nyúlványokban, melyekben nyúlványnövekedésre utaló aktin felhalmozódás figyelhető meg (D-F).

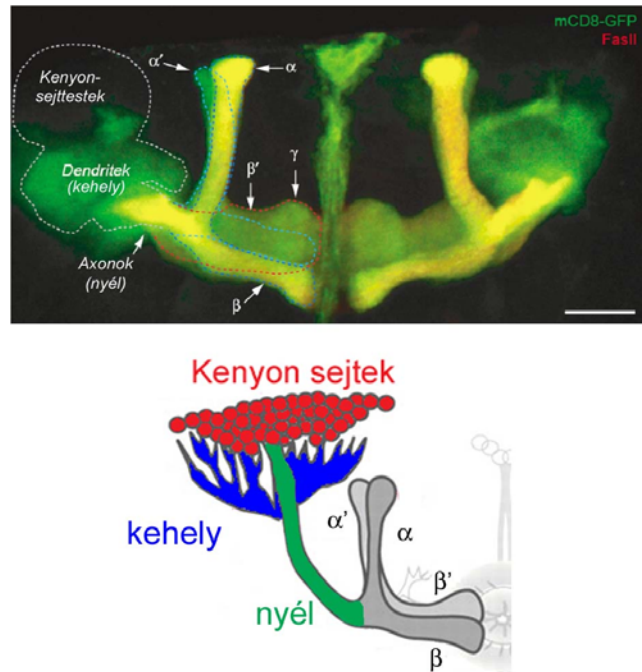
A gombatest szerkezete és kialakulása

A továbbiakban funkcionális vizsgálatainkat főként az adult agyra, azon belül is a gombatest nevű agyi területre fókuszáltuk, mert aktin festés mellett vizsgálva a dDAAM lokalizációját jól kivehető, hogy az agy belsejében található interneuronokból álló képlet, a gombatest területén a dDAAM erős feldúsulást mutat a nyúlványokban (23. ábra D-F).

A gombatest (mushroom body /MB/) egyike a *Drosophila* agy egyik legjobban elkülöníthető területeinek, és sztereotíp nyúlványmintája miatt az axonnövekedési vizsgálatok kedvelt modell rendszere. Több kutatás bebizonyította, hogy fontos szerepet játszik a szaglási tanulásban (Heisenberg 2003; Davis, 2004). A gombatest szerkezetében bekövetkezett elváltozások hatására sérül az állat hosszú- és rövidtávú memóriája (Heisenberg és mtsai., 1985; Pascual és Preat, 2001). A szaglási tanulás mellett azonban a gombatestnek még számos más funkciót is tulajdonítanak, mint például a mozgási aktivitás szabályozása, az alvás, a vizuális memória összetett formája, a helypreferencia, stb. (Martin és mtsai., 1998; Mizunami és mtsai., 1998; Liu és mtsai., 1999; Tang és Guo, 2001; Brembs és Wiener, 2006; Joiner és mtsai., 2006; Pitman és mtsai., 2006).

A *Drosophila* gombatest három fő részből áll, a kehelyből, a nyélből és a lebenyekből. Alapfelépítését az öt alkotó Kenyon sejtek adják, melyekből gombatestenként kb. 2500 darab van (Technau, 1984; Balling és mtsai., 1987). Ezen sejtek nyúlványai anterior irányba projektálva dendritikus ágakat képeznek, melyek összessége alkotja a kehelyt. Az axonok még előrébb projektálnak, így hozzák létre a nyelet. A nyél elülső végénél az axonok elágazódnak, majd dorzálisan és mediálisan tovább növekedve kialakítják a vertikális és mediális lebenyeket. A vertikális lebenyek az α' és α lebenyekből, míg a mediális lebenyek a γ , a β' és a β lebenyekből állnak. A Kenyon sejteknek három típusát különböztetjük meg, melyek nemcsak abban térnek el egymástól, hogy mely lebenyek kialakításában vesznek részt, de génexpresziós mintázatuk is eltérő (Crittenden és mtsai., 1998). A γ neuronok csak a

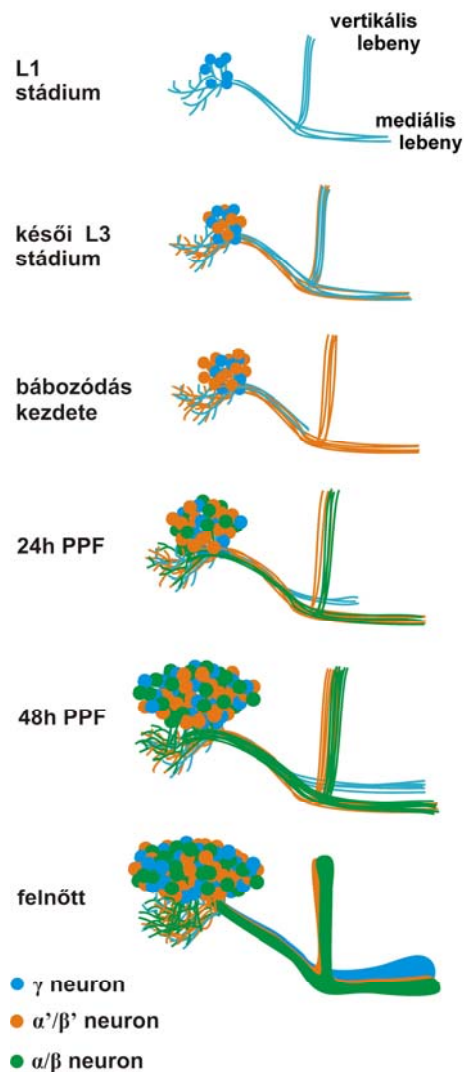
γ lebenyt idegzik be, mely a leganteriorálisabb része a mediális lebenynek. Az α'/β' neuronok elágaznak a nyél anteriorális végénél és az α' és a β' lebenybe projektálnak. Az α/β neuronok is ezt a mintázatot követik, és elágazódva az α és a β lebenyekben végződnek (24. ábra).



24. ábra A gombatest felépítése

A három Kenyon sejt típus és az általuk létrehozott lebenyek a fejlődés során egymás után keletkeznek. Először a γ neuronok jönnek létre és egészen az L3-as stádiumig csak ezek alkotják a fejlődő gombatestet. Másodikként az α'/β' neuronok jelennek meg a késői lárva stádiumban, végezetül az α/β neuronok jönnek létre a neuroblasztok osztódásából, melyek száma egészen a késői báb stádiumig egyre nő. A fejlődés során legelőször megjelenő Kenyon-sejtek (a γ neuronok) nyúlványai lárvális projekciójuk során kettéágaznak, létrehozva a vertikális és a mediális lebenyeket, de ezek az axonok csak ideiglenesek, mivel egyik funkciójuk, hogy a később projektáló α'/β' neuronok nyúlványai számára szolgáljanak segítségül a növekedés során, kijelölve az útvonalat. Az L3 lárva stádium végén kezdenek el projektálni az α'/β' neuronok nyúlványai a γ lebenyek közepén, majd az agy elülső részébe érve – követve a γ axonok mintázatát – létrehozzák az α' és a β' lebenyeket. A bábozódás

kezdetén, miután α'/β' nyúlványok létrehozták az α' és a β' lebenyeket, a γ neuronok nyúlványai visszametsződnek a gliasejtek fagocitózisának köszönhetően (Awasaki és Ito, 2004; Awasaki és mtsai., 2006). A visszametsződött axon a továbbiakban csak mediálisan nő vissza, létrehozva a felnőtt állatra jellemző γ lebenyt. Végezetül a báb stádium folyamán, miután az α'/β' neuronok kialakultak, és létrehozták a rájuk jellemző lebenyeket, a neuroblasztok osztódása során létrejönnek az α/β neuronok, melyek nyúlványai a korábban kialakított minta mentén projektálnak és hozzák létre az α és β lebenyeket (25. ábra). Az újonnan létrejött nyúlványok, növekedésük során mindig a nyúlvány-köteg belsejében futnak, így biztosítva a megfelelő projekciót (Verkhusha és mtsai., 2001).

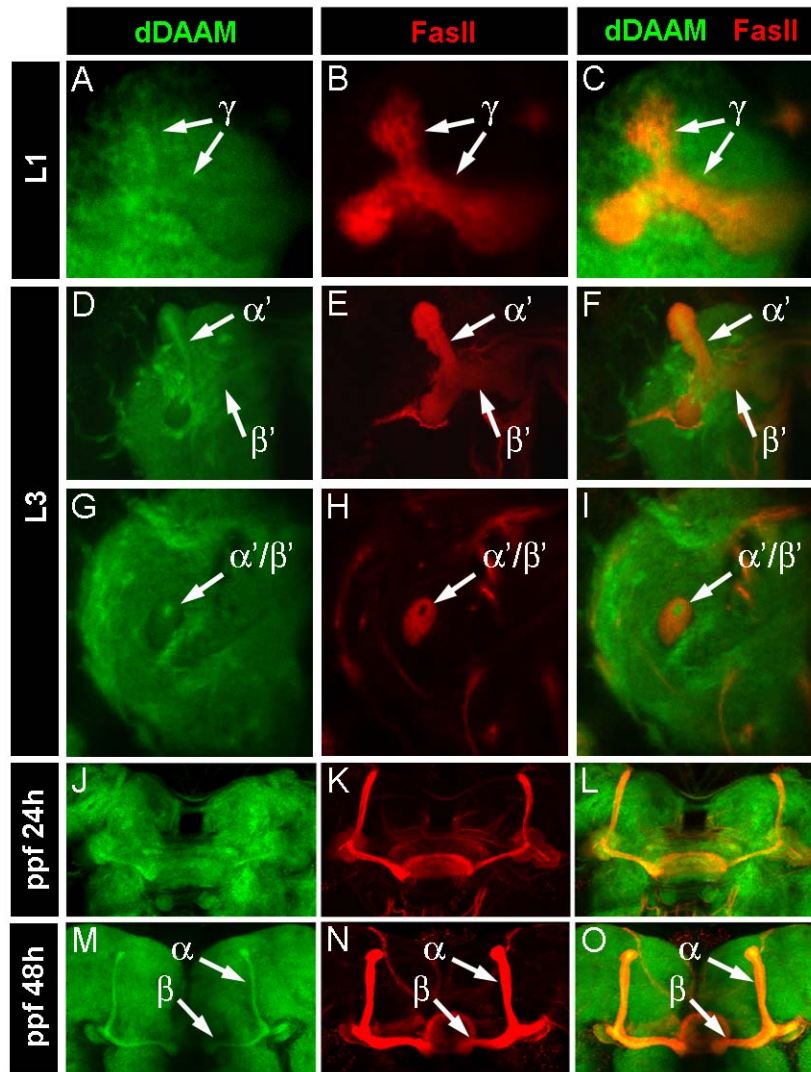


25. ábra A gombatest lebenyeinek kialakulása a különböző fejlődési stádiumok alatt.

A fejlődés során a gombatestet felépítő lebenyek egymás után jönnek létre. A lárvális fejlődés során legelőször a γ neuronok jönnek létre és alakítják ki a lárvális korra jellemző vertikális és mediális lebenyeket. Az L3 lárva stádium végén jelennek meg az α'/β' neuronok, melyek nyúlványai alkotják az α' és a β' lebenyeket. A bábozódás kezdetén, a γ neuronok nyúlványai visszametsződnek, majd továbbiakban csak mediálisan nőnek vissza, kialakítva a felnőtt állatra jellemző γ lebenyt. Legutoljára az α/β neuronok jönnek létre, melyek nyúlványai hozzák létre az α és β lebenyeket.

A dDAAM kifejeződésének vizsgálata a gombatestben

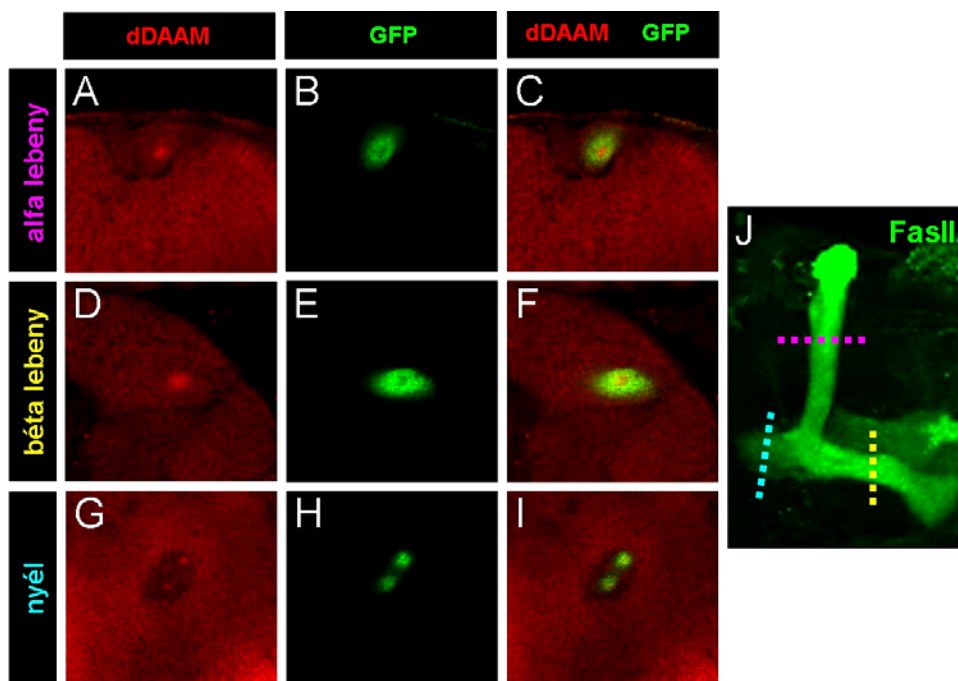
A fentieknek megfelelően úgy találtuk, hogy a dDAAM jelen van a gombatest-nyúlványokban, de ezt a kifejeződési mintát részletesen is tanulmányozni akartuk. Kísérleteinkhez FasII ellenanyagot festést használtunk, mely az α , a β és a γ lebenyeket jelöli ki. A DAAM fehérje elleni ellenanyaggal, és a FasII ellenanyaggal végzett kettős festéssel végig követhetjük a dDAAM expresszióját a különböző fejlődési stádiumok során a gombatest lebenyeiben. Mint már említettem, a lárvális fejlődés során először a γ neuronok jelennek meg, és kezdenek nyúlványokat növesztetni a meghatározott célterület felé. Ezen nyúlványok növekedése a korai lárvális stádiumokban megy végbe. L1-es stádiumú lárván végzett immunfestés alapján jól látszik, hogy a dDAAM fehérje a nyúlvány-köteg közepén mutat felhalmozódást (26. ábra A-C), amihez hasonló kifejeződési mintázatot figyeltünk meg a későbbi lárvális stádiumokban is. A késői L3 stádiumban az α'/β' neuronok jönnek létre, majd olyan nyúlványokat képeznek, amelyek a nyél közepén futnak, pont azon a területen, ahol a dDAAM erős feldúsulást mutat (26. ábra D-I). Azt, hogy ezek valóban az α'/β' neuronokhoz tartozó nyúlványok, a FasII ellenanyaggal végzett festés támasztja alá, mert az ebben a stádiumban csak a γ lebenyeket jelöli, a γ lebenyek közepén futó α'/β' axonokat nem. A 26. ábra G, H és I panelén jól látszik, hogy a dDAAM feldúsulás arra a területre lokalizálódik, ahol nincs FasII jelölés. A pupális stádiumokban elvégzett immunhisztokémiai festések is hasonló eredményekkel zárultak. A nyél, ill. a lebenyek közepén megfigyelhető dDAAM feldúsulás (26. ábra J-O) azt sugallta, hogy a dDAAM fehérje legnagyobb mértékben az aktuálisan növekvő nyúlványokban van jelen, hiszen korábban ismertté vált, hogy az aktuálisan növekvő gombatest axonok a lebenyek közepén futnak (Verkhusha és mtsai, 2001).



26. ábra A dDAAM fehérje lokalizációja a gombatestben az agy különböző fejlődési szakaszaiban. A dDAAM felhalmozódást mutat az újonnan létrejövő nyúlványokban a gombatestben az L1 (A-C), L3 (D-I) és a báb stádiumokban (J-O). A fejlődő gombatestet FasII festéssel jelöltük ki, mely specifikus a gombatest α , β és γ neuronok nyúlványaira. Megfigyelhető, hogy az összes lebeny kialakulása során a dDAAM fehérje a lebenyek közepén dúsul fel, ahol az aktuálisan növekvő nyúlványok futnak.

Az, hogy ez a felhalmozódás valóban csak a legfiatalabb nyúlványokra jellemző, az α és β lebenyek középső régiójára specifikus driver (NP6024-Gal4) segítségével támasztottuk alá. Ezzel a driverrel termeltettünk túl egy membrán fehérjéhez fúzionált GFP-t (mCD8-GFP), mely így kijelölte a fejlődés során legkésőbb létrejövő centrális nyúlványokat. Az ilyen jelöléssel készített keresztmetszeti képeken jól kivehető, hogy a dDAAM feldúsulás az

mCD8-GFP-vel kijelölt terület közepén van (27. ábra), tehát az általunk vizsgált formin valóban az újonnan létrejövő nyúlványokra specifikus kifejeződést mutat.

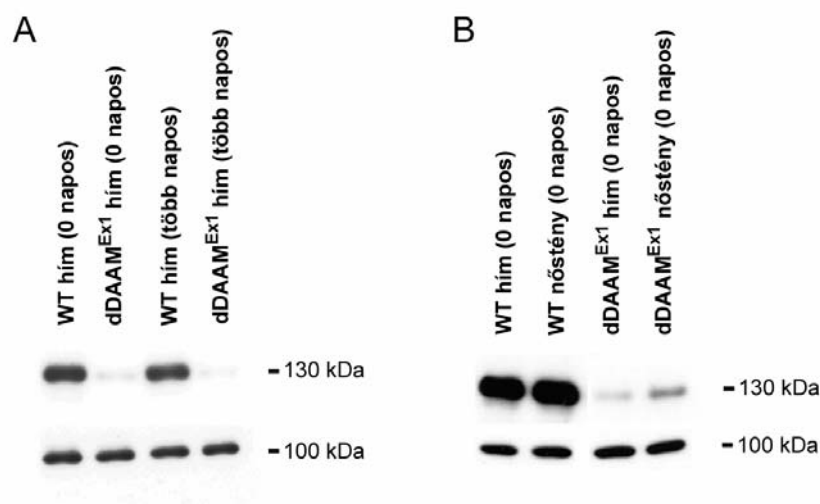


27. ábra A dDAAM fehérje lokalizációja a gombatest keresztmetszeti képén. Az adult gombatest különböző régióiról (α lebeny/A-C/, β lebeny /D-E/ és nyél /G-I/) készített keresztmetszeti képeken a dDAAM jól láthatóan az újonnan létrejött nyúlványokban mutat feldúsulást. A gombatest legutoljára létrejövő nyúlványait az NP6024-Gal4 driverrel túltermelt mCD8-GFP segítségével jelöltük ki.

Ez a felhalmozódás a frissen kikelő felnőtt állatokban jól látható, és még néhány napig megfigyelhető, az idősebb állatokban azonban teljesen eltűnik. Ez a megfigyelés azt a hipotézist támasztja alá, hogy a dDAAM a gombatestben elsősorban a nyúlványok képződéséhez szükséges, a folyamat végeztével azonban jelenléte feleslegessé válik és eltűnik a nyúlványokból. A gombatestre jellemző kifejeződési minta mellett a dDAAM fehérje elleni ellenanyaggal egy általános festődés figyelhető meg az agy neuropil, azaz nyúlvány-gazdag területein. Ez a festődés a több napos felnőtt agyban is jól kivehető, ami arra utalhat, hogy az agy gombatesten kívüli területein a dDAAM, az axonnövekedés mellett, a normális agyi működések fenntartásához is hozzájárulhat.

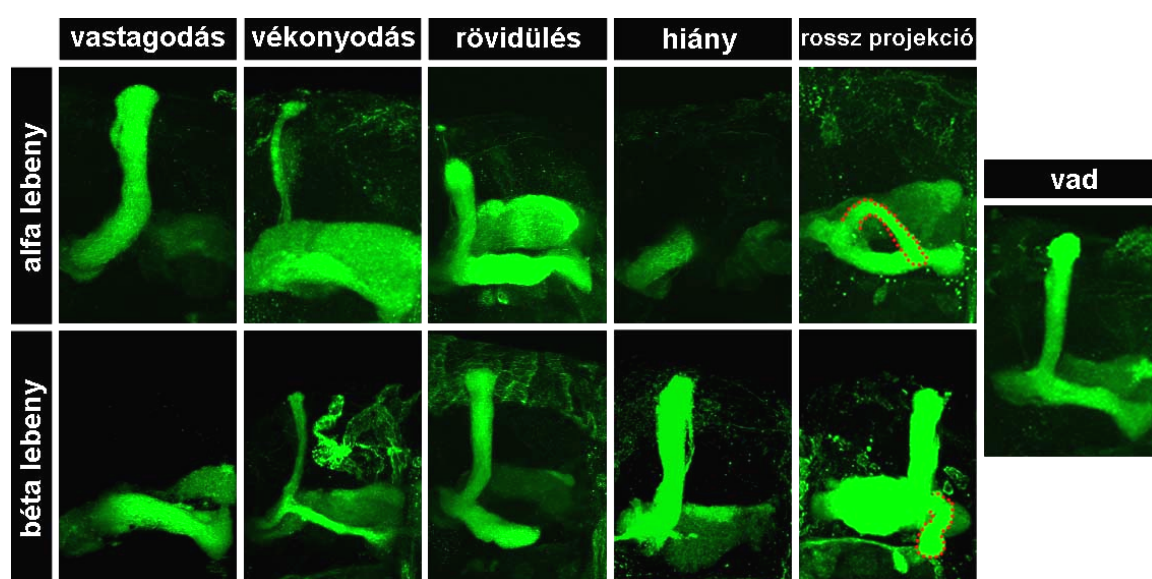
A *dDAAM* hipomorf mutánsok gombatestében axonnövekedési és navigálási hibák figyelhetők meg

A *dDAAM* fehérje kifejeződésének vizsgálata után meg szeretettük volna tudni, hogy milyen szerepe van a fejlődő agyban a nyúlványok növekedése során, modell rendszerül a gombatestet választva. A kezdeti funkcióvesztés vizsgálatok során a *dDAAM* gén egyik, már korábban, az embrionális kísérletek során is alkalmazott excíziós allélját, a *dDAAM^{Ex1}*-et használtuk. Ez a gén 3' régióját érintő delécio eltávolítja a *dDAAM* mRNS 3' UTR-jét és 36 bázispárt a kódoló részből. Az UTR hiánya ellenére, szemi-quantitatív RT-PCR-rel nem találtunk csökkenést a *dDAAM* mRNS mennyiségében a vad típushoz képest. Ezzel ellentétben, az adult agyból származó mintákat Western blot-tal vizsgálva jelentős csökkenés detektálható a mutáns fehérje szintjében (28. ábra), ami arra utal, hogy a mutáns fehérje jóval instabilabb a vad típushoz képest. Genetikailag a *dDAAM^{Ex1}*-es allél hipomorf, szemileltális allélként viselkedik, azonban homo- ill. hemizigótaként is életképes, így mind hímekben, mind nőstényekben vizsgálni tudjuk a mutáns allél hatását a gombatest szerkezetére.



28. ábra A *dDAAM^{Ex1}* hipomorf mutáns állatok agyában jelenlevő *dDAAM* fehérje mennyiségének vizsgálata Western blot segítségével. A homo- és hemizigóta *dDAAM^{Ex1}* állatok agyában jelentős csökkenés mutatható ki a *dDAAM* fehérje szintjében (130 kDa magasságban látható fehérje-sáv) a vad típusú állatokhoz (WT) képest. Belső kontrollként a glikogén-foszfóriláz ellenanyagot használtuk (100 kDa).

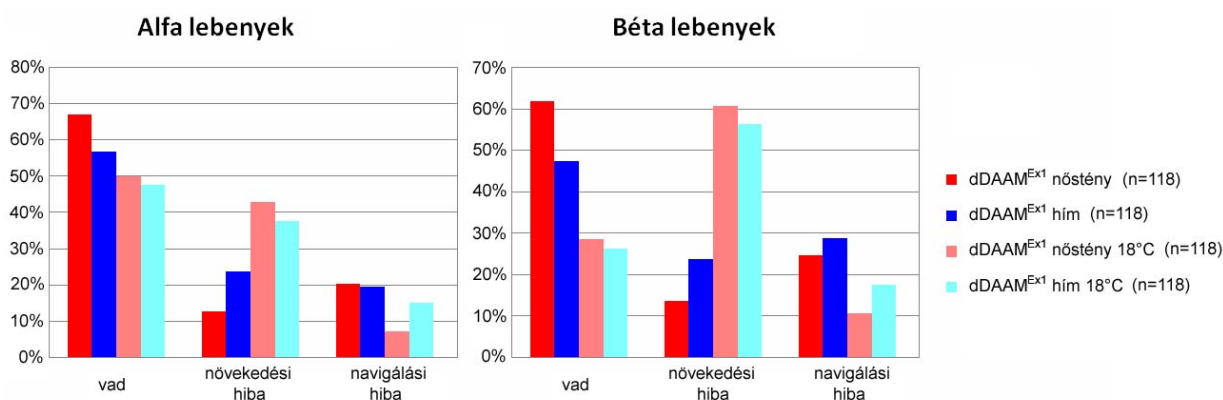
A korábban említett FasII markert használva azt találtuk, hogy a $dDAAM^{Ex1}$ mutáns gombatestek kb. felében különböző típusú axonnövekedési és projekciós/navigálási hibák figyelhetők meg. A nyúlványmintázatot érintő elváltozások között megfigyelhető volt nyúlvány vastagodás, vékonyodás, rövidülés, hiány és rossz helyre való projekció is mind az α , mind a β lebenyek esetében (29. ábra). Vizsgálataink során ezt az öt fenotípus kategóriát dokumentáltuk, de a könnyebb érthetőség kedvéért ezeket két fő csoportba soroltuk (növekedési hiba és navigálási hiba), és az alábbiakban eszerint tárgyalom őket. A növekedési hibák közé soroltuk a rövidülést, a vékonyodást és a hiányt, ez utóbbit akkor, ha nem párosult a másik lebenyt érintő vastagodással. A navigálási hibák közé számoltuk a vastagodást, a rossz helyre való projekciót, valamint a vékonyodást és hiányt, ha a gombatesthez tartozó másik lebenyben vastagodás volt megfigyelhető.



29. ábra A $dDAAM^{Ex1}$ állatok gombatestében megjelenő nyúlvánnövekedési és navigálási hibák. A gombatest fejlődése során a $dDAAM$ mutáns állatokban mind az α , mind a β lebenyekben megfigyelhetünk vastagodásokat, vékonyodásokat, rövidüléseket, hiányokat és rossz projekciót. Az α és β lebenyeket FasII festéssel tettük láthatóvá.

Az eredményeinket részletesebben analizálva elmondhatjuk, hogy míg a nőstények esetén 30-40%-ban kaptunk nyúlvánnövekedési és navigációs hibákat, addig a hímek esetében a

mutáns lebenyek aránya 40-50% volt (30. ábra). Érdekességgéppen elmondható, hogy mind a nőstények, mind a hímek esetében a β lebenyekben magasabb százalékban jelentek meg nyúlványnövekedési és navigálási hibák (30. ábra). A hímekben megfigyelhető erősebb fenotípus valószínűleg egy dóziskompensációs hibára utal, ami a *dDAAM*-hoz hasonlóan X kromoszómálisan elhelyezkedő mutánsok esetében gyakran tapasztalható. Ezzel összhangban kimutattuk, hogy a dDAAM fehérjéből kevesebb van a *dDAAM^{Ex1}*-es hímekben, mint a nőstényekben (28. ábra), ami egyben magyarázattal szolgál arra, hogy miért több a nyúlványnövekedési hiba a hímek gombatestjeiben.



30. ábra A hipomorf *dDAAM* mutánsokban előforduló fenotípusok penetranciájának számszerű ábrázolása. A *dDAAM^{Ex1}* homo- és hemizigóta állatok gombatestjeiben nyúlványnövekedési és navigálási hibákat találunk, mind az α , mind a β lebeny esetében. Ezek a nyúlványmintázatot érintő fenotípusok a hemizigótákban nagyobb százalékban fordulnak elő, mint a homozigótákban, illetve 18°C-on tartva az állatokat mind a hímekben, mind a nőstényekben megnő a mutáns lebenyek aránya.

Érdekes módon a *dDAAM* mutánsokat 18°C-on tartva, a nyúlványnövekedési hibák aránya magasabbnak adódott a 25°C-on, standard labor hőmérsékleten mért értékekhez képest (30. ábra). Ez arra utalhat, hogy a *dDAAM^{Ex1}*-es allélról képződő fehérje hidegérzékeny fehérjeként viselkedik a központi idegrendszerben, vagy esetleg az is elképzelhető, hogy 18°C-on a dDAAM fehérje hiánya jobban tolerálható az egyéb szövetekben, – ahol a

dDAAM-nak szintén fontos szerepe van a fejlődés folyamán - ezért javul az állatok életképessége, emellett azonban az idegi fenotípus valamelyest romlik.

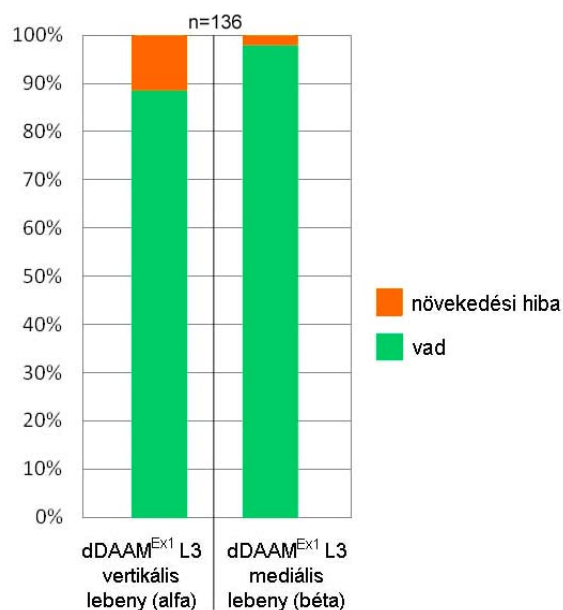
Az utóbb részletezett apróbb fenotípus eltérésekkel szemben lényeges megfigyelésnek tekinthetjük, hogy a *dDAAM^{Ex1}* mutánsokra jellemző axonnövekedési és navigálási hibák gyakorlatilag teljes mértékben menekíthetők a teljes hosszúságú dDAAM fehérje általános (*Act-Gal4*), ill. idegrendszer-specifikus (*Elav-Gal4*) túltermelésével (31.ábra). Ez egyrészt azt bizonyítja, hogy a gombatestet érintő növekedési és projekciós hibák kizárólag a *dDAAM* gén hiányának következményei, másrészt az idegrendszer-specifikus menekítés a dDAAM sejtautonóm működés módjára utal.



31. ábra Az FLDAAM túltermelés hatása a *dDAAM^{Ex1}* mutáns állatok gombatestében megjelenő növekedési és navigálási hibák arányára. Mind a nőstények, mind a hímek esetében a teljes hosszúságú dDAAM általános (*Act-Gal4*) vagy idegrendszer (*Elav-Gal4*) specifikus túltermelése képes volt menekíteni mindkét lebeny esetében a *dDAAM* mutánsokban megjelenő fenotípus kategóriákat.

A *dDAAM* fenotípus még teljesebb leírása érdekében arra kerestük a választ, hogy a *dDAAM* mutánsokban megfigyelhető növekedési hibák csak az α és β lebenyeket érintik-e, vagy detektálhatóak-e korábbi, más lebenyeket érintő nyúlványnövekedési defektusok. Ezeket a vizsgálatokat L3-as stádiumú mutáns lárvákön végeztük, ebben a stádiumban ugyanis még

többségében csak a γ neuronok axonjai vannak jelen, amelyek a mediális és a vertikális lebenyekbe tömörülnek. A lárvális mutáns agyakban is találtunk axonnövekedési hibákat, ezek penetranciája azonban a vertikális lebenyben csak 12%, míg a mediális lebenyben csupán 2% volt (32. ábra). Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a felnőtt állatok agyában megfigyelhető nyúlváynövekedési és navigációs hibák addicionális hatásra jönnek létre, mégpedig amiatt, hogy az újonnan létrejövő nyúlványok a korábban projektált nyúlványok mentén haladnak. Ha a korábban létrejött nyúlvány növekedése nem megfelelő, akkor az új nyúlvány sem a vad típusú minta szerint halad. Lárvális korban a nyúlváynövekedési hibák aránya még viszonylag alacsony, de ha hozzávesszük az esetleges későbbi hibás projekciókat is, akkor a felnőtt korban tapasztalt kb. 30-40%-os fenotípus arány reálisnak látszik.



32. ábra A *dDAAM^{Ex1}* mutánsokban megjelenő, a lárvális γ lebenyt érintő növekedési hibák aránya.

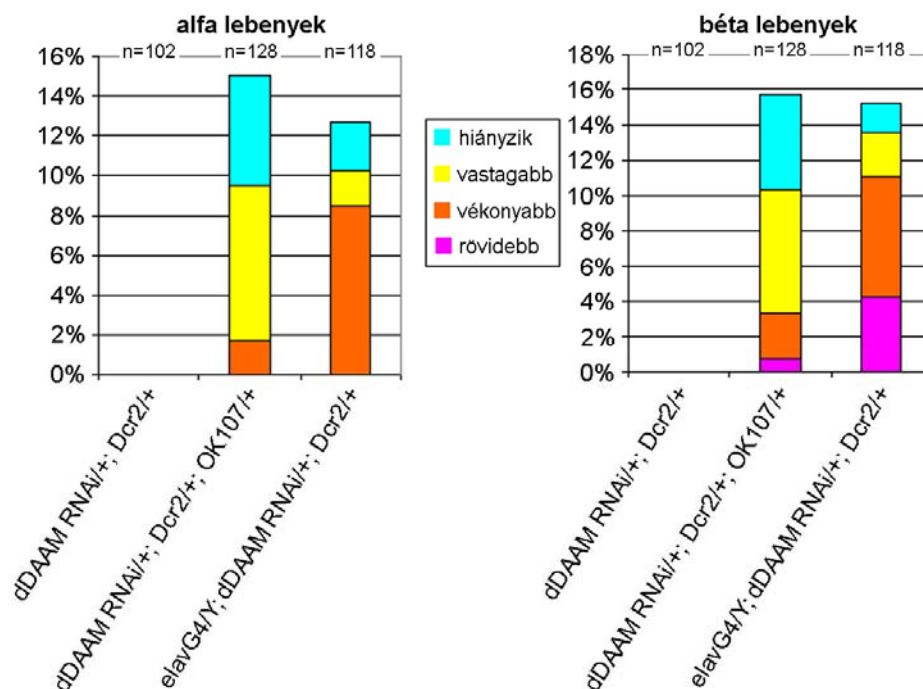
Az L3-as állatok agyában még jórészt a γ neuronok nyúlványai alkotják a vertikális és mediális lebenyeket. Ebben a stádiumban azonban csak néhány százalékban jelennek meg nyúlváynövekedési hibák.

Összegzésképpen elmondhatjuk, hogy a dDAAM fehérje nemcsak hogy jelen van a fejlődő adult agyban, de a gombatesten végzett kísérleteink alapján az újonnan létrejövő/létrejött nyúlványokban mutat erős, specifikus felhalmozódást. A *dDAAM* hiánya axonnövekedési és navigációs hibákat eredményez már a fejlődő lárvális és az adult idegsejtekben is, amelyek menekíthetőek a teljes hosszúságú fehérje túltermelésével. Ezek alapján egyrészt bizonyítottnak tekinthetjük, hogy a dDAAM minden fejlődési stádiumban

szerepet játszik a Kenyon sejt axonok megfelelő projekciójában, másrészt eredményeink azt is jelzik, hogy a *dDAAM* nem csak az embrionális idegrendszer fejlődéséhez nélkülözhetetlen, hanem az idegi differenciálódás általános faktorának tekinthető a muslicában.

A *dDAAM* RNSi mutánsok fenotípusa

A *dDAAM*^{Exl} hipomorf mutánsok analízise mellett kíváncsiak voltunk arra, hogy egy független módszerrel, RNS interferencia segítségével is lehetséges-e *dDAAM* fenokópiákat indukálni az idegrendszerben. A kísérlethez az idegrendszer-specifikus Elav-Gal4 és a gombatest-specifikus OK107-Gal4 drivereket használtuk, mely utóbbi a gombatest egész fejlődése során aktív expressziót biztosít a növekedő nyúlványokban. A kísérletek során a Dicer2-t is túltermeltettük, mivel hiányában a hosszú dsRNS-eken alapuló csendesítés hatékonysága minimalizálódik (esetünkben egyáltalán nem is működött). 25°C-on elvégezve a kísérletet, mindkét driver esetében 12-15%-os gyakorisággal tapasztaltunk nyúlványnövekedési és/vagy navigációs hibákat (33. ábra). A fenotipikus hatás viszonylag alacsony penetranciája valószínűleg azzal magyarázható, hogy az RNS interferencia 25°C-on sok esetben nem hatékony. 30°C-on elvégezve a kísérletet, az agyak mindegyikében megfigyelhető volt a nyúlványmintázatot érintő elváltozás, azonban az állatok életképessége erősen romlott, így csak néhány állatot tudtunk megvizsgálni. Mindazonáltal az RNS interferenciás kísérletek megerősítették a deléciós alléllal kapott funkcióvesztéses adatokat, és azok legfőbb konklúzióját, hogy a *dDAAM* fehérje fontos szerepet játszik az idegsejt-nyúlványok kialakításában.

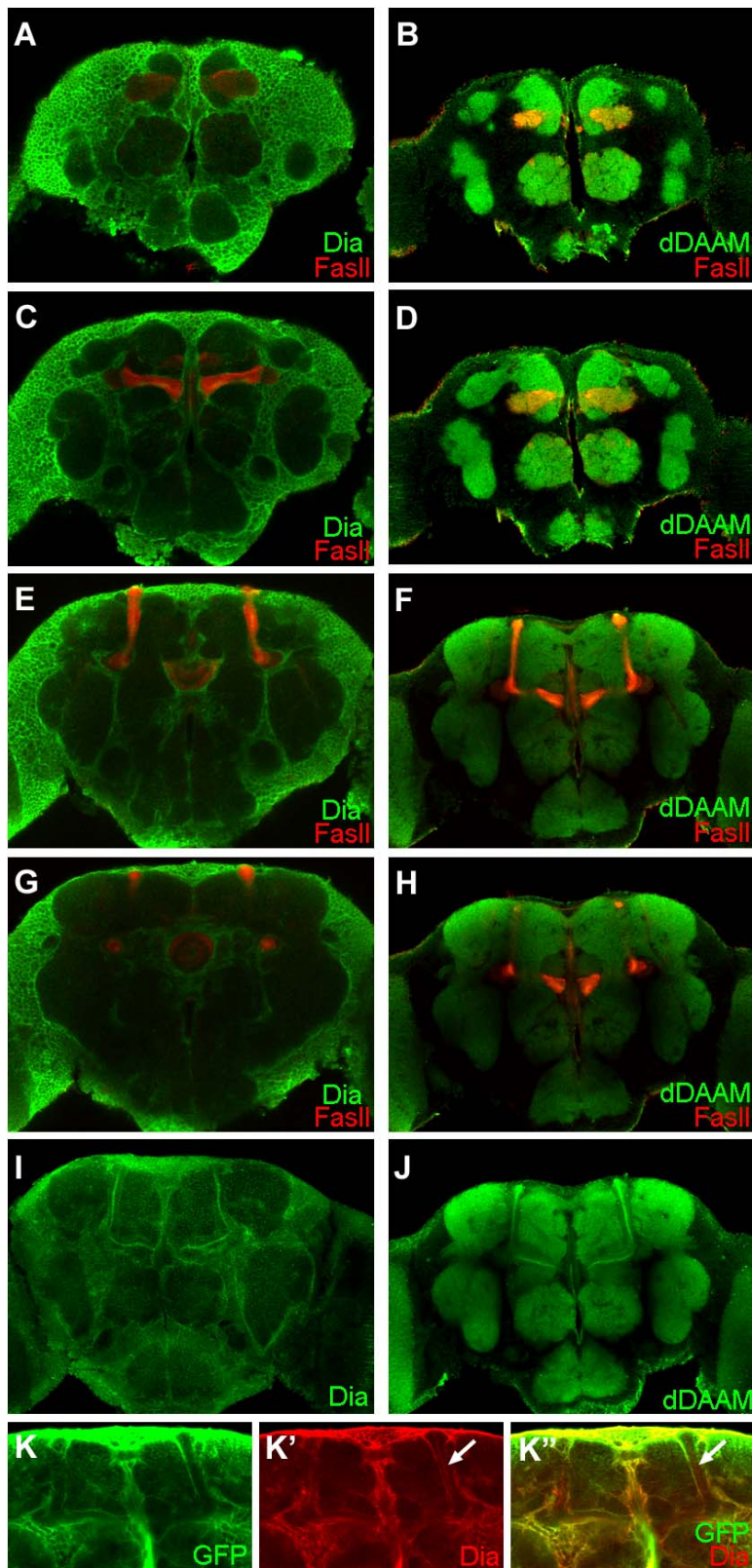


33. ábra A *dDAAM* RNSi mutánsok gombatest fenotípusainak előfordulási aránya. Mind az idegrendszer specifikus (Elav-Gal4), mind a gombatest specifikus (OK107-Gal4) driverrel túltermelve a *dDAAM*-ra specifikus RNS interferencia konstruktot, a gombatest lebenyeit érintő nyúlványnövekedési és navigálási hibákat tapasztalunk.

A *Drosophila Diaphanous* és a *dDAAM* kifejeződési mintájának összehasonlítása az adult agyban

Tekintve, hogy a *dDAAM*^{Ex1} mutánsok idegrendszeri fenotípusának nem 100%-os a penetranciája, felmerült a kérdés, hogy ez pusztán az allél hipomorf természetének köszönhető-e, vagy esetleg más formin típusú fehérje is szerepet játszhat a nyúlványnövekedésben a gombatest területén. Kezdetben a kifejeződési minták alapján próbáltuk ezt a kérdést megközelíteni, azonban a *Drosophila* genom által kódolt öt másik formin közül egyedül a Dia-ra tudtunk ellenanyagot beszerezni. Mivel ezzel a forminnal kapcsolatban korábban semmilyen, a gombatestet érintő lokalizációs vizsgálat nem jelent meg a szakirodalomban, kíváncsiak voltunk rá, hogy egyáltalán jelen van-e a gombatest nyúlványokban. Ezért első megközelítésben immunfestés végeztünk a rendelkezésünkre álló

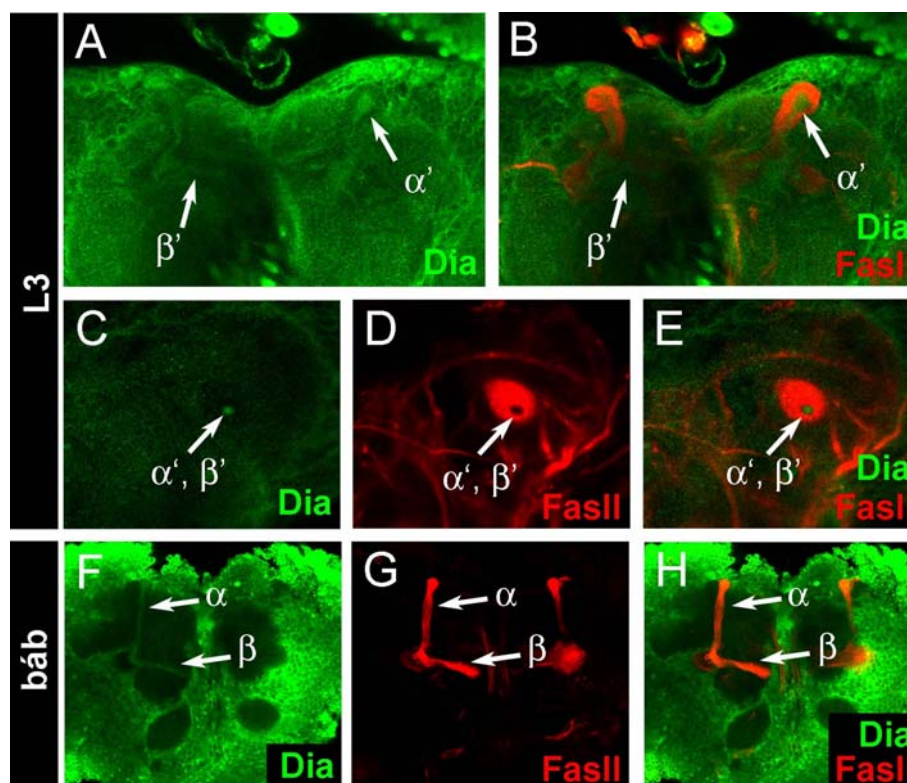
Dia elleni ellenanyaggal, FasII ellenanyagossal festés mellett. A festés alapján elmondhatjuk, hogy a Dia a DAAM-hoz képest komplementer expressziót mutat a felnőtt agyban, egyetlen kivétellel, mégpedig a gombatest lebenyek középső részén futó nyúlványokban, ahol is ennek a két formának átfedő a mintázata (34. ábra). A képek alapján a Dia fehérje a glia sejtekben van jelen nagy mennyiségben, ezt alátámasztja a glia-specifikus *repo-Gal4* driverrel túltermelt mCD8-GFP mintázat is, amivel a Dia teljes átfedést mutat. Emellett azonban a gombatest α/β lebenyeinek közepén projektáló nyúlványokban is viszonylag erős expresszió figyelhető meg, melyek biztosan nem glia sejtek, mivel a markerként használt glia-specifikus GFP minta erről a területről hiányzik (34. ábra K, K', K''). Ez a központi lokalizáció nagyon hasonló a dDAAM fehérjéhez, ami arra enged következtetni, hogy a dDAAM fehérje mellett a Dia is jelen van a gombatest nyúlványainak növekedése során az éppen projektáló nyúlványokban.



34. ábra A Dia és a dDAAM lokalizációjának összehasonlítása *Drosophila* agyban. A Dia az adult agyban főleg glia specifikus lokalizációt mutat (A, C, E, G, I) ellentétben a dDAAM-mal mely a neuropil régiókban mutat erős felhalmozódást, tehát expressziója nyúlvány-specifikus (B, D, F, H, J). Mind a két fehérje megtalálható azonban a gombatest α/β lebenyeinek központi részén futó újonnan létrejött nyúlványokban. Ez a központi felhalmozódás a Dia esetében sem gliasejt specifikus, mert a repo-Gal4 glia-specifikus driverrel túlexpresszált mCD8-GFP jelölés nem jelenik meg az α/β lebenyek központi régiójában (K, K', K'').

Ezzel összhangban, a Dia kifejeződése az újonnan létrejött nyúlványokban az összes fejlődési stádiumban hasonló a dDAAM-éhoz (35. ábra).

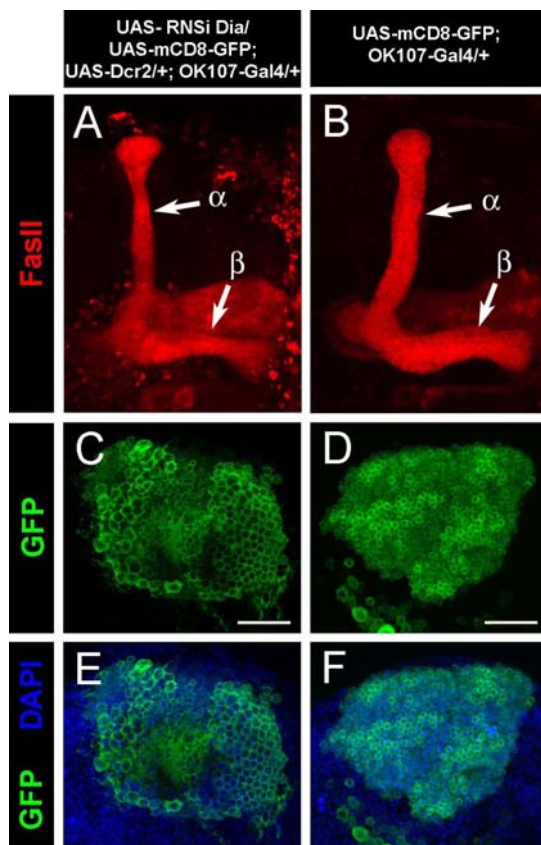
A Dia ellenanyaggal elvégzett immunhisztokémiai vizsgálatok alapján tehát elmondhatjuk, hogy a *Drosophila* agyban a Dia a dDAAM-mal ellentétben nem mutat általános nyúlvány-specifikus lokalizációt. Egyetlen kivételt a gombatest területe jelent, ahol az aktuálisan projektáló, újonnan létrejövő nyúlványokban a Dia a dDAAM-hoz hasonlatos erős felhalmozódást mutat. Ez a tény felvetette azt a lehetőséget, hogy nem csak a dDAAM-nak, de a Dia-nak is szerepe lehet a Kenyon sejtek nyúlványainak növekedésében.



35. ábra A Dia lokalizációja a különböző fejlődési stádiumokban a gombatest területén. A dDAAM-hoz hasonlóan a Dia is feldúsulást mutat a növekvő nyúlványokban a fejlődő gombatest területén, mind a lárvális, mind a báb stádiumokban.

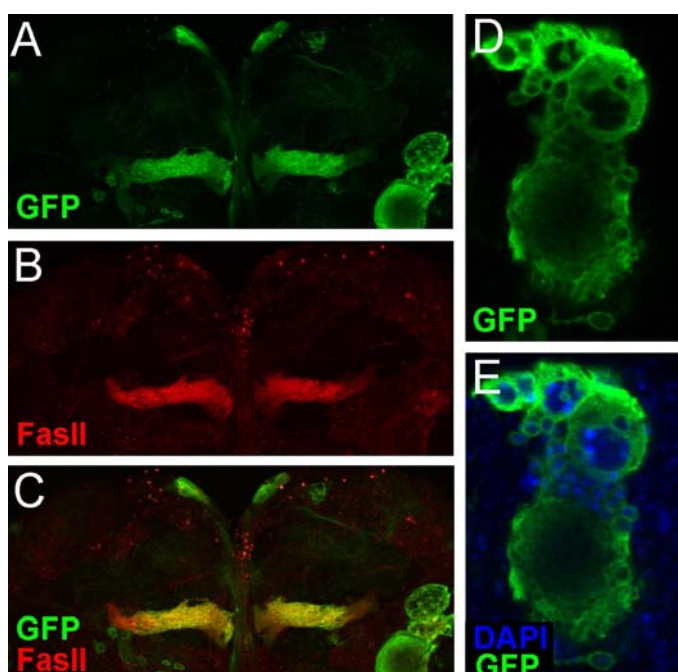
A Dia szerepe a Kenyon-sejtekben

Miután azt találtuk, hogy a Dia fehérje a gombatestben jelen van a növekvő idegsejtnyúlványokban, meg akartuk vizsgálni mi lehet a Dia szerepe a Kenyon-sejtekben, valóban köthető-e például az axonok növekedéséhez. A funkcionális vizsgálatokat kezdetben nehezítette, hogy nem állt rendelkezésünkre homozigóta formában életképes hipomorf allél, míg a funkcióvesztéses allélok heterozigóta formában nem okoztak nyúlványmintázatot érintő elváltozást. Ezt a problémát kiküszöbölendő, RNS interferencia konstrukciók segítségével próbáltuk a *dia* szerepét megérteni. A *dia* gén idegrendszer-specifikus csendesítésének hatására 19%-ban megjelenő nyúlvány-vékonyodás, illetve nyúlványhiány volt megfigyelhető (38. ábra), azonban nem tapasztaltunk sem egyértelmű navigálási (vastagodás, rossz projekció), sem egyértelmű nyúlványnövekedési (rövidülés) hibákat. Ezek az eredmények egybevágnak azokkal a korábbi, mutáns klónok analízisén alapuló megfigyelésekkel miszerint, a *dia* a Kenyon-sejtek osztódásához szükséges, de a nyúlványok növekedéséhez nem (Ng és Luo, 2004). Az általunk megfigyelt lebeny vékonyodások, illetve hiányok is jól magyarázhatók a Dia sejtosztódásban betöltött funkciójával, hiszen ha a Dia hiányában a sejtosztódás megáll, kevesebb Kenyon-sejt, és így kevesebb axon lesz jelen a gombatestben. Ennek az elképzelésnek az igazolására mCD8-GFP jelölés mellett termeltettük túl gombatest-specifikusan (OK107-Gal4) a *dia* géntermékre specifikus dsRNS-t. A kísérletet 25°C-on és 30°C-on is elvégezve, mindkét hőmérsékleten nyúlvány-vesztéseket (lebeny-vékonyodás és -hiány) találtunk, 25°C-on egy enyhébb, csak nagyrészt az α és β lebenyeket érintő nyúlványhiány volt tapasztalható (36. ábra), míg 30°C-on csak a γ neuronok nyúlványainak egy csoportja fejlődött ki, azokban azonban sem rövidülés, sem projekciós hiba nem volt megfigyelhető (37. ábra).



36. ábra A *dia* RNSi mutánsok fenotípusa a gombatestben. A *dia* gén gombatest-specifikus csendesítése 25°C-on, az α és β lebenyek vékonyodásához vezet (A, B). A Kenyon sejtek vizsgálata során megfigyelhető, hogy a sejttestek jóval nagyobbak (C, E), mint a vad típusú gombatestben (D, F), ami arra enged következtetni, hogy a sejtekben nem történt meg a citokinézis. (Nagyobb nagyítás mellett látszik, hogy a sejtek több sejtmaggal rendelkeznek.) A Kenyon sejtek membránjait a membrán kötött mCD8-GFP fehérje túltermelésével jelöltük ki, az α és β lebenyek vizsgálatához FasII festést használtunk. A skála mérete 20 μ m.

A Kenyon sejteket DAPI festés mellett vizsgálva jól kivehető volt, hogy a sejtek osztódási fázisában nem történt meg a citokinézis és így többmagvú sejtek jelentek meg (36. ábra). Ez a fenotípus a 30°C-on történő túltermelés esetén volt a legerősebb, ahol többmagvú óriássejtek jöttek létre, ezek nyúlványai azonban normális lefutást mutattak (37. ábra).



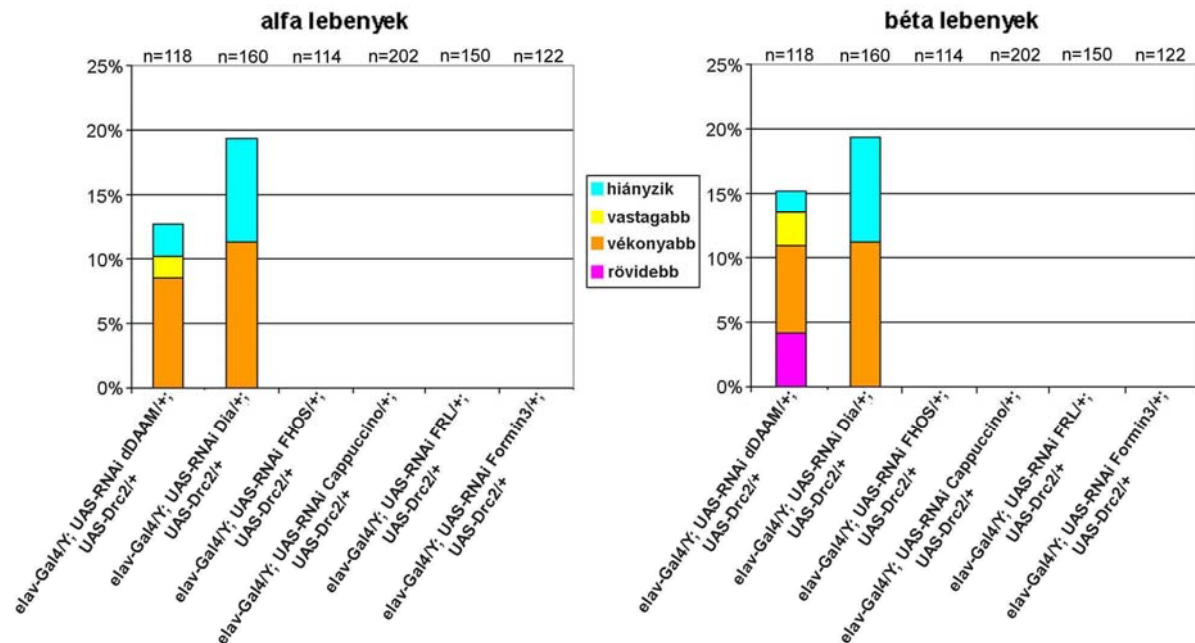
37. ábra A *dia* gén 30°C-on történő csendesítésének hatása a gombatest szerkezetére. Gombatest-specifikus driverrel 30°C-on lecsökkentve a *dia* géntermék szintjét erős sejtosztódási hibákat figyelhetünk meg, óriás többmagvú sejtek jönnek létre (D,E). Ezzel együtt a γ lebenyek kivételével, az összes gombatest-lebeny hiányzik az agyból, tehát az ezekhez tartozó idegsejtek valószínűleg már nem is jöttek létre (A-C).

Ez az eredmény teljes mértékben összhangban áll azzal a hipotézissel, hogy a Dia-nak csak a sejtosztódásban van szerepe, azonban még így is felmerül a kérdés, hogy a Dia valóban nem vesz részt az axonnövekedés szabályozásában, vagy csak a sejtosztódás folyamata érzékenyebb a Dia hiányára, így már nem is keletkeznek olyan sejtek, amelyekben vizsgálni lehetne a (későbbi) nyúlványnövekedési funkciót. A kérdés tisztázása érdekében a *201Y-Gal4* drivert használtunk, és ezzel termeltettük túl az RNS interferencia konstrukciót. Ez a driver az OK107-hez hasonlóan gombatest specifikus, ezen belül azonban csak az α/β és γ sejtekben aktív. Fontos jellemzője emellett, hogy ún. posztmitotikus driver, így segítségével a sejtosztódások befejeződése után vizsgálható a Dia hiányának hatása. Ezekben az agyakban sem találtunk azonban nyúlványnövekedési hibákat, az egyetlen megfigyelhető, 10%-ban előforduló elváltozás az volt, hogy a β nyúlványok nem terminálódtak az agy középvonalánál, hanem átnyúltak azon. Ez a megfigyelés arra utal, hogy ha van is szerepe a Dia-nak a nyúlványok növekedésében, akkor az a nyúlványnövekedés leállításában lehet, tehát ebben a vonatkozásban ellentétes szerepet játszik mint a dDAAM. Ennek a jelentősége és pontos mechanizmusa azonban egyelőre még nem világos.

A formin típusú fehérjék közül a dDAAM az egyetlen, amely a gombatest nyúlványok növekedésének pozitív szabályozója.

Az imént összefoglalt eredmények alapján a Dia kifejeződik ugyan a gombatestben, de szerepe elhanyagolhatónak látszik az axonnövekedés szempontjából. Kíváncsiak voltunk azonban arra, hogy más formin fehérjéknek van-e szerepe a gombatest nyúlványok növekedésében. Ennek vizsgálatára beszereztük azokat az RNS interferencia vonalakat, amelyek a *dia*-n és a *dDAAM*-on kívüli másik négy *Drosophila* formin gén (*capu*, *form3*, *Fhos*, CG6807) csendesítésére alkalmasak. Ezek az ún. második generációs VDRC vonalak, amelyek egymással jól összehasonlíthatóak, hiszen úgy hozták őket létre, hogy az RNS

interferencia konstrukciókat a phiC31 integráz rendszer segítségével mindig ugyanarra a kromoszómális helyre építették be. Ez az integrálódási hely a második kromoszóma bal karjának 22019296-os pozíciójában van, ami a neuronokban jól hozzáférhető, így megfelelő expressziót biztosít az idegrendszeri vizsgálatokhoz (Keleman és mtsai., 2009).



38. ábra A *Drosophila* formin gének RNSi mutánsai által okozott gombatest fenotípusok penetranciája. A *Drosophila* forminok idegrendszer-specifikus csendesítése során csak a dDAAM és a Dia esetében találtunk eltéréseket a gombatest nyúlványmintázatában. Ezek az eltérések a már korábban megfigyelt elváltozások voltak (a dDAAM esetében növekedési és navigációs hibák, míg a dia esetében sejtosztódásra utaló vékonyodások és hiányok).

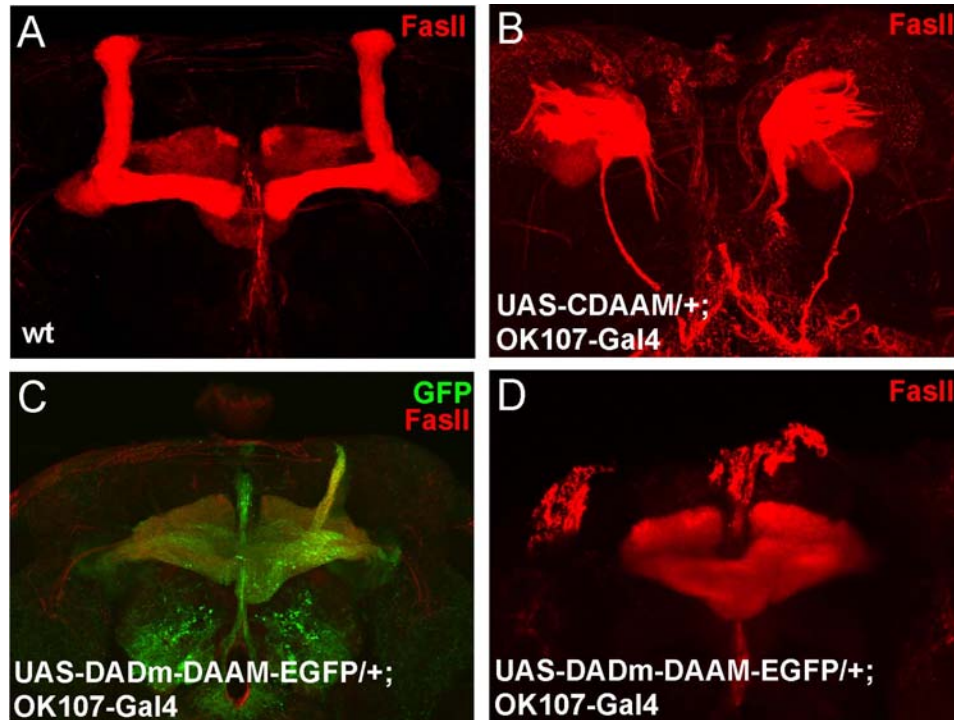
Ezekkel az RNS interferencia konstrukciókkal idegrendszer specifikusan (Elav-Gal4) lecsökkentve a megfelelő formin géntermékeket, azt találtuk, hogy a *dia*-n, és a *dDAAM*-on kívül egyetlen másik forminnak sincs szerepe a gombatest nyúlványok kialakításában (38. ábra). A *dDAAM* esetében 13-15%-os nyúlványmintázatot érintő elváltozást detektáltunk, míg a *dia* esetében 19% körül volt az elváltozások aránya (38. ábra). Korábbi adatainkkal egyezően, ezek a *dDAAM* esetében növekedési és navigációs hibák, míg a *dia* esetében sejtosztódási defektekre utaló hibák voltak, amelyek mellett sem nyúlványnövekedési, sem

navigációs problémára utaló fenotípusokkal nem találkoztunk. Ily módon a forminokkal elvégzett RNS interferenciás vizsgálatok arra utalnak, hogy a dDAAM az egyetlen olyan formin típusú aktin összeszerelő faktor, amely a gombatest axonok növekedésének pozitív regulátora.

A funkciónyeréses vizsgálatok is alátámasztják, hogy a dDAAM a Kenyon sejt nyúlványok növekedésének pozitív regulátora

A funkcióvesztéses vizsgálatok után kíváncsiak voltunk arra, hogy a dDAAM konstitutívan aktív formáinak túltermelése hatással van-e a gombatest nyúlványmintázatára. Az embrionális idegrendszeri vizsgálatokhoz használt CA formákat használtuk ebben az esetben is, és gombatest specifikusan termeltettük túl a CDAAM-ot és a DADm-DAAM-ot. Mindkét forma túltermelése hatással volt a nyúlványmintázatra, de eltérő módon. Míg a CDAAM esetében a túltermelés hatására a Kenyon sejtek környezetében egy amorf nyúlványmintázat jelent meg (39. ábra B), addig a DADm-DAAM jelenléte az α lebenyek teljes, vagy részleges hiányát, illetve a β lebenyek vastagodását és fúzióját eredményezte (39. ábra C és D). A CDAAM esetében az okozott fenotípust valószínűleg most is visszavezethetjük a CDAAM lokalizációs hiányosságára, így egy irányítatlan aktin polimerizáció következtében a nyúlványok a sejttest közelében rossz irányban, teljesen struktúrátlanul kezdenek el projektálni. Ezzel szemben a DADm-DAAM túltermelése egy kevésbé drasztikus elváltozást eredményez a nyúlványmintázatban, amely arra utalhat, hogy ennek a csonkolt formának a szabályozása közelebb lehet ugyan a vad típushoz (pl. a sejten belüli lokalizáció szempontjából), mint a CDAAM-hoz, de ez a reguláció sem tökéletes az aktin polimerizáció szempontjából, így a nyúlványmintázat sérül. Jellemző módon, a nyúlványok növekedése a β lebeny estében nem fejeződik be az agy középvonala előtt, hanem azon túlhaladnak. A konstitutívan aktív formák vizsgálata tehát a gombatest esetében is hasonló konklúzióval zárult, mint az embriók

esetében, és megerősítette, hogy a dDAAM-nak egyértelműen fontos és instruktív szerepe van a gombatestet alkotó idegsejt nyúlványok növekedésében.

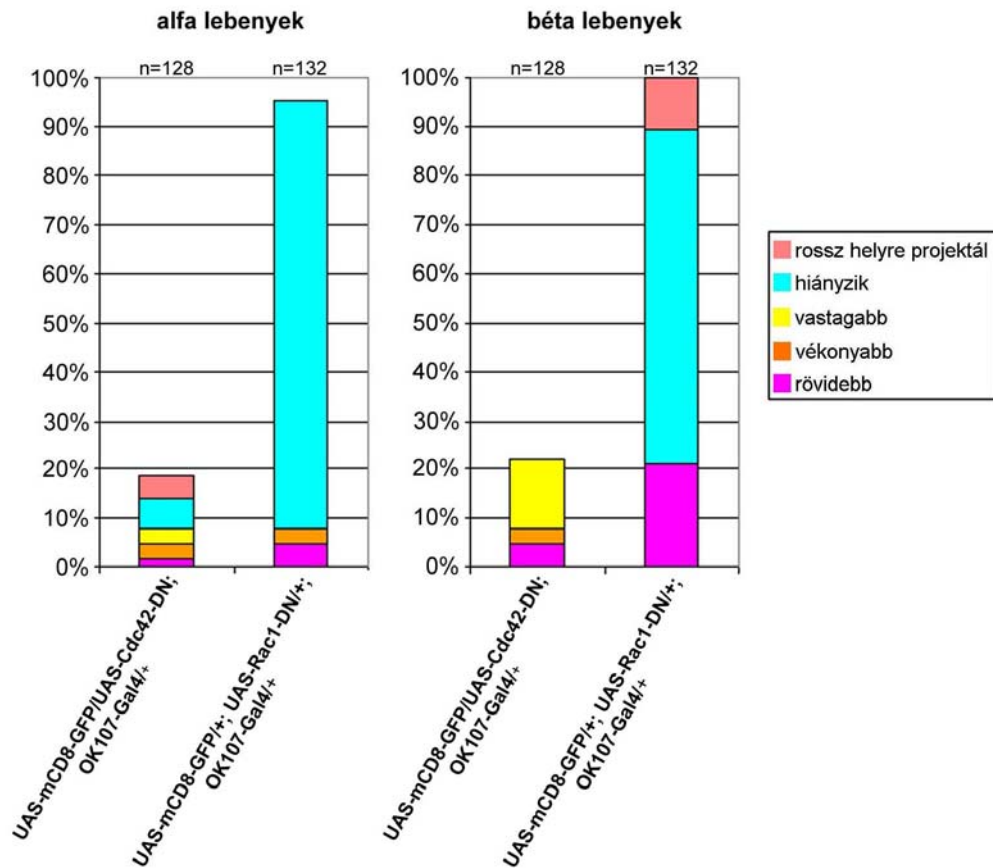


39. ábra A konstitutívan aktív dDAAM formák gombatest-specifikus túltermelésének hatása a gombatest nyúlványmintázatára. A CDAAM konstitutívan aktív forma hatására a Kenyon sejtek környezetében egy amorf nyúlványmintázat jelenik meg (B). A DADm-DAAM forma túltermelésével a β lebenyek fúziója (C és D), és az α lebenyek teljes (D), vagy részleges hiánya figyelhető meg (C). (wt : vad típusú gombatest)

A Rho típusú kisGTPázok szerepének vizsgálata a gombatestben domináns negatív formáik szövetspecifikus túltermelésével

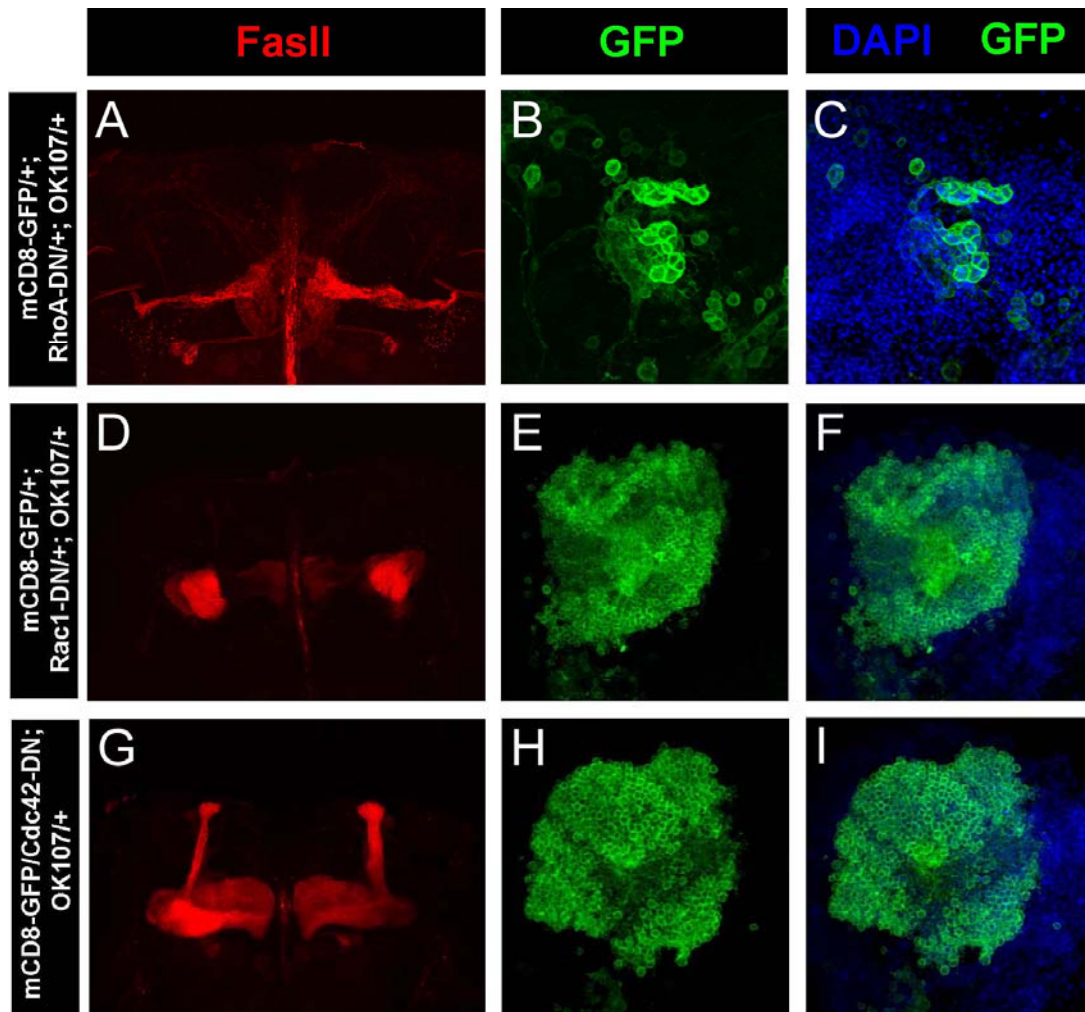
Mind a Diaphanous, mind a dDAAM a DRF (Diaphanous-Related Formins) forminok családjába tartoznak. Ennek a családnak az egyik közös jellemzője, hogy Rho típusú kisGTPázok kötődése szükséges a forminok aktiválódásához, ezek alapján érdekesnek találtuk megnézni, hogy a két formint vajon melyik kisGTPáz aktiválja a gombatest területén. A kisGTPázok vizsgálatának egyik elterjedt eszköze a domináns negatív (DN) formák használata, ezek gombatest-specifikus túltermelésével a kisGTPázok hatása specifikusan gátolható. A kisGTPázok domináns negatív formái hordoznak egy pontmutációt, mely miatt nem képesek a GDP-t GTP-re cserélni, így inaktív formában maradnak, ellenben képesek megkötni az aktivátoraikat, melyek aztán így kitittrálódnak a sejtéből, és nem képesek aktiválni az endogén kisGTPázokat. Mivel a kisGTPázokat érintő mutációk homozigóta formában általában letálisak, a domináns negatív formák használata bizonyos esetekben célszerűbb lehet a klasszikus allélokkal szemben, hiszen lehetőséget adnak arra, hogy szövetspecifikusan tudjuk vizsgálni a kisGTPáz funkcióvesztéses hatásait.

Vizsgálatainkhoz minden *Drosophila* Rho kisGTPázra beszereztünk UAS szekvencia mögé ültetett - tehát szövetspecifikus túltermelésre alkalmas - domináns negatív formát hordozó vonalakat. Gombatest specifikus OK107-Gal4 drivert használva minden esetben keltek ki a mutáns kisGTPáz túltermelő állatok, így a különböző kisGTPázok hatása vizsgálható volt. A domináns negatív formák túltermelésével változatos gombatestet érintő fenotípusokat kaptunk. A Rac1 esetében erős nyúlványnövekedési hibák voltak megfigyelhetők (41. ábra D-F), míg a Cdc42 esetében szintén tapasztaltunk növekedési és navigációs hibákat (41. ábra G-I), ám korántsem olyan magas százalékban, mint a Rac1 esetében, ahol közel 100%-os volt a penetrancia (40. ábra).



40. ábra A Cdc42 és a Rac1 DN formái által okozott gombatest fenotípusok penetranciája. A Rac1 domináns negatív formájának hatására majdnem 100%-os előfordulással nyúlvánnövekedési hibák jelennek meg, míg Cdc42 domináns negatív formája csak kb. 20%-ban okoz növekedési és navigálási hibákat.

A RhoA-DN forma túltermelésének hatására csak igen kevés utód élt túl, azonban azok mindegyike erős sejtsztódási hibát mutatott, nagyon hasonló módon a *dia* 30°C-on történő csendesítéséhez. Ezekben a gombatestekben is csak néhány nyúlvány volt megfigyelhető, az osztódási hibák miatt pedig a sejtszám is erősen lecsökkent (41. ábra A-C). A tapasztalt sejtsztódást érintő fenotípus arra utal, hogy a Dia-át a Kenyon-sejtekben feltételezhetően a RhoA aktiválja, míg az axonnövekedési/navigálási hibák alapján a dDAAM potenciális aktivátoraként főként a Rac típusú GTPázok és kisebb mértékben a Cdc42 jöhetnek szóba.

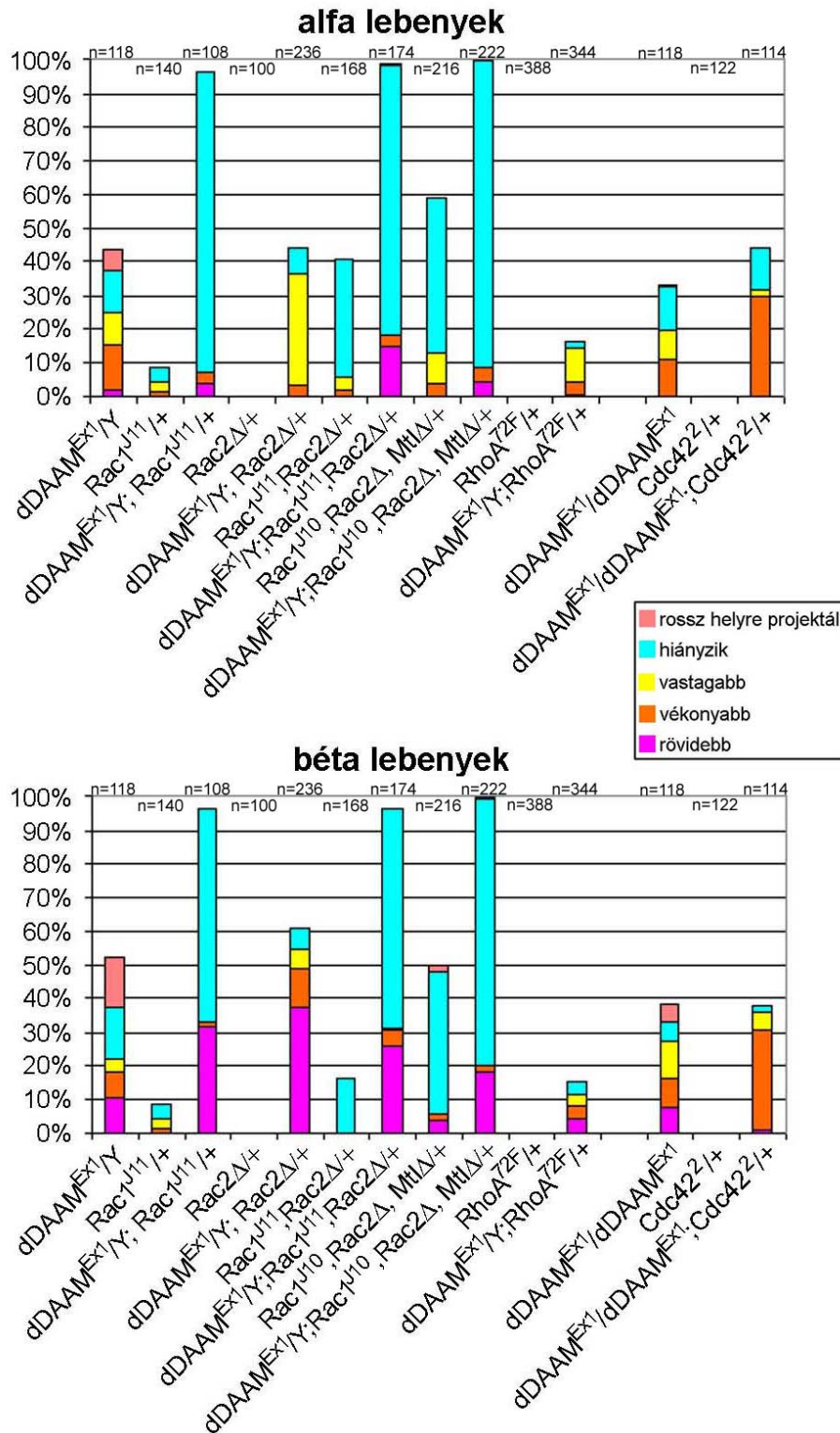


41. ábra A Rho típusú kis GTPázok domináns negatív formáinak gombatest specifikus túltermelése során jelentkező fenotípusok. A RhoA domináns negatív formája sejtosztódási hibákat okoz a Kenyon sejtek osztódása során, mely így a sejtek és a nyúlványok számának erős csökkenéséhez vezet (A-C). A Rac kisGTPáz domináns negatív formájának hatására jelentős nyúlványnövekedési hibák jelennek meg (D-F). A domináns negatív Cdc42 túltermelése gyenge nyúlványnövekedési és navigációs hibákkal párosul (G-I).

A Rac kisGTPázok domináns genetikai interakciót mutatnak a *DAAM^{ExI}* alléllal

Annak érdekében, hogy megtudjuk, mely kisGTPáz felelős a DAAM aktivációjáért a gombatest kialakulása során, genetikai interakciós vizsgálatokat végeztünk a Rho típusú GTPázokkal. A *RhoA*, *Rac1*, *Rac2*, *Mtl* és *Cdc42* gének alléljait teszteltük. Az idegrendszer érintő korábbi vizsgálatok alapján ismert volt, hogy mind a Rac GTPázoknak, mind a Cdc42-nek szerepe van a megfelelő idegi mintázat kialakításában (Ng és Luo, 2004.). Ezzel szemben, mutáns klónok analízise alapján, hasonlóan az általunk domináns negatív formákkal elvégzett kísérletekhez, azt találták, hogy a RhoA GTPáz muslicában nem szükséges az axonok növekedéséhez, ellenben szerepet játszik a neuroblasztok osztódásában és szabályozza a dendritek növekedését (Lee és mtsai, 2000).

A kisGTPáz mutánsokkal *DAAM^{ExI}* mutáns háttéren elvégzett domináns genetikai interakciós vizsgálatok alapján jól látszik, hogy míg a *RhoA* allélje szupresszálni látszik a nyúlványnövekedési hibákat (42. ábra), addig a Rac kisGTPázokkal egy erős dózis-függő genetikai interakciót találtunk, mely során már a *Rac1* egy kópiájának hiánya is jelentősen megnövelte a nyúlványnövekedési hibák számát a gombatest területén, azonban mindhárom Rac kisGTP gén-dózisának csökkenése mellett a mutáns lebenyek száma 100%-ra nőtt (42. ábra). Ezzel szemben a *Cdc42* allél nem mutatott kölcsönhatást (42. ábra). Ezek az eredmények ismételten megerősítik korábbi következtetésünket, miszerint az embriókhoz hasonlóan a felnőtt agy Kenyon sejtjeiben is főként a Rac típusú kisGTPázok aktiválják a dDAAM fehérjét.

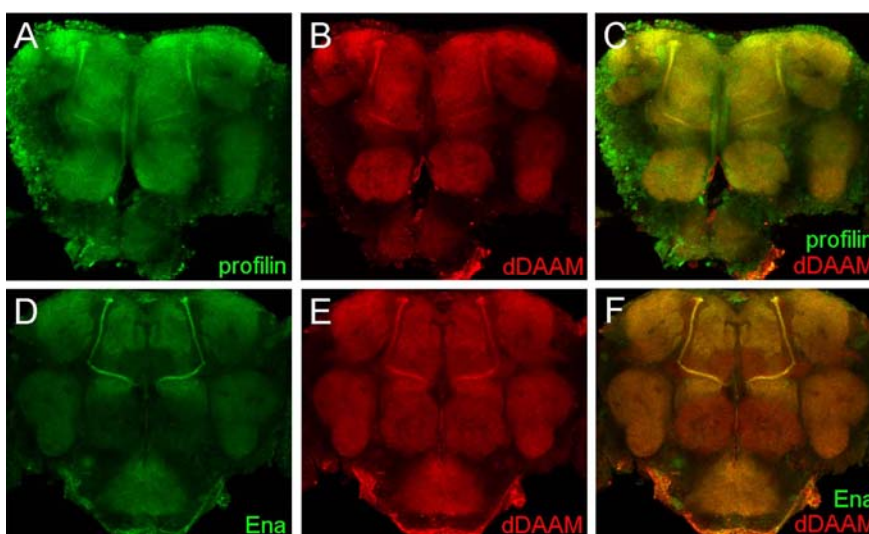


42. ábra Genetikai interakciós vizsgálatok eredményei a Rho típusú kisGTPázok alléljaival.

A *dDAAM^{Ex1}* allél domináns interakciót mutat a *Rac* kisGTPázok alléljeivel, míg *Cdc42* alléljével nincs kölcsönhatás. Ezzel szemben a *RhoA* funkcióvesztéses allélje szupresszálja a *dDAAM* hiányában fellépő nyúlványnövekedési és navigációs hibákat.

A dDAAM a Profilinnal és az Ena-val együttműködve szabályozza a nyúlványok növekedését a gombatestben

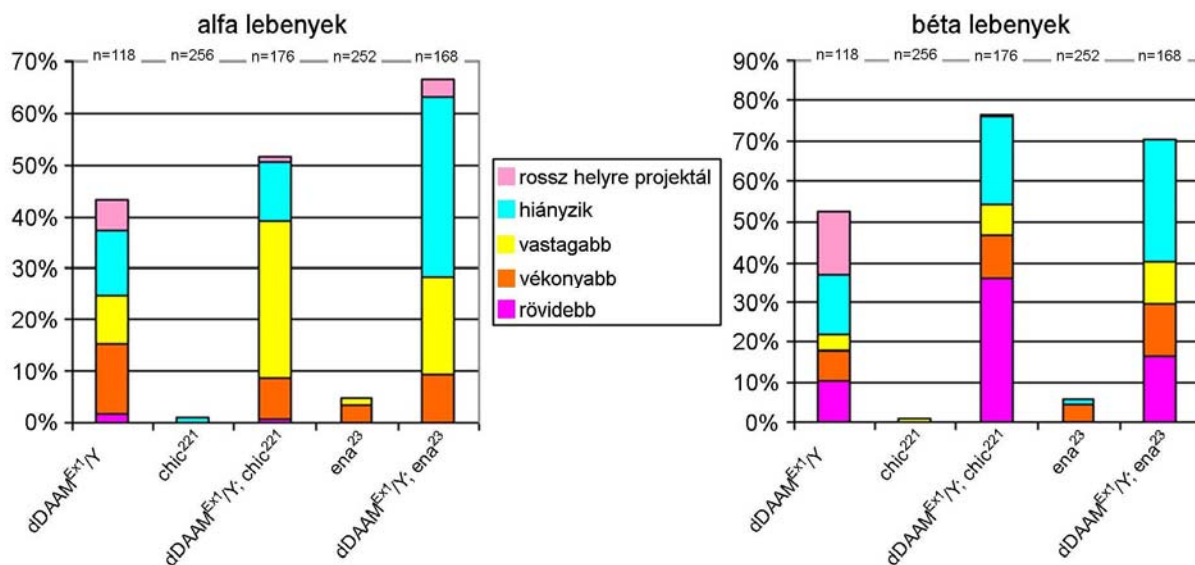
Már az embrionális vizsgálatok során felmerült, hogy a dDAAM vajon együttműködik-e a Profilin és az Ena fehérjékkel a nyúlválynövekedés során. Az adult agyon elvégzett ellenanyagos festések is arra utalnak, hogy ezek a fehérjék a gombatest axonok növekedése során is együttműködnek. Mindhárom fehérje a lebenyek közepén mutat erős feldúsulást, és a dDAAM mintával mindkét (Ena és Profilin) fehérje lokalizációja átfedő (43. ábra).



43. ábra A Profilin és az Ena lokalizációja az adult agy területén. Mind a Profilin , mind az Ena fehérje a nyúlvány-gazdag (neuropil) régiókban mutat feldúsulást, emellett a dDAAM erős kolokalizációt mutat mindkét fehérjével a gombatest területén az újonnan létrejött nyúlványokban.

Ezek után elvégeztük az interakciós vizsgálatokat, mely mindkét gén alléljának esetében interakciót mutatott, bár ez az interakció inkább minőségi, mint mennyiségi hatás volt. A Profilin esetében a β lebenyekben jobban nőtt a mutáns lebenyek aránya és a nyúlválynövekedési hibák száma megháromszorozódott (44. ábra), míg az Ena esetében inkább az α lebenyek voltak érintettebbek, melyekben a hiányok száma többszörösére nőtt (44. ábra). Összegésében mindkét gén esetén tapasztaltunk fenotípus erősödést, ami arra utal,

hogy ezek a fehérjék a gombatest területén is együttműködnek a nyúlványok növekedése során.



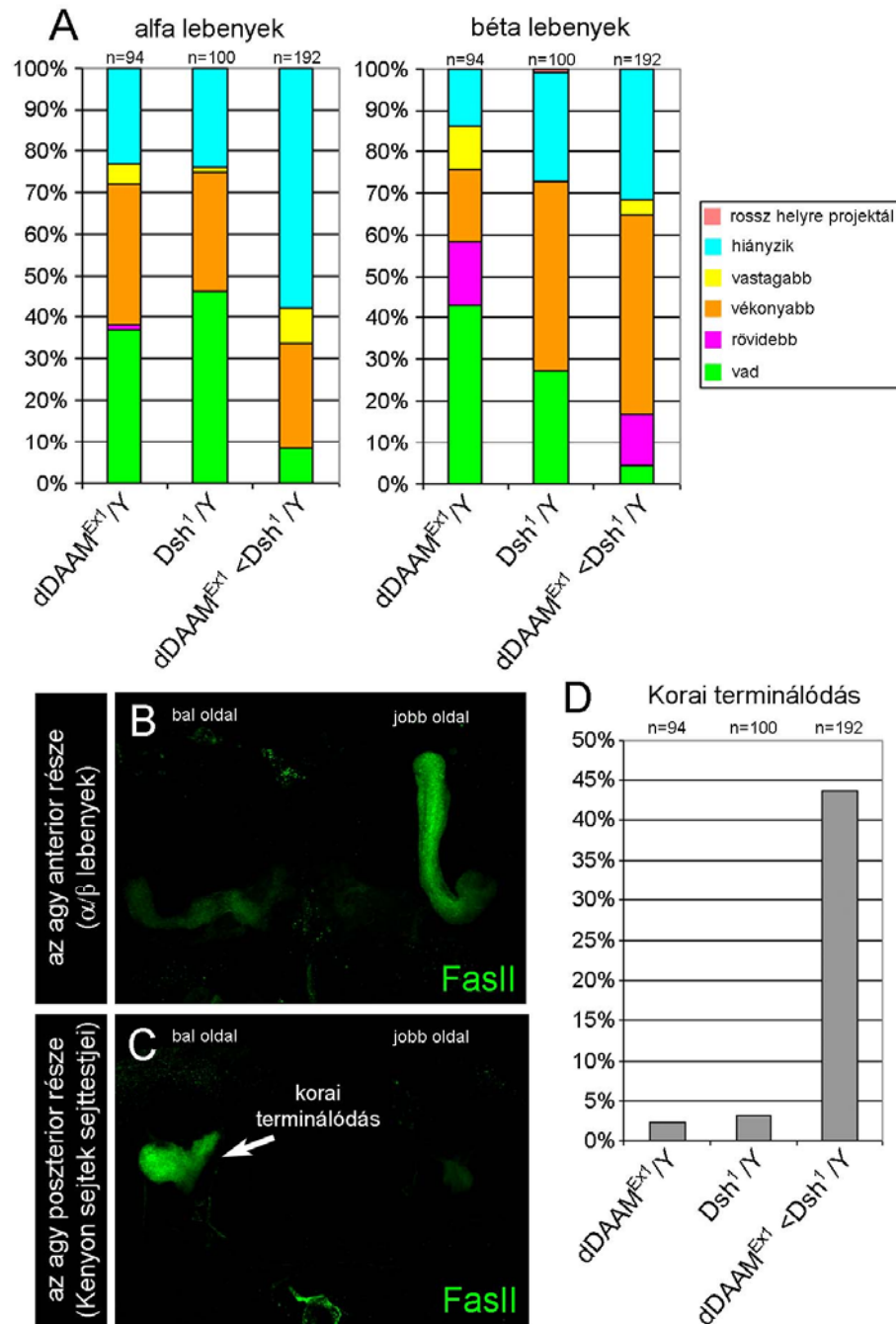
44. ábra Genetikai interakciós vizsgálatok eredményei a *chic* és az *ena* alléljaival. Mindkét gén allélje interakciót mutatott a dDAAM^{Ex1} alléllal. Az interakció során inkább a fenotípusok erősödése volt megfigyelhető, mint az érintet lebenyek számbeli növekedése.

A dDAAM és a szöveti polaritási gének kölcsönhatása az axonnövekedés során

Csoportunk korábbi eredményei alapján azt állapítottuk meg, hogy a *Drosophila* DAAM ortológ, ellentétben az emlős DAAM fehérjékkel, nem vesz részt a szöveti polaritás kialakításában, és nem kapcsolódik a klasszikus PCP jelátviteli rendszerhez (Matusek és mtsai., 2006). Érdekes módon azonban, a PCP-ben szerepet játszó fehérjék egy részéről, így pl. a Fmi-ről, korábban leírták, hogy mind emlős rendszerekben, mind pedig a *Drosophila* összetett szemében is szükséges az axonok megfelelő növekedéséhez (Gao és mtsai, 2000; Lee és mtsai, 2003; Senti és mtsai, 2003; Steinél és Whittington, 2009; Mrkusich és mtsai, 2011). Két nemrégiben megjelent közlemény alapján pedig a PCP gének egy csoportja (*fz*, *fmi*, *dsh*, *stbm* és *pk*) részt vesz a gombatest axonok navigációjában (Shimizo és mtsai, 2011;

Ng, 2012). Figyelemre méltó módon a *stbm* és *fz* mutánsok vonatkozásában lebeny preferencia is megfigyelhető volt, nevezetesen a *stbm* mutánsok főleg a β lebenyeket, míg a *fz* főleg az α lebenyeket érintő fenotípusokat mutat. Tekintve, hogy a DAAM családba tartozó forminokat eredetileg Dsh kötő fehérjeként azonosították, ugyanakkor mindezidáig nem ismertük, hogy milyen navigációs jelek lehetnek felelősek a dDAAM szabályozásáért az axonnövekedés során, logikusnak találtuk megvizsgálni, hogy a dDAAM együttműködik-e navigálási faktorként működő PCP fehérjékkel. Ez abból a szempontból is érdekesnek tűnt, hogy a *dDAAM* mutánsokban a növekedési hibák mellett egyértelműen megjelennek a navigációs hibák is. A vizsgálatot először a Dsh fehérjét kódoló gén PCP specifikus alléljával (*dsh^l*) végeztük el. Ez az allél hemizigóta formában életképes, így az adult hímek agya könnyen vizsgálható. Mivel mind a *dDAAM*, mind a *dsh* az X kromoszómán van, az interakciós kísérletekhez először egy kromoszómára rekombináltuk a *dsh^l* és a *dDAAM^{Exl}* allélokat. Szerencsére a *dDAAM^{Exl}*, *dsh^l* kettős mutánsok is életképesek hemizigótában, így az allélok közötti interakció viszonylag könnyen vizsgálható volt. A kettős mutánsok vizsgálata azt mutatta, hogy az egyes mutánsokhoz képest ugyan nagyobb arányban fordulnak elő nyúlvány defektusok, azonban ez a hatás additívnak látszott (nagyjából megfelelt az egyes mutánsokra jellemző értékek összegének), tehát ebben a vonatkozásban úgy tűnt, hogy nincs domináns interakció (45. ábra A). Meg kell viszont jegyeznünk, hogy ellentétben az egyes mutánsokkal, az összes kettős mutánsban minden agy mindkét hemiszférájában nyúlványnövekedési és/vagy navigációs hibák voltak megfigyelhetőek. Ez a látszólagos ellentmondás abból adódik, hogy a fenotípus kategorizálási módszerünk bizonyos szempontból félrevezető. Nevezetesen, abban az esetben, ha az egyik lebenyben elvékonyodás (növekedési hiba) tapasztalható, de ezzel együtt navigációs hiba is fellép, akkor előfordul, hogy például egy nagyon elvékonyodott α lebenyt, és egy normális vastagságúnak tűnő β

lebenyt látunk. Ebben az esetben normálisan a vad típusú kategóriába tesszük ezt a β lebenyt, bár nagyon valószínű, hogy nem a megfelelő axonok alkotják, és valójában nem vad típusú.

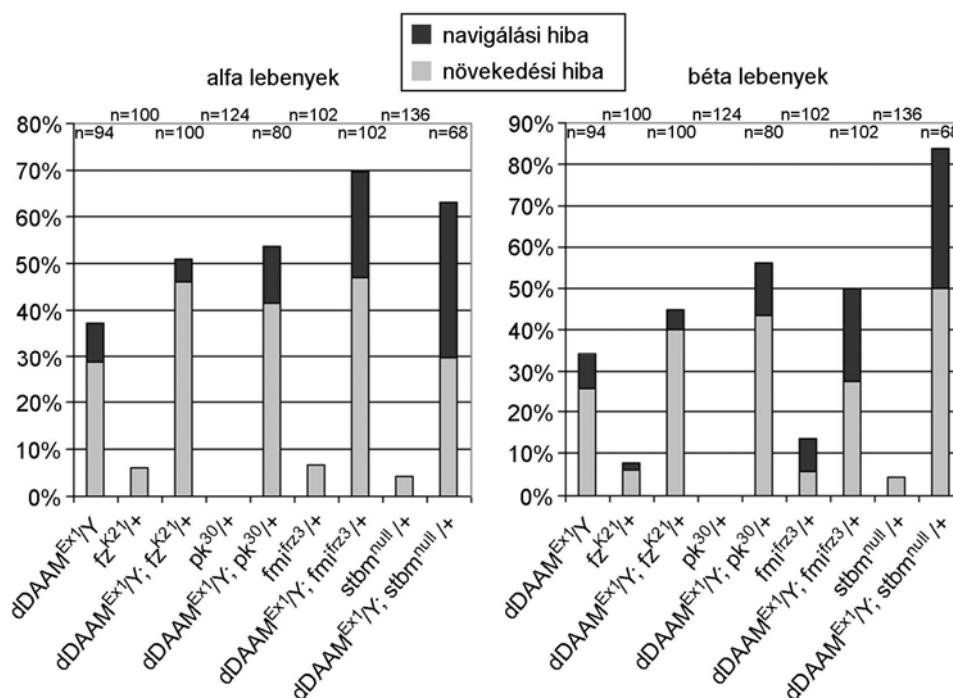


45. ábra A $dDAAM^{Ex1}$ és a dsh^1 genetikai interakciójának vizsgálata. A dsh^1 a nyúlványfenotípusok alapján nem mutat domináns interakciót (A), azonban a kettős hemizigóta ($dDAAM^{Ex1}<dsh^1/Y$) állatok agyában magas penetranciával (43,75%) megjelenik egy extrém erős fenotípus, mégpedig a nyúlványok korai terminációja (B-D).

Ezen túlmenően, a kettős mutáns állatokban a korábban megfigyelt nyúlvány- fenotípusok mellett egy új, extrém erős fenotípus kategória is megjelent, ami a nyúlványok korai terminációját jelenti (45. ábra B és C). Ezt a fenotípust az egyes mutánsokban csak igen ritkán lehet megfigyelni (2,32% a *dDAAM^{ExI}* esetében, 3% a *dsh^I* esetében), ezért korábban nem tekintettük külön fenotípus osztálynak. A kettős mutáns állatokban azonban magas százalékban megjelenik ez az elváltozás, ami abból adódik, hogy a nyúlványok egyáltalán nem projektálnak az agy elülső régója felé, hanem a sejttestek közelében egy labda szerű nyúlványköteget hoznak létre (45. ábra D). A kettős mutánsokban 43,75%-ban volt megfigyelhető ez a korai termináció, ami egy igen erős interakciót jelent, és mutatja azt, hogy a megfigyelhető nagy számú lebenyvékonyodás és hiány a nyúlványok korai terminálódásából, vagyis rossz navigációjából adódik. Ez az erős domináns kölcsönhatás egyben azt is jelzi, hogy a Dsh és a dDAAM fehérje valószínűleg együttműködve szabályozza a gombatest axonok navigálását.

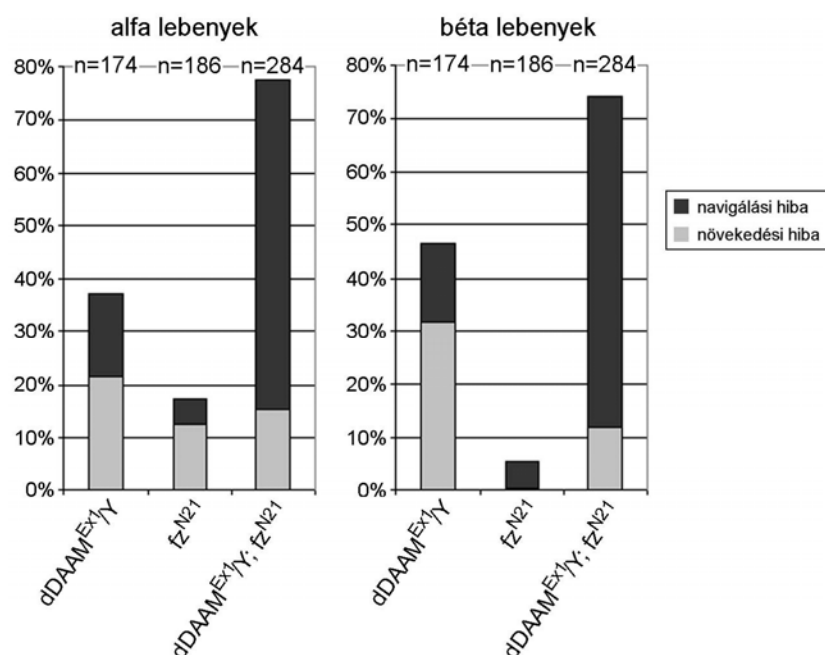
A továbbiakban a *dsh*-en kívül teszteltük a többi elsődleges PCP gént is a *diego* kivételével, amelyről azt találták, hogy nem vesz részt a gombatest nyúlványok növekedésében (Shimizo és mtsai, 2011). A *fz*, *stbm*, *pk* és *fmi* génekről azonban elképzelhető volt, hogy együttműködnek a *dDAAM*-mal az idegrendszerben, hiszen a szöveti polarizálódás során ezek *dsh* kölcsönható partnerek (Adler, 2002; Strutt, 2003), a *dsh* viszont fenti eredményeink alapján *dDAAM* együttműködő partnere a neuronokban. A domináns interakciós vizsgálatokat mind a négy PCP génnel elvégezve azt találtuk, hogy a legerősebb interakció a *stbm* esetében volt megfigyelhető, bár különbség mutatkozott az α és β lebenyek között. A lebeny specificitásra vonatkozó irodalmi adatokkal összhangban (Shimizo és mtsai, 2011; Ng, 2012), a mi kísérleti elrendezésünkben is a β lebenyeket érintette jobban a fenotípus erősödés, amely 34%-ról 84%-ra nőtt (46. ábra). A *pk* esetében egy enyhébb, mindkét lebenyt érintő fenotípus

erősödés volt látható (46. ábra), míg a *fmi* esetében az α lebenyekben volt domináns interakció megfigyelhető, ahol is a mutáns lebenyek aránya 37%-ról 70%-ra nőtt (46. ábra).



46. ábra A *dDAAM^{Ex1}* és a core PCP gének közötti genetikai interakciók eredményei a gombatestben. A *fz^{K21}* allél kivételével az összes PCP gén interakciót mutatott a *dDAAM^{Ex1}* alléllal.

A vizsgált allélok közül egyedül a *fz*-el nem kaptunk egyértelmű domináns interakciót (46. ábra), azonban erre a génre nézve rendelkezésünkre állt egy hipomorf allél, amely homozigóta formában életképes, bár a gombatest α lebenyeinek 17%-a, míg a β lebenyek 5%-a nyúlvány-defektusokat mutat (47. ábra). Amikor megvizsgáltuk a *dDAAM^{Ex1}*; *fz^{N21}* kettős mutánsok fenotípusát, azt találtuk, hogy mindkét lebeny esetén egy szinergisztikus hatás érvényesül, aminek következtében a kettős mutánsokban megfigyelhető projekciós hibák mindkét lebeny esetében 70% fölé emelkednek (47. ábra).



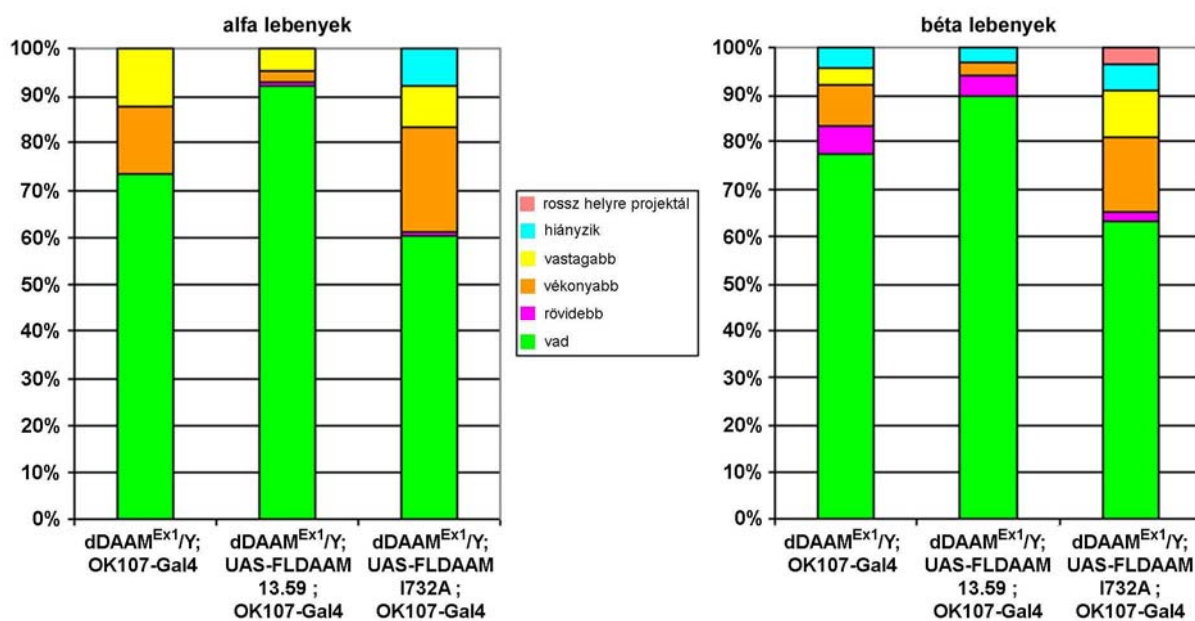
47. ábra A *dDAAM^{Ex1}* és *fz^{N21}* allélek közötti interakció. A *dDAAM^{Ex1}* mutáns állatok gombatest fenotípusát szinergisztikus módon erősítette a *fz^{N21}* allél homozigóta jelenléte.

A core PCP fehérjékkel elvégzett vizsgálatok együttesen arra utalnak, hogy a dDAAM a nyúlványok növekedése során valószínűleg ezekkel a fehérjékkel együttműködve segíti elő a nyúlványok megfelelő projekcióját. Ezzel az elképzeléssel összhangban, a funkcióvesztéses allélok vizsgálata mellett azt is megfigyeltük, hogy a Stbm fehérje gombatest-specifikus túltermelése a DADm-DAAM túltermeléshez hasonló elváltozást okoz a nyúlványmintázatban (Ng, 2012). Tehát a Stbm esetében nem csak a funkcióvesztéses (LOF), de a funkciónyeréses (GOF) adatok is erősítik az együttes működésre vonatkozó modellt. A dDAAM és a PCP fehérjék közötti együttműködés pontos mechanizmusa egyelőre még tisztázásra vár, azonban a dDAAM az eddigi adatok alapján is könnyen elhelyezhető egy olyan jelátviteli rendszerben, amely a PCP fehérjétől az aktin sejtvázig egy teljes szabályozási rendszert alkot az axonok irányított növekedése, vagyis navigációja során. Ennek a jelátviteli rendszernek a tetején a Wnt5 navigációs jel helyezkedik el, ami a Fz receptor aktivátora. A Fz aktiválódása a Stbm/Pk/Fmi fehérjékkel együttműködve a Dsh aktiválódásához vezet. A Dsh fehérjéről viszont ismert, hogy képes a dDAAM DAD

doménjéhez kapcsolódni, és ily módon a megfelelő helyen aktiválni ezt a formint (Liu és mtsai, 2008), így segítve elő a nyúlványnövekedéshez szükséges aktin-polimerizációt és filopódium képződést a környezeti (navigációs) jel irányába.

A dDAAM nyúlványnövekedésben és navigációban betöltött szerepe az aktin polimerizációs képességéhez kapcsolható

A dDAAM PCP fehérjékhez kapcsolható funkciója felveti azt a kérdést, hogy vajon ez a formin a jelátvitelt közvetlenül kapcsolja a sejtvázas átalakulásához, vagy a dDAAM nem egy végső effektor a nyúlványnövekedésben, hanem csak egy jelátviteli elemként működik. Ennek a kérdésnek az eldöntésére létrehoztunk egy olyan FLDAAM konstrukciót (UAS-FLDAAM-I732A), amelyben elrontottunk egy olyan aminosavat az FH2 doménben, ami szükséges az aktin polimerizációhoz. Ha ezzel a transzgénnel menekítési kísérletet végzünk, azt várjuk, hogy ha a dDAAM csak egy jelátviteli elem az axonnövekedés során, akkor ez a konstrukció is menekíti a mutáns fenotípust, ha azonban a dDAAM aktin összeszerelő aktivitása kritikus a nyúlványnövekedés szempontjából, akkor ez a forma nem fog menekíteni. A kísérletet *dDAAM^{Ex1}*-es háttéren végeztük el és gombatest specifikusan (OK107-Gal4) termeltettük túl a teljes hosszúságú vad típusú dDAAM fehérjét (FLDAAM 13.59), ill. a pontmutációt hordozó formát (FLDAAM I732A). A kísérlet során a vad típusú dDAAM képes volt csökkenteni a nyúlványnövekedési és/vagy navigációs hibákat (48.ábra), azonban az FLDAAM-I732A forma nem hogy csökkentette volna, inkább növelte a mutáns lebenyek számát (48.ábra), tehát az aktin polimerizációra képtelen dDAAM domináns negatívként viselkedett. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a dDAAM aktin polimerizáló képességére szükség van a nyúlványok növekedéséhez, ami nagymértékben erősíti azt az elképzelést, hogy a Wnt5/PCP jelátviteli út a dDAAM-on keresztül képes szabályozni az aktin sejtvázas átrendeződéseket a növekedési kúp perifériális részén.



48. ábra Menekítési kísérlet a teljes hosszúságú dDAAM és az FH2 doménjében pontmutáns, aktin polimerizációra képtelen dDAAM fehérje túltermelésével. Az aktin polimerizációra képtelen dDAAM forma (FLDAAM I732A) a vad típusú, teljes hosszúságú dDAAM fehérjével ellentétben nem képes menekíteni a *dDAAM^{Ex1}* allél által okozott nyúlványnövekedési és navigációs hibákat, ezzel szemben inkább domináns negatív formaként viselkedve megnöveli azok penetranciáját.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Már régóta ismert tény, hogy az axonok növekedésének elengedhetetlen feltétele az aktin sejtváz irányított átrendeződése, illetve az aktin polimerizáció. Ennek megfelelően, napjainkig több olyan fehérjét azonosítottak már, amelyek közvetlenül befolyásolják az aktin sejtváz dinamikus változásait a növekedési kúpban. Meglepő módon azonban, arról hiányos és ellentmondásos irodalmi adatok jelentek meg, hogy az aktin sejtváz szabályozásában kritikus szerepet betöltő nukleáló faktorok közül melyek vehetnek részt az idegsejt nyúlványok növekedésében. Így például az Arp2/3 komplex alegységeiről kimutatták, hogy szerepet játszanak a nyúlványnövekedésben (Zallen és mtsai, 2002; Mongiu és mtsai, 2007; Korobova és Svitkina, 2008), más adatok szerint azonban ez nem minden idegsejtben van így (Ng és Luo 2004; Strasser és mtsai, 2004). Emellett az Arp2/3 az elágazó filamentumok létrejöttében játszik szerepet, ami azt valószínűsíti, hogy nagyobb szerepe lehet a növekedési kúp lamellipódiumainak a kialakításában, mint a filopódiumok képződésében. Olyan kísérletes bizonyíték azonban, mely egy, a nem elágazó aktin filamentumok kialakításáért felelős nukleáló faktorról kapcsolatban igazolta volna, hogy szerepe van a nyúlványok növekedésében, és *in vivo* kimutatható a nyúlványok területén a növekedés időszakában, munkánk kezdetén még nem állt rendelkezésre. Csoportunk és mások előzetes eredményei alapján viszont erre a szerepre kiváló jelöltnek látszottak a forminok DAAM alcsaládjába tartozó fehérjék.

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. Funkcióvesztéses vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a *dDAAM* csökkent mennyisége mellett a nyúlványok projekciója sérül, nyúlványnövekedési és navigálási hibákat tapasztalunk. Azt,

hogyan ez a fenotípus valóban a *dDAAM* dózisának csökkenéséhez köthető, a teljes hosszúságú fehérje túltermelésével elvégzett menekítési kísérlet bizonyította. A *dDAAM* nyúlványnövekedésben játszott szerepét erősítették meg az *in vitro* nyúlvány-regenerációs tesztek is, amelyek során a *dDAAM* konstitutívan aktív formájának túltermelése elősegítette a hasi idegkötegből kilépő motoneuronok regenerációját és növekedését. Az *in vivo* elvégzett funkcionyeréses kísérletek során a konstitutívan aktív *dDAAM* elrontja az embrionális nyúlványkötegek szabályozott mintáját. A *CDAAM* és a *DAD-DAAM* aktivált formák által okozott fenotípusok összehasonlítása alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a *dDAAM* aktin összeszerelő aktivitásának és a sejten belüli lokalizációjának a szabályozásában fontos szerepe van a fehérje N-terminális régiójának, ami összhangban van az egyéb DRF típusú forminokra vonatkozó ismeretekkel.

Miután bebizonyítottuk, hogy a *dDAAM* az embrionális axonnövekedés egyik kulcsfontosságú faktora, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy mennyire általános szerepet tölt be az idegi differenciálódás során, szükséges eleme-e például a nyúlvány képződésnek a későbbi fejlődési stádiumok során is. A lárvális, báb és adult állapotokat tanulmányozva megállapítottuk, hogy a *dDAAM* ezekben a stádiumokban is pán-neurálisnak nevezhető kifejeződési mintát mutat. A funkcionális vizsgálatokra modell rendszerül az agy gombatest nevű területét használva pedig egyértelműen azt találtuk, hogy a *dDAAM* nem csak az embrionális, hanem a későbbi fejlődési stádiumokban is elengedhetetlen eleme a neuron nyúlványok növekedésének. Így tehát az embrionális idegrendszerben és a gombatest vizsgálatával kapott eredményeink együttesen azt jelzik, hogy ez a *DAAM* alcsaládba tartozó formin a neuronális differenciálódás egyik általánosan, valószínűleg minden idegsejtben működő esszenciális faktora.

A *dDAAM* sejten belüli funkciójával kapcsolatban 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. Jól ismert, hogy a filopódiumok kruciális szerepet játszanak az axonnövekedésben. 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 (Dickson, 2002). Ezek alapján a *dDAAM* mutánsokban megfigyelhető filopodiális defektusok jól magyarázzák a teljes idegrendszer szintjén megjelenő nyúlványnövekedési hibákat.

A *dDAAM* axonnövekedésben játszott szerepének bizonyítása után azt is tisztázni szeretnénk volna, hogy a *dDAAM*-on kívül vannak-e más hasonló funkcióval bíró forminok, vagy a *dDAAM* az egyetlen esszenciális aktin nukleátor a fejlődő idegrendszerben. Ezt a kérdést a gombatestben vizsgáltuk RNSi mutánsokkal, és azt találtuk, hogy a hat *Drosophila* formin gén közül csak a *dDAAM* és a *dia* mutat idegrendszeri fenotípust. A *Dia* fehérjéről kimutattuk, hogy a *dDAAM*-hoz hasonlóan, feldúsulást mutat a növekvő nyúlványokban a gombatest területén. Ennek ellenére a *dia* és a *dDAAM* mutánsok fenotípusa lényegesen különbözött egymástól. A *dDAAM*-mal ellentétben, a *dia* esetében a nyúlványok növekedésére gyakorolt pozitív hatást nem tudtunk kimutatni, helyette azt tapasztaltuk, hogy hiányában a Kenyon sejtek citokinézise sérül, és többmagvú sejtek jelennek meg, így az osztódásból nem származnak funkcionális neuronok, melyek nyúlványmintázata vizsgálható lenne. Egyetlen, a *Dia* nyúlványnövekedésben betöltött szerepére irányuló megfigyelésünk az volt, hogy posztmitotikus sejtekben aktív gombatest specifikus driverrel lecsökkentve a *Dia* mennyiségét a β lebenyek esetében nem történik meg a terminálódás, az axonok átnyúltak az ellenkező oldali hemiszférába. Ez a megfigyelés viszont arra utal, hogy amennyiben a *Dia*-nak szerepe van a nyúlványok növekedésében, az valamilyen módon inkább a növekedésre gyakorolt negatív hatás lehet. Ezzel egybevág az a megfigyelésünk is, hogy a kisGTPázokkal

elvégzett vizsgálataink alapján a Dia aktivátora a gombatest területén a RhoA lehet, amelynek a domináns negatív formája hasonló osztódási fenotípus okozott, mint a *dia* hiánya, és amelyről korábban leírták, hogy az axonnövekedés negatív regulátora (Lee és mtsai, 2000). Összegzésében pedig vizsgálataink azt a következtetést sugallják, hogy a forminok közül *Drosophila*-ban a dDAAM az egyetlen kitüntetett szerepű aktin összeszerelő faktor az axonnövekedés során.

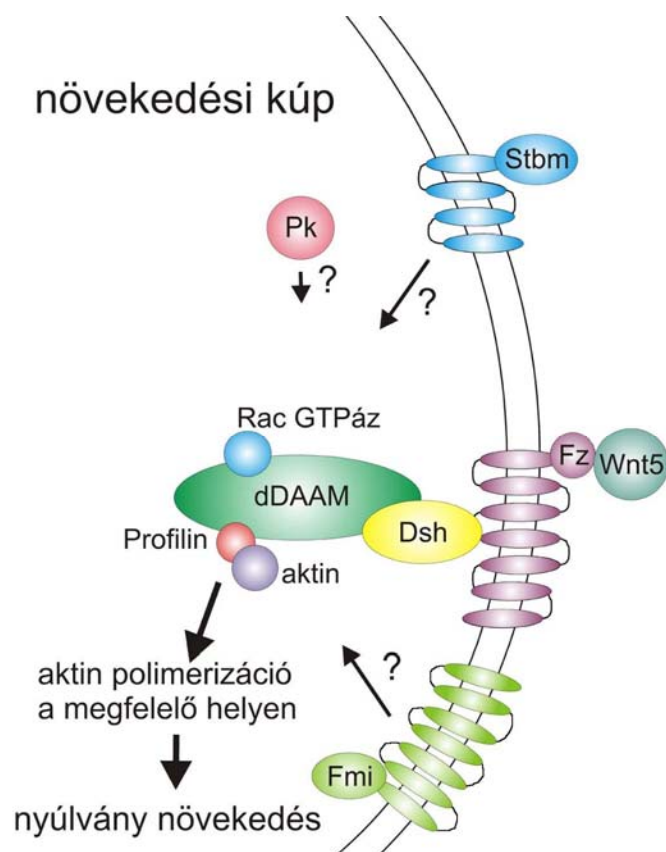
A DRF forminok családjába tartozó fehérjék, és így a dDAAM is speciális módon aktiválódnak, mégpedig az aktin polimerizációra képes nyitott konformáció eléréséhez egy aktivált Rho típusú kisGTPáz bekötődése szükséges. A *Drosophila* genom több ilyen típusú fehérjét is kódol, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy melyik GTPáz lehet felelős a dDAAM aktiválódásáért a központi idegrendszerben, kimutatható-e egyáltalán specificitás ebben a vonatkozásban. Öt Rho típusú GTPáz saját idegrendszeri fenotípusát vizsgálva, illetve genetikai kölcsönhatáson alapuló vizsgálatok útján kimutattuk, hogy mind az embrionális, mind a későbbi stádiumokban az idegrendszer területén a dDAAM aktivátorai a Rac alszaládba tartozó kisGTPázok. Ez jó összhangban van a Rac GTPázok ismert axonnövekedési szerepével *Drosophila*-ban (Hakeda-Suzuki és mtsai., 2002; Ng és mtsai., 2002) és más organizmusokban is (Govek és mtsai., 2005), továbbá azzal a ténnyel, hogy néhány gerinces DAAM ortológáról kimutatták, hogy Rac GTPázokhoz képesek kötődni (Aspenstrom és mtsai., 2006; Liu és mtsai., 2008).

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 filopodiális aktin sejtvázas átrendeződések kritikus szabályozó eleme. Az Ena/Profilin/dDAAM komplex

pontos molekuláris működés módját egyelőre nem tisztáztuk, de korábbi eredmények, továbbá episztázis vizsgálataink és a fehérjék biokémiai tulajdonságai alapján úgy gondoljuk, hogy a profilin szerepe itt is az aktin monomerek biztosítása a dDAAM aktin polimerizáló aktivitásához, míg a növekvő filamentumokat az Ena kötegekbe rendezi, ami elengedhetetlen a filopódiumok iniciálódásához. Természetesen egyéb lehetőségek is elképzelhetők, hiszen az Ena/VASP fehérje család tagjai az elongációt is segítik (Barzik és mtsai., 2005; Bear és mtsai., 2002), míg saját eredményeink alapján a dDAAM is rendelkezhet kötegformáló aktivitással (Barko és mtsai., 2010). Ettől függetlenül figyelemreméltó, hogy Schirenbeck és mtsai. szerint *Dyctiostelium*-ban is egy hasonló, formin/VASP-függő mechanizmus szabályozza a filopódium képződést (Schirenbeck és mtsai., 2006).

A mindezidáig tárgyalt Rac, dDAAM, Profilin és Ena fehérjék együttesen egy olyan szabályozási modult alkotnak, ami közvetlenül hat az aktin sejtvázra a növekedési kúpban, tehát az axonnövekedés molekuláris effektor komplexének tekinthető. Ezzel összhangban bebizonyítottuk, hogy a dDAAM aktin polimerizációs képessége elengedhetetlenül fontos az axonnövekedéshez, mert az egyetlen pontmutációt hordozó, de polimerizációra képtelen formával nem lehet menekíteni a *dDAAM* hiányát a gombatestben. Fontos azonban látnunk, hogy az *in vivo* axonnövekedés mindig irányított növekedés, amit a navigációs jelek szabályoznak. Emiatt rendkívül fontos kérdésnek tekintjük annak megértését, hogy milyen navigációs jelek irányítják a dDAAM-ot tartalmazó végrehajtó komplex működését és azok milyen köztes jelátviteli elemeken át csatlakoznak a Rac/dDAAM modulhoz. A navigációs jelek azonosítása érdekében laboratóriumunkban folyamatban van egy nagy léptékű genetikai kísérlet, amelynek során elvileg bármely kölcsönható jel azonosítható. Ugyanakkor néhány frissen publikált eredmény rendkívül érdekesnek tűnt ebben a vonatkozásban, ezek alapján ugyanis a PCP gének szerepet játszanak a gombatest axonok navigációjában. Ha mindezt egybevetjük azzal a ténnyel, hogy a DAAM fehérje család első ismert tagját Dsh asszociált

fehérjeként írták le, és emlős rendszerekben a PCP jelátviteli út elemeként viselkedik, a PCP fehérjék nagyon ígéretes jelöltnek tűntek navigációs faktorként is. A dDAAM és a PCP fehérjék közötti együttműködést genetikai eszközökkel megvizsgálva elmondhatjuk, hogy a dDAAM együttműködik a Dsh-del, a Stbm-szal, a Fz-del, a Fmi-val és a Pk-del is a gombatest nyúlványainak növekedése során. Ezek alapján azt gondoljuk, hogy a dDAAM aktivátora az axonnövekedés során a Wnt/Fz receptor komplex. Mivel korábbi eredmények alapján, a gombatestben legalábbis, a Wnt5 fehérjét tekintik a Fz receptor ligandjának és egy fő navigációs jelnek, hipotézisünk szerint ebben a jelátviteli folyamatban a Wnt5 kötődik a Fz receptorhoz, ami a Stbm/Pk/Fmi fehérjékkel együttműködve a Dsh aktiválódását idézi elő, ami viszont elősegíti a dDAAM aktiválódását. Molekuláris vizsgálatok alapján a Dsh képes kötődni a DAAM DAD doménjéhez (Liu és mtsai, 2007), ami önmagában is a fehérje aktiválódásához vezethet, de az is elképzelhető, hogy ez a kölcsönhatás képes stabilizálni a Rac kisGTPáz által létrehozott aktív konformációt. Végősoron a Dsh-DAAM kölcsönhatás elősegíti a növekedési kúpon belül a megfelelő helyen való aktin polimerizációt, így szabályozva a növekedés irányát. Az egyelőre nem világos, hogy a dDAAM aktivitását kizárólag a Wnt5 jel szabályozza-e vagy egyéb navigációs faktorok is képesek erre, és ha képesek, akkor milyen jelátviteli komponenseken keresztül teszik azt. Ezeknek a kérdéseknek a vizsgálata még folyamatban van. Mindezekről függetlenül végezetül kiemelném, hogy kísérleteinkkel egy olyan teljesnek nevezhető, a navigációs jeltől a sejtvez átrendeződésekig tartó jelátviteli rendszert tártunk fel (49. ábra), ami fontos új információkat szolgáltatott az axonnövekedés folyamatáról és a DAAM típusú forminok működéséről is.



49. ábra A PCP/dDAAM jelátviteli út modellje a nyúlváynövekedés során.

A Wnt5 kötődik a Fz receptorhoz, ami a Stbm/Pk/Fmi fehérjékkel együttműködve a Dsh aktiválódását idézi elő. A Dsh a dDAAM DAD doménjéhez való kötődési képessége által aktív állapotban (melyet korábban, vagy ezzel párhuzamosan az aktivált Rac GTPáz is elősegít) tarthatja a formint. Így az aktin nukleáció és polimerizáció a nyúlváynövekedési szignál irányába történik.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált Drosophila törzsek

*w*¹¹¹⁸

Ore-R

dDAAM^{Ex1}/*dDAAM*^{Ex1}

dDAAM^{Ex68}/*YDp(1;Y)Sz280/C(1)DX*

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

DAAM^{Ex68}/*FM7c, Ftz-lacZ*;

*chic*²²¹/*CyO,ftz-lacZ*

*ena*⁰²⁰²⁹/*TM3,ftz-lacZ*

*ena*²³/*TM3,ftz-lacZ*

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

Rac1^{J11}/*TM3*

Rac1^{J11}, *Rac2Δ*/*TM3*

Rac1^{J10}, *Rac2Δ*, *MtlΔ*/*TM3*

DAAM^{Ex68}/*FM7c, Ftz-lacZ* ; *chic*²²¹/*CyO,ftz-lacZ*

DAAM^{Ex68}/*FM7c, Ftz-lacZ* ; *ena*⁰²⁰²⁹/*TM3,ftz-lacZ*

DAAM^{Ex68}/*FM7c, Ftz-lacZ* ; *RhoA*^{72F}/*CyO, Ftz-lacZ*

DAAM^{Ex68}/*FM7c, Ftz-lacZ* ; *Rac1*^{J11}, *Rac2Δ*/*TM3*

dDAAM^{Ex1} < *Cdc42*² /*w,FM6*

dDAAM^{Ex68} < *Cdc42*² /*FM7c, Ftz-lacZ*

DAAM^{Ex68}/*FM7c, Ftz-lacZ* ; *RhoA*^{72F}/*CyO, Ftz-lacZ*

UAS-FLDAAM 13.59/*CyO*

UAS-FLDAAM I732A/TM3

UAS-C-DAAM/TM3,Kr-GFP

UAS-C-DAAM/TM3, ftz-lacZ

UAS-DADm-DAAM:EGFP UAS-mCD8-GFP

UAS-mCD8-GFP/SM6b;OK107-Gal4

UAS-Rac1-N17/TM3

UAS-Cdc42-N17/CyO

UAS-RhoA-N19/TM3

UAS-DAAM-RNSi (VDRC-KK103921)

UAS-Dia-RNSi (VDRC-KK103914)

UAS-FRL (CG6807)-RNSi (VDRC-KK110438)

UAS-Cappuccino-RNSi (VDRC-KK110404)

UAS-FHOS-RNSi (VDRC-KK108347)

UAS-Formin3-RNSi (VDRC-KK107473)

elav-Gal4 (C-155)

elav-Gal4/CyO

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

act-Gal4<UAS-FLDAAM 13.59/CyO,ftz-lacZ

elav-Gal4<UAS-FLDAAM 13.59/CyO,ftz-lacZ

DAAM^{Ex1}/ DAAM^{Ex1} ; act-Gal4-UAS-FLDAAM/CyO, Ftz-lacZ;

DAAM^{Ex1}/ DAAM^{Ex1} ; elav-Gal4-UAS-FLDAAM/CyO, Ftz-lacZ;

OK107-Gal4

dDAAM^{Ex1}; OK107-Gal4

Embriók preparálása

A legyeket, melyek utódait kívántuk vizsgálni, szén és agar tartalmú táptalajon petéztették 4 órán át. Az embriókat ezután a megfelelő kor eléréséig szobahőmérsékleten tartottuk (13-14h).

Kétféle fixálási eljárást alkalmaztam annak függvényében, hogy a vizsgálat során az embrió mely struktúrájára voltam kíváncsi.

Metanolos fixálás

Az embriókat a táptalajról desztillált vízzel lemosva nylon-on fogtuk fel, majd következő lépésben 2 percig hipóba (Clorox) áztatva őket, eltávolítottuk az embrió külső, korion-burkát. A dekorionizált embriókat desztillált vízzel mostuk, majd a felesleges vizet leitatva róluk, 3 ml N-heptánt tartalmazó szcintillációs üvegbe helyeztük át őket és 3 ml PBS-sel hígított 4%-os formaldehidet mértünk rá. A két fázis jól láthatóan elkülönült egymástól és a fázisok között helyezkedtek el az embriók. Amíg a heptán telítődött a fixálószerrel, az embriók vitellin membránján is keresztül penetrált a formaldehid, így fixálva őket. A fixálás 20 percig tartott, ezután eltávolítottuk a formaldehydes (alsó) fázist. Következő lépésként 1,5 tf -20°C-os metanolt mértünk az embriókra, és a két elkülönülő fázist 45 mp-ig folyamatosan, és erősen összeráztuk. E lépés során az embriók kb. 80%-nál felszakadt az őket borító vitellin membrán, és a devitellinizált embriók az alsó (metanol) fázisba süllyedtek. Azok az embriók, melyek vitellin membránja nem szakadt fel, ill. az üres vitellin burkok a heptán és a metanol fázis határán maradtak, így a következő lépésben a heptán fázis leszívásával könnyen eltávolíthatók. A devitellinizált embriókat Eppendorf csőbe tettünk át - a könnyebb kezelhetőség érdekében – és 3-szor mostuk metanollal. Ezután az embriókra 1 ml PBS : metanol (1:1) keveréket mértünk. 10 perc múlva a PBS : metanol-os oldatot eltávolítottuk, és

PBS-T-vel (PBS, 0,1% Triton-X) 3-szor 10 percig mostuk az embriókat, majd PBS-BT-vel (PBS, 0,1% Triton-X, 0,2% BSA) minimum 1 h-t blokkoltuk. E lépés során a BSA telíti a fehérje-kötő helyeket, így az immunhisztokémiai eljárás alatt az antitest specifikusabban kötődik.

Lassú fixálás

Az aktin váz vizsgálatára csak az ezzel a módszerrel fixált embriók használhatók, mert a metanol az aktin vázat a specifikusan az F-aktinhoz kötődő phalloidin-nel történő festésre alkalmatlanná teszi.

A dekorionizációs lépés a metanos fixálás során leírtakkal megegyezett. Ezután a megmosott és leitatott embriókat egy előre (legalább egy nappal hamarabb) elkészített, fixáló reagensbe (slow-fix) tettük bele, mely úgy készült, hogy 25ml heptánt, 25ml 37%-os formaldehidre mérünk, majd a két elkülönülő fázist jó alaposan összeráztuk, hogy a heptán fázis telítődjön formaldehiddel, ezután felhasználásig sötétben tartottuk. Kis idő elteltével a két fázis újra elkülönült. A fixáláshoz a felső, formaldehiddel telített heptán fázist használtuk. A fixálás 40 percig tartott, majd az embriókat petricsészére helyeztük ki. A heptán elpárolgásával az embriók vitellin membránja a petricsészéhez tapadt, ezután PBS-t öntöttünk rájuk és tű segítségével, mikroszkóp alatt az embriót borító vitellin membránt felszakítottuk, így az embriók kiúsztak a folyadékba. Innen összegyűjtöttük és Eppendorf csőbe helyeztük őket. Ezután az embriókat 3-szor 10 percig mostuk PBS-T-vel, majd minimum 1h-n át PBS-BT-vel blokkoltuk.

Agyak preparálása

Az agyakat PBSben boncoltam, majd szobahőmérsékleten 20 percig fixáltam 4%-os PBS-ben hígított paraformaldehiddel. A fixálás után a preparátumot 3x10 percig PBS-T-vel mostam, majd Eppendorf csőbe helyeztem, és PBS-BT-ben 1h-t szobahőn blokkoltam.

Hasi idegköteg-kultúra készítése (axon-regeneráció vizsgálatához)

13. stádiumú embriókat gyűjtünk, majd kétoldalú ragasztószalagra fektettük őket, melyet korábban egy poli-L-lizinnel bevont tárgylemezre ragasztottunk egy szilikon peremmel határolt négyzet területén. Ezután óvatosan leszedtük csipesszel az embriók korion burkát, majd PBS-t mértünk rájuk, utána tűvel kiszedtük az állatok hasi idegkötegeit. Ezeket a poli-L-lizines felületre fektettük, majd a PBS-t FBS-tartalmú Schneider táptalajra cseréltük, és ezzel többször mostuk, végül ebben a médiumban növesztettük 9 órán át 25°C-on. A növesztés után fixáltuk 4%-os, PBS-ben hígított formaldehiddel, és blokkoljuk 1 órát szobahőmérsékleten. Továbbiakban FasII ellenanyaggal festettük a hasi idegkötegeket.

Immunhisztokémia

A szövetek vizsgálatához csapadék-képződésen alapuló (torma peroxidázos /HRP-s/) ill. fluoreszcens jelölést használtam, az alábbi protokoll alapján:

.

A blokkolt, devitellinizált embriókat, vagy a kiboncolt és lefixált agyakat over night (kb.18h) festettem 4°C-on PBS-BT-vel megfelelő koncentrációra kihígított elsődleges antitesttel, majd 5-ször 20 percig mostam őket. Ezután megfelelő koncentrációra PBS-BT-vel kihígított fluoreszcens vagy biotinilált másodlagos ellenanyagot tettem rájuk, és 2-3 h-t inkubáltam

benne szobahőmérsékleten.(a fluoreszcens festésnél az inkubáció sötétben zajlik.) Ezután 5-ször 30 percig mostam őket.

A fluoreszcens festés utolsó lépéseiként először glicerin:PBS (1:1) keveréket mértünk az embriókra, majd miután az embriók az Eppendorf-cső aljára süllyedtek, ezt glicerin :PBS (4:1)-re cseréltük. Ebben az embriók tárgylemezre tehetők, és fedőlemezzel lefedve mikroszkóp alatt vizsgálhatók.

A csapadék-képződéses festésnél 30 perccel a mosás lejárta előtt összemértük a Vectastatin ABC reagens - mely Avidin DH-t és Biotinilált közönséges tormaperoxidáz H-t tartalmaz – és szobahőmérsékleten hagytuk 30 percig. Az ez idő alatt kialakuló avidin-tormaperoxiáz komplex képes a biotinilált másodlagos ellenanyaghoz kötődni. A 30 perc letelte után az embriókra mértük az ABC reagenst, majd ugyancsak 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk őket. Ezután az embriókat 5-ször 10 percig mostuk PBS-T-vel, majd egy előre összemért DAB-H₂O₂ reagenst mértünk rá. A reakció folyamán a tormaperoxidáz barna csapadékká alakítja a DAB-ot, mely specifikusan az ellenanyaggal megjelölt helyen jelenik meg, kirajzolva ezzel a számunkra érdekes struktúrákat. A csapadékképződést mikroszkóp alatt ellenőriztük a túlhívás elkerülése érdekében, majd kb. 15-20 perc elteltével leszívtuk a DAB reagenst és PBS-sel leállítottuk a folyamatot. Az embriókat mostuk PBS-T-ben, és a fluoreszcens festési eljárásnál leírtak szerint átvezettük őket glicerin:PBS (4:1) –be, majd ebben boncoltuk ki mikroszkóp alatt az embrionális idegrendszert, melyet ezután tárgylemezre téve nagyobb nagyítású mikroszkóp alatt fotózhattunk.

Western-blot

A kísérletek során genotípusonként 1 vagy 2 adult agyat lizáltunk 10 µl proteáz inhibitor tartalmú lízis pufferben (0,1% SDS; 0,2% NaDoc; 0,05% NP40; 150mM NaCl; 50mM Tris-HCl), majd 10 percig forraltuk őket. A forralás után a mintákat 5 percig 14000rpm-en lecentrifugáltuk, majd denaturáló SDS gélen megfuttattuk. Az elválasztott fehérjéket Millipore PVDF membránra blottoltuk. A blottolási lépést követően a membránokat 5% sovány tejport tartalmazó TBST-ben blokkoltuk 1h-ig szobahőn, majd egy éjszakán át inkubáltuk őket a blokkolóban hígított megfelelő elsődleges ellenanyagokkal. Ezt követően a membránokat TBST-ben 3x20 percig mostuk, majd a megfelelő másodlagos ellenanyagokkal kiegészített 5% sovány tejpor TBST-s oldatában 1 h-t szobahőn inkubáltuk. Ezek után a membránokat 3x20 percig TBST-ben mostuk, majd Millipore Immobilon kemilumineszcens detekciós reagenssel előhívtuk.

Felhasznált elsődleges ellenanyagok:

BP102 – egérben termelt, felhasznált hígítás: 1:5 (DSHB)

α -chic – egérben termelt, felhasznált hígítás: 1:10 (DSHB)

α -DAAM – nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:4000 (immunfestésen)

α -DAAM (R4) - nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:1000

(immunfestésen és western blot-on)

α -Dia – nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:1000

α -EGFP – nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:1000 (Invitrogen)

α -elav – patkányban termelt, felhasznált hígítás: 1:100 (DSHB)

α -ena – egérben termelt, felhasznált hígítás: 1:500 (DSHB)

α -FasII – egérben termelt, felhasznált hígítás: 1:50 (DSHB)

anti- β -galaktozidáz – egérben termelt, felhasznált hígítás: 1:1000 (Promega)

anti- β -galaktozidáz – nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:300 (Invitrogen)

α -glikogén-foszforiláz – nyúlban termelt, felhasznált hígítás: 1:20000

Felhasznált másodlagos ellenanyagok:

Egérben termelt ellenanyagra specifikus:

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

α -egér-A1-488: 1:600 (Invitrogen)

α -egér-A1-546: 1:600 (Invitrogen)

Nyúlban termelt ellenanyagra specifikus:

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

α -nyúl-A1-488: 1:600 (Invitrogen)

α -nyúl-A1-546: 1:600 (Invitrogen)

α -nyúl-HRP-konjugált: 1:10000

Patkányban termelt ellenanyagra specifikus:

Rat – Alexa-488, felhasznált hígítás: 1:600

Felhasznált egyéb reagensek:

Rhodamin-Phalloidin, felhasznált hígítás: 1:50 (Invitrogen)

A1488-Phalloidin, felhasznált hígítás: 1:100 (Invitrogen)

A1647-Phalloidin, felhasznált hígítás: 1:100 (Invitrogen)

DAPI (100 μ g/ml) , felhasznált hígítás: 1:500

FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK

AC - ADF/Cofilin

Arp - actin-related protein

CA – konstitutívan aktív

CC - coiled-coil domén

chic - *chickadee* gén (profilin)

Cobl - Cordon-bleu

DAAM - dishevelled associated activator of morphogenesis

DAD - diaphanous autoregulatory domain

DD - dimerizációs domén

dDAAM – *Drosophila* DAAM

Dia - Diaphanous

DID - diaphanous inhibitory domain

DN – domináns negatív

DRF - diaphanous related formin

Ena - Enabled

F-aktin – aktin filamentum

FH1 - formin homology 1

FH2 - formin homology 2

FRL - formin-related proteins identified in leukocytes

G-aktin – aktin monomer

GBD - GTPase-binding domain

GFP - zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)

GOF – gain of function (funkciónyerés)

Lmod - Leiomodin

LOF – loss of function (funkcióvesztés)

PBS - phosphate buffered saline

PCP – szöveti polaritás (planar cell polarity)

Scar - suppressor of cAMP receptor

WASP - Wiscott-Aldrich Syndrome Protein

WH2 - WASP homology 2

ÖSSZEFOGLALÁS

A komplex idegi működés alapja a megfelelő idegsejtek közötti kapcsolatok kialakulása. Ennek feltétele, hogy az idegsejtek nyúlványai megfelelő minta szerint projektáljanak, megtalálva a célsejtjüket. A növekvő axonok a környezeti jelek alapján választják ki növekedésük irányát, amiben döntő szerepet játszanak az axonok végén differenciálódó növekedési kúpok (growth cone). A nyúlvány növekedés során a növekedési kúp perifériális részén található ujjszerű (filopodiumok) és lemezszerű membránkitüremkedések (lamellipodiumok), illetve az ezeken elhelyezkedő receptorok játsszák a főszerepet a jelmolekulák érzékelésében. Attól függően, hogy vonzó vagy taszító jellegű faktorral érintkeznek, változik a növekedési kúp aktuális alakja és növekszik az axon egy meghatározott irányba. A növekvő axonvég jellegzetes sejtvázas elemekkel rendelkezik, amelyek a sejtvázas két fő alkotóeleméből, mikrotubulusokból és aktin filamentumokból állnak. A fonalas szerkezetű aktin a filopodiumokban kötegekbe rendeződik, míg a lamellipodiumokban laza, sugaras hálózatot alkot. Mivel az axonális növekedés folyamata dinamikus aktin sejtvázas átrendeződéseken alapul, megjósolható volt, hogy az aktin nukleáló és polimerizáló faktoroknak kitüntetett szerepük van az idegsejt nyúlványok kialakításában. Munkánk kezdetén még nem írtak le olyan aktin nukleáló és polimerizáló aktivitással rendelkező fehérjét, mely fontos szerepet játszik a növekedési kúp nem elágazó aktin filamentumainak kialakításában, és így a nyúlványnövekedésben. Mivel előzetes vizsgálatok alapján úgy találtuk, hogy a formin típusú aktin összeszerelő faktort kódoló *dDAAM* génről átíródó mRNS, és *dDAAM* fehérje is feldúsulást mutat az embrionális központi idegrendszer területén, érdekesnek találtuk megvizsgálni vajon a *dDAAM* szerepet játszik-e az idegsejt nyúlványok növekedésében.

Kísérleteinket első körben az embrionális központi idegrendszer területén végeztük el. A *dDAAM*^{Ex68} zigótikusan null mutáns embriók csak gyenge központi idegrendszeri eltéréseket

mutattak. Ez azonban magyarázható azzal, hogy az anyai hatás miatt ezek az állatok tartalmaztak vad típusú génterméket. Továbbiakban az anyai hatás gyengítése mellett transzheterozigóta mutáns embriókat ($dDAAM^{mat/zig}$) hoztunk létre. Ezek az állatok már viszonylag magas százalékban mutattak erősebb nyúlványnövekedési hibákat, melyek nem párosultak idegsejt hiányokkal. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a dDAAM szerepe a nyúlványok növekedésében van. Azt, hogy ez a fenotípus valóban a $dDAAM$ dózisének csökkenéséhez köthető, a teljes hosszúságú fehérje túltermelésével elvégzett menekítési kísérlet bizonyította.

A $dDAAM$ nyúlvány-növekedésben játszott szerepét erősítették meg az *in vitro* nyúlvány regenerációs tesztek is, amelyek során a dDAAM konstitutívan aktív formájának túltermelése elősegítette a hasi idegkötegből kilépő motoneuronok regenerációját, és növekedést. Az *in vivo* elvégzett funkcionyeréses kísérletek során a konstitutívan aktív dDAAM elrontja az embrionális nyúlványkötegek szabályozott mintáját. A CDAAM és a DAD-DAAM aktivált formák által okozott fenotípusok összehasonlítása alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a dDAAM aktin összeszerelő aktivitásának és a sejten belüli lokalizációjának a szabályozásában fontos szerepe van a fehérje N-terminális régiójának, ami összhangban van az egyéb DRF típusú forminokra vonatkozó ismeretekkel.

A $dDAAM$ nyúlványnövekedésben betöltött funkciójának pontosabb megértése érdekében primer idegsejt kultúrákon végeztünk kísérleteket, mely során a vad típusú, $dDAAM^{mat/zig}$ és a konstitutívan aktív formát (DADm-DAAM) túltermelő embriókból származó idegsejteket hasonlítottuk össze. A kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy a $dDAAM$ mutáns idegsejtek axon növekedése ugyan normális volt, azonban a növekedési kúpok területén megjelenő filopódiumok száma és hossza lecsökkent. Ezzel szemben a konstitutívan aktív formát túltermelő sejtek nyúlványai sokkal több filopódiummal rendelkeztek. Ezek alapján az

eredmények alapján úgy tűnik, hogy a *dDAAM* szerepe a nyúlványok növekedése során a növekedési kúp filopódiumainak kialakítása.

Miután bebizonyosodott, hogy a *dDAAM*-nak fontos szerepe van az embrionális idegsejtek nyúlványainak növekedésében, kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a nyúlványnövekedésben betöltött funkció mennyire általános, megfigyelhető-e a fejlődés későbbi stádiumaiban a központi idegrendszer más területein. A lárvális, báb és felnőtt állapotokat tanulmányozva megállapítottuk, hogy a *dDAAM* ezekben a stádiumokban is pán-neurálisnak nevezhető kifejeződési mintát mutat. Mivel a fehérje nagy mennyiségben jelen van a fejlődő gombatest területén, továbbiakban ezt az agyi struktúrát használtuk modell-rendszerül. A vizsgálatok során azt találtuk, hogy a *dDAAM* csökkent mennyisége mellett a gombatest nyúlványok növekedési és navigációs hibákat mutattak, mely alapján elmondhatjuk, hogy a *dDAAM* nem csak az embrionális, hanem a későbbi fejlődési stádiumokban is elengedhetetlen eleme az idegsejt nyúlványok növekedésének. Az embrionális idegrendszerben és a gombatest vizsgálatával kapott eredményeink együttesen azt jelzik, hogy ez a *DAAM* alcsaládba tartozó formin a nyúlványnövekedés egyik általános faktora.

A *dDAAM* idegrendszeri szerepének kimutatása után szeretnénk volna tisztázni, hogy a *dDAAM*-e az egyetlen formin melynek fontos szerepe van a nyúlványok növekedésében. Ezt úgy próbáltuk kideríteni, hogy idegrendszer-specifikusan *RNSi*-val lecsökkentettük a különböző forminok szintjét. A gombatesteket megvizsgálva azt találtuk, hogy a hat *Drosophila* formin gén közül csak a *dDAAM* és a *dia* mutat idegrendszeri fenotípust. A *Dia* fehérjéről kimutattuk, hogy a *dDAAM*-hoz hasonlóan, feldúsulást mutat a gombatest aktuálisan növekvő nyúlványaiban. Ennek ellenére a *dDAAM* és a *dia* mutánsok fenotípusa lényegesen különbözik egymástól. A *dDAAM*-mal ellentétben, a *dia* esetében a nyúlványok növekedésére gyakorolt pozitív hatást nem tudtunk kimutatni, helyette azt tapasztaltuk, hogy hiányában a Kenyon sejtek citokinézise sérül, és többmagvú sejtek jelennek meg, így az

osztódásból nem származnak funkcionális neuronok, melyek nyúlványmintázata vizsgálható lenne. Egyetlen a Dia nyúlványnövekedésben betöltött szerepére irányuló megfigyelésünk az volt, hogy posztmitotikus sejtekben aktív gombatest specifikus driverrel lecsökkentve a Dia mennyiségét, a β lebenyek esetében nem történik meg a terminálódás, az axonok átnyúltak az ellenkező oldali hemiszférába. Ez a megfigyelés viszont arra utal, hogy amennyiben a Dianak szerepe van a nyúlványok növekedésében, az valamilyen módon inkább a növekedésre gyakorolt negatív hatás lehet. Ezzel egybevág az a megfigyelésünk is, hogy a kisGTPázokkal elvégzett vizsgálataink alapján a Dia aktivátora a gombatest területén a RhoA lehet, amelynek a domináns negatív formája hasonló osztódási fenotípus okozott, mint a *dia* hiánya, és amelyről korábban leírták hogy az axon növekedés negatív regulátora. Összegzésében vizsgálataink azt a konklúziót sugallják, hogy a forminok közül *Drosophila*-ban a dDAAM az egyetlen kitüntetett szerepű aktin összeszerelő faktor az axon növekedés során.

Mint a DRF forminok családjába tartozó fehérje, a dDAAM is speciális módon aktiválódik, mégpedig az aktin polimerizációra képes aktív konformáció eléréséhez egy aktivált Rho típusú kisGTPáz bekötődése szükséges. Mivel a *Drosophila* genom több ilyen típusú fehérjét is kódol, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy melyik GTPáz lehet felelős a dDAAM aktiválódásáért a központi idegrendszerben, kimutatható-e egyáltalán specificitás ebben a vonatkozásban. Öt Rho típusú GTPáz saját idegrendszerei fenotípusát vizsgálva, illetve genetikai kölcsönhatáson alapuló vizsgálatok útján beláttuk, hogy mind az embrionális, mind a későbbi stádiumokban az idegrendszer területén a dDAAM aktivátorai a Rac alcsaládba tartozó kisGTPázok.

Genetikai interakciókkal további interakciós partnereket is azonosítottunk, mint a Profilin, és az Ena, melyek mind az embrionális, mind a későbbi stádiumokban együttműködnek a dDAAM-mal a nyúlványok növekedése során. Ezt a együttműködést co-immunoprecipitációs vizsgálatok is alátámasztották, illetve összhangban van az immunhisztokémiai vizsgálatokkal,

mely alapján a dDAAM fehérje részleges kolokalizációt mutat ezzel a két fehérjével a növekedési kúp területén, különös tekintettel a filopódiumokra.

A gombatest nyúlványok növekedése során fontos szerepük van az úgynevezett core PCP fehérjéknek. A genetikai interakciós vizsgálatok alapján a dDAAM ezekkel a fehérjékkel együttműködve szabályozza a nyúlványok növekedését, és megfelelő projekcióját. Az általunk felállított modell szerint a dDAAM a Wnt5 jelátviteli útvonalba illik bele, mégpedig a Wnt5 kötődése a Fz receptorhoz a Stbm/Pk/Fmi fehérjékkel együttműködve vezet a Dsh aktiválódásához. A Dsh viszont a dDAAM aktiválására képes a DAD doménjéhez való kötődése által, ami az aktin polimerizáló lokális aktiválódását eredményezi. Az irányított aktin összeszerelődés filopódiumok képződését segíti elő, ami végső soron a jelmolekula irányába történő nyúlványnövekedést eredményez. Az egyelőre nem világos, hogy a dDAAM aktivitását kizárólag a Wnt5 jel szabályozza-e vagy egyéb navigációs faktorok is képesek erre, és ha képesek akkor milyen jelátviteli komponenseken keresztül teszik azt, ezeknek a kérdéseknek a vizsgálata még folyamatban van.

Kísérleteinkkel egy olyan teljesnek nevezhető, a navigációs jeltől a sejtváz átrendeződésekig tartó jelátviteli rendszert tártunk fel, ami fontos új információkat szolgáltatott az axon növekedés folyamatáról és a DAAM típusú forminok működéséről is.

SUMMARY

The connections between neurons are necessary for the formation of a functional nervous system. A major prerequisite of this process is the outgrowth and precise navigation of axons toward their target cells. The growing axons choose their specific path by sensing the environmental cues. In this process, the key structure is the growth cone, formed at the tip of the growing axon. During axonal growth, the finger-like filopodia and the veil-like lamellipodia located at peripheral region of the growth cone play crucial roles because their plasmamembrane is rich in receptors of the guidance cues. Depending on the nature of these signals (attractant and repellent), the growth cone changes its shape, and the axon grows toward a specific location. Growth cone dynamics is ensured by microtubules and actin filaments, the two main components of the cytoskeleton. The growth cone actin filaments organize into bundled structures in the filopodia, whereas in the lamellipodia they form a loosely interwoven network of filaments. Because axonal growth relies on the dynamic actin cytoskeletal rearrangements, it was expected that actin nucleator and polymerization factors play essential roles in the forming of neurites. Despite of that, at the beginning of our research no protein was clearly identified yet that would act as an assembly factor for the unbranched actin filaments of the growth cone. However, our preliminary studies revealed that the mRNA and the protein of a formin type of actin assembly factor, encoded by the *Drosophila DAAM* gene (*dDAAM*), is highly enriched in the embryonic central nervous system (CNS), therefore dDAAM was a very good candidate for being the long sought-over axonal actin nucleation factor and we decided to investigate dDAAM function during neural differentiation.

The first set of experiments we carried out was focused on the analysis of the embryonic CNS. To begin the functional analysis, we examined embryos homozygous for the null mutant *dDAAM*^{Ex68} allele, however, these zygotic null mutant embryos showed very subtle phenotypic differences as compared to wild type. Because we knew that the maternal

dDAAM mRNA is heavily loaded into the embryo, we thought that the lack of phenotypic effect is most easily explained by maternal effect. Therefore, next we generated maternal and zygotic mutant embryos to weaken the maternal effect. The CNS of most of these embryos clearly showed axonal growth defects without significantly altering neuron numbers. To prove that the phenotypic defects observed are indeed due to the impairment of *dDAAM* function, rescue experiments were carried out by overexpressing the full-length protein which was able to fully rescue the axonal phenotypes. Together, these results indicated that this formin type of actin assembly factor plays an important role during neuronal differentiation and axonal growth regulation.

To collect further evidences for our conclusion, we used an *in vitro* axonal regeneration test. During this experiment the constitutively active form of dDAAM enhanced the regeneration and growth of the axons exiting the ventral nerve cord, thus these results further confirmed that *dDAAM* has an important role in neurite formation. When the activated form of dDAAM was expressed *in vivo* within the CNS, we found that the constitutively active dDAAM has the ability to disrupt the normally highly stereotyped pattern of the embryonic axonal tracts. Comparing the phenotypes caused by two different activated forms, CDAAM and DAD-DAAM, our results suggested that the N-terminal region of the protein plays an important role in the regulation of the actin assembly activity provided by the C-terminal FH2 domain, and also plays a role in the subcellular localization of the dDAAM protein, which is in good agreement with the findings for other DRF (Diaphanous related) formins.

To address the subcellular function of dDAAM, we generated primary neuronal cultures from *dDAAM^{mat/zig}* mutant embryos and from embryos that overexpress the constitutively active form of dDAAM (DADm-DAAM). The results we collected indicated that in *dDAAM* mutants the axons grow to their normal length, however the number and the

length of the filopodia is strongly decreased in the area of the growth cone. In contrast to this LOF data, cells that express the constitutively active form exhibited far more filopodia than their wild type counterparts. These results strongly suggested that the major subcellular function of *dDAAM* is to regulate filopodia formation in neuronal growth cones.

Once we have established that dDAAM has an essential role in embryonal neurite growth, we wanted to know whether this function is restricted to the embryonic stages or dDAAM is a more general regulator of axonal growth playing a role during the later stages of CNS development as well. By studying the larval, pupal and adult stages we revealed that dDAAM expression remains pan-neural during the whole course of CNS development. Because we noted that the dDAAM protein is heavily enriched in the developing mushroom body axons, we focused most of our subsequent studies on this particularly well known model system. Our results demonstrated that the decreased amount of dDAAM causes growth and guidance defects in the mushroom body, suggesting that dDAAM is crucial for neurite outgrowth during the later stages of the neuronal development. Taking the embryonic, larval and adult phenotypic analysis together, dDAAM clearly appears to be a general regulator of neuronal differentiation.

After having clearly demonstrated that the formin dDAAM is a critical element of axon growth, we wanted to know whether dDAAM is the only formin which involved in the regulation of this process. To address this question we reduced the level of other formin proteins by using RNAi tools in a neuronal specific manner. By analyzing the mushroom bodies we discovered that out of the six formin genes, only the *dDAAM* and *dia* mutants exhibit a neuronal phenotype. With respect of the Dia protein we revealed that it is enriched in the newly born axons of the mushroom body, which is very similar to our findings about dDAAM. Despite of that similarity in the expression pattern, the two mutants are characterized by different phenotypic effects. Contrasting to *dDAAM*, in the case of *dia* we

didn't find any positive effect to the neurite outgrowth, instead we noticed that cytokinesis is disrupted in the Kenyon cells of the mushroom body. As a consequence, most of the cells became multi-nuclear that prevents the formation of functional neurons. The only observation that hinted towards *dia* having an effect in the axonal growth regulation, was that the β -axons of the mushroom body failed to terminate at the midline of the brain and overextended into the opposite hemisphere. This observation implied that if *dia* has a role in the axonal growth, it works as a negative regulator. This is in good agreement with another set of data we obtained by studying RhoA. The dominant negative form of the small GTPase RhoA, that has previously been shown to be a negative regulator of neurite growth, caused very similar cell division phenotypes as the lack of *dia*, therefore RhoA is the likely activator of Dia in the mushroom body both acting as an inhibitor of axonal growth. Together our data suggest that dDAAM is the only formin type of actin assembly factor which plays an essential role in neurite formation.

As typical for the members of DRF family, it is thought that dDAAM activation requires the binding of an activated Rho GTPase to the GBD domain (GTPases binding domain) of the protein. Given that the *Drosophila* genome contains several small GTPases of the Rho family, we were curious to know which one is responsible for the activation of dDAAM in the CNS. With the examination of the phenotypes of five Rho GTPases, combined with genetic interaction tests, we demonstrated that the major activators of dDAAM during neuronal development are the Rac GTPases.

By using genetic interaction assays, we identified further interaction partners, these include Profilin and Enabled that we think to cooperate with dDAAM during all stages of neuronal growth. This interaction was further supported by co-immunoprecipitation experiments, and it is also consistent with the immunostaining experiments showing that

dDAAM at least partially colocalizes with these protein in the region of the growth cone, in particular within the filopodia.

According to recent findings, the PCP genes play a crucial role during the growth of the mushroom body neurites. Our genetic interaction experiments suggested that the dDAAM protein works together with the PCP proteins during the regulation of axonal growth and guidance in the mushroom body. Based on these data, we propose that dDAAM acts in the Wnt5 signaling pathway. In this pathway the binding of the Wnt5 guidance cue leads to the activation of the Fz receptor that in turn leads to the activation of Dsh while cooperating with the Stbm/Pk/Fmi proteins. Subsequently, the Dsh protein activates dDAAM by binding to its DAD domain that promotes local actin assembly. The directed actin elongation leads to the formation of new filopodia, which drives axon growth towards the direction of the guidance cue. At present, it is not clear whether Wnt5 is the only guidance cue that regulates the activity of dDAAM or other navigation factors also play a role, the investigation of this question awaits future experiments.

Taken all our data together, we uncovered a whole novel signaling system from an axon guidance cue to the direct regulator of the actin cytoskeleton that plays an essential role during directed axonal growth regulation. These studies not only deepened our knowledge about neuronal growth but we also learnt a lot about the *in vivo* functions of the DAAM formin subfamily.

IRODALOMJEGYZÉK

- Adler, P.N. (2002). Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* 2, 525-535.
- Ahuja, R. és mtsai. (2007) Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, 131(2), 337-350.
- Alberts, A. S. (2001). Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J. Biol. Chem.* 276, 2824-2830.
- Arakawa, Y., Bito, H., Furuyashiki, T., Tsuji, T., Takemoto-Kimura, S., Kimura, K., Nozaki, K., Hashimoto, N., and Narumiya, S. (2003). Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J Cell Biol* 161, 381-391.
- Aspenström, P., Richnau, N. és Johansson, A. (2006) The diaphanous-related formin DAAM1 collaborates with the Rho GTPases RhoA and Cdc42, CIP4 and Src in regulating cell morphogenesis and actin dynamics. *Exp Cell Res*, 312(12), 2180-2194.
- Awasaki T, Ito K. (2004) Engulfing action of glial cells is required for programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Curr Biol* 14:668–677.
- Awasaki T, Tatsumi R, Takahashi K, Arai K, Nakanishi Y, Ueda R, Ito K. (2006) Essential role of the apoptotic cell engulfment genes draper and ced-6 in programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Neuron* 50:855–867.
- Balling A, Technau GM, Heisenberg M. (1987) Are the structural changes in adult *Drosophila* mushroom bodies memory traces? Studies on biochemical learning mutants. *J Neurogenet* 4:65–73.
- Barko, S., Bugyi, B., Carlier, M.F., Gombos, R., Matusek, T., Mihaly, J., and Nyitrai, M. (2010). Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of *Drosophila* DAAM. *J Biol Chem* 285, 13154-13169.
- Barzik, M., Kotova, T.I., Higgs, H.N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F.B., and Schafer, D.A. (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem* 280, 28653-28662.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., et al. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109, 509-521.
- Bentley, D., és O'Connor, T.P. (1994). Cytoskeletal events in growth cone steering. *Curr Opin Neurobiol* 4, 43-48.

- Bentley, D., és Toroian-Raymond, A. (1986) Disoriented pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. *Nature* 323, 712–715
- Bixby, J. L. és Spitzer, N. C. (1984) Early differentiation of vertebrate spinal neurons in the absence of voltage-dependent Ca^{2+} and Na^{+} influx. *Dev. Biol.* 106, 89-96.
- Bosch, M. és mtsai. (2007) Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin. *Mol Cell*, 28(4), 555-568.
- Boutros, M., és Mlodzik, M. (1999). Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech Dev* 83, 27-37.
- Brembs B, Wiener J. (2006) Context and occasion setting in *Drosophila* visual learning. *Learn Mem* 13:618–628.
- Campos-Ortega J.A. és Hartenstein, V. (1997) Central Nervous System. In *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster* Heidelberg: Springer-Verlag
- Carrier, M.F. (1990). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Adv Biophys* 26, 51-73.
- Carroll, E.A. és mtsai. (2003) Cordon-bleu is a conserved gene involved in neural tube formation. *Dev Biol*, 262(1), 16-31
- Cassimeris, L. and Spittle, C. (2001) Regulation of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol.* 210, 163-226
- Chang, F., Drubin, D. and Nurse, P. (1997) cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J. Cell Biol.* 137, 169-182.
- Chen PL, Clandinin TR (2008) The cadherin Flamingo mediates level-dependent interactions that guide photoreceptor target choice in *Drosophila*. *Neuron* 58:26–33.
- Chereau, D., F. Kerff, et al. (2005). Actin-bound structures of Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(46): 16644-16649
- Chereau, D., M. Boczkowska, és mtsai. (2008). Leiomodin Is an Actin Filament Nucleator in Muscle Cells. *Science* 320(5873): 239-243.
- Chesarone, M.A., DuPage, A.G., and Goode, B.L. (2010) Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 62-74.
- Copeland, S.J. és mtsai. (2007) The diaphanous inhibitory domain/diaphanous autoregulatory domain interaction is able to mediate heterodimerization between mDia1 and mDia2. *J Biol Chem*, 282(41), 30120-30130
- Crittenden JR, Skoulakis EMC, Han K, Kalderon D, Davis RL. (1998) Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn Mem* 5:38–51.

- Davis RL. (2004) Olfactory learning. *Neuron* 76:44:31–48.
- Dent, E.W., és Gertler, F.B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209-227
- Dent, E.W., Kwiatkowski, A.V., Mebane, L.M., Philippar, U., Barzik, M., Robinson, D.A., Gupton, S., Van Veen, J.E., Furman, C., Zhang, J., et al. (2007). Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol* 9, 1347-1359.
- Dickson, B. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959-1964
- Dominguez, R. (2007). The β -Thymosin/WH2 Fold. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1112(1): 86-94.
- Eisenmann, K.M., West, R.A., Hildebrand, D., Kitchen, S.M., Peng, J., Sigler, R., Zhang, J., Siminovitch, K.A., and Alberts, A.S. (2007). T cell responses in mammalian diaphanous-related formin mDia1 knock-out mice. *J Biol Chem* 282, 25152-25158.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M. S., Chow, C. J., Adames, N., Pringle, J. R., Peter, M. and Boone, C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276, 118-122.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D. C., Boone, C. and Bretscher, A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* 4, 260-269.
- Fass J, Gehler S, Sarmiere P, Letourneau P, Bamburg JR. (2004) Regulating filopodial dynamics through actin-depolymerizing factor/cofilin. *Anat Sci Int.* 79,173-83
- Fujimura L, Watanabe-Takano H, Sato Y, Tokuhisa T, Hatano M (2009) Prickle promotes neurite outgrowth via the Dishevelled dependent pathway in C1300 cells. *Neurosci Lett* 467:6–10.
- Gao FB, Kohwi M, Brenman JE, Jan LY, Jan YN (2000) Control of dendritic field formation in Drosophila: the roles of flamingo and competition between homologous neurons. *Neuron* 28:91–101.
- Genova, J.L., Jong, S., Camp, J.T., and Fehon, R.G. (2000). Functional analysis of Cdc42 in actin filament assembly, epithelial morphogenesis, and cell signaling during Drosophila development. *Dev Biol* 221, 181-194.
- Gertler, F.B., Comer, A.R., Juang, J.-L., Ahern, S.M., Clark, M.J., Liebl, E.C., and Hoffmann, F.M. (1995). enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the Drosophila Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev* 9, 521-533.
- Gilbert, Scott F. (2000) Early embryonic development. In the Developmental Biology. (6th edition) Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates, Inc. Publishers

- Gho M, Schweisguth F (1998) Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 393:178–181
- Goldberg, D.J., and Burmeister, D.W. (1986). Stages in axon formation: observations of growth of *Aplysia* axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *The Journal of Cell Biology* 103, 1921-1931.
- Gomez, T. M. and Spitzer, N. C. (1999) In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 397, 350-355.
- Gomez TM, Robles E, Poo M, Spitzer NC (2001) Filopodial Calcium Transients Promote Substrate-Dependent Growth Cone Turning. *Science* 291,1983 - 1987
- Goode, B. L. and M. J. Eck (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* 76: 593-627.
- Goodman,C.S. and Doe,C.Q. (1993). Embryonic Development of the *Drosophila* Central Nervous System. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. II (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 1131-1206. Plainview (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Goodman CS (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci* 19:341–377
- Govek, E.E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19, 1-49.
- Gu, X. and Spitzer, N. C. (1995) Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients. *Nature* 375, 784-787.
- Habas, R., Kato, Y. and He, X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 107, 843-854.
- Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L., and Dickson, B.J. (2002). Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* 416, 438-442.
- Heisenberg M, Borst A, Wagner S, Byers D. (1985) *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* 2:1–30.
- Heisenberg M. (2003) Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* 4:266–275
- Hertzog, M., van Heijenoort, C., Didry, D., Gaudier, M., Coutant, J., Gigant, B.t., Didelot, G., Pr  at, T., Knossow, M., Guittet, E., et al. (2004). The β -Thymosin/WH2 Domain: Structural Basis for the Switch from Inhibition to Promotion of Actin Assembly. *Cell* 117, 611-623.

- Higashi, T. és mtsai., (2008) Biochemical Characterization of the Rho GTPase-regulated Actin Assembly by Diaphanous-related Formins, mDia1 and Daam1, in Platelets. *J. Biol. Chem.*, 283(13), 8746-8755.
- Higgs, H.N., and Peterson, K.J. (2005). Phylogenetic Analysis of the Formin Homology 2 Domain. *Molecular Biology of the Cell* 16, 1-13.
- Hirokawa, N., and Takemura, R. (2004). Molecular motors in neuronal development, intracellular transport and diseases. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 564-573.
- Hüfner, K., Higgs, H.N., Pollard, T.D., Jacobi, C., Aepfelbacher, M., and Linder, S. (2001). The Verprolin-like Central (VC) Region of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Induces Arp2/3 Complex-dependent Actin Nucleation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 35761-35767.
- Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T. and Takai, Y. (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.
- Joiner WJ, Crocker A, White BH, Sehgal A. (2006) Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature* 441:757–760.
- Kato, T., Watanabe, N., Morishima, Y., Fujita, A., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2001). Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *J Cell Sci* 114, 775-784.
- Kater, S. B., Mattson, M. P., Cohan, C. and Conner, J. A. (1988) Calcium regulation of the neuronal growth cone. *Trends Neurosci.* 11, 317-323.
- Keleman, K., T. Micheler, et al. (2009). RNAi-phiC31 construct and insertion data submitted by the Vienna *Drosophila* RNAi Center.
- Kida, Y., Shiraishi, T., and 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.
- Kida, Y.S., Sato, T., Miyasaka, K.Y., Suto, A., and Ogura, T. (2007). Daam1 regulates the endocytosis of EphB during the convergent extension of the zebrafish notochord. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 6708-6713.
- Kim, G.H., and Han, J.K. (2007). Essential role for beta-arrestin 2 in the regulation of *Xenopus* convergent extension movements. *Embo J* 26, 2513-2526.
- Kishida S, Yamamoto H, Kikuchi A(2004) Wnt-3a and Dvl induce neurite retraction by activating Rho-associated kinase. *Mol Cell Biol* 24:4487–4501.
- Korobova, F., and 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.

- Kwiatkowski, A.V., Robinson, D.A., Dent, E.W., Edward van Veen, J., Leslie, J.D., Zhang, J., Mebane, L.M., Philippar, U., Pinheiro, E.M., Burds, A.A., et al. (2007). Ena/VASP Is required for neuritogenesis in the developing cortex. *Neuron* 56, 441-455.
- Lake BB, Sokol SY (2009) Strabismus regulates asymmetric cell divisions and cell fate determination in the mouse brain. *J Cell Biol* 185:59-66
- Lammers, M. és mtsai., 2005. The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho*GTP. *EMBO J*, 24(23), 4176-4187.
- Lanier, L.M., Gates, M.A., Witke, W., Menzies, A.S., Wehman, A.M., Macklis, J.D., Kwiatkowski, D., Soriano, P., and Gertler, F.B. (1999). Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* 22, 313-325.
- Lee, Hyun K., and Deneen, B. (2012). Daam2 Is Required for Dorsal Patterning via Modulation of Canonical Wnt Signaling in the Developing Spinal Cord. *Developmental Cell* 22, 183-196.
- Lee RC, Clandinin TR, Lee CH, Chen PL, Meinertzhagen IA, Zipursky SL (2003) The protocadherin Flamingo is required for axon target selection in the Drosophila visual system. *Nat Neurosci* 6:557-563.
- Lee, T., Winter, C., Marticke, S.S., Lee, A., and Luo, L. (2000). Essential roles of Drosophila RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron* 25, 307-316.
- Letourneau, P.C. and Shattuck T.A. (1989) Distribution and possible interactions of actin-associated proteins and cell adhesion molecules of nerve growth cones. *Development*, 105 (1989), pp. 505-519
- Li, F. and Higgs, H.N. (2005) Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *J. Biol. Chem.* 8, 6986-6992
- Lin, C.H., and Forscher, P. (1993) Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions. *J Cell Biol* 121, 1369-1383.
- Liu L, Wolf R, Ernst R, Heisenberg M. (1999) Context generalization in Drosophila visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* 400: 753-756
- Liu, W., Sato, A., Khadka, D., Bharti, R., Diaz, H., Runnels, L.W., and Habas, R. (2008). Mechanism of activation of the Formin protein Daam1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 210-215.
- Luo L. (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18, 601-35.
- Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M, Zou Y(2003) Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 302:1984-1988.

- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T.D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *The Journal of Cell Biology* 127, 107-115.
- Machesky, L.M., and Insall, R.H. (1998). Scar1 and the related Wiskott–Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Current Biology* 8, 1347-1356.
- Martin JR, Ernst R, Heisenberg M. (1998). Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* 5:179–191
- Matus A. (1991) Microtubule-associated proteins and neuronal morphogenesis. *J Cell Sci Suppl.* 15,61-7
- Matusek, T., Djiane, A., Jankovics, F., Brunner, D., Mlodzik, M., and Mihaly, J. (2006). The *Drosophila* formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton. *Development* 133, 957-966.
- Mizunami M, Weibrecht JM, Strausfeld NJ. (1998) Mushroom bodies of the cockroach: their participation in place memory. *J Comp Neurol* 402:520–53
- Mongiu, A.K., Weitzke, E.L., Chaga, O.Y., and Borisy, G.G. (2007). Kinetic-structural analysis of neuronal growth cone veil motility. *J Cell Sci* 120, 1113-1125.
- Montcouquiol, M. (2007). Planar polarity in mammals: similarity and divergence with *Drosophila Melanosgaster*. *J Soc Biol* 201, 61-67.
- Moseley, J.B. és mtsai., (2004). A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell*, 15(2), 896-907.
- Mrkusich, E.M., Flanagan, D.J., and Whittington, P.M. (2011). The core planar cell polarity gene prickles interacts with flamingo to promote sensory axon advance in the *Drosophila* embryo. *Developmental Biology* 358, 224-230.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. és Pollard, T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 6181-6186.
- Nakaya, M.A., Habas, R., Biris, K., Dunty, W.C., Jr., Kato, Y., He, X., and Yamaguchi, T.P. (2004). Identification and comparative expression analyses of Daam genes in mouse and *Xenopus*. *Gene Expr Patterns* 5, 97-105.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B.J., and Luo, L. (2002). Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* 416, 442-447.

- Ng, J., and Luo, L. (2004). Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron* 44, 779-793.
- Ng, J. (2012). Wnt/PCP proteins regulate stereotyped axon branch extension in *Drosophila*. *Development* 139, 165-177.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Okabe, S., and Hirokawa, N. (1991). Actin dynamics in growth cones. *Int. Rev. Cytol.* 178, 207-275. *J. Neurosci.* 11, 1918-1929.
- Okuda H, Miyata S, Mori Y, Tohyama M (2007) Mouse Prickle1 and Prickle2 are expressed in postmitotic neurons and promote neurite outgrowth. *FEBS Lett* 581:4754-4760.
- Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., and Rosen, M.K. (2005). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* 433, 488-494
- Pascual A, Preat T. (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115-1117
- Peng, J., Kitchen, S.M., West, R.A., Sigler, R., Eisenmann, K.M., and Alberts, A.S. (2007). Myeloproliferative defects following targeting of the *Drf1* gene encoding the mammalian diaphanous related formin mDia1. *Cancer Res* 67, 7565-7571.
- Pitman JL, McGill JJ, Keegan KP, Allada R. (2006) A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature* 441:753-756.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 545-576.
- Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36: 451-477.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C. and Zigmond, S. H. (2003). Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* 42, 486-496.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. and Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 297, 612-615.
- Quinlan, M. E., J. E. Heuser, et al. (2005). *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature* 433(7024): 382-388.
- Quinlan, M.E., Hilgert, S., Bedrossian, A., Mullins, R.D., and Kerkhoff, E. (2007). Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappuccino. *The Journal of Cell Biology* 179, 117-128.

- Rivero, F., Muramoto, T., Meyer, A.-K., Urushihara, H., Uyeda, T., and Kitayama, C. (2005). A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from Dictyostelium, fungi and metazoa. *BMC Genomics* 6, 28.
- Rosales-Nieves, A.E., Johndrow, J.E., Keller, L.C., Magie, C.R., Pinto-Santini, D.M., and Parkhurst, S.M. (2006). Coordination of microtubule and microfilament dynamics by Drosophila Rho1, Spire and Cappuccino. *Nature Cell Biology* 8, 367-376
- Rose, R., Weyand, M., Lammers, M., Ishizaki, T., Ahmadian, M. R. and Wittinghofer, A. (2005). Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature* 435, 513-518.
- Sagot, I., Klee, S. K. and Pellman, D. (2002a). Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* 4, 42-50.
- Sagot, I., Rodal, A. A., Moseley, J., Goode, B. L. and Pellman, D. (2002b). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* 4, 626-631.
- Sakata, D., Taniguchi, H., Yasuda, S., Adachi-Morishima, A., Hamazaki, Y., Nakayama, R., Miki, T., Minato, N., and Narumiya, S. (2007). Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *J Exp Med* 204, 2031-2038.
- Sato, A., Khadka, D.K., Liu, W., Bharti, R., Runnels, L.W., Dawid, I.B., and Habas, R. (2006). Profilin is an effector for Daam1 in non-canonical Wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation. *Development* 133, 4219-4231.
- Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Stradal, T.E.B., Schleicher, M., and Faix, J. (2006). The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 7694-7699.
- Senti KA, Usui T, Boucke K, Greber U, Uemura T, Dickson BJ (2003) Flamingo regulates R8 axon-axon and axon-target interactions in the Drosophila visual system. *Curr Biol* 13:828–832.
- Shima Y, Kengaku M, Hirano T, Takeichi M, Uemura T(2004) Regulation of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin. *Dev Cell* 7:205–216.
- Shima Y, Kawaguchi SY, Kosaka K, Nakayama M, Hoshino M, Nabeshima Y, Hirano T, Uemura T (2007) Opposing roles in neurite growth control by two seven-pass transmembrane cadherins. *Nat Neurosci* 10:963–969.
- Shimizu, K., Sato, M., and Tabata, T. (2011). The Wnt5/Planar Cell Polarity Pathway Regulates Axonal Development of the Drosophila Mushroom Body Neuron. *The Journal of Neuroscience* 31, 4944-4954.

- Steinel, M.C., and Whittington, P.M. (2009). The atypical cadherin Flamingo is required for sensory axon advance beyond intermediate target cells. *Developmental Biology* 327, 447-457.
- Strasser, G.A., Rahim, N.A., VanderWaal, K.E., Gertler, F.B., and Lanier, L.M. (2004). Arp2/3 is a negative regulator of growth cone translocation. *Neuron* 43, 81-94.
- Strutt, D. (2003). Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Development* 130, 4501-4513.
- Takei, K., Shin, R. M., Inoue, T., Kato, K. and Mikoshiba, K. (1998) Regulation of nerve growth mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in growth cones. *Science* 282, 1705-1708.
- Tang S, Guo A. 2001. Choice behavior of *Drosophila* facing contradictory visual cues. *Science* 294:1543–1547.
- Technau GM. 1984. Fiber number in the mushroom bodies of adult *Drosophila melanogaster* depends on age, sex and experience. *J Neurogenet* 1:113–126
- Tessier–Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123–1133
- Tissir F, Bar I, Jossin Y, De Backer O, Goffinet AM (2005) Protocadherin Celsr3 is crucial in axonal tract development. *Nat Neurosci* 8:451–457.
- Urban, E., Jacob, S., Nemethova, M., Resch, G.P., and Small, J.V. (2010). Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nat Cell Biol* 12, 429-435.
- Verkhusha, V.V., Otsuna, H., Awasaki, T., Oda, H., Tsukita, S., and Ito, K. (2001). An Enhanced Mutant of Red Fluorescent Protein DsRed for Double Labeling and Developmental Timer of Neural Fiber Bundle Formation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 29621-29624.
- Wang Y, Thekdi N, Smallwood PM, Macke JP, Nathans J (2002) Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS. *J Neurosci* 22:8563–8573.
- 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.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B. M. and Narumiya, S. (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.
- Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997a) 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

- Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997b) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385,265–269
- Wills, Z., Bateman, J., Korey, C.A., Corner, A., and 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.
- Yamada KM, Spooner BS, Wessells NK. (1970) Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 66, 1206-12
- Yamada KM, Spooner BS, Wessells NK. (1971) Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *J Cell Biol*. 49, 614-35
- Zallen, J.A., Cohen, Y., Hudson, A.M., Cooley, L., Wieschaus, E., and Schejter, E.D. (2002). SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *J Cell Biol* 156, 689-701.
- Zheng, J. Q. (2000) Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions *Nature* 403, 89-93
- Zhou L, Bar I, Achouri Y, Campbell K, De Backer O, Hebert JM, Jones K, Kessaris N, de Rouvroit CL, O'Leary D, Richardson WD, Goffinet AM, Tissir F (2008) Early forebrain wiring: genetic dissection using conditional *Celsr3* mutant mice. *Science* 320:946–949.
- Zigmond, S. H., M. Evangelista, et al. (2003). Formin Leaky Cap Allows Elongation in the Presence of Tight Capping Proteins. *Current Biology* 13(20): 1820-1823.