

AS FUNÇÕES DE FORMINAS, KLF6, TUSC3, CYP11A1 E FOXN1 NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO: CONEXÕES IMPROVÁVEIS, MAS POSSÍVEIS. UMA REVISÃO DA LITERATURA

THE ROLES OF FORMINS, KLF6, TUSC3, CYP11A1, AND FOXN1 IN EMBRYONIC DEVELOPMENT: UNLIKELY BUT POSSIBLE CONNECTIONS. A LITERATURE REVIEW

Beatriz Cubero Freitas; Guilherme Vannucchi Portari; Claudio Roberto Simon

Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Rua Vigário Carlos, 100. Uberaba/MG, CEP 38025-350 claudio.simon@uftm.edu.br

RESUMO

Durante o desenvolvimento animal, diversos genes agem em “circuitos” que evoluíram e tornaram-se indispensáveis para os diferentes processos do desenvolvimento embrionário. As distintas funções gênicas na embriogênese têm sido identificadas por diversas técnicas experimentais *in vivo*, *ex vivo* e *in silico*. Muitas vezes são laboriosas, de alto custo e às vezes limitadas na identificação de interações de proteínas com estruturas moleculares distintas. Identificar novos “circuitos” formados por genes e proteínas de características diversas é ferramenta valiosa para melhor compreensão do desenvolvimento embrionário normal e disfuncional. Neste trabalho, através de uma revisão narrativa da literatura, visou-se a identificação de possíveis relações entre: os genes codificadores de membros da família de proteínas *forminas* e também dos genes: *TUSC3*, *KLF6*, *CYP11A1* e *FOXN1* com a embriogênese animal. A extensa, variada e evolutivamente conservada família de *forminas* codifica proteínas reguladoras do citoesqueleto, envolvidas em vários processos do desenvolvimento. *TUSC3* uma proteína do complexo Oligossacariltransferase, atua na N-glicosilação, na supressão tumoral e também na maturação sexual. O gene *KLF6* (*Kruppel Like Factor 6*) codifica uma proteína nuclear com domínios dedos-de-zinco, que regulam múltiplos genes. A proteína codificada por *CYP11A1* faz parte da membrana mitocondrial interna e atua na esteroidogênese e espermatogênese, enquanto o gene *FOXN1*, é expresso principalmente em células epiteliais do timo e da pele com distintas funções. A análise dos artigos selecionados evidencia a participação desses genes em uma grande variedade de processos do desenvolvimento animal e em diferentes espécies animais. *Forminas* e *KLF6* atuam em processos similares de desenvolvimento e podem eventualmente interagir. *CYP11A1* também atua similarmente à *KLF6* e *forminas* em menor grau. *TUSC3* e *FOXN1*, a despeito de seus papéis fundamentais, atuam no desenvolvimento animal em contextos mais específicos. A investigação experimental dessas possíveis interações deve contribuir para o melhor entendimento de suas funções no desenvolvimento, nos processos comuns do desenvolvimento animal aqui apontadas.

PALAVRAS-CHAVE: embriogênese animal, circuitos genéticos, função gênica

ABSTRACT

During animal development, several genes act in “circuits” that have evolved and become indispensable for the different processes of embryonic development. The distinct gene functions in embryogenesis have been identified by several experimental techniques such as: *in vivo*, *ex vivo* and *in silico*. They are often laborious, expensive, and sometimes limited in identifying interactions

between proteins with distinct molecular structures. Identifying new “circuits” formed by genes and proteins with diverse characteristics is a valuable tool for better understanding normal and dysfunctional embryonic development. In this work, through a narrative review of the literature, we aimed to identify possible relationships amongst the genes encoding members of the *formin* family of proteins and also the genes: *TUSC3*, *KLF6*, *CYP11A1*, and *FOXN1* and the animal embryogenesis. The extensive, varied and evolutionarily conserved family of *formins* encodes cytoskeletal regulatory proteins involved in several developmental processes. *TUSC3*, a protein of the Oligosaccharyltransferase complex, acts in N-glycosylation, tumor suppression and also in sexual maturation. The *KLF6* gene (*Kruppel Like Factor 6*) encodes a nuclear protein with zinc finger domains, which regulate multiple genes. The protein encoded by *CYP11A1* is part of the inner mitochondrial membrane and acts in steroidogenesis and spermatogenesis, while the *FOXN1* gene is expressed mainly in epithelial cells of the thymus and skin with distinct functions. The analysis of the selected articles shows the participation of these genes in a wide variety of processes of animal development and in different animal species. *Formins* and *KLF6* act in similar developmental processes and may eventually interact. *CYP11A1* also shares similar actions to *KLF6* and *formins* to a lesser extent. *TUSC3* and *FOXN1*, despite their fundamental roles, act in animal development in more specific contexts. Experimental investigation of these possible interactions should contribute to a better understanding of their functions in development, in the common processes of animal development highlighted here.

KEYWORDS: animal embryogenesis, genetic circuits, gene function

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento animal é um processo biológico complexo baseado na utilização alternativa do genoma das células embrionárias sob influência, tanto de sinais maternos quanto de sinais do microambiente embrionário que modulam as respostas celulares e promovem a diferenciação e morfogênese das estruturas orgânicas. Na evolução da biodiversidade terrestre, conservou-se, modulou-se ou modificou-se os mecanismos básicos do desenvolvimento, possibilitando que novas estruturas surgissem, se modificassem ou se adaptassem¹. Tais mecanismos são regidos por conjuntos de genes que agem como um “intrincado circuito de informações” que coordenam a formação das estruturas do corpo. Um exemplo claro são os ossos do crânio, os quais variam grandemente em tamanho e forma de espécie para espécie, porém as estruturas ósseas desempenham funções similares². Na era pós-genômica foi possível estabelecer uma infinidade desses circuitos (ou *clusters*) gênicos e relacioná-los aos mais variados processos de desenvolvimento e conseqüentemente às suas disfunções. Conhecer esses circuitos gênicos torna-se fundamental para o entendimento da embriogênese das diferentes estruturas animais e de suas variações. Apesar dos grandes avanços, muitos outros destes circuitos ainda são desconhecidos, principalmente se compostos por genes que codificam proteínas muito distintas

estruturalmente, ou ainda, que não interajam diretamente, ou que sejam hierarquicamente distantes numa cadeia de ativação ou ainda, não investigados no contexto de atuação na embriogênese animal. Incontáveis estudos de transcriptômica, proteômica, mutagênese, *crosslink* e análises em *highthroughput* são as principais ferramentas na detecção das relações entre genes e revelaram muitos dos circuitos gênicos conhecidos nos diferentes processos biológicos. Porém, são laboriosos, de custo elevado e demonstram correlações específicas dentro de um determinado processo celular, necessitando de experimentação específica para cada animal e contexto do desenvolvimento, criando dificuldades para o entendimento de suas atividades na embriogênese animal.

Neste estudo, hipotetizou-se, se alguns genes de interesse de nosso grupo de pesquisa: os genes codificadores da família de *Forminas* e dos genes *TUSC3*; *KLF6*; *FOXn1* e *CYP11A1*, atuariam num possível circuito gênico ativo em processos do desenvolvimento animal, mesmo tendo seus produtos tão diversos em estrutura e funções moleculares.

As *forminas* compõem uma vasta família de genes, evolutivamente conservados desde leveduras até mamíferos placentários, totalizando cerca de 9 subtipos³. Seus produtos são proteínas grandes (>1000 a.a.), diméricas e com múltiplos domínios que participam de variados processos e estruturas subcelulares. Participam ativamente da polimerização e remodelamento dinâmicos do citoesqueleto de actina regulando a polimerização de dímeros de actina instáveis pelo seu domínio assinatura FH2. As proteínas forminas atuam na formação e dinâmica de diversas especializações de membranas celulares como anéis contráteis, filopódios, fibras de stress, “feixes” de actina polarizados, junções de adesão, posicionamento nuclear, entre inúmeras outras funções^{4,5}.

O gene de *TUSC3* (*Tumor suppressor candidate 3*) codifica uma proteína que faz parte do complexo oligossacarídeos transferase, que além de atuar na N-glicosilação de proteínas, desempenha diversas funções biológicas. Seu produto localiza-se no retículo endoplasmático e interage com a Proteína Fosfatase 1 (PPPC1A) atuando no sistema de transporte dos íons (Mg²⁺), cujo papel é importante na aprendizagem e memória⁰⁶⁻⁰⁷. Demonstrou-se que *TUSC3* possui função onco-supressora, uma vez que mutações em *TUSC3* contribuem para a transformação celular maligna em cânceres ovarianos, pancreáticos e glioblastoma^{8,9} além de estar relacionada com a deficiência mental não-sindrômica autossômica recessiva.

O gene *KLF6* (*Kruppel Like Factor 6*) codifica uma proteína “ligante de DNA”, com domínios “dedo-de-zinco” (*zinc-finger*), que atua como fator de transcrição nuclear, com afinidade

a “elementos” ricos em guanina nas regiões promotoras de múltiplos genes alvo e tem sido relacionada à supressão de tumores, sobrevivência e morte celulares em diferentes processos biológicos¹⁰.

O gene codificador da enzima *CYP11A1* e o gene *Foxn1* (Forkhead box N1) são outros dois genes, para os quais, pretendeu-se identificar possíveis interações durante o desenvolvimento animal. A proteína CYP11A1 localiza-se na membrana mitocondrial interna e participa canonicamente dos processos de esteroidogênese e espermatogênese¹¹. Mutações em *CYP11A1* estão relacionadas às deficiências hormonais, prematuridade, fenótipos de sub androgenização completa e insuficiência adrenal^{12,13}.

FOXN1, é um gene membro da família de proteínas FOX de fatores de transcrição pois contém o domínio estereotípico *forkhead box* e atua na proliferação, diferenciação e senescência celulares. Os principais locais de expressão de *FOXN1* são epiderme e timo atuando tanto no desenvolvimento dessas estruturas quanto no envelhecimento celular e câncer^{14,15}.

Observou-se, nos produtos desses genes, proteínas de naturezas distintas tanto em suas estruturas moleculares quanto em processos biológicos em que atuam. A expressão destes é distinta tanto no que tange aos organismos estudados, quanto nos níveis, *i.e.*, teciduais, celulares e subcelulares. Acredita-se que identificar, na literatura, artigos demonstrando a participação desses genes, durante o desenvolvimento animal, em processos comuns ou não e, eventuais interações (diretas ou indiretas, ou ainda a atuação em processos comuns do desenvolvimento) poderá ampliar o entendimento sobre suas funções biológicas, com potencial utilização para biomarcação, avaliação prognóstica e idealmente, na terapêutica. Realizou-se uma revisão narrativa da literatura com o intuito de identificar estudos demonstrando a participação desses genes em processos do desenvolvimento (embriogênese) animal e se os mesmos poderiam interagir formando circuitos gênicos.

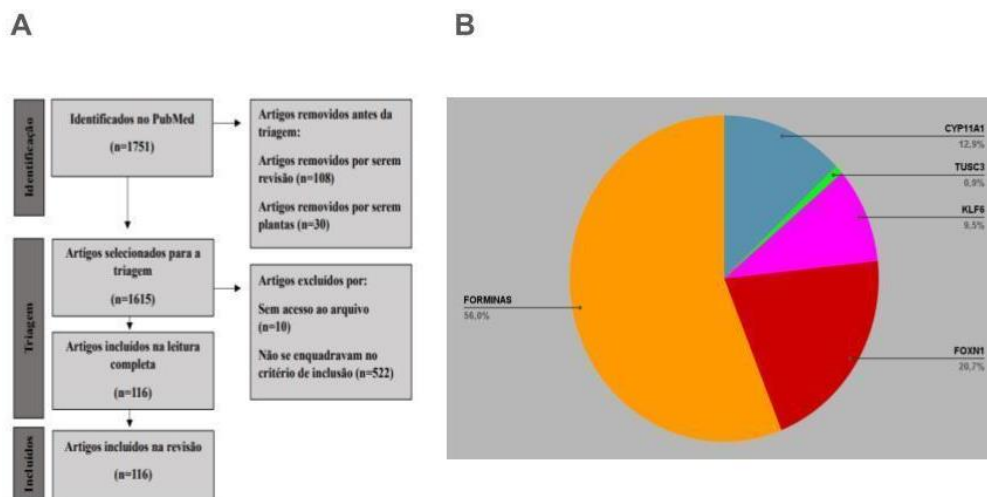
METODOLOGIA

Nesta revisão narrativa, utilizou-se como base de dados o MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*) através de buscas na plataforma PubMed, utilizando o termo “development”, combinado com o nome dos genes *TUSC3*, *KLF6*, *CYP11A1*, *FOXN1*”, individualmente. No caso da família de proteínas forminas, devido ao grande número de

subfamílias, nomes, siglas e apelidos, optou-se por utilizar o termo “*formin*” para incluir as proteínas com os domínios estereotípicos presentes nesta grande variedade de proteínas. Nas buscas não houve filtragem temporal e os critérios de inclusão de artigos foram: (1) com dados originais, (2) artigos publicados em inglês, espanhol e português e (3) artigos relacionados com desenvolvimento embrionário animal, utilizou-se como critérios de exclusão (1) artigos de revisão e relatos de casos, (2) artigos com texto completo indisponível, (3) artigos que não se adequarem aos critérios de inclusão e (4) artigos referentes a plantas (Figura 1A). Leu-se os resumos para triagem e removeu-se as duplicatas. Analisou-se criticamente os artigos remanescentes avaliando-se os seguintes critérios: *Qual a espécie estudada*; *Qual(is) órgão/tecido/célula era objeto de estudo*; *Qual o processo embrionário em que o gene foi estudado*; *Disponibilidade de dados de expressão do gene em processos do desenvolvimento e participação desses genes em vias de sinalização*. No critério “*processo embrionário*”, os dados foram categorizados em: (i)*Embriogênese geral*, (ii)*Organogênese*, (iii)*Anexos Embrionários* e (iv)*Outros*.

A partir destes dados, analisou-se as possíveis semelhanças e correlações entre esses genes no desenvolvimento animal e se constituem um potencial circuito gênico.

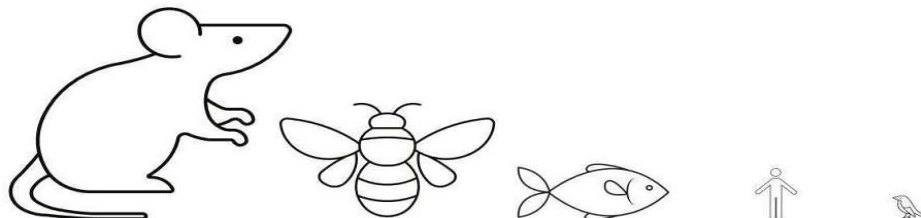
Figura 1. A) Fluxograma da metodologia de buscas, triagem e seleção dos estudos. B) Distribuição de artigos selecionados por gene estudado após a aplicação dos critérios de exclusão/inclusão.



RESULTADOS

As buscas, após triagem conforme os critérios (Figura 1A), resultaram em 116 artigos para análise crítica (6,63% do total de 1750 artigos). A distribuição destes artigos, por gene de interesse, pode ser observada na Figura 1B. Apenas um artigo foi selecionado acerca de função do gene *TUSC3* (~0,9%) no desenvolvimento animal, discutido adiante¹⁶. 11 artigos (9,5%) mostram a atuação de *KLF6* em processos relacionados ao desenvolvimento animal, como por exemplo, a sua expressão durante o desenvolvimento do cristalino e da córnea em camundongos¹⁷. Do gene *FOXN1*, 24 artigos foram selecionados (20,6%), em um destes¹⁸ demonstra-se o papel do gene *FOXN1* no desenvolvimento do timo, além de sua participação na formação de anexos cutâneos. O maior número de artigos selecionados aborda a atuação das *forminas* no desenvolvimento embrionário correspondendo a 56 % dos títulos selecionados, devendo-se, em parte, à sua notória participação em processos celulares, como a migração e diferenciação celular e também em processos morfogenéticos. Quinze (15) artigos, representando 12,9%, abordaram funções de *CYP11A1*, em sua maioria, relacionando-se ao desenvolvimento gonadal, como o artigo de LIANG et al.¹⁹, que demonstra a função de *CYP11A1* na diferenciação e desenvolvimento das gônadas do peixe linguado. Analisou-se a distribuição dos artigos selecionados por espécies animais utilizadas como modelo/material de estudo. A Figura 2 mostra, em escala comparativa e proporcional, a representatividade dos modelos experimentais mais utilizados nos estudos. A maioria utilizou roedores (murinos), principalmente camundongos (cerca de 34,7% do total para os genes avaliados em conjunto). Estudos com a “mosca da fruta” (drosófila, um organismo modelo de estudos), representam 14,65% dos artigos selecionados, enquanto os insetos em geral representam cerca de 18,6% dos estudos. 11% dos artigos utilizaram peixes como modelo animal e os estudos com seres humanos e aves não representaram mais do que cerca de 7% dos artigos selecionados. É notável a grande variedade de estudos utilizando outros e variados organismos, todos agrupados na categoria “outros” (28,8%).

Figura 2. Representação, em escala, da proporção de artigos por organismo utilizado como modelo experimental. O tamanho é a conversão em unidade arbitrária mantendo a proporção do número de títulos selecionados. Roedores e insetos foram os modelos mais utilizados nos estudos selecionados, seguidos por peixes, seres humanos e aves, sem distinção por gene de interesse.



Ainda, com relação à utilização de modelos experimentais, segregou-se os artigos por gene de interesse (Figura 2). No caso dos genes *FOXN1*, *KLF6* e codificadores de *forminas* a maioria dos estudos foi realizada em roedores representando 71,4%, 55,6% e 29,2% respectivamente. *CYP11A1* é amplamente estudado em diferentes espécies e em peixes, ambos na ordem aproximada de 35,7% dos estudos realizados. Os insetos, principalmente as drosófilas, foram significativamente utilizados como modelos para estudo das funções de *forminas* e *KLF6* no desenvolvimento, sendo 26,2% e 22,2% dos estudos utilizaram os insetos. Em peixes, apenas um estudo, em *Danio rerio* (F. Hamilton, 1822), também conhecido como paulistinha, peixe-zebra ou *zebrafish* aborda funções de *TUSC3* na embriogênese, 12,30 % aborda funções de *forminas* e 35,7 % a participação de *CYP11A1* no desenvolvimento. Vários organismos não-modelo, foram utilizados nos artigos selecionados e sua distribuição por genes é variável, dentre eles pode-se destacar: *Nilaparvata lugens* (Hemiptera; Delphacidae, cigarrinha marrom do arroz); *Dictyostelium* (Amoebozoa; *Dictyostelium*); cabras (*Capra aegagrus hircus*); *Neurospora crassa* (Fungi); *Lymnaea stagnalis* (molusco gastropoda); *Caenorhabditis elegans* (nematóide); *Schizosaccharomyces pombe* (levedura de fissão); *Pejerrey* (*Odontesthes bonariensis*, peixe prateado).

Em seguida, visando-se a identificação de possíveis correlações entre os genes na embriogênese, buscou-se nos artigos as informações referentes aos critérios descritos na metodologia, para cada gene, e os resultados são apresentados nas seções a seguir.

FOXN1 (FORKHEAD BOX PROTEIN N1): “...À FLOR DA PELE...”

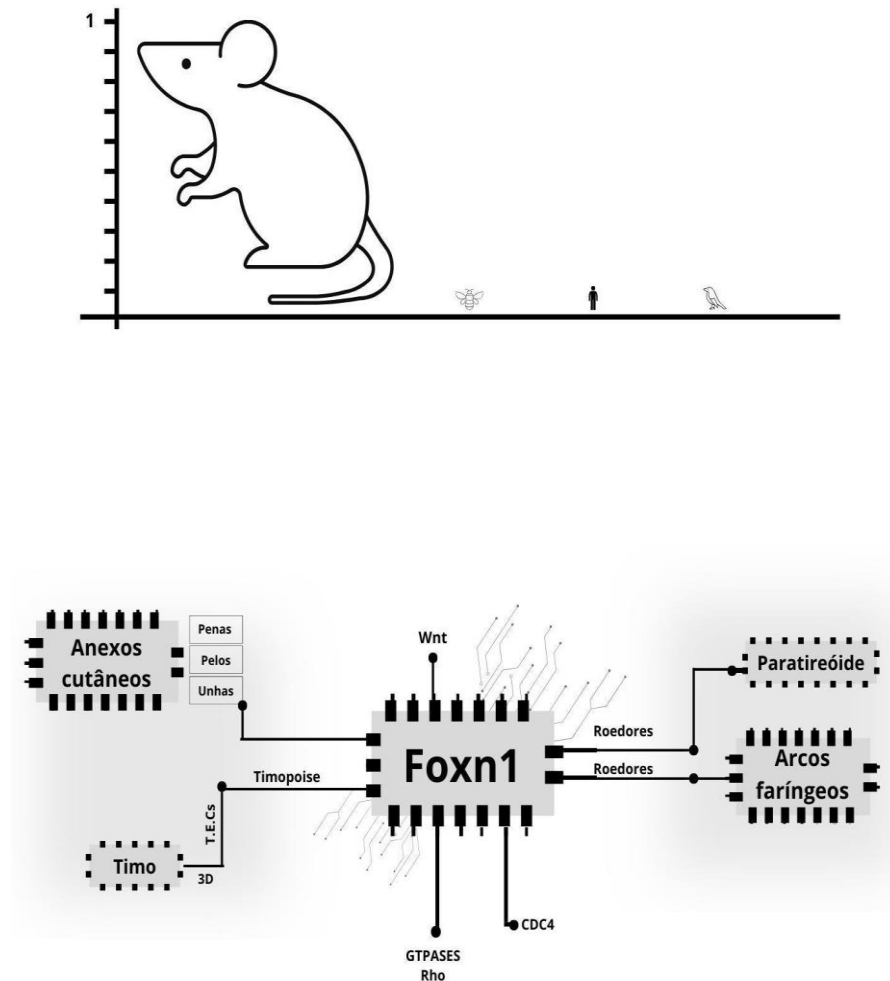
Nas análises dos 26 artigos selecionados sobre *FOXn1*, demonstrou-se que seu produto participa essencialmente da embriogênese de estruturas cutâneas e do timo (Figura 3B) principalmente com funções na embriogênese das células epiteliais tímicas (“TECs”)^{18, 20-26}, na timopoiese e no desenvolvimento de tecidos epiteliais extra-tímicos²⁷⁻³⁰. Muñoz et al.³¹ demonstrou

sua expressão durante a diferenciação entre regiões medulares e corticais do timo e na morfogênese e manutenção da microestrutura 3D do timo³². FOXn1 também participa da embriogênese das estruturas cutâneas como unhas³³, folículos pilosos e penas de aves³⁴⁻³⁸. FOXN1 participa ainda, da morfogênese inicial do terceiro arco faríngeo e da organogênese da paratireoide em camundongos³⁹. A maioria desses estudos foi realizada em roedores principalmente camundongos representando 66,6% dos artigos de *FOXN1* selecionados (Figura 3A), entretanto, existem estudos utilizando-se de outros modelos animais, tais como seres humanos, galinha, cabras e anfíbios (*Xenopus laevis*).

Com relação à análises de perfis de expressão de *FOXn1*, em processos do desenvolvimento, existem evidências tanto qualitativas quanto quantitativas da sua expressão durante a diferenciação do timo e de folículos pilosos, unhas e penas como comentado acima. *FOXn1* é expresso durante o desenvolvimento inicial de folículos pilosos de ovelhas³⁴, durante a formação de lã de cabras caxemiras^{40,35}, além de sua expressão na diferenciação inicial e terminal de queratinócitos^{35,28} com uma regulação diferencial no leito ungueal^{24,36,37}. Sua expressão durante o desenvolvimento do timo e diferenciação das células epiteliais tímicas (TECs) regula dois componentes da maquinaria de replicação destas células, o *mcm2* e *Cdca7* demonstrando que *Foxn1* atua na interação entre as TECs e células T durante a timopoiese formando um eixo juntamente com *mcm2*²¹ em *zebrafish*. Atua, tanto no desenvolvimento quanto na involução do timo em camundongos^{20,22,23,32,41}. Em *Xenopus*, sua expressão está restrita às TECs, diferentemente de outras espécies, nas quais sua expressão também foi detectada nas bolsas faríngeas⁴².

Com relação à participação de *FOXn1* em vias de sinalização celular, os artigos de Swann et al.²⁹ e Zhang et al.³⁴ demonstraram a relação de FOXn1 com a via BMP, Delta/ Notch e das GTPases Rho e CDC-42. MA D et al.²¹ mostra que *FOXn1* forma um eixo genético regulatório do desenvolvimento do timo com *mcm-2*. Em conjunto, esses artigos evidenciam que *FOXn1* é regulado por vias canônicas do desenvolvimento embrionário e organogênese (WNT, TGF- β , FGF, Hedgehog, NOTCH e BMP^{41,43} e devem ser investigadas suas condições hierárquicas em cada processo nos diferentes animais em que atua.

Figura 3. A) Modelos animais, em escala da proporção de estudos com FOXn1. B) FOXn1 e sua participação no desenvolvimento do timo e estruturas cutâneas.



KLF6 (KRUPPEL-LIKE FACTOR 6): “...ANTES TARDE DO QUE NUNCA...”

Com base nas análises dos artigos selecionados, *KLF6* atua tanto na embriogênese inicial quanto tardia, em diferentes espécies animais (Figura 4), como por exemplo, durante a formação de camadas germinativas, no estabelecimento de eixos corporais de anfíbios⁴⁴ na formação de anexos embrionários⁴⁵⁻⁴⁸ de vertebrados e mais tardiamente da organogênese renal em camundongos⁴⁹, na formação de estruturas oculares de camundongos e insetos^{17,50-51}, na morfogênese das asas de drosófilas⁵⁰ e também na auto-renovação de células tronco⁴⁶. Outro aspecto interessante é que a expressão de *KLF6*, é controlada espaço e temporalmente durante a organogênese de coração, pulmões, rins^{44,49,52}, olhos de *Xenopus*⁴⁴ e do sistema nervoso central^{17,52}

de camundongos. Sua expressão também é necessária para a formação de camadas germinativas (ectoderma e mesênquima em camundongos) e durante a formação do cristalino e córnea¹⁷ e no desenvolvimento hepático em *zebrafish*, no qual o ortólogo de *KLF6*, denominado *copeb* tem papel central na hepatogênese e também de derivados de ectoderma no peixe⁵³.

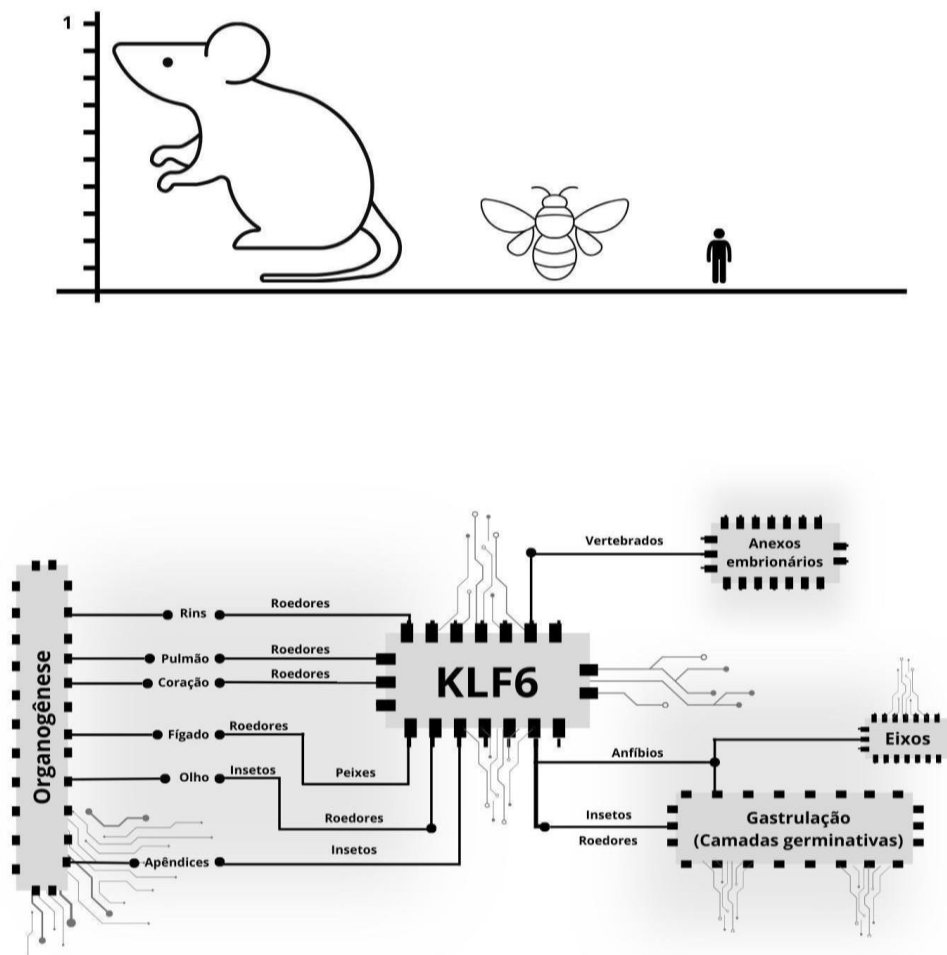
Na drosófila, estudos demonstraram que tanto o *knockdown* quanto a expressão ectópica do gene ortólogo de *KLF6*, denominado *Luna*, causam a paralisação do desenvolvimento embrionário em diferentes estágios e perturbam o desenvolvimento do olho composto do inseto, sugerindo que este seja um determinante transcricional durante o desenvolvimento do inseto⁵¹. Função essa também observada em camundongos nos quais a expressão de *KLF6* é determinante para a morfogênese do cristalino de camundongos.

KLF6 desempenha, ainda, importante papel na embriogênese do aparelho urinário, visto que sua expressão pode ser observada na formação dos ductos de Wolff e também em todos os seus derivados, como, por exemplo, os ductos coletores⁴⁹.

KLF6 atua na formação de anexos embrionários, como o saco vitelino e placenta, desde a diferenciação de células trofoblásticas até o desenvolvimento tardio placentário como regulador da expressão de vários genes alvo⁴⁵⁻⁴⁸. Zhao et al.⁵³ demonstrou seu perfil de expressão tecido-específica em diferentes espécies de vertebrados, como na morfogênese hepática em camundongos e *zebrafish*⁵³.

Em *Xenopus laevis* (anfíbio) detectou-se sua expressão durante a gastrulação e estabelecimento de eixos⁴⁴. *KLF6* também está relacionado à formação de camadas germinativas, como demonstrado por Weber et al⁵⁰ onde mutações de perda de função de *KLF6* em *drosófilas* causaram diversos fenótipos defectivos por alterações na etapa de celularização do blastoderme⁵⁰.

Figura 4. A) Modelos animais, em escala da proporção de estudos com KLF6. B) KLF6, sua participação na embriogênese inicial e tardia



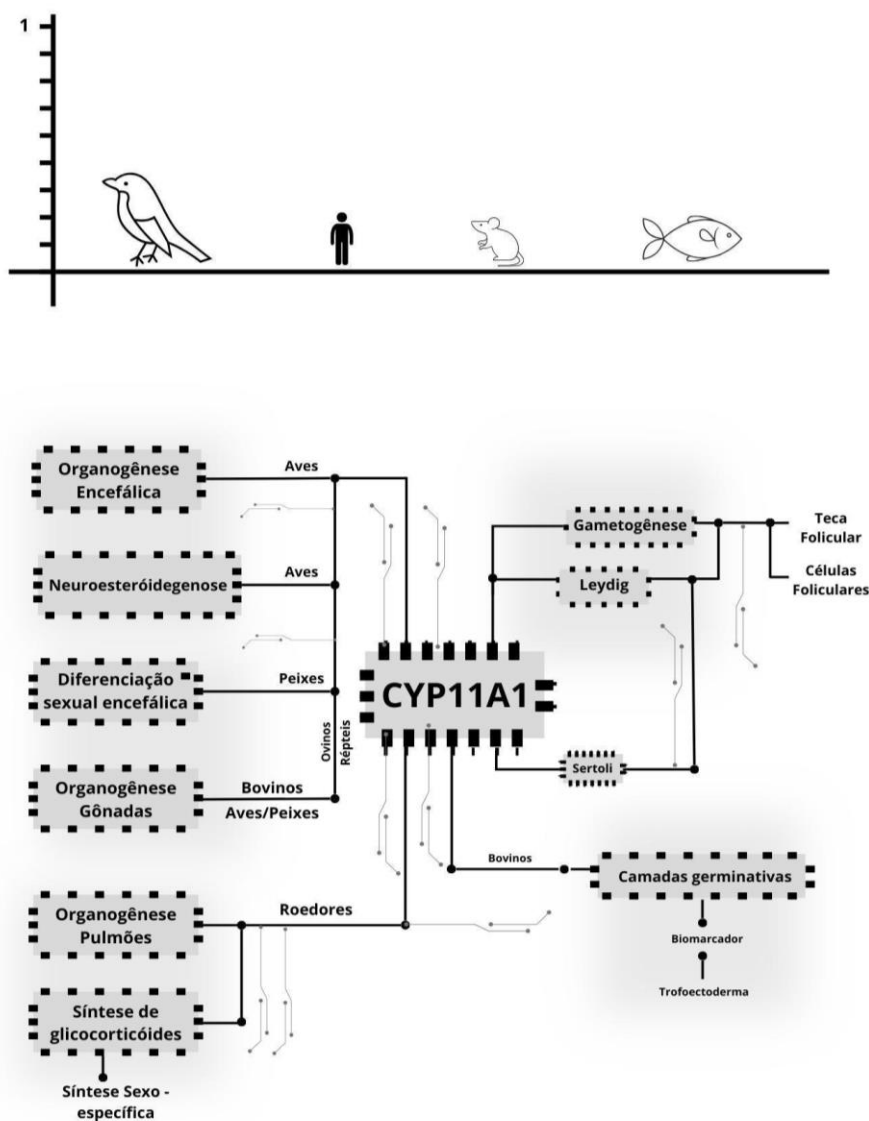
CYP11A1 (CYTOCHROME P450 FAMILY 11 SUBFAMILY A MEMBER 1): “...DA SÍNTESE DE ESTERÓIDES À ORGANOGÊNESE...”

Os artigos selecionados sobre *CYP11A1*, em sua maioria, mostram um papel canônico na organogênese de gônadas (Figura 5) em diferentes animais como: peixes, aves, bovinos e ovinos^{19,40,54-59}. Para além das gônadas, sua expressão também foi detectada durante a organogênese pulmonar em camundongos, participando ativamente da síntese de glicocorticoides, com expressão diferencialmente regulada entre fetos masculinos e femininos. Sua expressão também foi detectada durante a embriogênese do encéfalo de codornas, atuando na

neuroesteroidogênese porém de forma independente do sexo^{60,61}. *CYP11A1* é expresso em células trofoectodérmicas durante a embriogênese inicial de bovinos e Negrón et al.⁶², sugerem uma eventual função biomarcadora nesta população celular.

Os padrões de expressão do *CYP11A1* são bastante conhecidos qualitativa e quantitativamente, principalmente durante a embriogênese de gônadas e nos processos de diferenciação de gametas, além de sua expressão nas células somáticas de Leydig e Sertoli nos testículos e nos ovários, nas células foliculares e da teca. Nestas últimas, com um padrão espacial que auxilia na determinação dos limites entre medula e córtex ovarianos⁵⁵⁻⁵⁶, em diferentes espécies animais, com localização subcelular essencialmente citoplasmática^{19,54,59}. Observou-se também sua expressão na matriz extracelular e no estroma ovariano bovino com padrão de expressão mais tardio e num *cluster* gênico envolvido no controle da função folicular⁴⁰. *CYP11A1* também é expresso em trutas monogênicas (trutas arco-íris), e participa da diferenciação sexual encefálica e gonadal⁵⁷. Endo D et al.⁶³ demonstrou que a expressão de *CYP11A1* é abundante anteriormente ao período termossensível de diferenciação sexual do réptil *Eublepharis macularius* (Gecko-leopardo).

Figura 5. A) Modelos animais, em escala da proporção de estudos com CYP11A1. B) CYP11A1, das gônadas e gametogênese até a organogênese de diferentes órgãos em múltiplas espécies.

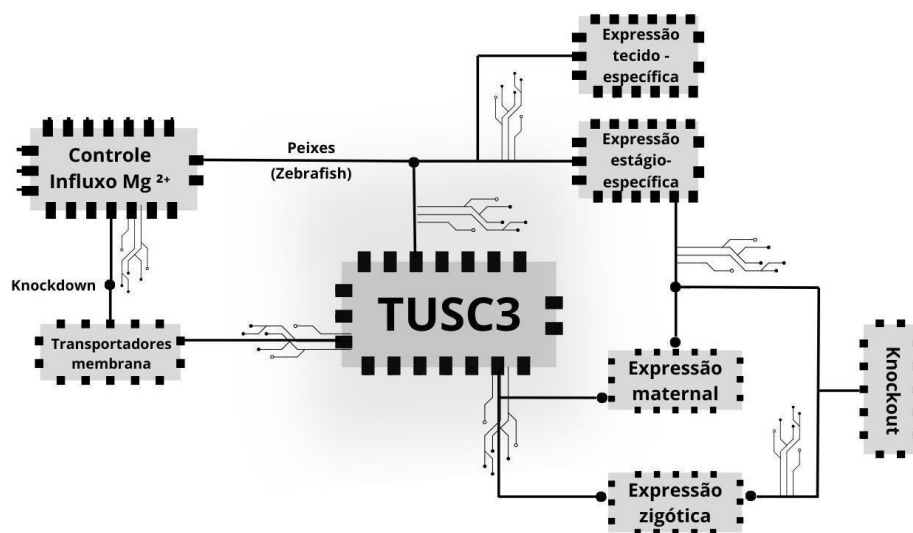


TUSC3 (TUMOR SUPPRESSOR CANDIDATE 3): “...O INFLUXO DE Mg^{2+} E A EMBRIOGÊNESE DE ZEBRAFISH...”

O único artigo selecionado sobre a atuação de *TUSC3* foi publicado por ZHOU *et al.*¹⁶. Utilizando-se de um *screening* de complementação em leveduras, dois genes homólogos a humanos, foram identificados e apresentam cerca de 66% de identidade de a.a., são eles: o *MagT1* e o *TUSC3*. Eles são os principais reguladores do influxo de Mg^{2+} nas células de *zebrafish*. Ensaios de *knockdown* de *MagT1/TUSC3* por RNA de interferência (siRNA) em células HEK293T demonstraram que os mesmos agem como transportadores de membrana. Análise transcriptômica

revelou que ambos são expressos em grande variedade de tecidos e estágios embrionários do peixe (Figura 6). O *knockdown* da expressão utilizando morfolinos das proteínas *MagT1* e *TUSC3* afetam a expressão tanto materna quanto zigótica nos embriões de *zebrafish* indicando papel central de ambos no desenvolvimento embrionário do peixe. Concluiu-se que ambos atuam cooperativamente na regulação de Mg^{2+} intracelular e tecidual, uma vez que sua ablação resulta em parada precoce do desenvolvimento¹⁶.

Figura 6. *TUSC3*, um transportador de membrana e os impactos de alterações de seus padrões de expressão no desenvolvimento de *zebrafish*.



FORMINAS: “...UMA GRANDE E DIVERSIFICADA FAMÍLIA ...”

Pode-se comprovar a natureza molecular das *forminas* e sua interação canônica com o citoesqueleto, nos artigos selecionados, onde revelou-se a extensa atuação delas nos mais variados processos, espécies, células, tecidos e órgãos, a destacar: na epiderme em *C. elegans*⁶⁴, septo de actomiosina em *Neuróspora crassa*⁶⁵, formação de canais anelares (*ring canals*) na ovogênese de *drosófilas*⁶⁶, rim de *Xenopus*⁶⁷, cérebro (córtex) e neuroepitélios^{68,76}, ovários⁷⁷, placenta^{69,78}, coração^{79,80}, apêndices⁸¹, intestino, músculo⁸², esqueleto⁶⁵, traqueia⁸³, células endoteliais⁸⁴⁻⁸⁶, sarcômeros⁸⁷⁻⁹², células musculares lisas⁹³, fibroblastos^{16,66}, córtex celular⁹⁴, células endocárdicas, células de Sertoli⁹⁵⁻⁹⁶, dentre outros processos variados evidenciando sua importância para a embriogênese animal e a necessidade de investigar suas interações moleculares em todos esses contextos. As funções das diferentes *forminas* conforme o modelo animal utilizado são demonstradas na Figura 7 e detalhadas a seguir.

Figura 7. Funções das forminas, em diferentes animais e processos do desenvolvimento.

ANIMAIS	FORMINAS	FUNÇÕES
ROEDORES	FMN-2; mDIA	Maturação de oócitos
	mDIA 1; 3	Organogênese SNC
	mDIA 3; FMN2	Espermiogênese
	FMN1	Formação de membros/ BMP-regulado
	FMN2	Filopódios; migração celular; SNC
	DAAM1	Mortalidade neonatal; formação coração
	DAAM2	Formação coração/ Wnt/Dish-regulado
	FHOD3	Neurulação; coração
INSETOS	FMNL2; FHDC	Encéfalo
	spire; cappu	Oogênese; eixos embrionários
	cappu; dDIA	Fechamento dorsal; apêndices; blastoderme; polaridade celular; ring canals
	dDIA	Filopódios; lamelipódios; miogênese
	dDAAM	Sinapses; sarcômeros; axônios
PEIXES	dFHOS	Metamorfose; morte celular; olho composto; miogênese
	zDAMM1	Habênula; axônios
	zDIA	Gastrulação
HUMANOS	FMNLs	Efeito materno; olhos; circulatório
	FHOD3	Sarcomerogênese
	DIAPH1	SNC; crescimento e ganho de peso corporal
	FMN2	SNC
OUTROS	ForA	Córtex celular
	LsDIA; DIAPH	Quiralidade em moluscos
	EXC-6; INFL2	Aparelho excretor <i>C.elegans</i>
	FHOD1	Eixos; músculos <i>C. elegans</i>

ROEDORES

Deng et al.⁹¹, utilizando-se de inibidor específico (SMIFH2), para as *Formin-2* e a *mDia*, observou alterações na maturação de oócitos e nas divisões assimétricas na ovogênese de camundongo (defeitos no fuso mitótico). A *mDia* “1 e 3” desempenham papel na organogênese do sistema nervoso como demonstrado por Lu et al.⁶⁹, ambas atuam na migração de interneurônios corticais e olfativos. A deficiência de *mDia*, altera a integridade do neuroepitélio e causa displasia periventricular em camundongos, denotando o papel dessas forminas na histogênese do sistema nervoso central^{95,97}. A proteína *mDia3* participa da espermiogênese e contribui para a formação de uma malha filamentosa de actina em células de Sertoli, como demonstrado por Sakamoto et al.⁹⁵.

A FMN1 (de ratos) também atua na espermiogênese fazendo parte das junções de células de Sertoli entre si, e também entre elas e espermátides para gerar a especialização ectoplásmica. O *knockdown* de FMN1 provoca falhas de espermição por alterarem a adesão, o transporte e a polaridade dessas células entre a barreira hematotesticular e o compartimento adluminal de túbulos seminíferos de ratos⁷⁶. Em camundongos (FMN1) é regulada pela via de sinalização BMP e mutações causam a ausência de dígitos, defeitos metatarsais, fusão de tecidos falangeais moles e agenesia fibular, com penetrância de 100% do fenótipo mutante¹⁶.

Demonstrou-se, através de ensaios genéticos, uma nova função da formina *FMN2* no desenvolvimento, atuando na formação de cones de crescimento de neurônios⁹⁸. Além deste papel, *FMN2* também participa da formação de feixes de filamentos de actina na maturação de filopódios e na geração de forças de tração em fibroblastos de ratos. Propõe-se que *FMN2* age como mediadora da integridade de feixes de actina possibilitando força de tração eficiente nos sítios de adesão celular.

Outro papel da *FMN2* de camundongos foi estudado por Lian et al.⁷⁶. o autor demonstra que *FMN2* interage fisicamente com outras proteínas ligantes de actina, como por exemplo, Filamina A (Fla). Mutações de perda de função destas duas proteínas causam fenótipos graves, como a microcefalia, por exemplo. Tal associação interfere com a endocitose de componentes da via de sinalização *Wnt* canônica. A formina *FMN2* participa, ainda, da diferenciação de neuroepitélios em camundongos⁷⁹.

Observou-se no trabalho de Weise et al.⁹³, através de ensaios de edição genômica e expressão ectópica, que a sinalização mediada pelas forminas relacionadas à *Diaphanous* (DRFs) desempenha papel fundamental no desenvolvimento da musculatura lisa e também vascular em camundongos. A formina *DAAM1* é expressa em vários órgãos e deficiências dela causam letalidade embrionária, neonatal e defeitos cardíacos como: dupla saída do ventrículo direito e defeitos no septo ventricular^{80,99}. *DAAM1* e *DAAM2* agem de forma redundante e respondem à via de sinalização *Wnt/Disheveled* durante a morfogênese cardíaca¹⁰⁰.

Kan et al.⁹² demonstrou, por imunohistoquímica que a formina *FHOD3*, participa da organogênese cardíaca de ratos, com expressão de isoformas distintas com padrão subcelular específico⁹². *FHOD3*, desempenha ainda, papel importante durante a morfogênese da placa neural, participando do processo de constrição apical destas células, fundamental na neurulação¹⁰¹. Outras duas forminas com participação no desenvolvimento do SNC são: *FMN12* e *FHDC-1* de camundongos, expressas em diferentes estágios do desenvolvimento do encéfalo e também pós natalmente, com importante papel para a função cerebral¹⁰².

INSETOS

Os insetos foram o segundo mais abundante modelo utilizado em estudos envolvendo *forminas*. Destaca-se o artigo de Quinlan et al.⁷⁷, em *drosophila*, que através de diversos ensaios genéticos, demonstrou o papel das forminas *Spire* e *Cappuccino* na ovogênese do inseto. Estas

proteínas participam da formação de uma malha de filamentos durante a embriogênese dos oócitos, facilitando o estabelecimento dos eixos embrionários nas células ovo deste inseto. Alelos mutantes de *cappuccino* analisados alteraram a ovogênese e fertilidade do inseto¹⁰³. Outros artigos abordam a participação de *Cappuccino* e *dDia* nos processos de fechamento dorsal (*dorsal closure*), regulando protruções celulares e migração durante o desenvolvimento embrionário, atuando também na formação de cerdas de asas, e durante o estágio de celularização da blastoderme, fundamental para a formação dos eixos embrionários e posterior segmentação^{14,69,104-106}. Estas duas forminas também têm função no estabelecimento de polaridade celular e formação dos “ring cannals” (canais anulares) durante a ovogênese do inseto^{107,108}.

Homem et al.¹⁰⁹, descreveu que a formina Dia de insetos, é ferramenta necessária para a formação de filopódios e lamelipódios em combinação com outra proteína a Ena/VASP interferindo na migração celular¹⁰⁹. Deng et al.⁹¹, sugere um outro papel de Dia (Diaphanous) na regulação dos processos de fusão de mioblastos durante a embriogênese muscular do inseto. Sua expressão é aumentada nos sítios de fusão regulando a polimerização de actina conjuntamente com a regulação do complexo Arp2/3 e mutações de perda de função causam fenótipos alterados na musculatura do inseto. dDIA também está envolvida na diferenciação de fibras e sarcômeros da musculatura de vôo, regulando o número e comprimento dos filamentos finos de actina⁹¹. Seu ortólogo em ratos, também participa de processos miogenéticos, pois a mDia 1 é um regulador multifuncional com função estágio específica e interagindo com outras proteínas envolvidas na formação de miotubos¹¹⁰.

A DAAM de drosófila, regula a formação de microtúbulos de botões sinápticos em junções neuromusculares do inseto. A dDAAM, é necessária para a montagem de filamentos finos durante a formação de sarcômeros no inseto. Mutações nesse gene causam defeitos nos músculos de vôo, no coração e músculos somáticos, por afetar a estrutura normal dos miofilamentos⁸⁷. dDAAM participa também da morfogênese de axônios em drosófila, uma vez que a perda de função causa fenótipos passíveis de resgate através de sua expressão ectópica durante a embriogênese e desenvolvimento axonal^{87,111}.

dFHOS, uma outra formina da mosca da fruta, pertencente à subfamília de forminas FHOD, participa de vários processos durante a embriogênese inicial e morfogênese do inseto como por exemplo regulação de processos de morte celular programada (MCP). Estudos utilizando *knockdown* e expressão ectópica dirigida demonstraram importantes alterações fenotípicas, dentre

elas a letalidade no estágio pupal, persistência de glândulas salivares larvais, defeitos na embriogênese do olho composto e musculatura somática¹¹².

HUMANOS E AVES

Em seres humanos, pôde-se destacar a atuação da formina FHOD-3 que participa da formação de sarcômeros em miocardiocitos humanos⁸⁹.

DIAPH1 participa ativamente da organogênese, pois a análise de linhagens familiares com mutações homozigóticas *nonsense* desta *formina*, causam severa microcefalia, reduções de peso e tamanho, similarmente observadas em camundongos mutantes, demonstrando o papel de DIAPH1 na histogênese e desenvolvimento do sistema nervoso central com expressão localizada nas células precursoras neuronais mitóticas⁷³.

As forminas 2 de humanos (FMN-2), bem como os ortólogos em murinos, apresentam padrão de expressão bastante similar na morfogênese do sistema nervoso central e possuem alto grau de homologia com a *formina-1* e *cappuccino* de drosófila⁷⁰. Durante a embriogênese de galinha, a formina FMN2 apresenta alta expressão na medula espinhal do embrião⁹⁸. Esses artigos evidenciam a conservação evolutiva das funções de forminas para além dos metazoários.

PEIXES

Com a análise dos artigos selecionados, envolvendo o papel de *forminas* durante a embriogênese de peixes, observou-se o *zebrafish* como o modelo de estudo preponderante. A formina DAAM1 de *zebrafish*, atua na morfogênese da habênula de *zebrafish*, um órgão epitalâmico e assim como seus ortólogos parecem ter papel importante na morfogênese de vertebrados¹¹³, e na morfogênese axonal^{67,111}.

A formina de *zebrafish* *zDia2* é fundamental na migração de células durante a gastrulação¹¹⁴. *zDia2* têm expressão ubíqua durante o desenvolvimento embrionário inicial, conforme determinado por RT-PCR e análises de hibridização *in situ*. O *knockdown* de *zDia2* por oligonucleotídeos morfolino antisense (MOs) bloqueou os movimentos de epibolia e de extensão convergente de maneira dependente da dose, podendo ser resgatado parcialmente esse fenótipo, com a expressão ectópica de *mDia* (ortólogo em camundongo).

Zebrafish, possui outras 5 forminas componentes da subfamília *Fmnl*, Santos et al.¹¹⁵, estudou o padrão de expressão estágio- e tecido-específico delas, sugerindo papéis comuns

principalmente de efeito materno. Mais tardiamente, a expressão tecido específica delas sugere funções na embriogênese do olho, ouvido e sistema circulatório do peixe¹¹⁵. FMN13, atua na angiogênese e diferenciação de células endoteliais, pois quando depletada em cultura de célula apresenta vários fenótipos. A sua expressão ectópica é capaz de resgatar fenótipos mutantes em embriões de *zebrafish* mutantes nos quais FMN13 estava depletada⁸⁴. FMN13 atua também na estabilização de f-actina nas junções entre as células endoteliais e interfere na formação do lúmen vascular⁸⁶.

OUTRAS ESPÉCIES

Forminas, são ainda expressas em outras espécies, destaca-se o trabalho de Litschko et al.⁹⁴, que aborda as funções de forminas relacionadas à *Diaphanous* (DRFs) em *Dictyostelium* ForA, E, as quais apresentam atuação sinérgica na montagem de filamentos de actina do córtex celular. Mutantes nulos simples ou duplos mutantes, para essas forminas exibem defeitos moderados, enquanto a eliminação delas causa maciça alteração da arquitetura e rigidez do córtex celular⁹⁴.

Em moluscos, duas forminas, LsDial1 e Diaph, com efeito materno, participam dos processos de estabelecimento de eixo levo-destro e quiralidade durante a formação das conchas^{75,116,117}.

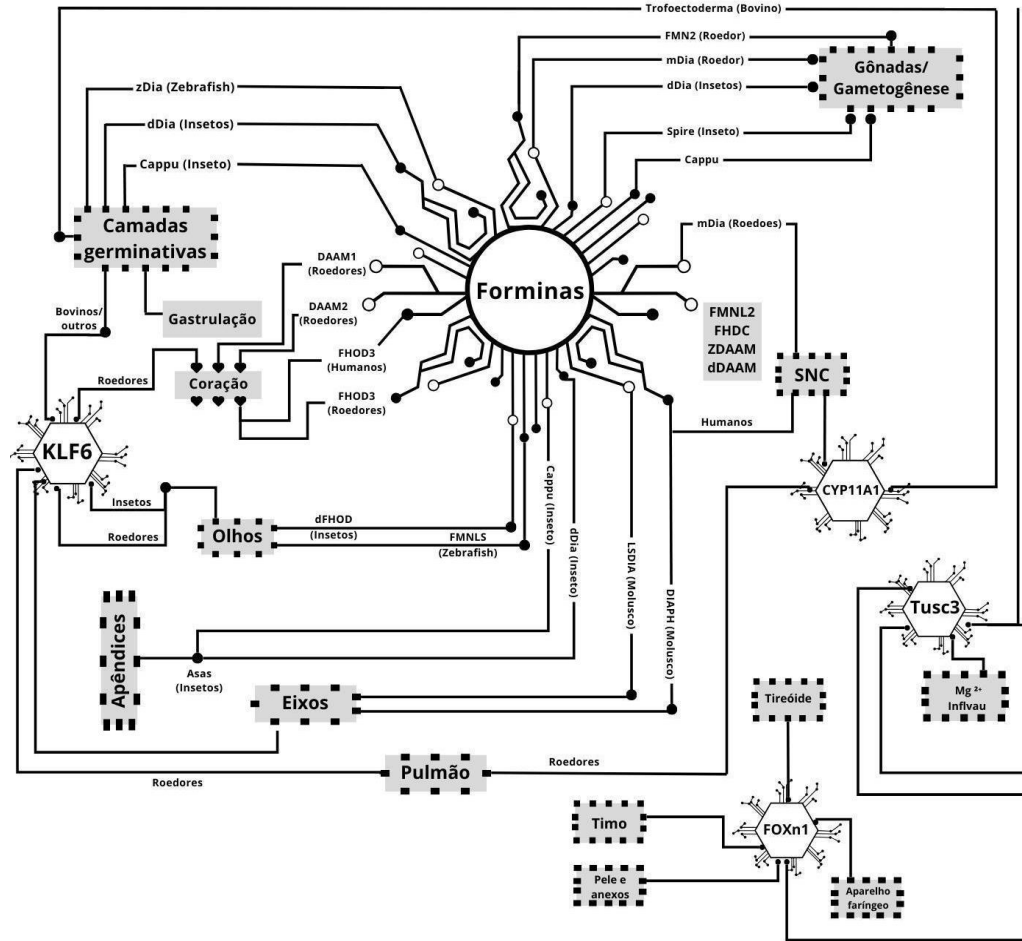
A atividade coordenada entre *forminas* distintas fica evidente em dois artigos que demonstram a participação dessa família na embriogênese de *C. elegans*, atuando na tubulogênese do aparelho excretor. Essa função é desempenhada por uma rede de forminas conservadas EXC-6, INF2 e INFT, reguladas pela GTPase Rho/ CDC-42¹¹⁸. SUNDARAMURTH *et al*, através da análise de mutantes da formina FHOD-1, concluiu que esta é a única formina de *C. elegans* que diretamente promove o desenvolvimento da musculatura de forma autônoma⁹⁰. Lardennois et al.⁶⁴, demonstra que, FHOD1 participa do estabelecimento de eixos embrionários em *C. elegans* bem como da morfogênese de estruturas contráteis na musculatura do nematóide⁸⁸. Através da expressão ectópica por mosaicismo e análise de mutantes, demonstrou-se que FHOD-1 promove o crescimento das células musculares e a organização adequada do corpo denso de maneira autônoma nas células musculares de *C. elegans*¹¹⁴.

DISCUSSÃO

Um grande desafio experimental é determinar interações entre genes e produtos de naturezas moleculares distintas. As *forminas*, suas subfamílias, e os genes *TUSC3*, *KLF6*, *CYP11A1* e *FOXn1*, aqui estudados, são um bom exemplo. Sem a experimentação adequada essa tarefa é laboriosa e de alto custo, mesmo que, na literatura, exista uma infinidade de dados *in silico*, transcriptômicos e proteômicos sobre esses genes. Entretanto, nem sempre, é possível determinar a participação, similar ou integrada em processos de desenvolvimento embrionário, mesmo tendo papéis notoriamente importantes e individualizados já descritos. A estratégia aqui utilizada, visava direcionar a experimentação futura acerca das possíveis interações entre esses genes no desenvolvimento animal, realizou-se uma revisão da literatura, narrativa e crítica, com o intuito de identificar quais são as participações conhecidas, desses genes, no desenvolvimento embrionário animal (não apenas de organismos considerados “modelo”) tentando encontrar possíveis pontos de interação que pudessem sugerir a existência de interação direta ou indireta aqui chamada de “circuito gênico” a ser investigado, ampliando-se assim o entendimento das funções biológicas deles no contexto do desenvolvimento embrionário.

Com base nas análises dos artigos selecionados, pôde-se organizar um “circuito de interações” possíveis entre esses genes (Figura 8) para embasar novas estratégias de estudo.

Figura 8. Um “circuito” de possíveis interações entre os genes.



Observou-se as maiores “conexões” entre as funções de *KLF6* e diferentes *forminas* no desenvolvimento, que atuam tanto na embriogênese inicial, na formação de camadas germinativas (em insetos e peixes), no estabelecimento de eixos (anfíbios, moluscos), quanto na embriogênese tardia durante: a organogênese do coração em roedores e anfíbios; formação dos olhos (em roedores, peixes e insetos) e na morfogênese de apêndices corporais como as asas de insetos. Levanta-se aqui um questionamento sobre também investigar a participação de *FOXn1* e seus ortólogos nessas diferentes espécies, visto seu papel na formação de estruturas cutâneas.

CYP11A1, também apresenta “conexões” tanto com o *KLF6* quanto *forminas*, como por exemplo, na formação de camadas germinativas (trofoectoderma) em bovinos⁴⁰, porém nenhum artigo selecionado demonstrou essa atuação em outros grupos animais. Sendo assim, existe a necessidade de expandir-se as análises acerca dessa função em outros grupos animais. *CYP11A1*, participa ainda, em roedores, da organogênese pulmonar, fato esse em comum com o *KLF6*. É interessante investigar a atuação molecular, nesses processos, para determinar se existe interação

ou via de sinalização em comum^{23,61}. Outra conexão entre *CYP11A1* e *forminas*, se deu nos processos de organogênese de gônadas e gametogênese, em diferentes espécies, tanto *CYP11A1*, quanto as *forminas* *FMN2*, *mDIA* (roedores), *dDIA*, *Spire* e *Cappu* (as duas últimas em drosófila) desempenham funções na ovogênese, espermiogênese e maturação de oócitos^{19,40,54-60,77,102,103,107,108}. *CYP11A1* e *forminas* também apresentam atuação, em comum, na organogênese do sistema nervoso central (SNC) em aves, peixes, seres humanos, roedores e insetos com a função de diferentes *forminas*^{6,60,68,70,72-74}.

FOXN1 e *TUSC3*, apresentam funções mais restritas no desenvolvimento e a investigação sobre sua participação em outros processos do desenvolvimento em outros organismos depende de experimentação específica, sendo portanto os dois genes que menos apresentaram conexões de funções no desenvolvimento em comparação aos demais genes, embora não possamos descartá-las. *TUSC3*, é fundamental para o desenvolvimento de *zebrafish*, uma vez que foi demonstrado que seu *knockdown* paralisa a embriogênese em estágios iniciais¹⁶. Existem homólogos de *TUSC3* em várias espécies de vertebrados e mesmo em insetos, como a drosófila, e essas análises revelam que embora *TUSC3* tenha sido identificado como um supressor de tumor em câncer de próstata, este age cooperativamente com uma série de outros produtos de genes para o controle do influxo de Magnésio nas células. É, neste caso, interessante investigar-se outras funções de *TUSC3*, em modelos experimentais distintos e analisar a literatura sobre seus padrões de expressão, ou ainda propor-se uma análise transcricional em diferentes fases da embriogênese de outras espécies cuja sua expressão ainda não tenha sido estudada.

No caso de *FOXn1*, em todos os artigos selecionados, confirmou-se sua notória atuação no desenvolvimento do timo e de estruturas cutâneas. Sendo este considerado um dos *master genes* do desenvolvimento, manutenção e regeneração de células epiteliais córtico-medulares do timo, as cTECs e mTECs¹¹⁹ e conseqüentemente de suas funções. A análise de múltiplas variantes de *FOXn1* revelou impacto no desenvolvimento do timo por provocarem alterações em sua atividade transcricional, localização nuclear e atuação como dominante negativo¹²⁰.

Swann et al.²⁹ e Zhang et al.³⁴ demonstraram a relação de *FOXn1* com a via das GTPases Rho e CDC-42^{29,34}. MA D, et al.²¹ mostra a participação do gene na via de Delta-Notch. As evidências de sua regulação por vias canônicas do desenvolvimento nos convidam a avaliar a potencial participação deste em processos independentes da formação do timo e estruturas cutâneas, uma vez que é expresso em diferentes espécies animais. Viu-se na literatura que a maioria

dos estudos abordaram as funções de *FOXn1* relacionadas ao fenótipo *nude*, nesses animais, os pêlos e o timo são ausentes devido ao *knockout* do gene.

Chamou atenção, em termos gerais, o baixo número de artigos utilizando seres humanos como modelo biológico, (cerca de 4%). Claramente, as limitações experimentais e éticas, são os maiores obstáculos, porém, a utilização de estudos *in vitro*, *in silico* entre outras técnicas, utilizando tecidos e células humanas, ou mesmo expressão ectópica em outros modelos animais poderiam ampliar o entendimento das funções desses genes no contexto do desenvolvimento humano ampliando assim a compreensão de suas funções biológicas.

CONCLUSÃO

A partir dos dados aqui compilados, revelou-se a extensa atuação de *forminas* distintas e em menor escala dos outros genes analisados no desenvolvimento animal, principalmente se considerarmos os fenótipos mutantes observados quando seus perfis de expressão são alterados ou ausentes. Investigar a atuação comum entre *forminas* e o *KLF6* é um campo promissor e analisar os impactos de duplos mutantes, desde estágios iniciais até os mais tardios da embriogênese, em diferentes animais podem revelar novas funções biológicas. Torna-se necessário investigar a potencial relação entre *CYP11A1*, *KLF6* e *forminas*, principalmente pela carência de dados experimentais em diferentes modelos animais.

TUSC3 e *FOXn1*, por suas atuações específicas, demandam a investigação acerca das funções de homólogos e ortólogos em outros animais e processos do desenvolvimento.

Embora essas conexões aqui observadas sugiram um circuito gênico em potencial, é necessária a experimentação específica para ampliar o entendimento de suas importantes funções no desenvolvimento embrionário animal.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo fomento à iniciação científica de Beatriz Cubero Freitas. Aos membros da BioRede-UFTM pelo compartilhamento de conhecimentos e pela biologia dos genes estudados nesta revisão. À Bruna Luiza Santos Faleiros pelo auxílio com as ilustrações.

CONFLITO(S) DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse de qualquer ordem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Loffet EA, Durel JF, Nerurkar NL. Evo-Devo Mechanobiology: The Missing Link. *Integr Comp Biol.* 2023 16: icad033. 10.1093/icb/icad033.
2. Goswami A, Noirault E, Coombs EJ, Clavel J, Fabre AC, Halliday TJD, Churchill M, Curtis A, Watanabe A, Simmons NB, Beatty BL, Geisler JH, FD L Felice RN 2023 Developmental origin underlies evolutionary rate variation across the placental skull *Phil. Trans. R. Soc.* B3782022008320220083 10.1098/rstb.2022.0083.
3. Pruyne D. Revisiting the phylogeny of the animal formins: two new subtypes, relationships with multiple wing hairs proteins, and a lost human formin. *PLoS One.* 2016; 11(10): e0164067. 10.1371/journal.pone.0164067.
4. Labat-de-Hoz L, Alonso MA. Formins in Human Disease. *Cells.* 2021 27; 10(10): 2554. 10.3390/cells10102554.
5. Innocenti M. Investigating Mammalian Formins with SMIFH2 Fifteen Years in: Novel Targets and Unexpected Biology. *Int J Mol Sci.* 2023 21; 24(10): 9058. 10.3390/ijms24109058.
6. Mohorko E, Owen RL, Malojčić G, Brozzo MS, Aebi M, Glockshuber R. Structural Basis of Substrate Specificity of Human Oligosaccharyl Transferase Subunit N33/Tusc3 and Its Role in Regulating Protein N-Glycosylation. *Structure*, 2014, 590–601 p.
7. Vaňhara P, Horak P, Pils D, Anees M, Petz M, Gregor W, Zeillinger R, Krainer M. Loss of the Oligosaccharyl Transferase Subunit TUSC3 Promotes Proliferation and Migration of Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Oncology*, 2013, 1383–89. 10.3892/ijo.2013.1824.
8. Zhang MJ, Xing LX, Cui M, Yang X, Shi JG, Li J, Zhang KJ, Zheng ZJ, Zhang FC, Li JL, Gao XC. Association of TUSC3 gene polymorphisms with non-syndromic mental retardation based on nuclear families in the Qinba mountain area of China. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 5022–30 p.
9. Yu X, Zhai C, Fan Y, Zhang J, Liang N, Liu F, Cao L, Wang J, Du J. TUSC3: A Novel Tumour Suppressor Gene and Its Functional Implications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2017, 1711–18. 10.1111/jcmm.13128.
10. Bieker J. Krüppel-like Factors: Three Fingers in Many Pies. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 34355–58. 10.1074/jbc.R100043200.
11. Stocco D, Clark BJ. Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells. *Endocrine Reviews*, 1996, 221–44. 10.1210/edrv-17-3-221.

12. al Kandari H, Katsumata N, Alexander S, Rasoul MA. Homozygous Mutation of P450 Side-Chain Cleavage Enzyme Gene (CYP11A1) in 46, XY Patient with Adrenal Insufficiency, Complete Sex Reversal, and Agenesis of Corpus Callosum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, 2821–26. 10.1210/jc.2005-2230.
13. Kim CJ, Lin L, Huang, N, Quigley CA, AvRuskin TW, Achermann JC, Miller WL. Severe Combined Adrenal and Gonadal Deficiency Caused by Novel Mutations in the Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme, P450scc. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2008, 696–702. 10.1210/jc.2007-2330.
14. Nowotarski S, McKeon N, Moser RJ, Peifer M. The actin regulators Enabled and Diaphanous direct distinct protrusive behaviors in different tissues during *Drosophila* development. *Mol Biol Cell*. 2014 ;25(20): 3147-65. 10.1091/mbc.E14-05-0951.
15. Mecklenburg L, Tychsen B, Paus R. Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. *Exp Dermatol*. 2005; 14: 797–810.
16. Zhou F, Leder P, Zuniga A, Dettenhofer M. Formin1 disruption confers oligodactylysm and alters Bmp signaling. *Hum Mol Genet*. 2009 ;18(13): 2472-82. 10.1093/hmg/ddp185.
17. Nakamura H, Chiambaretta F, Sugar J, Sapin V, Yue BY. Developmentally regulated expression of KLF6 in the mouse cornea and lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 ;45(12): 4327-32. 10.1167/iovs.04-0353.
18. Rode I, Martins VC, Küblbeck G, Maltry N, Tessmer C, Rodewald HR. Foxn1 Protein Expression in the Developing, Aging, and Regenerating Thymus. *J Immunol*. 2015 ;195(12): 5678-87. 10.4049/jimmunol.1502010.
19. Liang D, Fan Z, Zou Y, Tan X, Wu Z, Jiao S, Li J, Zhang P, You F. Characteristics of Cyp11a during Gonad Differentiation of the Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Int J Mol Sci*. 2018 ;19(9): 2641. 10.3390/ijms19092641.
20. O'Neill K, Bredenkamp N, Tischner C, Vaidya HJ, Stenhouse FH, Peddie CD, Nowell CS, Gaskell T, Blackburn CC. Foxn1 Is Dynamically Regulated in Thymic Epithelial Cells during Embryogenesis and at the Onset of Thymic Involution. *PLoS One*. 2016 ;11(3): e0151666. 10.1371/journal.pone.0151666.
21. Ma D, Wang L, Wang S, Gao Y, Wei Y, Liu F. Foxn1 maintains thymic epithelial cells to support T-cell development via mcm2 in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 ;109(51): 21040-5. 10.1073/pnas.1217021110.
22. Nowell CS, Bredenkamp N, Tetélin S, Jin X, Tischner C, Vaidya H, Sheridan JM, Stenhouse FH, Heussen R, Smith AJ, Blackburn CC. Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence. *PLoS Genet*. 2011 ;7(11): e1002348. 10.1371/journal.pgen.1002348.

23. Larsen BM, Cowan JE, Wang Y, Tanaka Y, Zhao Y, Voisin B, Constantinides MG, Nagao K, Belkaid Y, Awasthi P, Takahama Y, Bhandoola A. Identification of an Intronic Regulatory Element Necessary for Tissue-Specific Expression of Foxn1 in Thymic Epithelial Cells. *J Immunol.* 2019 ;203(3): 686-695. 10.4049/jimmunol.1801540.
24. Gordon J, Xiao S, Hughes B 3rd, Su DM, Navarre SP, Condie BG, Manley NR. Specific expression of lacZ and cre recombinase in fetal thymic epithelial cells by multiplex gene targeting at the Foxn1 locus. *BMC Dev Biol.* 2007 ;7: 69. 10.1186/1471-213X-7-69.
25. Corbeaux T, Hess I, Swann JB, Kanzler B, Haas-Assenbaum A, Boehm T. Thymopoiesis in mice depends on a Foxn1-positive thymic epithelial cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 ;107(38): 16613-8. 10.1073/pnas.1004623107.
26. Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG, Manley NR. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol.* 2003 ;4(11): 1128-35. 10.1038/ni983.
27. Dooley J, Erickson M, Farr AG. Lessons from thymic epithelial heterogeneity: FoxN1 and tissue-restricted gene expression by extrathymic, endodermally derived epithelium. *J Immunol.* 2009 ;183(8): 5042-9. 10.4049/jimmunol.0901371.
28. Janes SM, Ofstad TA, Campbell DH, Watt FM, Prowse DM. Transient activation of FOXN1 in keratinocytes induces a transcriptional programme that promotes terminal differentiation: contrasting roles of FOXN1 and Akt. *J Cell Sci.* 2004 ;117(Pt 18): 4157-68. 10.1242/jcs.01302.
29. Swann JB, Krauth B, Happe C, Boehm T. Cooperative interaction of BMP signalling and Foxn1 gene dosage determines the size of the functionally active thymic epithelial compartment. *Sci Rep.* 2017 ;7(1): 8492. 10.1038/s41598-017-09213-1.
30. Ye YX, Zhang CX. Pleiotropic Functions of FoxN1: Regulating Different Target Genes during Embryogenesis and Nymph Molting in the Brown Planthopper. *Int J Mol Sci.* 2020 ;21(12): 4222. 10.3390/ijms21124222.
31. Muñoz JJ, Tobajas E, Juara S, Montero S, Zapata AG. FoxN1 mediates thymic cortex-medulla differentiation through modifying a developmental pattern based on epithelial tubulogenesis. *Histochem Cell Biol.* 2019 ;152(6): 397-413. 10.1007/s00418-019-01818-z.
32. Guo J, Rahman M, Cheng L, Zhang S, Tvinnereim A, Su DM. Morphogenesis and maintenance of the 3D thymic medulla and prevention of nude skin phenotype require FoxN1 in pre- and post-natal K14 epithelium. *J Mol Med (Berl).* 2011 ;89(3): 263-77. 10.1007/s00109-010-0700-8.
33. Cai J, Ma L. Msx2 and Foxn1 regulate nail homeostasis. *Genesis.* 2011; 49(6): 449-59. 10.1002/dvg.20744.

34. Zhang Y, Wang L, Li Z, Chen D, Han W, Wu Z, Shang F, Hai E, Wei Y, Su R, Liu Z, Wang R, Wang Z, Zhao Y, Wang Z, Zhang Y, Li J. Transcriptome profiling reveals transcriptional and alternative splicing regulation in the early embryonic development of hair follicles in the cashmere goat. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 17735. 10.1038/s41598-019-54315-7.
35. Han W, Li X, Wang L, Wang H, Yang K, Wang Z, Wang R, Su R, Liu Z, Zhao Y, Zhang Y, Li J. Expression of fox-related genes in the skin follicles of Inner Mongolia cashmere goat. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2018; 31(3): 316-326. 10.5713/ajas.17.0115.
36. Potter CS, Pruett ND, Kern MJ, Baybo MA, Godwin AR, Potter KA, Peterson RL, Sundberg JP, Awgulewitsch A. The nude mutant gene *Foxn1* is a *HOXC13* regulatory target during hair follicle and nail differentiation. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(4): 828-37. 10.1038/jid.2010.391.
37. Darnell DK, Zhang LS, Hannenhalli S, Yaklichkin SY. Developmental expression of chicken *FOXN1* and putative target genes during feather development. *Int J Dev Biol.* 2014; 58(1): 57-64. 10.1387/ijdb.130023sy.
38. Dooley J, Erickson M, Roelink H, Farr AG. Nude thymic rudiment lacking functional *foxn1* resembles respiratory epithelium. *Dev Dyn.* 2005; 233(4): 1605-12. 10.1002/dvdy.20495.
39. Gordon J, Bennett AR, Blackburn CC, Manley NR. *Gcm2* and *Foxn1* mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch. *Mech Dev.* 2001; 103(1-2): 141-3. 10.1016/s0925-4773(01)00333-1.
40. Hatzirodos N, Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Breen J, Perry VEA, Anderson RA, Rodgers RJ. Transcript abundance of stromal and thecal cell related genes during bovine ovarian development. *PLoS One.* 2019; 14(3): e0213575. 10.1371/journal.pone.0213575.
41. Bryson JL, Griffith AV, Hughes B 3rd, Saito F, Takahama Y, Richie ER, Manley NR. Cell-autonomous defects in thymic epithelial cells disrupt endothelial-perivascular cell interactions in the mouse thymus. *PLoS One.* 2013; 8(6): e65196. 10.1371/journal.pone.0065196.
42. Lee YH, Williams A, Hong CS, You Y, Senoo M, Saint-Jeannet JP. Early development of the thymus in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn.* 2013; 242(2): 164-78. 10.1002/dvdy.23905.
43. Cai J, Ma L. *Msx2* and *Foxn1* regulate nail homeostasis. *Genesis.* 2011; 49(6): 449-59. 10.1002/dvg.20744.
44. Gao Y, Cao Q, Lu L, Zhang X, Zhang Z, Dong X, Jia W, Cao Y. Kruppel-like factor family genes are expressed during *Xenopus* embryogenesis and involved in germ layer formation and body axis patterning. *Dev Dyn.* 2015; 244(10): 1328-46. 10.1002/dvdy.24310.
45. Blanchon L, Bocco JL, Gallot D, Gachon AM, Lémery D, Déchelotte P, Dastugue B, Sapin V. Co-localization of *KLF6* and *KLF4* with pregnancy-specific glycoproteins during human placenta development. *Mech Dev.* 2001; 105(1-2): 185-9. 10.1016/s0925-4773(01)00391-4.

46. Matsumoto N, Kubo A, Liu H, Akita K, Laub F, Ramirez F, Keller G, Friedman SL. Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Kruppel-like factor 6. *Blood*. 2006; 107(4): 1357-65. 10.1182/blood-2005-05-1916.
47. Racca AC, Camolotto SA, Ridano ME, Bocco JL, Genti-Raimondi S, PanzettaDutari GM. Krüppel-like factor 6 expression changes during trophoblast syncytialization and transactivates β hCG and PSG placental genes. *PLoS One*. 2011; 6(7): e22438. 10.1371/journal.pone.0022438.
48. Slavin D, Sapin V, López-Díaz F, Jacquemin P, Koritschoner N, Dastugue B, Davidson I, Chatton B, Bocco JL. The Krüppel-like core promoter binding protein gene is primarily expressed in placenta during mouse development. *Biol Reprod*. 1999; 61(6): 1586-91. 10.1095/biolreprod61.6.1586.
49. Fischer EA, Verpont MC, Garrett-Sinha LA, Ronco PM, Rossert JA. Klf6 is a zinc finger protein expressed in a cell-specific manner during kidney development. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12(4): 726-35.
50. Weber U, Rodriguez E, Martignetti J, Mlodzik M. Luna, a Drosophila KLF6/KLF7, is maternally required for synchronized nuclear and centrosome cycles in the preblastoderm embryo. *PLoS One*. 2014; 9(6): e96933. 10.1371/journal.pone.0096933.
51. De Graeve F, Smaldone S, Laub F, Mlodzik M, Bhat M, Ramirez F. Identification of the Drosophila progenitor of mammalian Krüppel-like factors 6 and 7 and a determinant of fly development. *Gene*. 2003; 314: 55-62. 10.1016/s0378-1119(03)00720-0.
52. Laub F, Aldabe R, Ramirez F, Friedman S. Embryonic expression of Krüppel-like factor 6 in neural and non-neural tissues. *Mech Dev*. 2001; 106(1-2): 167-70. 10.1016/s0925-4773(01)00419-1.
53. Zhao X, Monson C, Gao C, Gouon-Evans V, Matsumoto N, Sadler KC, Friedman SL. Klf6/copeb is required for hepatic outgrowth in zebrafish and for hepatocyte specification in mouse ES cells. *Dev Biol*. 2010; 344(1): 79-93. 10.1016/j.ydbio.2010.04.018.
54. Kazeto Y, Ijiri S, Adachi S, Yamauchi K. Cloning and characterization of a cDNA encoding cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (CYP11A1): tissue distribution and changes in the transcript abundance in ovarian tissue of Japanese eel, *Anguilla japonica*, during artificially induced sexual development. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006; 99(2-3): 121-8. 10.1016/j.jsbmb.2005.12.004.
55. Nakamoto M, Fukasawa M, Orii S, Shimamori K, Maeda T, Suzuki A, Matsuda M, Kobayashi T, Nagahama Y, Shibata N. Cloning and expression of medaka cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 during gonadal development. *Dev Growth Differ*. 2010; 52(4): 385-95. 10.1111/j.1440-169X.2010.01178.x.
56. Quirke LD, Juengel JL, Tisdall DJ, Lun S, Heath DA, McNatty KP. Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biol Reprod*. 2001; 65(1): 216-28. 10.1095/biolreprod65.1.216.

57. Vizziano-Cantonnet D, Anglade I, Pellegrini E, Gueguen MM, Fostier A, Guiguen Y, Kah O. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. *Gen Comp Endocrinol.* 2015; 170(2): 346-55. 10.1016/j.ygcn.2010.10.009.
58. Freking F, Nazairians T, Schlinger BA. The expression of the sex steroid synthesizing enzymes CYP11A1, 3 β -HSD, CYP17, and CYP19 in gonads and adrenals of adult and developing zebra finches. *Gen Comp Endocrinol.* 2000; 119(2): 140-51. 10.1006/gcen.2000.7503.
59. Kanda I, Akazome Y, Ogasawara O, Mori T. Expression of cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase during embryogenesis in chicken adrenal glands and gonads. *Gen Comp Endocrinol.* 2000; 118(1): 96-104. 10.1006/gcen.1999.7448.
60. Aste N, Watanabe Y, Shimada K, Saito N. Sex- and age-related variation in neurosteroidogenic enzyme mRNA levels during quail embryonic development. *Brain Res.* 2008; 1201: 15-22. 10.1016/j.brainres.2008.01.075.
61. Provost PR, Tremblay Y. Genes involved in the adrenal pathway of glucocorticoid synthesis are transiently expressed in the developing lung. *Endocrinology.* 2005; 146(5): 2239-45. 10.1210/en.2005-0077.
62. Negrón-Pérez Vm, Zhang Y, Hansen PJ. Single-cell gene expression of the bovine blastocyst. *Reproduction.* 2017; 154(5): 627-644. 10.1530/REP-17-0345.
63. Endo D, Kanaho Y, Park MK. Expression of sex steroid hormone-related genes in the embryo of the leopard gecko. *Gen Comp Endocrinol.* 2008; 155(1): 70-8. 10.1016/j.ygcn.2007.04.010.
64. Lardennois A, Pásti G, Ferraro T, Llense F, Mahou P, Pontabry J, Rodriguez D, Kim S, Ono S, Beaurepaire E, Gally C, Labouesse M. An actin-based viscoplastic lock ensures progressive body-axis elongation. *Nature.* 2019; 573(7773): 266-270. 10.1038/s41586-019-1509-4.
65. Delgado-Álvarez DI, Bartnicki-García S, Seiler S, Mouriño-Pérez RR. Septum development in *Neurospora crassa*: the septal actomyosin tangle. *PLoS One.* 2014; 9(5): e96744. 10.1371/journal.pone.0096744.
66. Tee Yh, Shemesh T, Thiagarajan V, Hariadi RF, Anderson KL, Page C, Volkmann N, Hanein D, Sivaramakrishnan S, Kozlov MM, Bershadsky AD. Cellular chirality arising from the self-organization of the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 2015; 17(4): 445-57. 10.1038/ncb3137.
67. Corkins Me, Krneta-Stankic V, Kloc M, McCrea PD, Gladden AB, Miller RK. Divergent roles of the Wnt/PCP Formin Daam1 in renal ciliogenesis. *PLoS One.* 2019; 14(8): e0221698. 10.1371/journal.pone.0221698.
68. Hong Eh, Kim JY, Kim JH, Lim DS, Kim M, Kim JY. BIG2-ARF1-RhoA-mDia1 Signaling Regulates Dendritic Golgi Polarization in Hippocampal Neurons. *Mol Neurobiol.* 2018; 55(10): 7701-7716. 10.1007/s12035-018-0954-7.

69. Lu Q, Adler PN. The diaphanous gene of *Drosophila* interacts antagonistically with multiple wing hairs and plays a key role in wing hair morphogenesis. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0115623. 10.1371/journal.pone.0115623.
70. Leader B, Leder P. Formin-2, a novel formin homology protein of the cappuccino subfamily, is highly expressed in the developing and adult central nervous system. *Mech Dev*. 2000; 93(1-2): 221-31. 10.1016/s0925-4773(00)00276-8.
71. Lian G, Chenn A, Ekuta V, Kanaujia S, Sheen V. Formin 2 Regulates Lysosomal Degradation of Wnt-Associated β -Catenin in Neural Progenitors. *Cereb Cortex*. 2019; 29(5): 1938-1952. 10.1093/cercor/bhy073.
72. Vorstman JA, van Daalen E, Jalali GR, Schmidt ER, Pasterkamp RJ, de Jonge M, Hennekam EA, Janson E, Staal WG, van der Zwaag B, Burbach JP, Kahn RS, Emanuel BS, van Engeland H, Ophoff RA. A double hit implicates DIAPH3 as an autism risk gene. *Mol Psychiatry*. 2011 Apr;16(4):442-51. 10.1038/mp.2010.26.
73. Ercan-Sencicek A, Jambi S, Franjic D, Nishimura S, Li M, El-Fishawy P, Morgan TM, Sanders SJ, Bilguvar K, Suri M, Johnson MH, Gupta AR, Yuksel Z, Mane S, Grigorenko E, Picciotto M, Alberts AS, Gunel M, Šestan N, State MW. Homozygous loss of DIAPH1 is a novel cause of microcephaly in humans. *Eur J Hum Genet*. 2015; 23(2): 165-72. 10.1038/ejhg.2014.82.
74. Dollar G, Gombos R, Barnett AA, Sanchez Hernandez D, Maung SM, Mihály J, Jenny A. Unique and Overlapping Functions of Formins Frl and DAAM During Ommatidial Rotation and Neuronal Development in *Drosophila*. *Genetics*. 2016; 202(3): 1135-51. 10.1534/genetics.115.181438.
75. Yanakieva I, Erzberger A, Matejčić M, Modes CD, Norden C. Cell and tissue morphology determine actin-dependent nuclear migration mechanisms in neuroepithelia. *J Cell Biol*. 2019; 218(10): 3272-3289. 10.1083/jcb.201901077.
76. Lian G, Dettenhofer M, Lu J, Downing M, Chenn A, Wong T, Sheen V. Filamin A and formin 2-dependent endocytosis regulates proliferation via the canonical Wnt pathway. *Development*. 2016; 143(23): 4509-4520. 10.1242/dev.139295.
77. Quinlan Me. Direct interaction between two actin nucleators is required in *Drosophila* oogenesis. *Development*. 2013; 140(21): 4417-25. 10.1242/dev.097337.
78. Nakaya Ma, Gudmundsson KO, Komiya Y, Keller JR, Habas R, Yamaguchi TP, Ajima R. Placental defects lead to embryonic lethality in mice lacking the Formin and PCP proteins Daam1 and Daam2. *PLoS One*. 2020; 15(4): e0232025. 10.1371/journal.pone.0232025.
79. Fujimoto N, Kan-O M, Ushijima T, Kage Y, Tominaga R, Sumimoto H, Takeya R. Transgenic Expression of the Formin Protein Fhod3 Selectively in the Embryonic Heart: Role of Actin-Binding Activity of Fhod3 and Its Sarcomeric Localization during Myofibrillogenesis. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0148472. 10.1371/journal.pone.0148472.

80. Vogler G, Liu J, Iafe TW, Migh E, Mihály J, Bodmer R. Cdc42 and formin activity control non-muscle myosin dynamics during *Drosophila* heart morphogenesis. *J Cell Biol.* 2014; 206(7): 909-22. 10.1083/jcb.201405075.
81. Reber I, Keller I, Becker D, Flury C, Welle M, Drögemüller C. Wattles in goats are associated with the FMN1/GREM1 region on chromosome 10. *Anim Genet.* 2015; 46(3): 316-20. 10.1111/age.12279.
82. Lian G, Kanaujia S, Wong T, Sheen V. FilaminA and Formin2 regulate skeletal, muscular, and intestinal formation through mesenchymal progenitor proliferation. *PLoS One.* 2017; 12(12): e0189285. 10.1371/journal.pone.0189285.
83. Matussek T, Djiane A, Jankovics F, Brunner D, Mlodzik M, Mihály J. The *Drosophila* formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton. *Development.* 2006; 133(5): 957-66. 10.1242/dev.02266.
84. Hetheridge C, Scott AN, Swain RK, Copeland JW, Higgs HN, Bicknell R, Mellor H. The formin FMNL3 is a cytoskeletal regulator of angiogenesis. *J Cell Sci.* 2012; 125(Pt 6): 1420-8. 10.1242/jcs.091066.
85. Lecorgne H, Tudosie AM, Lavik K, Su R, Becker KN, Moore S, Walia Y, Wisner A, Koehler D, Alberts AS, Williams FE, Eisenmann KM. Differential Toxicity of mDia Formin-Directed Functional Agonists and Antagonists in Developing Zebrafish. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 340. 10.3389/fphar.2018.00340.
86. Phng Lk, Gebala V, Bentley K, Philippides A, Wacker A, Mathivet T, Sauteur L, Stanchi F, Belting HG, Affolter M, Gerhardt H. Formin-mediated actin polymerization at endothelial junctions is required for vessel lumen formation and stabilization. *Dev Cell.* 2015; 32(1): 123-32. 10.1016/j.devcel.2014.11.017.
87. 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 J, Mihály J. DAAM is required for thin filament formation and Sarcomerogenesis during muscle development in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 2014; 10(2): e1004166. 10.1371/journal.pgen.1004166.
88. Mi-Mi L, Votra S, Kempthues K, Bretscher A, Pruyne D. Z-line formins promote contractile lattice growth and maintenance in striated muscles of *C. elegans*. *J Cell Biol.* 2012; 198(1): 87-102. 10.1083/jcb.201202053.
89. Fenix Am, Neining AC, Taneja N, Hyde K, Visetsouk MR, Garde RJ, Liu B, Nixon BR, Manalo AE, Becker JR, Crawley SW, Bader DM, Tyska MJ, Liu Q, Gutzman JH, Burnette DT. Muscle-specific stress fibers give rise to sarcomeres in cardiomyocytes. *Elife.* 2018; 7: e42144. 10.7554/eLife.42144.
90. Sundaramurthy S, Votra S, Laszlo A, Davies T, Pruyne D. FHOD-1 is the only formin in *Caenorhabditis elegans* that promotes striated muscle growth and Z-line organization in a cell autonomous manner. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2020; 77(10): 422-441. 10.1002/cm.21639.

91. Deng S, Silimon RL, Balakrishnan M, Bothe I, Juros D, Soffar DB, Baylies MK. The actin polymerization factor Diaphanous and the actin severing protein Flightless I collaborate to regulate sarcomere size. *Dev Biol.* 2021; 469: 12-25. 10.1016/j.ydbio.2020.09.014.
92. Kan-O M, Takeya R, Abe T, Kitajima N, Nishida M, Tominaga R, Kurose H, Sumimoto H. Mammalian formin Fhod3 plays an essential role in cardiogenesis by organizing myofibrillogenesis. *Biol Open.* 2012; 1(9): 889-96. 10.1242/bio.20121370.
93. Weise-Cross L, Taylor JM, Mack CP. Inhibition of Diaphanous Formin Signaling In Vivo Impairs Cardiovascular Development and Alters Smooth Muscle Cell Phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35(11): 2374-83. 10.1161/ATVBAHA.115.305879.
94. Litschko C, Brühmann S, Csiszár A, Stephan T, Dimchev V, Damiano-Guercio J, Junemann A, Körber S, Winterhoff M, Nordholz B, Ramalingam N, Peckham M, Rottner K, Merkel R, Faix J. Functional integrity of the contractile actin cortex is safeguarded by multiple Diaphanous-related formins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019; 116(9): 3594-3603. 10.1073/pnas.1821638116.
95. Sakamoto S, Thumkeo D, Ohta H, Zhang Z, Huang S, Kanchanawong P, Fuu T, Watanabe S, Shimada K, Fujihara Y, Yoshida S, Ikawa M, Watanabe N, Saitou M, Narumiya S. mDia1/3 generate cortical F-actin meshwork in Sertoli cells that is continuous with contractile F-actin bundles and indispensable for spermatogenesis and male fertility. *PLoS Biol.* 2018; 16(9): e2004874. 10.1371/journal.pbio.2004874.
96. Li N, Mruk DD, Wong CK, Han D, Lee WM, Cheng CY. Formin 1 Regulates Ectoplasmic Specialization in the Rat Testis Through Its Actin Nucleation and Bundling Activity. *Endocrinology.* 2015; 156(8): 2969-83. 10.1210/en.2015-1161.
97. Thumkeo D, Shinohara R, Watanabe K, Takebayashi H, Toyoda Y, Tohyama K, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. Deficiency of mDia, an actin nucleator, disrupts integrity of neuroepithelium and causes periventricular dysplasia. *PLoS One.* 2011; 6(9): e25465. 10.1371/journal.pone.0025465.
98. Sahasrabudhe A, Ghatge K, Mutalik S, Jacob A, Ghose A. Formin 2 regulates the stabilization of filopodial tip adhesions in growth cones and affects neuronal outgrowth and pathfinding in vivo. *Development.* 2016; 143(3): 449-60. 10.1242/dev.130104.
99. Li D, Hallett MA, Zhu W, Rubart M, Liu Y, Yang Z, Chen H, Haneline LS, Chan RJ, Schwartz RJ, Field LJ, Atkinson SJ, Shou W. Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1) is required for heart morphogenesis. *Development.* 2011; 138(2): 303-15. 10.1242/dev.055566.
100. Ajima R, Bisson JA, Helt JC, Nakaya MA, Habas R, Tessarollo L, He X, Morrisey EE, Yamaguchi TP, Cohen ED. DAAM1 and DAAM2 are co-required for myocardial maturation and sarcomere assembly. *Dev Biol.* 2015; 408(1): 126-39. 10.1016/j.ydbio.2015.10.003.

101. Sulistomo Hw, Nemoto T, Yanagita T, Takeya R. Formin homology 2 domain-containing 3 (Fhod3) controls neural plate morphogenesis in mouse cranial neurulation by regulating multidirectional apical constriction. *J Biol Chem.* 2019; 294(8): 2924-2934. 10.1074/jbc.RA118.005471.
102. Dutta P, Maiti S. Expression of multiple formins in adult tissues and during developmental stages of mouse brain. *Gene Expr Patterns.* 2015; 19(1-2): 52- 9. 10.1016/j.gep.2015.07.003.
103. Yoo H, Roth-Johnson EA, Bor B, Quinlan ME. *Drosophila* Cappuccino alleles provide insight into formin mechanism and role in oogenesis. *Mol Biol Cell.* 2015; 26(10): 1875-86. 10.1091/mbc.E14-11-1558.
104. Homem Cc, Peifer M. Diaphanous regulates myosin and adherens junctions to control cell contractility and protrusive behavior during morphogenesis. *Development.* 2008; 135(6): 1005-18. 10.1242/dev.016337.
105. Magie CR, Meyer MR, Gorsuch MS, Parkhurst SM. Mutations in the Rho1 small GTPase disrupt morphogenesis and segmentation during early *Drosophila* development. *Development.* 1999; 126(23): 5353-64.
106. Grosshans J, Wenzl C, Herz HM, Bartoszewski S, Schnorrer F, Vogt N, Schwarz H, Müller HA. RhoGEF2 and the formin Dia control the formation of the furrow canal by directed actin assembly during *Drosophila* cellularisation. *Development.* 2005; 132(5): 1009-20. 10.1242/dev.01669.
107. Bor B, Bois JS, Quinlan ME. Regulation of the formin Cappuccino is critical for polarity of *Drosophila* oocytes. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2015; 72(1): 1-15. 10.1002/cm.21205.
108. Thestrup J, Tipold M, Kindred A, Stark K, Curry T, Lewellyn L. The Arp2/3 complex and the formin, Diaphanous, are both required to regulate the size of germline ring canals in the developing egg chamber. *Dev Biol.* 2020; 461(1): 75-85. 10.1016/j.ydbio.2020.01.007.
109. Homem CC, Peifer M. Exploring the roles of diaphanous and enabled activity in shaping the balance between filopodia and lamellipodia. *Mol Biol Cell.* 2009; 20(24): 5138-55. 10.1091/mbc.e09-02-0144.
110. Saleh A, Subramaniam G, Raychaudhuri S, Dhawan J. Cytoplasmic sequestration of the RhoA effector mDiaphanous1 by Prohibitin2 promotes muscle differentiation. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 8302. 10.1038/s41598-019-44749-4.
111. Matusek T, Gombos R, Szécsényi A, Sánchez-Soriano N, Czibula A, Pataki C, Gedai A, Prokop A, Raskó I, Mihály J. Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth. *J Neurosci.* 2008; 28(49): 13310-9. 10.1523/JNEUROSCI.2727-08.2008.
112. Anhezini, L. Saita, AP, Costa, MS, Ramos RGP, Simon CR. *Fhos* encodes a *Drosophila* Formin-Like Protein participating in autophagic programmed cell death. *Gênesis (Nova York, NY: 2000).* 2012, 672–84mp. 10.1002/dvg.22025.

113. Colombo A, Palma K, Armijo L, Mione M, Signore IA, Morales C, Guerrero N, Meynard MM, Pérez R, Suazo J, Marcelain K, Briones L, Härtel S, Wilson SW, Concha ML. Daam1a mediates asymmetric habenular morphogenesis by regulating dendritic and axonal outgrowth. *Development*. 2013; 140(19): 3997-4007. 10.1242/dev.091934.
114. Lai SI, Chan TH, Lin MJ, Huang WP, Lou SW, Lee SJ. Diaphanous-related formin 2 and profilin I are required for gastrulation cell movements. *PLoS One*. 2008; 3(10): e3439. 10.1371/journal.pone.0003439.
115. Santos-Ledo A, Jenny A, Marlow FL. Comparative gene expression analysis of the fmnl family of formins during zebrafish development and implications for tissue specific functions. *Gene Expr Patterns*. 2013; 13(1-2): 30-7. 10.1016/j.gep.2012.09.002.
116. Abe M, Kuroda R. The development of CRISPR for a mollusc establishes the formin *Lsdial* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling. *Development*. 2019; 146(9): dev175976. 10.1242/dev.175976.
117. Noda T, Satoh N, Asami T. Heterochirality results from reduction of maternal diaph expression in a terrestrial pulmonate snail. *Zoological Lett*. 2019; 5: 2. 10.1186/s40851-018-0120-0.
118. Shaye Dd, Greenwald I. A network of conserved formins, regulated by the guanine exchange factor EXC-5 and the GTPase CDC-42, modulates tubulogenesis in vivo. *Development*. 2016; 143(22): 4173-4181. 10.1242/dev.141861.
119. Vaidya HJ, Briones Leon A, Blackburn CC. FOXN1 in thymus organogenesis and development. *Eur J Immunol*. 2016; 46(8): 1826-37. 10.1002/eji.201545814.
120. Moses A, Bhalla P, Thompson A, Lai L, Coskun FS, Seroogy CM, de la Morena MT, Wysocki CA, van Oers NSC. Comprehensive phenotypic analysis of diverse FOXN1 variants. *J Allergy Clin Immunol*. 2023; 152(5): 1273-1291.e15. 10.1016/j.jaci.2023.06.019.