

## Szakmai zárójelentés az „Az axon növekedést szabályozó DAAM alcsaládba tartozó forminok funkcionális analízise” című (OTKA K82039) pályázatról

Pályázatunk legfontosabb tudományos célkitűzése egy formin típusú aktin összeszerelő faktor funkcionális jellemzése volt, különös tekintettel az axon növekedésben betöltött szerepére, illetve potenciálisan egyéb szövetspecifikus funkciókra. Eredetileg négy fontos kísérleti célkitűzésünk volt, jelen beszámolómban az elért eredmények ismertetését ennek a négy nagy témakörnek megfelelően fogom bemutatni. A beszámoló második részében pedig azokat a részben nem várt, de a pályázat fő kísérleti megközelítéséhez köthető eredményeket fogom összefoglalni, amelyek az axon növekedéshez közvetlenül nem, de a DAAM (Dishevelled associated activator of morphogenesis) fehérje család funkcionális jellemzéséhez döntően hozzájárultak.

### 1. **DAAM kölcsönható partnerek azonosítása**

#### 1.1 *Genetikai kölcsönható partnerek azonosítása*

A DAAM formin alcsalád *Drosophila* tagjának (dDAAM) funkcionális jellemzése érdekében egyik fontos célkitűzésünk a dDAAM-mal együttműködő fehérjék azonosítása volt. Ennek során egyik eszközünk a genetikai interakciós partnerek azonosítása volt. Ebben a kísérleti elrendezésben egy hipomorf, adult életképes dDAAM allélt (*dDAAM<sup>Ex1</sup>*) használtunk, amelyről korábban beláttuk, hogy axon növekedési és navigációs hibákat mutat az adult agy gombatest nevű területén (ami egy szaglással összefüggő tanulási és memória központ). Részben jelölt gének vizsgálatával, másrészt a *Drosophila* deficiencia kit segítségével, olyan mutánsokat kerestünk, amelyek módosítják a *dDAAM<sup>Ex1</sup>* allél közepesen erős (kb. 50%-os penetranciával megjelenő) axonális fenotípusát. 354 autoszámális deléciós törzs tesztelését végeztük el, ami lefedi a *Drosophila* genom ~80%-át, és a validáló kísérletek után 23 enhancer és 9 szuppresszor hatású deléciót azonosítottunk. Ezeket a kölcsönható régiókat szűkítő deléciókkal, majd az adott régióba térképeződő egyedi géneket érintő mutációkkal tovább tesztelve, 15 kölcsönható partnert tudtunk gén szinten is azonosítani. Az eredetileg delécióval azonosított potenciális kölcsönható partnereken kívül, 110 olyan jelölt gén mutációit is vizsgáltunk, amelyeket korábban vagy az axon növekedéssel vagy a sejtvez szabályozással hoztak kapcsolatba. Ezek között 12 genetikai kölcsönható partnert találtunk.

#### 1.2 *Biokémiai interakciós partnerek azonosítása*

A genetikai kölcsönható partnerek azonosítása mellett célunk volt az is, hogy egy attól teljesen független módszerrel, affinitáskromatográfiás eljárással tisztítsuk a dDAAM fehérjével egy komplexben található fehérjéket. Ennek érdekében elkészítettünk egy *in situ* 3xFLAG tag-elt dDAAM mutánst (dDAAM3xFLAG „knock-in” allél), ami tökéletesen életképes és a fúziós fehérje kifejeződése a gén saját szabályozó régiójának a kontrollja alatt áll. Ez az eszköz elméletileg optimálisnak látszott a kísérletek kivitelezésére, azonban valószínűleg a viszonylag moderált dDAAM kifejeződési szint miatt, a tisztítási körülmények

optimalizálása jelentős erőfeszítést igényelt. Ezt a technikai problémát a harmadik támogatási évben sikerült megoldani, amikor a dDAAM fehérjét tartalmazó komplex tisztítását sikeresen elvégeztük. A potenciális biokémiai együttműködő partnereket az MTA SZBK LCMS laboratóriuma azonosította. A negatív kontrollként használt vad típusú, a dDAAM3xFLAG mutáns és a dDAAM::3xFLAG fúziós fehérjét idegrendszer specifikusan túltermelő minták összevetése és az ismétlődő kísérletek elvégzése után kb. 30 olyan fehérjét azonosítottunk, amelyek ebben a rendszerben potenciális együttműködő partnernek látszott.

### 1.3 A genetikai és biokémiai kölcsönható partnerek összehasonlítása

A genetikai és a biokémiai interakciós kísérletek sikeres kivitelezése után elvégeztük a két csoport összehasonlítását. Ennek az elemzésnek az a konklúziója, hogy a biokémiai módszerrel azonosított jelöltek közül 17 térképeződik olyan kromoszómális régióba vagy érint olyan gént, amelyek genetikai interakciót mutatott a *dDAAM<sup>Ex1</sup>* alléllal. Ily módon a genetikai és biokémiai adatok kölcsönösen megerősítették egymást, és ezt a 17 jelöltet tartjuk a legígéretesebbnek, ahol jó esély van arra, hogy *in vivo* is létező kölcsönhatást tártunk fel. A 17 jelölt többsége korábbi vizsgálatok alapján egyértelműen köthető az idegrendszer működéséhez, ami további megerősítésként szolgált eredményeink vonatkozásában. Kiemelendő, hogy jelöltjeink közül 7 fehérje kapcsolható az axon növekedéshez, 6 fehérje a szinaptogenezishez és 7 olyan fehérjét is találtunk, amelyek részt vesznek a mikrotubulusok szabályozásában (az említett csoportok részben átfednek egymással).

Összegésében tehát a genetikai és biokémiai kölcsönható partnerek azonosítására irányuló kísérletek sikeresen lezárultak. Összesen kb. 40 jelöltet azonosítottunk, amelyek közül 17 fehérje mindkét rendszerben pozitívnak bizonyult. Ezeket tartjuk a legfontosabb jelölteknek, bár alaposabb vizsgálatok nélkül nyilvánvalóan nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy a csak egyik vagy csak másik rendszerben kölcsönható gének/fehérjék is releváns *in vivo* partnerek. Az értékelés teljessé tétele érdekében fontos megjegyezni, hogy a biokémiai tisztítás jóval nehezebb és időigényesebb feladatnak bizonyult az eredetileg tervezettnél, ezért a potenciális partnerek részletes jellemzése is később kezdődött a tervezettnél.

## 2. Az új dDAAM kölcsönható fehérjék funkcionális vizsgálata

### 2.1 A szöveti polaritási jelátviteli rendszer és a dDAAM kölcsönhatás jellemzése

A genetikai úton azonosított dDAAM kölcsönható gének egyik csoportját az ún. szöveti polaritási vagy elsődleges PCP (planar cell polarity) gének alkották. A deléciós analízist követő génspecifikus vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a *dDAAM* genetikai kölcsönhatást mutat a *frizzled* (*fz*), a *strabismus* (*stbm*), a *flamingo* (*fmi*) és *prickle* (*pk*) génekkel a gombatest axonok növekedése során. Tekintve, hogy a DAAM fehérje család első tagját eredetileg a szintén PCP gént kódoló Dishevelled (*Dsh*) fehérje kölcsönható partnereként azonosították, megvizsgáltuk a *dDAAM*-hoz hasonlóan szintén X kromoszómás *dsh* és a *dDAAM* közti interakciót is, ami szintén pozitív eredményt adott. Két friss publikáció alapján a PCP faktorok, egy ismeretlen mechanizmus útján, hozzájárulnak a gombatest axonok

fejlődéséhez, ezért a dDAAM és a PCP fehérjék kapcsolatát részletesen is jellemeztük. Az előző megfigyelésekhez kapcsolódva, a Dsh-dDAAM kapcsolatot immunprecipitációs módszerrel is igazoltuk, tehát biokémiai eszközökkel is kimutatható volt, hogy ez a két fehérje az adult agyban egy komplexben található. Egy aktin polimerizáció inkompetens mutáns forma segítségével megmutattuk, hogy a dDAAM fehérje aktin összeszerelő aktivitása valóban szükséges az axonok fejlődéséhez. Genetikai és sejtbiológiai módszerek kombinálásával feltártuk, hogy a gombatestben a Wnt5 jelmolekula a Fz és Stbm receptorok aktiválásával a Dsh és Rac1 fehérjéken keresztül aktiválja a dDAAM-ot, ami elősegíti az aktin polimerizációt és a filopodium képződést. Összegezve, eredményeink azt jelzik, hogy az idegsejtekben axon navigálási rendszerként működő PCP szabályozási modul a dDAAM fehérjén keresztül befolyásolja az aktin sejtváza átrendeződéseket a gombatest axonok növekedési kúpjában. Mindezzel együtt sikerült feltárnunk egy olyan gyakorlatilag teljes navigációs jelátviteli rendszert, ami a Wnt5 jelmolekulától a PCP modulon és egy sejtváza effektoron keresztül a növekedési kúpban bekövetkező sejtalkalakulásig tart. Ezen kívül eredményeink arra is rávilágítottak, hogy a PCP/dDAAM modul szöveti polarizálódásban betöltött szerepe ugyan *Drosophila*-ban nem konzervált, de az axon növekedés szabályozásában játszott szerep nagy valószínűséggel igen.

A PCP navigációs rendszer és a dDAAM közötti kapcsolat vizsgálatának eredményei publikálás alatt vannak. Az igen hosszú és küzdelmes publikálási folyamat a végéhez közeledik: a Neuron és a PNAS visszautasítása után a Journal of Neuroscience igen pozitív általános bírálói vélemények mellett szeretne még látni néhány kontrol kísérletet, amelyek egy kivételével már elkészültek és minden remény megvan arra, hogy a módosított kéziratot hamarosan visszaküldjük és az végző elfogadásra kerüljön.

Egy másik általunk azonosított genetikai kölcsönható partner az Abelson (Abl) tirozin kináz volt. Ismert, hogy a Dsh foszforilációja az Abl fehérje által, szükséges a PCP modul aktiválódásához a szöveti polarizálódás során. Ezek alapján feltételezzük, hogy az Abl az idegsejtekben is hasonlóan járul hozzá a Dsh aktiválódásához, ami viszont a dDAAM fehérje aktiválódását és fokozott aktin polimerizációt eredményez. Egy további érdekes kölcsönható partner a Wnk szerin-treonin kináz, amelyet szintén kapcsolatba hoztak a Wnt jelátviteli rendszerrel és az embrionális axon növekedéssel. Annak érdekében, hogy az Abl/dDAAM és Wnk/dDAAM kapcsolatokat, illetve általánosságban a foszforiláció szerepét jobban megértsük ebben a rendszerben, további kísérleteket terveztünk, ezek kivitelezése még folyamatban van.

A potenciális kölcsönható partnerek egy további érdekes csoportját a mikrotubulus asszociált fehérjék alkotják. Tekintve, hogy a forminok főként aktin sejtváza szabályozó fehérjeként ismertek, ez egy meglepő eredmény volt. Ugyanakkor szakirodalmi adatok alapján az is ismert, hogy *in vitro* a forminok több alcsoportja is képes mikrotubulusokat kötni, ennek az *in vivo* jelentőségéről azonban nagyon keveset tudunk. Kontroll kísérletként mi is megvizsgáltuk a dDAAM fehérje mikrotubulus kötő képességét, és *in vitro* egy koszedimentációs tesztben kimutatható volt a kölcsönhatás. Ezen kívül, primer embrionális idegsejt kultúrákban azt is kimutattuk, hogy a *dDAAM* mutáns idegsejtekben az aktin alapú filopodialis fenotípusok mellett, a mikrotubulus rendszer kevésbé komplex, mint a vad típusban, és a növekedési kúp területe is kisebb. A kölcsönhatást mutató mikrotubulus

asszociált fehérjék egyike az egyetlen *Drosophila* MAP1B homológot kódoló Futsch. A Futsch -ról ismert, hogy szerepe van az axon növekedésben és a szinaptogenezisben is. Kísérleteink alapján, a Futsch fehérje szintje *dDAAM* mutáns idegsejtekben jelentősen csökken, mind az axon növekedési kúpban, mind pedig a neuro-muszkuláris junkciók szinaptikus bouton-jaiban. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a *dDAAM* fehérje hozzájárul a Futsch stabilizálásához és azon keresztül feltételezhetően elősegíti a mikrotubulus stabilizálódást. Ennek a hipotézisnek a bizonyítása és a molekuláris mechanizmus felderítése még további kísérleteket igényel, de eddigi eredményeink rendkívül érdekesek és újszerűek, mert azt jelzik, hogy a *dDAAM* fehérje az aktin sejtvez szabályozásán túl részt vesz az aktin/mikrotubulus kapcsolatok koordinálásában is. Az aktin és a mikrotubulus sejtvez összehangolt szabályozása az axon növekedés központi, de csak részben megértett kérdése, ezért megfigyeléseink úttörő jelentőségűek lehetnek a területen. Abban bízunk, hogy ezeket a kísérleteket egy év távlatában sikerül lezárni és azt követően minél gyorsabban publikálni, tehát minimálisan további egy olyan publikáció várható, amely jelen OTKA pályázat támogatásával valósul meg.

### **3. A filopodium képződés mechanizmusának vizsgálata**

A növekedési kúp perifériális területén képződő, aktin-alapú, dinamikus filopodiumok kitüntetett szerepet játszanak az irányított axon növekedésben, mert a filopodiális membránok receptorokban rendkívül gazdagok és a navigációs jelek érzékelésével döntően hozzájárulnak a növekedési kúp megfelelő irányba történő elmozdulásához. Korábbi megfigyelések alapján többféle elképzelés is napvilágot látott a filopodium képződés mechanizmusával kapcsolatban. Az egyik modell szerint a filopodiális aktin filamentumok a lamellipodiális aktin hálózatból erednek, más idegsejtek vizsgálata alapján azonban azt javasolták, hogy a filopodiumok csúcsában forminok segítik elő az aktin összeszerelődést. A filopodium képződés mechanizmusának és azon belül az aktin összeszerelő faktorok szerepének jobb megértése érdekében *Drosophila* embrionális idegsejtekben vizsgáltuk a filopodium képződés mechanizmusát. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az aktin nukleáló faktorok közül *Drosophila* embrionális primer idegsejtekben az Arp2/3 komplex és a formin típusú *dDAAM* fehérje is szükséges az axon növekedési kúpban a filopodiumok képződéséhez. Azt is bizonyítottuk, hogy a két nukleáló komplex együttműködik az Enabled fehérjével a filopodium képződés során. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy az Arp2/3 komplex által létrehozott elágazó aktin hálózat és a *dDAAM* segítségével összeszerelt nem elágazó aktin filamentumok egyaránt szükségesek a filopodiumok képződéséhez, és a két nukleáló komplex együttműködik a nyúlványok képződése során. Erre vonatkozó eredményeink publikálásra kerültek a PLoS One című folyóiratban (Goncalves-Pimentel C, Gombos R, Mihály J, Sanchez-Soriano N, Prokop A. Dissecting Regulatory Networks of Filopodia Formation in a *Drosophila* Growth Cone Model). Ezzel a publikációval kapcsolatban egy mini-review közlemény írására is felkértük bennünket a Communicative&Integrative Biology (Landes Biosciences kiadó) című laptól. Ez is egy elfogadott közlemény lett: Prokop A, Sánchez-Soriano N, Gonçalves-Pimentel C, Molnár I, Kalmár T. and Mihály J. DAAM family members leading a novel path into formin research.

#### 4. Evolúciós konzerváltság

Saját korábbi eredményeink és az egér Daam gének erős idegrendszeri kifejeződése alapján úgy gondoljuk, hogy a DAAM formin alcsalád axon növekedésben betöltött szerepe evolúciósan konzervált. Az egér Daam gének feltételezett szerepének vizsgálatát az axon növekedés során, egy egér P19 sejtés neurogén differenciációs modell rendszerben tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy a reténsavval indukált P19 sejtek kifejezik mindkét Daam ortológot (mDaam1 és mDaam2), és mindkét fehérje kimutatható a citoplazmában és erősen felhalmozódik a sejtek axon-szerű nyúlványaiban is. Az mDaam1 és mDaam2 potenciális szerepének tisztázása érdekében RNSi alapú funkcióvesztéses vizsgálatokat végeztünk. Mindkét génre több, független régiót targetáló RNSi konstrukciót készítettünk és azokat stabilan kifejező P19 sejt vonalakat szelektáltunk, majd vizsgáltuk azok reténsavval indukált neurogén differenciálódását. Azt állapítottuk meg, hogy a csendesítő konstrukciók jelenlétében nem változott meg szignifikáns mértékben a P19 sejtek differenciálódási képessége. A két egér Daam gén közötti redundancia vizsgálata érdekében az mDaam1 és mDaam2 gének együttes csendesítését is elvégeztük, azonban ebben az esetben sem tapasztaltunk meggyőző változást a P19 sejtek neurogén differenciálódásában. Ezek alapján azt a konklúziót tudjuk levonni, hogy az egér Daam fehérjék a lokalizációjuk alapján hozzájárulhatnak az idegi irányú differenciálódáshoz P19 sejtekben, de vagy nem játszanak esszenciális szerepet vagy funkciójuk redundáns. Az utóbbi lehetőséget az a tény is támogatja, hogy az egér genom összesen 15 formin típusú fehérjét kódol. Egy ettől független lehetőség, hogy az mDaam gének szerepe nem minden sejt típusban kritikus. Ezt a hipotézist embrionális őssejtek differenciálódásának nyomon követésével kezdtük el vizsgálni. Megállapítottuk, hogy a neurogén irányba történő differenciálódás során a 7. és 10. nap közötti időszakban az mDaam1 gén kifejeződési szintje 52-szeres, az mDaam2-é kb. 800-szoros emelkedést mutat, ami a 14. napig hasonló szinten marad, majd a 20. napra jelentősen csökken. Fehérje szinten ezek a változások szintén megjelennek, mindkét fehérje kimutatható a sejtek citoplazmájában és erősen felhalmozódnak a sejtek axon-szerű nyúlványaiban is. A rendkívül nagymértékű génindukció egyértelműen arra utal, hogy ezekre a forminokra szükség van az idegi differenciálódás során. Ennek bizonyítására a funkcionális kísérletek még folyamatban vannak. A hosszú ideig tartó differenciálódás miatt az RNSi alapú géncsendesítés nem működött kellően hatékonyan, ezért az újabban kidolgozott CRISPR/Cas9 rendszerrel tervezünk mDaam1 és mDaam2 mutáns sejteket előállítani. Azok vizsgálata után eredményeink publikálása várható. Végezetül érdemes megjegyezni, hogy gerinces modell organizmusokban genetikai megközelítéssel még nem térképezték fel kellő mélységben a DAAM formin alcsalád funkcióját, de figyelemre méltó egy friss közlemény (Colombo et al., 2013, Development 140, 3997-4007), amely bizonyítja, hogy zebrahalban a Daam1a fehérje elősegíti az axonok és dendritek fejlődését a habikuláris idegsejtekben. Ez a publikáció mindenképpen egy megerősítés az evolúciós konzerváltság vonatkozásában, és alátámasztja a munkahipotézisünk helyességét.

Kiegészítő megjegyzésként hozzá kell tennem, hogy ennek a kutatási iránynak a fő felelőse, Szécsényi Anita, a projekt befejezése előtt másfél évvel fizetetlen szabadságra

távozott gyermeke egészségügyi problémája miatt. Az ő távozása nyilvánvalóan nehézségeket okozott a téma előrehaladásában.

## **5. Az Src-dDAAM modul szerepe a tracheacsövek hosszának szabályozása során**

A genetikai interakciós vizsgálataink során azt találtuk, hogy az egyik *Drosophila Src* homológot kódoló gén, az *Src42A* mutánsai szignifikáns mértékben szuppresszálják a *dDAAM* mutánsok axon növekedési hibáit a gombatestben, ezért ennek a kölcsönhatásnak a vizsgálatát is tervbe vettük bár azt már korábbi vizsgálatainkból tudtuk, hogy a tracheakutikula mintájának meghatározása során is együttműködik ez a két fehérje. Időközben azonban kapcsolatba lépett velünk Greg Beitel csoportja (Northwestern University, Evanston, USA), akik azt találták, hogy az *Src42A*-nak szerepe van tracheacsövek hosszának a meghatározásában és kíváncsiak voltak arra, hogy van-e együttműködés a *dDAAM* és az *Src42A* között ebben a rendszerben. A kérdést egy tudományos együttműködés keretein belül kezdtük el vizsgálni, aminek során bizonyítottuk az *Src42A/dDAAM* kölcsönhatás instrukatív szerepét a tubuláris szervfejlődésben, és ezzel elsőként azonosítottunk olyan fehérjéket, amelyek nem gátló hatás útján szabályozzák a tracheacsövek hosszát, hanem pozitíven elősegítik azok megnyúlását/növekedését. Emellett feltártuk a tracheacsőhossz szabályozás egyik fontos új mechanizmusát, ami egy anizotrópikus apikális felszín növekedésen alapul. Egy embrionális egér aorta fejlődési modell segítségével bizonyítottuk, hogy ez a mechanizmus, minimálisan az *Src* vonatkozásában, valószínűleg evolúciósan erősen konzervált mechanizmus. Eredményeinket a *Nature Cell Biology* hasábjain publikáltuk. Ezek a megfigyelések tehát direktan nem kötődnek az OTKA pályázatunk idegrendszeri témájához, ugyanakkor kiinduló pontjuk egyértelműen az OTKA pályázat teljesítéséhez köthető. Tudományos értelemben pedig ennek az új szövetspecifikus formin funkciónak a feltárása nagymértékben hozzájárult ennek a fehérje családnak a funkcionális jellemzéséhez.

## **6. A dDAAM fehérje izoformái**

A *dDAAM* gén *in situ* FLAG tag-elése (lásd 1.2 pont) lehetővé tette, hogy a rendkívül specifikus anti-FLAG ellenanyag segítségével is vizsgáljuk a *dDAAM* fehérje kifejeződését különböző szövetekben és fejlődési stádiumokban. Ezen kísérletek során észrevettük, hogy a gén legalább két fehérje izoformát kódol, egy kb. 130 kD-os és egy kb. 162 kD-os formát. Ez a két izoforma valószínűleg megfelel a Flybase adatbázisban prediktált PB és PD izoformáknak, amelyek egymással teljesen átfedő fehérjék, azzal a különbséggel, hogy a PD izoforma N-terminális régiója tartalmaz 310 olyan aminosavat, ami hiányzik a PB formából. Azt is megfigyeltük, hogy Western blot analízis alapján a központi idegrendszerben csak a rövidebb izoforma fejeződik ki, míg más szövetekben, így pl. az izmokban főként a PD fehérje mutatható ki. Tekintve, hogy vizsgálatainkat korábban a 130 kD-os izoformára fókuszáltuk, de funkcióvesztéses mutánsaink mindkét izoforma funkcióját érintették, alkalmasan elhelyezkedő P-elem inszerciók segítségével izoforma specifikus mutánsokat állítottunk elő, mind a PB mind a PD izoforma vonatkozásában. A PB izoformát érintő

mutánsok homozigóta életképesek, míg a PD mutánsok letálisnak bizonyultak. A PB mutánsok vizsgálata megmutatta, hogy az expressziós adatokkal összhangban, ezekben a mutánsokban az embrionális idegrendszerben csökken a dDAAM fehérje szintje (de kimutatható marad), míg az adult agyban gyakorlatilag nem detektálható a fehérje. Ennek megfelelően, az embrionális idegrendszer fejlődése normálisnak látszik, ugyanakkor az adult gombatestek kb. 90% súlyos axon növekedési hibákat mutat. Ezek alapján a PB izoforma csak az adult idegrendszer fejlődése szempontjából esszenciális faktor, az embrionális fejlődés során viszont hiánya kompenzálható. Tekintve, hogy a PCP navigációs rendszer és a dDAAM közötti kapcsolatot elsősorban az adult agyban vizsgáltuk, a PB specifikus mutáns kísérleteink szempontjából rendkívül hasznosnak bizonyult és nagymértékben hozzájárult a PCP/DAAM szabályozási kapcsolat jobb megértéséhez.

## 7. A DAAM fehérje szerepe a szarkomerogenezisben

A *dDAAM* mutánsok vizsgálata során észrevettük, hogy az adult életképes *dDAAM<sup>Ex1</sup>* mutánsok egy része nem képes repülni, míg a null mutáns lárvák jóval lassabban mozognak, mint vad típusú társaik. Tekintve, hogy a csökkent mozgásképességet idegrendszeri problémák is okozhatják, és tudtuk, hogy a dDAAM fehérjének szerepe van az idegrendszer fejlődésében, megvizsgáltuk menekíti-e a motilitási fenotípust a dDAAM fehérje idegrendszer specifikus expressziója. A CNS specifikus túltermelésnek azonban csak részleges, gyenge menekítő hatása volt, ellentétben az izom specifikus túltermeléssel, ami majdnem tökéletes menekítő hatást eredményezett. Ezek alapján arra következtettünk, hogy ennek a forminnak szerepe van az izomrendszer fejlődésében is, amit az is megerősített, hogy a fehérje immunfestés alapján erős felhalmozódást mutatott a szarkomerekben. Annak ellenére, hogy a szarkomerek aktin és miozin filamentumokra épülő szerkezete már több évtizede ismert, a szakirodalom tanulmányozása után kiderült, hogy a szarkomerikus aktin filamentumok összeszerelődésének nem ismert a mechanizmusa. Tekintve, hogy ez egy fundamentális biológiai kérdés, úgy gondoltuk a dDAAM szarkomerikus funkciójának tanulmányozása fontos új ismereteket adhat ezen a területen, ezért elhatároztuk, hogy részleteiben is megvizsgáljuk mi módon járul hozzá az izomfejlődéshez a dDAAM.

A dDAAM mutáns izmok vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy azok súlyos szerkezeti hibákat mutatnak: szarkomer hossz rövidülés, abnormális vagy részlegesen hiányzó Z-korong és M-vonal, csökkent szarkomer szám és szabálytalan, teljesen felborult szerkezetű miofibrilláris szerveződés. Összegésében vizsgálataink azt jelezték, hogy ez a formin a szarkomer képződés egyik korai faktora, ami elősegíti a vékony filamentumok összeszerelődését. Adataink alapján felállítottunk egy új modellt a szarkomerikus aktin filamentumok képződésére, ami magyarázatot kínál arra, hogyan növekedhetnek ezek a filamentumok egy (+) vég kötő fehérje segítségével a (-) végük irányából. Ezen kívül eredményeink feltárták, hogy a dDAAM-nak szerepe van az aktin és miozin filamentum rendszerek integrálódásában is, és arra is rávilágítottunk, hogy az idegrendszeri funkcióhoz hasonlóan, a szarkomerogenezisben betöltött szerep is evolúciósan konzervált. Ez utóbbi javaslatunkat egy tőlünk független publikáció is megerősítette, amelyben az egér *mDaam1*

gén szívizom fejlődésben betöltött szerepét írták le (Li et al., 2011, Development 138, 303-315). Saját eredményeink a PLoS Genetics-ben kerültek publikálásra (Molnar I, Migh E, Szikora S, Kalmar T, Vegh AG, et al. (2014) DAAM Is Required for Thin Filament Formation and Sarcomerogenesis during Muscle Development in Drosophila. PLoS Genet 10(2): e1004166).

Közleményjegyzék:

	<b>Közl. típusa</b>	<b>mező</b>	<b>Tartalom</b>
1.	folyóiratcikk	<i>Szerzők</i>  <i>Cím</i>  <i>Lelőhely</i>  <i>Közlés éve</i>  <i>IF</i>  <i>OTKA támogatás</i>  <i>feltüntetve?</i>	Goncalves-Pimentel C, Gombos R, Mihaly J, Sanchez-Soriano N, Prokop A.  Dissecting Regulatory Networks of Filopodia Formation in a Drosophila Growth Cone Model  PLoS One 6(3):e18340  2011  4.411  igen
2.	folyóiratcikk	<i>Szerzők</i>  <i>Cím</i>  <i>Lelőhely</i>  <i>Közlés éve</i>  <i>IF</i>  <i>OTKA támogatás</i>  <i>feltüntetve?</i>	Prokop A, Sánchez-Soriano N, Gonçalves-Pimentel C, Molnár I, Kalmár T. and Mihály J.  DAAM family members leading a novel path into formin research  Communicative & Integrative Biology 4:5, 1-5  2011  még nem elérhető  igen
3.	folyóiratcikk	<i>Szerzők</i>	Nelson KS, Khan Z, Molnár I, Mihály J, Kaschube M, Beitel GJ



		<i>Cím</i> <i>Lelőhely</i> <i>Közlés éve</i> <i>IF</i> <i>OTKA támogatás</i> <i>feltüntetve?</i>	Drosophila Src regulates anisotropic apical surface growth to control epithelial tube size. Nature Cell Biology 14:518-525 2012 20,761 igen
4.	folyóiratcikk	<i>Szerzők</i>  <i>Cím</i>  <i>Lelőhely</i> <i>Közlés éve</i> <i>IF</i> <i>OTKA támogatás</i> <i>feltüntetve?</i>	Molnár I, Migh E, Szikora S, Kalmár T, Végh AG, Deák F, Barkó S, Bugyi B, Orfanos Z, Kovács J, Juhász G, Váró G, Nyitrai M, Sparrow JC and <b>Mihály J.</b> DAAM is required for thin filament formation and sarcomerogenesis during muscle development in Drosophila.  <b>PLoS Genetics</b> 10(2): e1004166 2014 8.517 igen
5	Előadás	<i>Szerzők</i>  <i>Cím</i>  <i>Esemény</i> <i>Időpont</i>	Gombos R. and Mihaly J.  The formin DAAM functions as the molecular effector of the planar cell polarity pathway during axonal development in the Drosophila brain  Molecular Life Sciences Conference 2013, Siófok
6.	Poszter prezentáció	<i>Szerzők</i>  <i>Cím</i>  <i>Esemény</i>	Gombos R., Migh E. and Mihaly J.  The formin DAAM functions as the molecular effector of the planar cell polarity pathway during axonal development in the Drosophila brain  EMBO Workshop: Decoding neuronal circuit structure and

		<i>Időpont</i>	function 2014, Istanbul
7.	Poszter prezentáció	<i>Szerzők</i>	Migh E., Gombos R., Darula, Z. and Mihaly J.
		<i>Cím</i>	Identification of the molecular interaction partners of the formin dDAAM
		<i>Esemény</i>	Neurofly, European Fly Neurobiology Conference
		<i>Időpont</i>	2014, Hersonissos, Greece
8.	Poszter prezentáció	<i>Szerzők</i>	Gombos R., Migh E. and Mihaly J.
		<i>Cím</i>	The Drosophila formin dDAAM is required for axon growth in the adult brain
		<i>Esemény</i>	Neurofly, European Fly Neurobiology Conference
		<i>Időpont</i>	2014, Hersonissos, Greece
9.	folyóiratcikk	<i>Szerzők</i>	Gombos R., Migh E., Antal O., Mukherjee A., Jenny A. and Mihaly J.
		<i>Cím</i>	The formin DAAM functions as molecular effector of the planar cell polarity pathway during axonal development in Drosophila
		<i>Lelőhely</i>	Revízió alatt a J. Neuroscience-nél
		<i>Közlés éve</i>	várhatóan 2015
		<i>IF</i>	
		<i>OTKA támogatás</i>	igen
		<i>feltüntetve?</i>	