

**Biochemische und phänotypische Untersuchungen
zur Funktion der p21-aktivierten Kinase DPAK3
in *Drosophila melanogaster***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Benjamin Tobias Mentzel
aus Donauwörth

Würzburg, im September 2008

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter :

Gutachter:.....

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Erklärung gemäß § 4 Abs. 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie an der Universität Würzburg

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Aus der Literatur entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich habe vorher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht.

Würzburg, den 25. September 2008

Benjamin Tobias Mentzel

Benjamin Tobias Mentzel
Mariannahillstraße 3
97074 Würzburg

Lebenslauf

22. 10. 1977	geboren in Donauwörth
1984 - 1987	Mangold-Grundschule Donauwörth
1987 - 1997	Gymnasium Donauwörth
Juni 1997	Abitur
Juli 1997 - Juni 1998	Grundwehrdienst
November 1998 Oktober 2003	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, abgeschlossen mit dem Diplom
November 2003 - September 2008	Promotion an der Julius-Maximilians -Universität Würzburg am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
September 2003	Beantragung des Promotionsverfahrens an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Danksagung:

Zuallererst möchte ich Thomas für die spitzenmäßige Betreuung danken, vor allem dafür, daß er mich bei all den zahlreich auftretenden kleinen und etwas größeren Problemen immer unterstützt und mich wenn nötig immer wieder aufs Neue motiviert hat. Erich Buchner möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Koreferats und die stets hilfsbereite Unterstützung danken. Ein riesiges Dankeschön für die tolle Arbeitsatmosphäre und Kameradschaft geht an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder unserer Arbeitsgruppe, vor allem an Felix & Eike für die vielen informellen "Arbeitsbesprechungen". Unserer Diplomandin Theresa und meinen beiden Ex-Diplomandinnen Katharina und Rike danke ich für die tolle Zusammenarbeit bei den gemeinsamen Experimenten. Ich danke allen Kollegen am MSZ einschließlich den „Exil-RVZ'lern“ für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Eva danke ich viele viele tausend Male dafür, daß sie mich vor allem in der Endphase immer wieder aufgebaut hat, wenn die Motivation wieder mal besonders niedrig war („Du machst das jetzt!“). Außerdem noch herzlichen Dank für's Korrekturlesen dieses Werkes und – ja – für einfach alles.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich dafür, daß sie mich nicht nur während des Studiums, sondern auch während der Anfertigung dieser Arbeit stets auf jede nur erdenkliche Art und Weise unterstützt haben. Für herausragende moralische Unterstützung möchte möchte ich meinem Schwesterchen danken und wünsche ihr auf diesem Wege viel Glück für ihr jetzt beginnendes Studium.

Allen meinen Freunden und Bekannten gilt mein herzlicher Dank für solch motivierende Kommentare wie „Brotlose Kunst!“ o. ä. sowie für die nicht enden wollende Flut an Hilfsangeboten. Danke, aber ich will keine Fruchtfliegen aus eurer Küche / Biotonne etc.

Euch und allen die ich hier vergessen haben sollte:

Vielen, vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Familie der p21-aktivierten Kinasen.....	1
1.2 Allgemeine Funktionen von p21-Aktivierten Kinasen.....	5
1.3 Funktionen von p21-aktivierten Kinasen im Nervensystem.....	7
1.4 Bisher bekannte Eigenschaften von DPAK3.....	8
1.5 Ziele dieser Arbeit.....	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Chemikalien.....	10
2.1.2 Enzyme.....	10
2.1.3 Puffer & Medien.....	10
2.1.4. Proteaseinhibitoren.....	12
2.1.5 Kits.....	12
2.1.6 Oligonukleotid-Primer.....	13
2.1.7 Antikörper.....	15
2.1.8 Plasmide.....	15
2.1.9 Verwendete Fliegenlinien.....	17
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Plasmidkonstruktion.....	18
2.2.2 Polymerasekettenreaktion.....	18
2.2.3 Zellkultur.....	19
2.2.4 Immunkopräzipitation überexprimierter Proteine aus HEK293 Zellen.....	19
2.2.5 Nachweis der Kinaseaktivität in vitro.....	20
2.2.6 Immunfluoreszenz.....	20
2.2.7 RNA-Interferenz in S2R+ Zellen.....	21
2.2.8 Sequenzanalyse.....	21
2.2.9 Keimbahntransformation von Drosophila.....	22
2.2.10 DNS-Präparation aus Fliegen (nach Parks et al., 2004).....	22
2.2.11 Immunhistofluoreszenz.....	23
2.2.12 Fixierung von Fliegen für die Rasterelektronenmikroskopie.....	23
2.2.13 Semidünnschnitte der Komplexaugen von Drosophila.....	23

3. Ergebnisse.....	25
3.1. Regulation von DPAK3 durch RhoGTPasen und Einfluß auf das Aktin-Zytoskelett.....	25
3.1.1 DPAK3 interagiert präferentiell mit Rac1 und Rac2.....	25
3.1.2 Die Interaktion mit RhoGTPasen steigert die Kinaseaktivität von DPAK3....	28
3.1.3 DPAK3 liegt in inaktivem Zustand als Dimer vor.....	29
3.1.4 Kolokalisierung von DPAK3 mit Rac und Einfluß auf das Zytoskelett.....	31
3.2 Interaktion und Regulation von <i>Drosophila</i> PAK-Proteinen durch CK2β.....	33
3.2.1 DPAK3 interagiert mit CK2b in vivo	33
3.2.2 CK2b bindet an die Kinasedomäne von DPAK3.....	36
3.2.3 Alle <i>Drosophila</i> PAK Proteine interagieren mit CK2β.....	37
3.2.4 Regulation von PAK-Proteinen durch CK2β.....	39
3.2.5 Posttranslatorische Modifikationen von CK2β beeinflussen nicht die Interaktion mit DPAK3.....	40
3.2.6 DPAK3 interagiert nicht mit dem CK2- Holoenzym.....	43
3.3 Genetische und phänotypische Analyse der vorhandenen <i>Dpak3</i> -Allele.....	46
3.4 Phänotypische Analyse der Defizienz <i>Df(3R)Exel9055</i> mit Hilfe genetischer Mosaik.....	48
3.4.1 Phänotypische Analyse von <i>Df(3R)Exel9055</i> in der Entwicklung der Pilzkörper von <i>Drosophila melanogaster</i>	49
3.4.2 Phänotypische Analyse von <i>Df(3R)Exel9055</i> in der Augenentwicklung	52
3.5 Herstellung neuer Defizienzen.....	54
3. 6 Herstellung genomischer Rettungskonstrukte.....	58
3.7 Redundanz von DPAK1 und DPAK3 in der Augenentwicklung von <i>Drosophila</i> . ..	60
4. Diskussion.....	65
4.1 DPAK3 und seine Homologen bilden eine eigene Untergruppe der p21-aktivierten Kinasen.....	65
4.2 CK2β als ein neuer Regulator von p21-aktivierten Kinasen in <i>Drosophila</i>	66
4.3 Mögliche Funktionen von DPAK3 in der Augenentwicklung und im Nervensystem von <i>Drosophila</i>	69
5. Zusammenfassung.....	74
6. Summary.....	76

7. Literaturverzeichnis.....	77
8. Anhang.....	88
8.1 Sequenzen.....	88
8.2 Wichtige Abkürzungen.....	89

1. Einleitung

1.1 Die Familie der p21-aktivierten Kinasen

Die p21-aktivierten Kinasen bilden eine Proteinfamilie, die an zahlreichen intrazellulären Signalprozessen beteiligt ist. Die ersten Vertreter dieser in allen Eukaryoten vorhandenen Proteine wurden als Bindungspartner der kleinen GTPasen Rac und Cdc42 in Lysat aus dem Gehirn von Ratten entdeckt (Manser et al., 1994). Seitdem wurde an dieser Proteinfamilie eine beachtliche Anzahl an Studien, vor allem *in vitro* oder in Zellkultur, durchgeführt und eine Beteiligung an zahlreichen intrazellulären Signalwegen und Prozessen nachgewiesen (Übersicht u.a. in Bokoch, 2003, Arias-Romero and Chernoff, 2008).

Im Allgemeinen wurden die PAK-Proteine bisher in zwei Gruppen, Gruppe 1 und Gruppe 2 unterteilt, die sich sowohl in ihrer molekularen Struktur, als auch in ihren biochemischen Eigenschaften und Funktionen unterscheiden. Zur Gruppe 1 gehören PAK1, 2 und 3 der Säuger, während PAK4, 5 und 6 der Gruppe 2 zugeordnet werden (Jaffer & Chernoff, 2002, Bokoch, 2003). Im Genom des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* wurden drei Vertreter der Gruppe 1 (XPAK1, 2 & 3), aber nur ein Gruppe 2 PAK (XPAK5) gefunden. Das Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kodiert zwei PAK-Proteine, die aber vermutlich beide der Gruppe 1 zuzuordnen sind. In den bislang sequenzierten Genomen von Insekten und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurde ebenfalls jeweils ein Gruppe 1 und ein Gruppe 2 PAK gefunden. Diese Organismen besitzen allerdings jeweils noch ein drittes PAK-Protein, das zumindest aufgrund seiner Sequenz einer eigenen Gruppe von PAK-Proteinen zuzuordnen ist (Abb. 1). Allen PAK-Proteinen gemeinsam sind lediglich die p21-Bindungsdomäne (PBD) am N-Terminus des Proteins und die C-terminal gelegene Kinasedomäne (Abb. 2). Ferner verfügen die Gruppe 1 PAK-Proteine noch über konservierte Bindungsstellen für die SH2/SH3-Domänenproteine Nck und Grb2 am äußersten N-terminalen Ende (Galisteo et al., 1996, Bokoch et al., 1996, Puto et al., 2003). Diesen folgt die PBD, welche die für die Interaktion mit den kleinen GTPasen Rac und Cdc42 unbedingt erforderliche CRIB-Region (Cdc42 Rac Interactive Binding, Burbelo et al., 1995) enthält und teilweise mit der anschließenden autoinhibitorischen Domäne (AID) überlappt (Zenke et al., 1999, Lei et al., 2000).

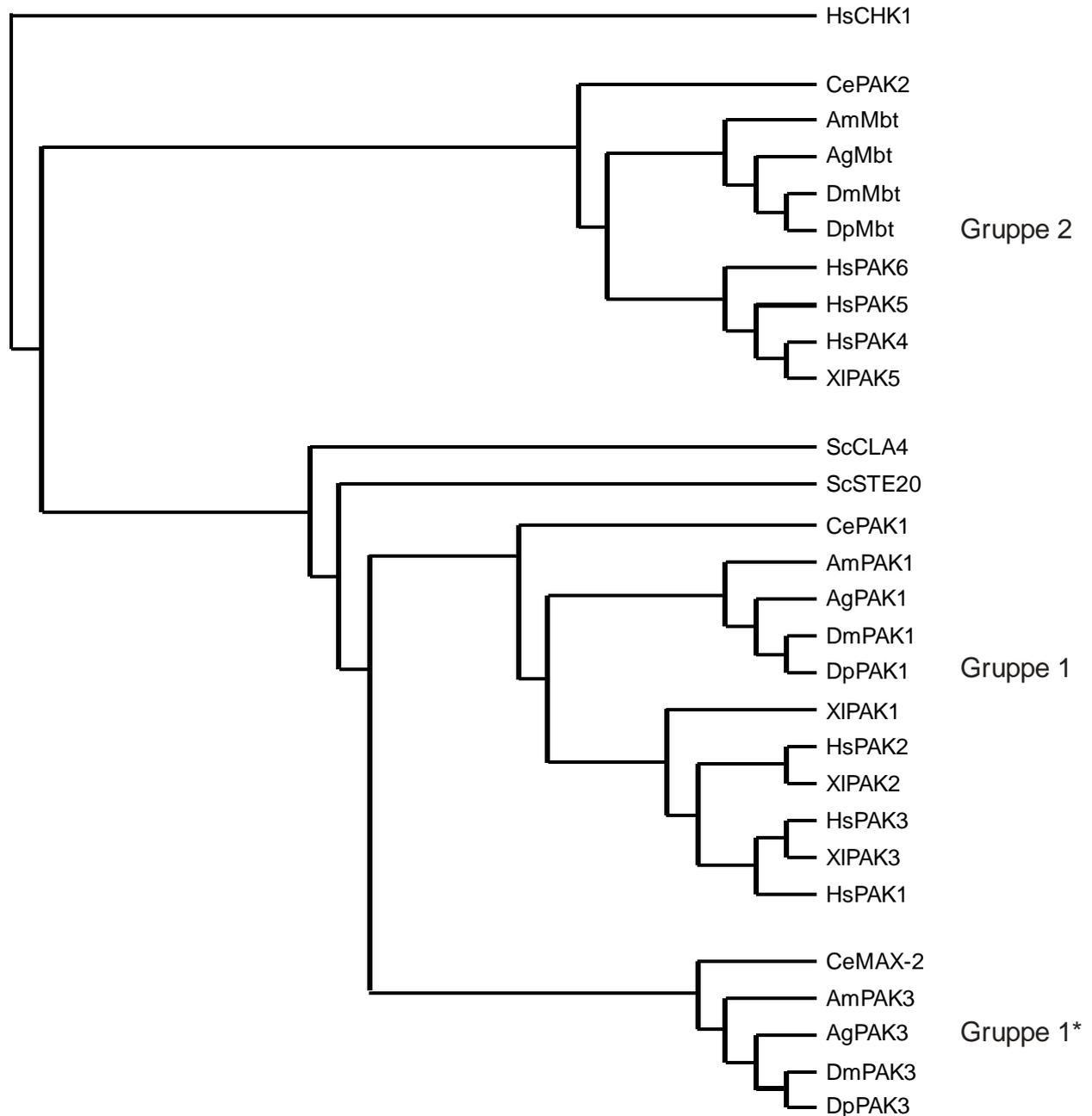


Abb. 1: Stammbaum der p21-aktivierten Kinasen. Die Sequenzen der Kinasedomänen aller verschiedener PAK-Proteine wurden mit dem Programm ClustalW miteinander abgeglichen und ein phylogenetischer Baum erstellt. Als nicht verwandte Sequenz wurde die Kinasedomäne der humanen Checkpoint-Kinase 1 (HsCHK1) verwendet. Es wurden PAK-Proteine folgender Organismen analysiert: *Anopheles gambiae* (Ag), *Apis mellifera* (Am), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Drosophila pseudoobscura* (Dp), *Homo sapiens* (Hs), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) und *Xenopus laevis* (XI).

Zwischen diesen in allen Gruppe 1 PAK-Proteinen konservierten Regionen und der Kinasedomäne befindet sich eine Region mit zwischen allen p21-aktivierten Kinasen stark divergierender Aminosäuresequenz, die als einzige Gemeinsamkeit die

Bindungsstelle für den Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF) Pix (PAK interacting exchange factor, Manser et al., 1998, Bagrodia et al., 1998) enthält. Am äußersten C-Terminus, im Anschluß an die Kinasedomäne, befindet sich eine konservierte Bindungsstelle für die G β γ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine (Leeuw et al., 1998, Wang et al., 1999).

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den beiden „klassischen“ PAK-Familien liegt in ihrer Regulation. Gruppe 1 PAK-Proteine liegen im inaktiven Zustand als Dimere vor, wobei die autoinhibitorische Domäne des einen PAK-Moleküls an die Kinasedomäne des anderen bindet. Zusätzlich findet eine Interaktion zwischen den CRIB-Domänen der beiden Moleküle statt (Lei et al., 2000). Die Bindung von GTP-gebundenem Rac oder Cdc42 an die PBD führt zum Auseinanderbrechen des Dimers und durch Autophosphorylierung zu einer Aktivierung der Kinase (Bagrodia et al., 1995, Buchwald et al., 2001, Lei et al., 2000, Chong et al., 2001). Zusätzlich kann PAK an die Membran rekrutiert werden, da die kleinen GTPasen aufgrund ihrer C-terminal gebundenen Farnesylreste dort lokalisiert sind. Neben Rac und Cdc42 und homologen Proteinen wurden zahlreiche weitere Prozesse entdeckt, die zu einer Aktivierung von Gruppe 1 PAK Proteinen beitragen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß eine Interaktion mit Sphingolipiden und verwandten Molekülen ebenfalls zu einer Steigerung der Kinaseaktivität von PAK führen (Bokoch et al., 1998). Die Interaktion mit dem Guaninnukleotidaustauschfaktor Pix führt ebenfalls zu einer Steigerung der PAK-Aktivität, die vermutlich nur teilweise durch die Aktivierung von Rac durch Pix erfolgt (Manser et al., 1998, Bagrodia et al., 1998, Daniels et al., 1999). In *Drosophila* besitzen sowohl DPAK1 als auch DPAK3 eine Pix-Bindungsstelle und sind auch in der Lage, den GEF zu binden. Eine Steigerung der Aktivität beider Kinasen durch diese Interaktion konnte aber bislang nicht nachgewiesen werden. Ferner wurde gezeigt, daß weitere Kinasen, wie zum Beispiel Akt oder die membranassoziierte Kinase PDK1, PAK-Proteine durch Phosphorylierung aktivieren können (Tang et al., 2000). Schließlich kann auch eine Abspaltung der Kinasedomäne von der N-terminalen regulatorischen Region, wie zum Beispiel bei der Spaltung von Säuger-PAK2 durch Caspase 3 im Verlauf der Apoptose zu einer Aktivierung führen (Rudel und Bokoch, 1997). Die Bindung der Adapterproteine Nck und Grb2 an die N-terminal gelegenen PXXP-Bindungsstellen führt zu einer Rekrutierung von PAK an die Zellmembran und damit verbunden zu einer Aktivierung der Kinase (Galisteo et al., 1996, Puto et al., 2003).

Die Phosphatasen POPX-1 und -2 (Partner of Pix, Koh et al., 2002), die zusammen mit

Pix und PAK einen Komplex bilden können, inaktivieren wiederum die p21-aktivierten Kinasen. Eine ähnliche Wirkung kann durch Phosphorylierung zum Beispiel durch die Serin-Threonin-Kinase PKA oder die Tyrosinkinase Abl erzielt werden (Howe & Juliano, 2000, Roig et al., 2000). Andere Proteine binden an die N-terminale regulatorische Region von PAK und hemmen die Bindung von Rac oder Cdc42. Dies ist beispielsweise bei hPIP1 (human PAK interacting protein 1), CRIPAK (Cysteine-rich inhibitor of PAK1) und dem Tumorsuppressorprotein Merlin der Fall (Xia et al., 2001, Kissil et al., 2003, Talukder et al., 2006).

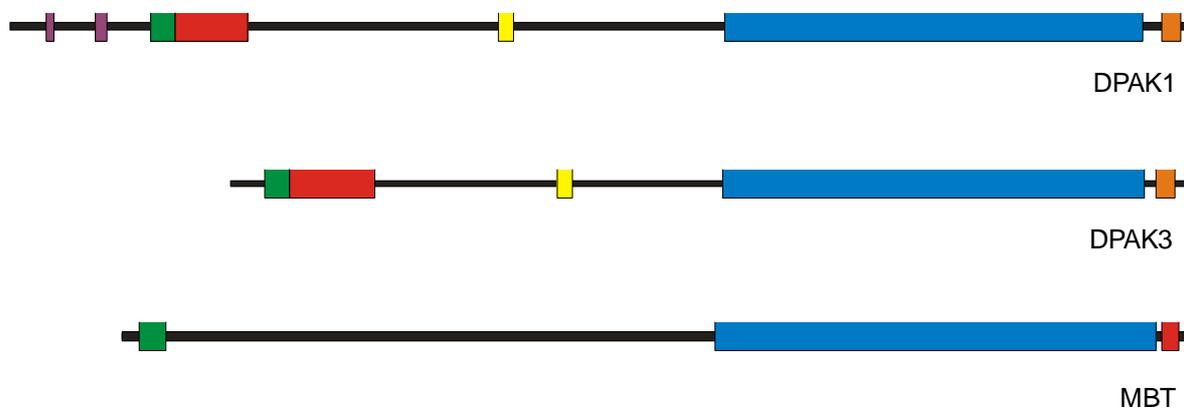


Abb. 2: Aufbau der p21-aktivierten Kinasen. Alle drei *Drosophila* PAK-Proteine besitzen eine N-terminale p21-Bindungsdomäne (grün), eine C-terminale Kinasedomäne (blau) sowie am äußersten C-terminalen Ende eine der Gβγ-Bindungsstelle in STE20 homologe Sequenz. DPAK1, dessen Aufbau im wesentlichen mit dem der humanen Gruppe 1 PAKs übereinstimmt, besitzt weiterhin noch vor der PBD zwei in Gruppe 1 PAKs konservierte PxxP-Bindungsstellen für Adapterproteine und eine autoinhibitorische Domäne (rot). Diese besitzt auch DPAK3, für das es zwar kein Homolog in Vertebraten, wohl aber in anderen Insekten gibt, ebenso wie auch die Bindungsstelle für den RhoGEF Pix zwischen PBD und Kinasedomäne. Mbt, und alle anderen Gruppe 2 PAKs hingegen besitzen diese Domänen nicht.

Im Gegensatz zu den Gruppe 1 PAK-Proteinen ist die Regulation der Vertreter der Gruppe 2 nur relativ wenig erforscht. Ihnen fehlen sowohl die beiden N-terminalen PXXP-Motive als auch die sich an die CRIB-Region anschließende autoinhibitorische Domäne der Gruppe 1 PAK Proteine. Sie sind daher nicht zur Dimerisierung fähig. Ihre Kinaseaktivität ist generell höher, weil durch Wechselwirkungen innerhalb der Kinasedomäne eine aktive Konformation stabilisiert wird und kann durch die Bindung von GTP-gebundenem Cdc42 nicht weiter gesteigert werden (Abo et al., 1998, Pandey et al., 2002, Schneeberger & Raabe, 2003, Eswaran et al., 2007). Vielmehr wird angenommen, daß die Interaktion mit der GTPase lediglich die Lokalisierung des PAK-

Proteins beeinflusst. Nicht nur die Regulation, auch die Substratspezifität beider Gruppen unterscheidet sich vermutlich voneinander, wie eine Studie zur Ermittlung der Konsensussequenz für die bevorzugte Phosphorylierungstellen beider Gruppen andeutet (Rennefahrt et al., 2007).

1.2 Allgemeine Funktionen von p21-Aktivierten Kinasen

Die wohl bislang am besten erforschte Funktion der p21-aktivierten Kinasen ist ihre Fähigkeit zur Regulation des Zytoskeletts und damit ihr Einfluß auf die Gestalt der Zelle. So sind PAK-Proteine beispielsweise an der Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien, dem Abbau von Aktinstressfasern sowie der Auflösung von Zell-Zellkontakten beteiligt (Sells et al., 1997, Manser et al., 1997) wobei diese Funktionen teilweise unabhängig von der katalytischen Aktivität der p21-aktivierten Kinase sind (Daniels et al., 1998, Frost et al., 1998). Ein Großteil der Effekte von PAK-Proteinen auf das Aktinzytoskeletts kommt durch die Hemmung der Aktindepolymerisierung durch die Phosphorylierung von LIM-Kinase, die wiederum den Aktindepolymerisierungsfaktor Cofilin phosphoryliert (Edwards et al., 1999, Dan et al., 2001). Zumindest die Gruppe 2 PAK-Proteine PAK4 und Mbt wirken zudem nicht oder nicht ausschließlich durch die Phosphorylierung von LIMK, sondern durch direkte Phosphorylierung von Cofilin und der Phosphatase Slingshot (Soosairajah et al., 2005, Menzel et al., 2007). Im wesentlichen wird hierdurch die Depolymerisierung von filamentösem Aktin an der Stelle der PAK-Aktivierung verhindert und die Ausbildung von aktinreichen Strukturen wie beispielsweise Filopodien begünstigt. Weitere am Aufbau des Aktinzytoskeletts beteiligte Substrate von p21-aktivierten Kinasen sind Filamin A oder P41^{Arc}, eine Untereinheit des Arp2/3-Komplexes (Vadlamundi et al., 2002, Vadlamundi et al., 2004). Eine weitere wichtige Rolle spielen PAK-Proteine in der Regulation der Aktivität des Myosinkomplexes und nehmen damit direkt Einfluß auf die Motilität der Zelle.

Dabei hemmen PAK1 und PAK2 durch Phosphorylierung die Myosinkinase MLCK, wodurch diese die regulatorische leichte Kette von Myosin (R-MLC) nicht mehr phosphorylieren kann, was eine Relaxation der Zelle bewirkt (Sanders et al., 1999, Goeckeler et al., 2000). Allerdings kann PAK *in vitro* auch direkt die R-MLC phosphorylieren, wobei diese aber vermutlich kein physiologisch relevantes Substrat darstellt (Chew et al., 1998, Wirth et al., 2003). Weiterhin wurden die schweren Ketten von Myosin I und II sowie Myosin IV als Substrate von p21-aktivierten Kinasen identifiziert (Wu et al., 1996, van Leeuwen et al., 1999, Lee et al., 1996). Auch

Drosophila DPAK1 spielt eine wichtige Rolle bei der korrekten Organisation des Aktinzytoskeletts und der Zellmotilität. So wurde gezeigt, daß DPAK1 eine entscheidende Rolle in der dorsalen Schließung des Embryos spielt. Ein Fehlen der DPAK1-Funktion führt hier zu Störungen Bildung und Lokalisierung von F-Aktin (Harden et al., 1996, Conder et al., 2004). Während der Oogenese ist es in den polar organisierten Zellen des Follikelepithels am basalen Pol lokalisiert und dort an der Bildung der F-Aktinfilamente und der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt (Conder et al., 2007).

Aber nicht nur das Aktinzytoskelett wird durch PAK-Proteine beeinflusst, auch etliche mit dem Mikrotubuli-Netzwerk assoziierte Proteine wurden als Substrate oder Interaktionspartner von PAKs gefunden. So ist PAK zum Beispiel in der Lage, durch Phosphorylierung die Aktivität von Stathmin zu hemmen. Da aktives Stathmin α/β Tubulin-Dimere bindet und so den Zerfall von Mikrotubuli begünstigt, trägt die Aktivität von PAK hier zu einer Stabilisierung derselben bei (Daub et al., 2001, Wittman et al., 2003). In Säugerzellen wurde PAK1 außerdem am Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) und den Centrosomen gefunden, und konstitutiv durch aktivierte PAK-Konstrukte konnten zentrosomale Aberrationen hervorgerufen werden (Banerjee et al., 2002, Li et al., 2002). Weiter wurden die leichte und die schwere Kette des Dynein-Komplexes sowie das Molekül p50/Dynamitin, ein Bestandteil des Dynactinkomplexes, der beispielsweise die Bindung von Vesikeln an den Dynein-Motorkomplex bewirkt, als Substrate beziehungsweise Interaktionspartner von p21-aktivierten Kinasen gefunden, was auf eine mögliche Beteiligung von PAK-Proteinen an intrazellulären Transportprozessen hindeutet (Mayhew et al., 2006, Lu et al., 2005, Menzel et al., 2007).

Weiterhin sind PAK-Proteine in der Lage, durch Phosphorylierung von Raf oder MEK-1, den MAP-Kinase Signalweg zu aktivieren, und so etwa die Genexpression, Proliferation oder das Überleben der Zelle zu beeinflussen (Eblen et al., 2002, Slack-Davis, 2003). Für PAK1 wurde zudem nachgewiesen, daß es den Apoptosefaktor Bad inhibitorisch phosphorylieren kann und damit dem Zelltod entgegenwirkt. (Tang et al., 2000, Schurmann et al., 2000). Wenn eine Zelle jedoch einmal in die Apoptose übergegangen ist, so wird PAK2 durch Caspase 3 gespalten, wodurch die von den regulatorischen N-terminalen Sequenzen getrennte Kinasedomäne konstitutiv aktiv wird und proapoptotisch wirkt (Rudel & Bokoch, 1997, Lee et al., 1997, Walter et al., 1998).

1.3 Funktionen von p21-aktivierten Kinasen im Nervensystem

PAK-Proteine sind an zahlreichen Prozessen im Nervensystem, wie zum Beispiel Axonwachstum, Bildung und Plastizität von Synapsen, beteiligt (Übersicht in Boda et al., 2006). Dies zeigt sich schon an der Expression der verschiedenen PAK-Proteine, die alle im Gehirn der Säuger nachgewiesen werden können (Arias-Romero and Chernoff, 2008). PAK3 und PAK5 werden fast ausschließlich dort gefunden, und das Expressionslevel von PAK1 ist dort im Vergleich zu anderen Geweben erhöht (Burbelo et al., 1999, Dan et al., 2002, Pandey et al., 2002). Besonders hohe Mengen an PAK1 und PAK3 werden unter anderem im Hippocampus, einer für das Lernen bei Säugern besonders bedeutsamen Hirnregion, gefunden. Verschiedene Mutationen in humanem PAK3 sind die Ursache für X-chromosomale mentale Retardation (Allen et al., 1998, Bienvenu et al., 2000). In *Drosophila* wurde für DPAK1 eine erhöhte Expression im embryonalen zentralen Nervensystem nachgewiesen (Harden et al., 1996).

Eine Beteiligung an Proliferationsvorgängen im Nervensystem konnte bislang nur für das *Drosophila* PAK4-Homolog Mbt (Mushroom bodies tiny), nicht aber für irgendeine andere p21-aktivierte Kinase nachgewiesen werden. Das Fehlen von Mbt führt zu einer Verringerung der Anzahl der neuronalen Zellen im Auge und im Pilzkörper der Fliege (Melzig et al., 1998, Schneeberger und Raabe, 2003).

In Säugern und *Drosophila* ist PAK1 für das Auswachsen von Axonen erforderlich und für humanes PAK1 wurde zudem gezeigt, daß die Lokalisierung dieses Proteins an die Zellmembran ausreichend ist, um die Bildung eines Axons zu induzieren (Daniels et al., 1998, Rashid et al., 2001, Ng & Luo, 2004). Doch nicht nur am Wachstum, auch an der axonalen Wegfindung sind PAK-Proteine maßgeblich beteiligt. So ist DPAK1, zusammen mit dem *Drosophila* Nck-Homolog Dock und dem für RhoGTPasen spezifischen Guaninnukleotidaustauschfaktor (RhoGEF) Trio, für die korrekte Projektion sowohl der Axone der olfaktorischen Sinneszellen als auch der Photorezeptorzellen in *Drosophila* erforderlich. Das Fehlen dieses Komplexes führt zu massiven Defekten (Newsome et al., 2000, Hing et al., 2000, Ang et al., 2003). Eine Wirkung unterhalb des an der axonalen Wegfindung beteiligten Rezeptormoleküls Roundabout (Robo) ist für den Komplex aus DPAK1, Rac und Dock auch in der Entwicklung der Mittellinie des *Drosophila* Embryos gezeigt (Fan et al., 2003). Für PAK1 der Säuger wurde gezeigt, daß es, zusammen mit den kleinen GTPasen Rac und Cdc42, im Wachstumskegel des Axons an den Netrin-Rezeptor DCC rekrutiert wird und dort für die korrekte

Organisation des Aktinzytoskeletts sorgt (Shekarabi et al., 2005). Im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* sind zwei PAK-Moleküle, das PAK1-Homolog CePAK1 und das DPAK3-Homolog Max-2, an der Wegfindung der Motorneurone beteiligt, wobei beide Proteine teilweise Redundanz zeigen (Lucanic et al., 2006). Doch nicht nur das Wachstum von Axonen wird durch PAK-Proteine beeinflusst, sie sind auch in der Lage, zusammen mit Rac und Pix, die Bildung von dendritischen Strukturen und Synapsen anzuregen (Hayashi et al., 2002, Zhang et al., 2005). Die Anzahl der dendritischen Verzweigungen und der Dornen, aber auch ihre Größe und ihr Überleben sowie die Anzahl und Größe der Synapsen werden durch PAK1, aber auch durch PAK3, maßgeblich reguliert (Hayashi et al., 2007, Kreis et al., 2007, Chen et al., 2007). In *Drosophila* sind DPAK1, aber auch DPix und das Adapterprotein Dock an der Bildung der postsynaptischen Strukturen der neuromuskulären Endplatte beteiligt, eine Beteiligung an der Entwicklung der dendritischen Strukturen im CNS konnte bislang nicht gezeigt werden (Parnas et al., 2001, Albin et al., 2004). Es deutet vieles darauf hin, daß diese zahlreichen Effekte, die PAK-Proteine auf die Struktur der Postsynapse haben, der Grund für die durch Mutationen in PAK3 hervorgerufene mentale Retardation beim Menschen, aber auch für die Lernschwäche von PAK3-knockout Mäusen, sind (Meng et al., 2005, Boda et al., 2006). Weitere Studien deuten ferner darauf hin, daß durch β -Amyloid-Oligomere hervorgerufene Fehler in der Lokalisierung und Aktivierung von PAK zumindest für einen Teil der im Verlauf der Alzheimerschen Krankheit auftretenden synaptischen Defekte sind (Zhao et al., 2006, Ma et al., 2008).

1.4 Bisher bekannte Eigenschaften von DPAK3

Die bisherigen Arbeiten zu PAK-Proteinen in *Drosophila* konzentrierten sich auf DPAK1 und Mbt, wobei die Funktion dieser Proteine vornehmlich durch Phänotypenanalysen untersucht wurde. DPAK3 wurde erstmals während der Analyse der Genomsequenz von *Drosophila melanogaster* als zunächst nur vorhergesagtes Gen entdeckt, und so war zunächst nur die cDNS- und Proteinsequenz bekannt. Das *Dpak3* Gen kodiert ein 569 Aminosäuren langes Protein, das im Embryo ubiquitär exprimiert wird. Auf den ersten Blick besitzt es alle Merkmale einer p21-aktivierten Kinase, die N-terminale PBD und die C-terminale Kinasedomäne. Ferner ist es in der Lage, die Rho-GTPasen Rac1, Rac2 und Cdc42 zu binden (Mentzel & Raabe, 2005). Dies spricht zunächst für eine

Zuordnung zu den Gruppe 1 PAK Proteinen, zu denen auch DPAK1 oder humanes PAK1 gehören. Allerdings fehlt ein wichtiges Merkmal der Gruppe 1-PAKs, nämlich die circa 60 Aminosäuren lange Sequenz vor der PBD-Region, die die konservierten Bindungsstellen für die Adapterproteine Dock/Nck und Grb2/Drk enthält. Auch wenn die Sequenzhomologie von DPAK3 zu DPAK1 größer ist als die zu Mbt, dem einzigen Gruppe 2-PAK in *Drosophila*, so ist sie doch weit geringer als zwischen den "klassischen" Gruppe 1 PAKs, beispielsweise DPAK1 und HPAK1. Insgesamt läßt die Sequenzanalyse den Schluß zu, daß DPAK3 und seine Homologe aus anderen Insekten und *Caenorhabditis elegans* eine eigene Untergruppe der PAK-Proteine bilden.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieses Projektes sollte zunächst die Regulation von DPAK3 erforscht werden, auch um eine bessere Einordnung in die Familie der p21-aktivierten Kinasen zu ermöglichen. Daneben sollten Interaktionspartner gefunden und Effekte von DPAK3 auf das Zytoskelett untersucht werden. Weiterhin sollten die *in vivo*-Funktionen von DPAK3, besonders im zentralen Nervensystem und im optischen System von *Drosophila*, erforscht werden. Dies war sowohl durch die Herstellung von transgenen Fliegen zur Überexpression von DPAK3 als auch durch die Analyse von *Dpak3*-Mutanten zu bewerkstelligen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien in p.a.-Qualität wurden von Applichem, Roche, Roth und Sigma bezogen. Radiochemikalien ($\gamma^{32}\text{P}$ -Adenosintriphosphat) wurden von Amersham (GE Healthcare) geliefert.

2.1.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA Ligase und Phosphatasen wurden von New England Biolabs, Roche, Invitrogen und MBI bezogen.

Es wurden folgende DNA-Polymerasen für PCR-Reaktionen verwendet: Taq (New England Biolabs, Eppendorf), PfuTurbo (Stratagene) und Vent (New England Biolabs).

2.1.3 Puffer & Medien

Folgende Standardpuffer wurden nach Sambrook et al. 1989 hergestellt:

PBS, TE, TBE, TAE

Bakteriologische Medien (Sambrook et al. 1989): LB, 2YT, NZY+, SOB

Medien und Lösungen für die Zellkultur wurden von Gibco/Invitrogen und Biowest bezogen.

Eiablageplatten:

Apfelsaft	300 ml
Zucker (Saccharose)	33g
Agar-Agar	30g
H ₂ O	ad 1l

Injektionspuffer (1x):

Kaliumchlorid	5 mM
Natriumphosphat pH 6,8	0,1 mM

SDS-PAGE Trenngelbuffer (4x):

Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) pH 8,8	1,5 M
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,4 %

SDS-PAGE Sammelgelbuffer (4x):

Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) pH 6,8	0,5 M
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,4 %

SDS-PAGE Ladepuffer (5x):

Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) pH 6,8	125 mM
SDS (Natriumdodecylsulfat)	10 %
Glycerin	50 %
DTT (1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)	0,625 M
Bromphenolblau	0,05 %

SDS-PAGE Gellaufpuffer (5x):

Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) pH 8,3	125 mM
Glycin	1 M
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,5 %

Transferpuffer für Western-Blot (1x):

Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) pH 8,3	25 mM
Glycin	150 mM
Methanol	10 %

TBST für Western-Blot (10x):

Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) pH 8,3	100 mM
Natriumchlorid	1,5 M
Tween 20	0,5 %

Lysispuffer (Immunkopräzipitation, 1x):

Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) pH 7,5	25 mM
Natriumchlorid	150 mM
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	2 mM
EGTA (Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure)	2 mM
Glycerol	10 %
Nonidet P-40	0,1 %

PAK-Kinasepuffer (1x)

HEPES pH 7,6	20 mM
Magnesiumchlorid	20 mM
Dithiothreitol (DTT)	2 mM
β-Glycerolphosphat	10 mM
p-Nitrophenylphosphat	20 mM

Natriumorthovanadat 0,5 mM

Sörensen-Puffer

Kaliumdihydrogenphosphat 12,2 mM

Dinatriumhydrogenphosphat 81,8 mM

PLP Fixierlösung für Immunhistofluoreszenz

Paraformaldehyd 3,5 %

Lysin 75 mM

Natriumhydrogenphosphat-Puffer pH 6,8 30 mM

Natriumperjodat 20 mM

Fixierlösung 1 für Semidünnschnitte

Natriumcacodylatpuffer pH 7,3 84 mM

Osmiumtetroxid 1 %

Glutardialdehyd 2 %

Fixierlösung 2 für Semidünnschnitte

Natriumcacodylatpuffer pH 7,3 100 mM

Osmiumtetroxid 1 %

2.1.4. Proteaseinhibitoren

<i>Inhibitor</i>	<i>Arbeitskonzentration</i>
Antipain	5 µg/ml
Aprotinin	10 µg/ml
Leupeptin	0,5 µg/ml
Pepstatin A	0,7 µg/ml
PMSF	200 µg/ml
Roche complete® Tablette	1 Tablette / 50 ml Lysispuffer

2.1.5 Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>
Plasmid Mini/Midi-Prep Kits	Qiagen
Gelextraktions-Kit	Macherey-Nagel
MegaScript Transkriptions-Kit	Ambion
jetPEI Transfektionsreagenz	polyPlus / BioMol
DNEasy Tissue DNS-Extraktionskit	Qiagen

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>
ECL Detektionsreagenz	Amersham-Pharmacia

2.1.6 Oligonukleotid-Primer

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Zweck</i>
BTM-01	AAGAAAGAGAACGAGGTCTTCAAGC	Klon. variable Region Dpak3
BTM-02	TCTTCTCCTTGGAGCGGCGCA	Klon. variable Region Dpak3
BTM-03	TGCGCCGCTCCAAGGAGAAGA	Sequenzierung
BTM-07	ACTTGAATTCTATGTCAACCGGAAGGCC	Klonierung Mtl f. pcDNA3myc
BTM-08	ATGCTCGAGTTACATTATTAACACTTTCGCT GGC	Klonierung Mtl f. pcDNA3myc
BTM-11	GCTTGAAGACCTCGTTCTCTTTCTC	Sequenzierung
BTM-12	GTAGTCGTTGGTGACGTCACCGTCGAAAG ACC	Mutagenese Mtl G15V
BTM-13	GGTCTTCCGACGGTGACGTCACCAACGACT AC	Mutagenese Mtl G15V
D-Pak3-for	CCGGAATTCCATGAGCTTCACCAAGTGGTCC	Klon. dPak3 in pcDNA3myc
D-Pak3-for2	CCGGAATTCTGATGAGCTTCACCAAGTGGTC C	Klon. dPak3 in pcDNA3HA1
D-Pak3-rev	GCTCTAGAGCCTATACGTTGCGTCGGAGC	Klon. dPak3 in pcDNA3HA1
M-DPak3K322A-F	CGCAGGTGGCCGTCGCGACCATCGATATGA AGAACCAG	dPak3 Kinasetot K322A
M-DPak3K322A-R	CTGGTTCTTCATATCGATGGTCGCGACGGCC ACCTGCG	dPak3 Kinasetot K322A
M-DPak3T451A-F	CGCCAGACAATGGTGGGAGCGCCGTACTGG ATGGCG	dPak3 Kinasetot T451A
M-DPak3T451A-R	CGCCATCCAGTACGGCGCTCCCACCATTGT CTGGCG	dPak3 Kinasetot T451A
pcDNA3HA1>2F	GCTCGGATCCACTAGTGAACGGCCGCCAGT G	Mutagenese pcDNA3HA1 zu pcDNA3HA2
pcDNA3HA1>2R	CACTGGCGGCCGTTCACTAGTGGATCCGAG G	Mutagenese pcDNA3HA1 zu pcDNA3HA2
P-dPak3KD-F	CCAAGGAATTCCTACAAGACAACCCAGGAG GTG	Klon. dPak3 AA293-570 (Kinasedomäne) pcDNA3myc
P-dPak3RD-R	TGTTCTAGAGCGTTCCTTGGGTCATCTG	Klon. dPak3 AA1-292 (Reg.Domäne)
M-DPAK3-H19,21L-F	CAAACCTCCAACGGCTCTTCCTTGTCTCGCG CAACC	Mutagenese DPAK3 H19,21L
M-DPAK3-H19,21L-R	GTTTGAAGGTTGCCGAGAAGGAACAGAGCG CGTTGG	Mutagenese DPAK3 H19,21L
M-DPAK3-Y488-F	GAAGGCCAGCCACCCTACCTATACGAGACT CCA	Mutagenese D488Y in RE01659
M-DPAK3-Y488-R	TGGAGTCTCGTATAGGTAGGGTGGCTGGCC TTC	Mutagenese D488Y in RE01659

Name	Sequenz	Zweck
DPAK3-Resc1-for	AAAGGTACCGAGGATGTTTGGCTGTAATGGA CA	Klonierung Genomisches Rescue DPAK3
DPAK3-Resc1-rev	CGAACAAATTGTGTGCTCGACCTCA	Klonierung Genomisches Rescue DPAK3
DPAK3-Resc2-for	CATTAAAGTGGTTCTTGCAGTTGGGAA	Klonierung Genomisches Rescue DPAK3
DPAK3-Resc2-rev	GATCTAGAATTGGAGCTCGGCACTTTTGCAT	Klonierung Genomisches Rescue DPAK3
DPAK1-Eco-For	AAGGAATTCATGTCCAGCGAGGAAGA	Klonierung DPAK1 aus LD20767
DPAK1-Xba-Rev	GTTCTAGATCAGTTGCCCTTGGTAGC	Klonierung DPAK1 aus LD20767
Exel-XP-5'-in	AATGATTCGCAGTGGAAAGGCT	Kartierung Df(3R)Exel9055
Exel-XP-5'-out	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG	Kartierung Df(3R)Exel9055
Exel-RB-3'-in	TGCATTTGCCTTTTCGCCTTAT	Kartierung Df(3R)Exel9055
Exel-RB-3'-out	CCTCGATATACAGACCGATAAAAC	Kartierung Df(3R)Exel9055
ORF-DPAK3-5'-out	CTTCTTGAACCACTTGGTGAAGCTCAT	Verifikation Df(3R)BTM1
ORF-DPAK3-3'-out	GAAGGTGCTCCGACGCAACGTATAG	Verifikation Df(3R)BTM1
M-5'-Nsi-for	AGCCGCTGGAAAATGCATAGCTTCACCAAGT GG	Mutagenese Nsi-Site am ATG von DPAK3
M-5'-Nsi-REV	CCACTTGGTGAAGCTATGCATTTTCCAGCGG CT	Mutagenese Nsi-Site am ATG von DPAK3
M-3'-Xho-for	CTCCGACGCAACGTACTCGAGTAGTTGCTAT GCAATCAC	Mutagenese Xho-Site am TAG von DPAK3
M-3'-Xho-rev	GTGATTGCATAGCAACTACTCGAGTACGTTG CGTCGGAG	Mutagenese Xho-Site am TAG von DPAK3
HA-Xho-for	TCGAGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTA CGCTC	HA-Tag für C-Terminus in DPAK3
HA-Xho-rev	TCGAGAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT AAGCC	HA-Tag für C-Terminus in DPAK3
DPAK3-T7-For	TAATACGACTCACTATAGGGATGAGCTTCAC CAAGTGGTCCA	RNAi DPAK3 in S2R Zellen
DPAK3-T7-Rev	TAATACGACTCACTATAGGGATCCGCTCCAG CATCCTGGGC	RNAi DPAK3 in S2R Zellen
GFP-T7-for	TAATACGACTCACTATAGGGCGCCACCATGG TGAGCAAGGG	RNAi GFP (Kontrolle) in S2R Zellen
GFP-T7-rev	TAATACGACTCACTATAGGGTTGTACAGCTC GTCCATGCCGAG	RNAi GFP (Kontrolle) in S2R Zellen
S-DPAK1-500f	TTCATCGCTCAGCCGCGT	Sequenzierung DPAK1
S-DPAK1-1000f	GGACGCCAGGCGGAATAT	Sequenzierung DPAK1
S-DPAK1-1500f	CCTCGTGTCTGAGGAACTG	Sequenzierung DPAK1
PLAC4	ACT GTG CGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT	Verifikation Df(3R)BTM1
PLAC1	CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT	Verifikation Df(3R)BTM1
PRY4	CAA TCA TAT CGC TGT CTC ACT CA	Verifikation Df(3R)BTM1
PRY1	CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT	Verifikation Df(3R)BTM1

2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper:

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Blockreagenz</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
α-HA 12CA5	Maus	3 % BSA	1:1000	Western Blot,	Roche
		1 % Ziegen Serum	1:100	Immunfluoreszenz	
α-HA F-7	Maus	-	1:50	Immunkopräzipitation	Santa Cruz
		5 % Milchpulver	1:1000	Western Blot	
α-Myc 9E10	Maus	5 % Milchpulver	1:2500	Western-Blot	Santa Cruz
		-	1:50	Immunkopräzipitation	
α-DPAK3-PBD	Meerschweinchen	5 % Milchpulver	1:100	Western-Blot	R. Schulte, Diplomarbeit
		-	1:15	Immunkopräzipitation	
α-CK2β	Kaninchen				Jauch et al., 2006
α-Tubulin DM1A	Maus	1 % Ziegen Serum	1:250	Immunfluoreszenz	Sigma
α-Myc-FITC	Maus	1 % Ziegen Serum	1:25	Immunfluoreszenz	Santa Cruz

Sekundäre Antikörper:

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Blockreagenz</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
α-Kaninchen-HRP	Esel	-	1:5000	Western Blot	Amersham
α-Maus-HRP	Esel	-	1:1500	Western Blot	Amersham
α-Meerschweinchen-HRP	Ziege	-	1:5000	Western Blot	Dianova
α-Kaninchen-Cy3	Ziege	-	1:250	Immunfluoreszenz	Dianova
α-Maus-Cy3	Ziege	-	1:250	Immunfluoreszenz	Dianova
α-Maus-Alexa488	Ziege	-	1:200 - 1:250	Immunfluoreszenz	Molecular Probes

2.1.8 Plasmide

<i>Nummer</i>	<i>Insert</i>	<i>Vektor</i>	<i>Kloniert mit (5'-3')</i>	<i>Referenz</i>
pBTM9	Mtl aus pBTM5	pcDNA3-myc	EcoR I – Xho I	Diplomarbeit (Mentzel 2003)
pBTM13	Mtl G15V	pcDNA3-myc	EcoRI / XhoI	Diplomarbeit
pBTM16	DmRac1 T17N (dom. neg.)	pcDNA3-myc	Mutagenese pDB33	Diplomarbeit
pBTM17	DmCdc42 T17N (dom. neg.)	pcDNA3-myc	Mutagenese pDB31	Diplomarbeit
pBTM27	DPAK3 reg. Domäne	pcDNA3 HA1->2	EcoR I – Xba I	Diplomarbeit
pBTM28	DPAK3 reg. Domäne	pcDNA3-myc	EcoR I – Xba I	Diplomarbeit

Nummer	Insert	Vektor	Kloniert mit (5'-3')	Referenz
pBTM32	DPAK3 WT Y488 (korrigierte KD, alle DPAK3-Konstrukte ab pBTM32)	pPCRScripT	Mutagenese	Diese Arbeit
pBTM33	DPAK3 WT	pcDNA3 HA1->2	EcoR I – Xba I	Diese Arbeit
pBTM38	DPAK3 R445L, T447E	pcDNA3 HA1->2	EcoR I – Xba I	Diese Arbeit
pBTM39	DPAK3 K322A	pcDNA3 HA1->2	EcoR I – Xba I	Diese Arbeit
pBTM40	DPAK3 H19,21L	pcDNA3 HA1->2	EcoR I – Xba I	Diese Arbeit
pBTM44	DPAK3 Kinasedomäne	pcDNA3 HA1>2	EcoR I – Xba I	Diese Arbeit
pBTM45	DPAK3 WT (korr. KD)	pcDNA3-myc	EcoR I – Xba I	Diese Arbeit
pBTM49	DPAK3 H19,21L	pcDNA3-Myc	EcoR I – Xba I	Diese Arbeit
pBTM50	Myc-DPAK3 WT	pUAST	Asp718 – Xba I	Diese Arbeit
pBTM51	Myc-DPAK3 H19,21L	pUAST	Asp718 – Xba I	Diese Arbeit
pBTM52	Myc-DPAK3 K322A	pUAST	Asp718 – Xba I	Diese Arbeit
pBTM54	DmRac1	pcDNA3-HA1>2	EcoR I – Xho I	Diese Arbeit
pBTM55	DmRac1 G12V	pcDNA3-HA1>2	EcoR I – Xho I	Diese Arbeit
pBTM56	DmRac1 T17N	pcDNA3-HA1>2	EcoR I – Xho I	Diese Arbeit
pBTM57	DPAK1 T340A (ORF f. HA2)	pBSK	EcoR I – Xba I	Diese Arbeit
pBTM58	Fragment aus BACR01H23 für genomisches Rettungskonstrukt	pBSK	Asp718 – Not I	Diese Arbeit
pBTM59	DPAK1 T340A aus pBTM57	pcDNA3-Myc	EcoR I – Not I	Diese Arbeit
pBTM60	DPAK3-DE	pcDNA3-Myc	EcoR I – Xba I	Diese Arbeit
pBTM62	DPAK1 WT	pcDNA3-Myc	Mutagenese pBTM59	Diese Arbeit
pBTM63	DPAK3 K322A	pcDNA3-Myc	EcoR I – Xba I	Diese Arbeit
pHW21	DmCKIIβ VIIa	pcDNA3 HA1	BamHI - EcoRI	Jauch et al., 2006
J099	DmCKIIβ C109,114S	pcDNA3 HA1	Mutagenese	E. Jauch
J100	DmCKIIβ C137,140S	pcDNA3 HA1	Mutagenese	E. Jauch
J103	DmCKIIβ S2,3,4A	pcDNA3 HA1	Mutagenese	E. Jauch
pHW44	DmCKIIβ S2,3,4E	pcDNA3 HA1	Mutagenese	E. Jauch
pHW13	DmCKIIβ D55A,E57A	pcDNA3 HA1	Mutagenese	E. Jauch
pHW16	DmCKIIβ D60A,E61,63A	pcDNA3 HA1	Mutagenese	E. Jauch
pDP12	DmCKIIβ VIIb	pcDNA3 HA1	BamHI - EcoRI	Jauch et al., 2006

Nummer	Insert	Vektor	Kloniert mit (5'-3')	Referenz
pDP13	DmCKII β VIIc	pcDNA3 HA1	BamHI - EcoRI	Jauch et al., 2006
pDP14	DmCKII β VIId	pcDNA3 HA1	BamHI - EcoRI	Jauch et al., 2006
pDP15	DmCKII β VIId - VI	pcDNA3 HA1	BamHI - EcoRI	Jauch et al., 2006
pHW32	DmCKII β '	pcDNA3 HA1	BamHI - XhoI	
pHW31	DmCKII β testes	pcDNA3 HA1	BamHI - XhoI	
J040	DmCKII α	pcDNA3 Myc	EcoRI – XhoI	Jauch et al., 2006

2.1.9 Verwendete Fliegenlinien

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft / Referenz
BL5253	y[1] w[*]; P{w[+m*]=GAL4-ey.H}3-8, P{w[+mC]=UAS-FLP1.D}JD1; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B P{w[+mC]=GMR-hid}SS4, I(3)CL-R[1]/TM2	Bloomington 03/05, Stowers & Schwarz, 1999
MARCM 3R	P{hsFLP}1, y[1] w[1118], P{UAS-mCD8::GFP.L}; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B, P{tubP-GAL80}/TM3, Sb; P{GawB}OK107	Lee & Luo, 1999
BL2050	w[1118]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B P{w[+t*] ry[+t*]=white-un1}90E	Bloomington Stock Center
Actin-Gal4	w; act:Gal4 / CyO	T. Raabe
Tubulin-Gal4	w; P{tubP-Gal4}32 / TM3, SB, e	T. Raabe
w; TM3/TM6	w; TM3, Sb, e / TM6B, Hu, Tb, e	Bloomington Stock Center
FM7a; TM2/TM6	FM7a, y w[a] B / Dp(1;Y)y[+]; TM2,Ubx, e/TM6C, Sb[1], e	Diese Arbeit
w; CyO/Sco	w; CyO / noc[Sco]	Bloomington Stock Center
w; CyO/Sco; MKRS/TM6	w[1118]/Dp(1;Y)y[+]; CyO/nub[1] b[1] noc[Sco] lt[1] stw[3]; MKRS/TM6B, Tb[1]	Bloomington Stock Center
BL13661	y[1]; ry[506] P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}KG00430	Bloomington, 01/03
DPAK3P1	yw; P{Mae-UAS.6.11, y+}Dpak307369.1	U. Schäfer, 12/02
NP4472	w[1118]; P{GawB}NP4472-5-1	RIKEN / GETDB 03/05
Pak3EP1191	w[1118]; P{EP}Pak3[EP1191]	Szeged 04/05
BL7986	w[1118];Df(3R)Exel9055, P+PBac{XP5.RB3}Exel9055/TM6B, Tb	Bloomington, 04/04
CB-6089-3	w; P{RS3}CB-6089-3 / TM6C, Sb	Szeged 10 / 07
CB-5374-3	w; P{RS3}CB-5374-3/ TM6C, Sb	Szeged 10 / 07
CB-0469-3	w; P{RS3}CB-0469-3 / TM6C, Sb	Szeged 10 / 07
BL 9123	y[d2] w[1118] P{ry[+t7.2]=ey-FLP.N}2 P{GMR-lacZ.C(38.1)}TPN1; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B Pak[14]/TM6B, P{y[+t7.7] ry[+t7.2]=Car20y}TPN1, Tb[1]	Bloomington Stock Center
FRT, Exel9055	w[1118]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B,Df(3R)Exel9055, P+PBac{XP5.RB3}Exel9055/MKRS	Diese Arbeit

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft / Referenz
FRT, NP4472/TM3	w[1118]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B, P{w[+mW.hs]=GawB}pak3[NP4472]/TM3, Sb	Diese Arbeit
Df(3R)BTM1	w[1118]; Df(3R)BTM1, P{RS3}BTM1 / TM6, Hu, Tb	Diese Arbeit
d02472	w[1118];P{RB}d02472/TM6B, Tb	Exelixis Stock Collection
e00329	w[1118];PBac{XP}e00329/TM6B, Tb	Exelixis Stock Collection
FRT, e00329	w[1118]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B, PBac{XP}e00329/TM3, Sb	Diese Arbeit
Dpak1/NP4472	w[1118]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B, Dpak1[14], P{w[+mW.hs]=GawB}pak3[NP4472]/TM3, Sb	Diese Arbeit
Dpak1/e00329	w[1118]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B, Dpak1[14], PBac{XP}e00329/TM3, Sb	Diese Arbeit
UAS-DPAK3 WT	w[1118]; P{w+, UAS:Myc-DPAK3} Linien 1-11	Diese Arbeit
Rescue WT 2	w[1118]; P{pW8, w+, Rescue DPAK3} (II)	Diese Arbeit
Rescue WT 1	w[1118]; P{pW8, w+, Rescue DPAK3} / TM3, Sb	Diese Arbeit
Rescue HA 1M, 3F, 4F	yw P{pW8, w+, Rescue HA-DPAK3} (X)	Diese Arbeit

2.2 Methoden

2.2.1 Plasmidkonstruktion

Restriktionsverdau, Agarose-Gelelektrophorese, Ligationen und Transformationen wurden nach Sambrook et al., 1989 durchgeführt.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit den folgenden Standardbedingungen durchgeführt, die jedoch wenn erforderlich für jede Reaktion angepaßt wurden.

Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge
10x Puffer	5µl
Primer 1	30 - 50 pMol
Primer 2	30 - 50 pMol
Templat	30 - 100 ng Plasmid oder 5 µg Genom. DNA
dNTP-Mix	10 - 20 nMol
H ₂ O	auf 50 µl

Standard-Programm:

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
94 °C	2 min.	1
94°C	20 sec.	25 - 30
T _m + 5 °C	20 sec.	
72 °C	1 min / kb DNA	
72 °C	10 min	1

2.2.3 Zellkultur

Zur Überexpression von Proteinen in einem heterologen, eukaryotischem System wurden HEK293 (humane embryonale Nierenzellen) und NIH3T3 (Maus-Fibroblasten) verwendet. Diese Säugerzelllinien wurden bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid in Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) kultiviert. Das Medium wurde mit 10 % fötalem Kälberserum, Glutamin, Penicillin (1 U/ml) und Streptomycin (1 U/ml) supplementiert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert um stets eine optimale, subkonfluente Zelldichte zu gewährleisten.

Die Drosophila-Zelllinien S2 und S2R+ wurden in Schneider's Medium (Biowest) kultiviert, dem ebenso 10 % Serum und die beiden Antibiotika zugesetzt wurden. Diese Zellen wurden bei 25 °C ohne CO₂-Begasung kultiviert.

2.2.4 Immunkopräzipitation überexprimierter Proteine aus HEK293 Zellen

Für die Transfektion wurden ca. 1×10^6 Zellen auf einer Zellkulturplatte ausgesät und 24 h später transfiziert, wobei die DNA-Mengen der verschiedenen Expressionsvektoren so gewählt wurden, daß eine möglichst gleichmäßige Expression aller Proteine erzielt wurde. Die Transfektionen wurden mit JetPEI (PolyPlus Transfections) oder Polyfect (Quiagen) jeweils nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und mit 400 µl Lysispuffer IP bei 4 °C auf dem Nutator 45 Min. lysiert. Handelte es sich bei einem der beteiligten Proteine um CKIIβ, wurden die Zellen zuvor für 5 Stunden mit dem Proteasomeninhibitor MG132 inkubiert, um eine ausreichend hohe Expression dieses Proteins sicherzustellen. Zellmembranen, Kerne und andere unlösliche Bestandteile wurden durch 30 minütige Zentrifugation bei 16.100 g und 2 °C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und der Proteingehalt bestimmt. Von jedem Versuchsansatz wurde eine 40 µg

Gesamtprotein entsprechende Lysatmenge abgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und als Expressionskontrolle für die Elektrophorese aufbewahrt. Für die Immunpräzipitation wurde das Lysat mit ca. 1 µg Antikörper (anti-HA oder anti-Myc) 20' bei 4 °C rotiert, anschließend wurden 25 µl Protein-G-Agarosesuspension zugegeben und je nach zu untersuchenden Proteinen 2 – 16 Stunden inkubiert. Die an die Protein-G-Agarose gebundenen Proteinkomplexe wurden anschließend durch dreimaliges Abzentrifugieren und Waschen mit Lysispuffer gereinigt, mit Probenpuffer versetzt und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit geeigneten Erst- und Zweitantikörpern durch Chemolumineszenz nachgewiesen.

2.2.5 Nachweis der Kinaseaktivität *in vitro*

HEK293 Zellen wurden wie oben beschrieben ausgesät und transfiziert, wurden allerdings vor dem Ernten 24 h in Hungermedium (DMEM mit 0,3 % FKS) kultiviert, um endogene Signalkaskaden soweit wie möglich zu inaktivieren. Die Proteinkomplexe wurden mit jeweils gegen die Kinase gerichteten Antikörpern präzipitiert wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Anschließend wurde zweimal mit Lysispuffer IP, einmal mit 0,5 M Natriumchloridlösung und zweimal mit Kinasepuffer gewaschen. Die an die Agaroseperlen gebundenen Proteinkomplexe wurden anschließend für 30 Minuten bei 30 °C in Kinasepuffer mit 5 µCi [γ-³²P]-ATP und 5 µg MBP (myelin basic protein) als Substrat inkubiert. Die Proteine wurden anschließend durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und die Phosphorylierung durch Autoradiographie nachgewiesen.

2.2.6 Immunfluoreszenz

Zellen (NIH3T3 oder S2R+) wurden subkonfluent auf Deckgläschen ausgesät und, sofern überexprimierte Proteine untersucht werden sollten, am nächsten Tag transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen um Reste des Mediums zu entfernen und anschließend für 20' bei 4 °C mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Das Fixativ wurde durch dreimaliges Waschen á 5' mit PBS entfernt. Die Zellen wurden danach durch fünf-minütige Inkubation mit 0,2 % Triton X100 in PBS permeabilisiert und daraufhin wiederum gewaschen. Im Anschluß daran wurden die Zellen 1 – 3 Stunden mit den in PBS mit 1 % Normalziegenserum verdünnten Primärantikörpern (siehe Tabelle) inkubiert und wiederum dreimal 10

Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die in PBS verdünnten, fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper zugegeben und 45 - 90 Minuten inkubiert. Filamentöses Aktin wurde durch Phalloidin-Tetramethylrhodaminisothiocyanat (Phalloidin-TRITC), DNA durch Hoechst Färbelösung (DAPI) nachgewiesen. Nach nochmaligem Waschen wurden die Präparate in Mowiol eingedeckelt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.7 RNA-Interferenz in S2R+ Zellen

Anders als aus Säugern isolierte Zelllinien, die für RNA-Interferenzexperimente mit kurzen (20 - 22 Basenpaare), doppelsträngigen siRNAs und speziellen Reagenzien transfiziert werden müssen, sind kultivierte Drosophila-Zellen in der Lage, mehrere hundert Basenpaare lange doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNAs) ohne weitere Zusätze aus dem Medium aufzunehmen.

Zur Herstellung der doppelsträngigen RNA mußte zunächst ein geeignetes Templat erzeugt werden. Hierzu wurde durch Polymerasekettenreaktion ein Teil der Dpak3 – cDNA amplifiziert, wobei beide verwendeten Oligonukleotide jeweils an ihrem 5'-Ende die Promotorsequenz für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 enthielten. Dieses DNA-Molekül konnte anschließend als Templat für die mit dem MegaScript-Kit (Ambion) durchgeführte Transkriptionsreaktion eingesetzt werden, wobei durch die T7 Promotoren an den 5' Enden beider DNA-Stränge die dsRNA in einem Schritt erzeugt werden konnte. Zur Durchführung der RNA-Interferenzexperimente wurden 1×10^6 S2R+ Zellen in 1 ml serumfreien Medium ausgesät, welchem dsRNA in einer Konzentration von 30 µg/ml zugesetzt wurde. Nach dreißigminütiger Inkubation wurden 3 ml serumhaltiges Medium zugegeben. Nach dreitägigem Wachstum wurden die Zellen geerntet und entweder für Immunfluoreszenzexperimente auf Deckgläschen ausgesät oder zum Proteinnachweis lysiert.

2.2.8 Sequenzanalyse

Aminosäure- und DNA-Sequenzen der p21-aktivierte Kinasen von *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura*, *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus laevis*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera* wurden von Genbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) heruntergeladen.

Die Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalW des European Bioinformatics Institute (<http://ebi.ac.uk/clustalw>) analysiert und der phylogenetische Baum wurde mit

TreeView erstellt.

2.2.9 Keimbahntransformation von *Drosophila*

Für die Keimbahntransformation wurden 20 µg des zu injizierenden Konstruktes mit 10 µg pUCh π Δ 2-3 präzipitiert und anschließend in 40 µl Injektionspuffer gelöst. Die zu injizierenden, maximal 30 Minuten alten w¹¹¹⁸ Embryonen wurden von den Eiablageplatten in einen mit Gaze ausgelegten Büchnertrichter überführt und mehrfach gewaschen, um anhaftende Hefe und Agar zu entfernen. Anschließend wurde für 90 Sek. mit 7 % Natriumhypochloritlösung dechorionisiert und wiederum mit Leitungswasser gewaschen. Die Eier wurden daraufhin unter dem Stereomikroskop auf einem linierten Membranfilter aufgereiht, auf einen mit Heptankleber bestrichenen Objektträger überführt, 30 ' über Silikatgel getrocknet und mit Injektionsöl überschichtet. Die DNA wurde durch eine Glaskapillare in den posterioren Pol von Embryonen im nichtzellulären Blastodermstadium injiziert, und diese 48 Stunden bis zum Schlüpfen der Larven in einer Feuchtekammer bei 18 °C gehalten. Die Larven wurden in Gläser mit Futterbrei überführt und entwickelten sich bei 25 °C zu adulten Fliegen. Diese wurden mit w¹¹¹⁸ Fliegen gekreuzt und die an den roten Augen zu erkennenden Nachkommen wiederum mit w¹¹¹⁸ zurückgekreuzt. Durch Kreuzung mit Balancerstämmen (w; CyO/Sco und w; TM3/TM6) wurden die autosomalen Insertionen balanciert und stabile Linien etabliert.

2.2.10 DNS-Präparation aus Fliegen (nach Parks et al., 2004)

Mit einem Mikro-Pistill wurden 5 Fliegen in einem Reaktionsgefäß mit 100 µl Puffer A homogenisiert und anschließend 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 3 M Kaliumacetatlösung zugegeben, das ganze 10 Minuten auf Eis gestellt und 20 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. Ungefähr 150 µl des Überstandes wurden daraufhin in ein neues Gefäß überführt und die DNS mit 90 µl 2-Propanol präzipitiert. Nach erneuter zehnminütiger Inkubation im Eisbad wurde bei 4 °C und 2000 x g erneut 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die DNS mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, nochmals 5 Minuten zentrifugiert der Alkohol entfernt und das Pellet getrocknet. Zuletzt wurden 100 µl TE-Puffer zugegeben, die DNS 15 Minuten bei 65 °C im Thermoschüttler gelöst und anschließend direkt für die PCR verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

2.2.11 Immunhistofluoreszenz

Gehirne adulter Fliegen wurden in PBS präpariert und anschließend 90 Minuten in PLP auf Eis fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS + 0,3 % Triton X100 (PBTx) wurden die Gehirne 3 Stunden in PBT mit 1 % Ziegennormalserum (NGS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen des Sekundärantikörpers zu blockieren. Anschließend wurden sie über Nacht bei 4 °C mit in Blockierlösung verdünntem Primärantikörper auf einem Schwenktisch gelagert. Danach wurden die Gehirne für mindestens 3 x 30 Minuten in jeweils frischem PBT gewaschen und anschließend 3 Stunden mit in PBT verdünntem fluorochromgekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Um das Ausmaß der unspezifischen Hintergrundfärbung möglichst gering zu halten wurde anschließend mindestens 24 Stunden unter mehrmaligem Wechseln der Waschlösung in PBT gewaschen. Die Färbungen wurden an einem konfokalen Mikroskop analysiert und Reihen optischer Schnitte aufgezeichnet. Aus diesen wurde mit dem Programm Amira 4.0 (Mercury / Visage Imaging) 3D-Rekonstruktionen erstellt.

2.2.12 Fixierung von Fliegen für die Rasterelektronenmikroskopie

Fliegen wurden getötet und in eine mit Sörensen-Puffer mit 6,25 % Glutardialdehyd gefüllte 50 ml Injektionsspritze überführt. In dieser wurde ein Vakuum erzeugt, um die Luftsäcke und Tracheen zu entleeren. Anschließend wurden die Fliegen über Nacht bei 4 °C fixiert. Danach wurden sie fünfmal mit Sörensen-Puffer gewaschen. Daran schloß sich die Entwässerung in einer aufsteigenden Acetonreihe (30 %, 50 %, 75 %, 90 %) an, zuletzt wurden die Fliegen fünfmal dreißig Minuten in 100 % Aceton inkubiert, in welchem sie dann gelagert wurden.

2.2.13 Semidünnschnitte der Komplexaugen von *Drosophila*

Die zu untersuchenden Fliegen wurden getötet, mit einer Minutie rücklings fixiert, mit PBS bedeckt und anschließend die Mundwerkzeuge und die sich darüber befindenden Luftsäcke entfernt. Die Köpfe wurden abgetrennt und anschließend 30 Minuten in Fixierlösung 1 und nochmal 2 Stunden in Fixierlösung 2 auf Eis fixiert. Daraufhin wurde mehrmals mit 0,2 M Natriumcacodylat gewaschen und die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 10 Minuten 50 % / 70 % / 90 % / 96 % / 100 % / 100 %) entwässert. Daraufhin wurden die Köpfe zweimal 20 Minuten in 1,2-Epoxypropan und über Nacht in einem 1:1 Gemisch aus 1,2-Epoxypropan und EPON-Einschlusmittel

inkubiert. Danach wurden sie in vorbereiteten Förmchen in EPON eingebettet und der Kunststoff 3 Tage bei 60 °C ausgehärtet. Danach wurden die Präparate mit zugetrimmt und mit Hilfe eines Mikrotoms 1 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf einen Objektträger transferiert und 5-10 Minuten in der Färbelösung (1 % Toluidinblau, 1 % Natriumtetraborat) gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Präparate mit DePex eingebettet und am Phasenkontrastmikroskop ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Regulation von DPAK3 durch RhoGTPasen und Einfluß auf das Aktin-Zytoskelett

3.1.1 DPAK3 interagiert präferentiell mit Rac1 und Rac2

DPAK3 und die seine Homologen unterscheiden sich in ihrer Sequenz deutlich von den "klassischen" Gruppe 1 und Gruppe 2 PAK-Proteinen. Sie besitzen wie alle p21-aktivierten Kinasen eine N-terminale p21-Bindungsdomäne und die C-terminale Kinasedomäne. Die PBD weicht allerdings etwas von der Konsensus-Sequenz ISxPxxFxFxHxxHVG der anderen PAKs ab (Abb. 3, Burbelo et al., 1995). Am auffälligsten ist, daß die beiden für die Bindung der RhoGTPasen unbedingt erforderlichen Histidine in DPAK3 nur durch eine statt durch zwei Aminosäuren getrennt sind (Sells et al., 1997, Zhao et al., 1998). Ferner findet man in den anderen Gruppe 1 PAKs an Position 2 der CRIB ein Serin und an letzter Stelle ein Glycin, bei DPAK3 sind die Positionen dieser Aminosäuren vertauscht. Daran schließt sich in den Gruppe 1 PAK-Proteinen die autoinhibitorische Domäne an, und auch in diesem Bereich sind viele Aminosäuren zwischen DPAK3 und humanem PAK1 konserviert.

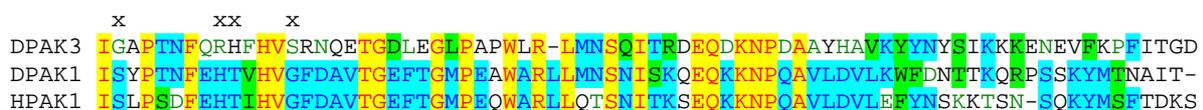


Abb. 3: Sequenzvergleich der p21-Bindungsdomänen und Autoinhibitorischen Domänen von DPAK1 (Aminosäuren 83-157), DPAK3 (20-94) und humanem PAK1 (HPAK1, 75-149). In allen Proteinen konservierte Aminosäuren sind rot auf gelbem Hintergrund dargestellt, blau hinterlegte Aminosäuren sind in 2 der 3 Sequenzen konserviert und grün kennzeichnet die Substitution durch eine ähnliche Aminosäure. Die von der Konsensussequenz für die CRIB-Domäne (ISxPxxFxFxHxxHVG) abweichenden Aminosäuren in DPAK3 sind durch „x“ über der Sequenz gekennzeichnet.

Es konnte bereits gezeigt werden, daß DPAK3 mit RhoGTPasen interagiert, allerdings waren die Ergebnisse aufgrund methodischer Probleme nicht eindeutig (B. Mentzel, Diplomarbeit). Die Interaktion mit verschiedenen RhoGTPasen ist ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Gruppen der p21-aktivierten Kinasen:

Gruppe 1 PAK-Proteine wie DPAK1 oder die PAK1, 2 & 3 der Säuger interagieren mit den GTPasen Rac und Cdc42 Gruppe (Manser et al., 1994, Bagrodia, 1995, Harden et al., 1996). Die Gruppe 2 PAK-Proteine wie Mbt oder PAK4, 5 & 6 binden dagegen bevorzugt Cdc42, mit Rac-ähnlichen GTPasen interagieren sie nicht oder nur schwach (Abo et al., 1998, Lee et al., 2002, Pandey et al., 2002, Schneeberger und Raabe, 2003). Das *Drosophila*-Genom kodiert für sechs Rho-GTPasen: Cdc42, Rac1, Rac2, Mtl, Rho-A und Rho-L.

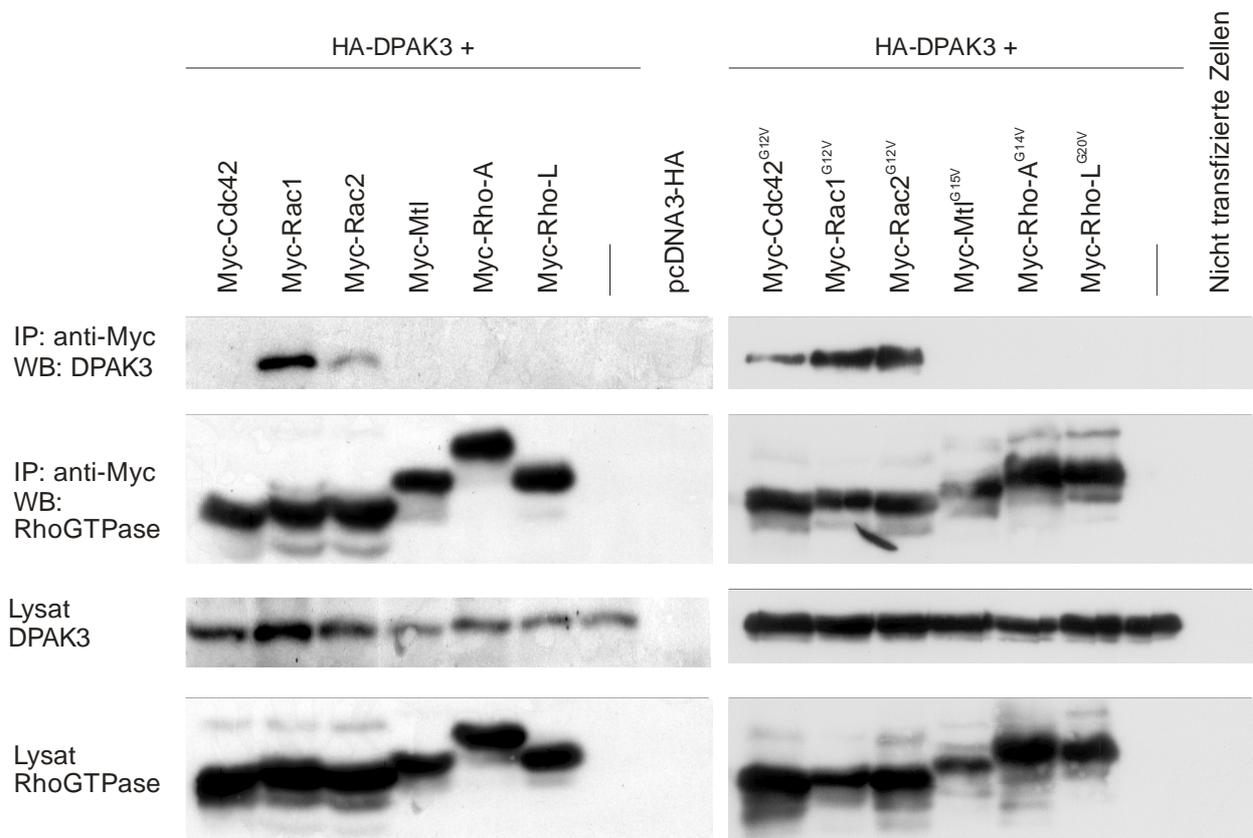


Abb. 4: Interaktion von DPAK3 mit Rho-GTPasen. HEK293-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für HA-DPAK3 und jeweils eine RhoGTPase (wildtypisch oder aktiviert) kotransfiziert. Als Kontrollen wurde nicht transfizierte Zellen und solche, die nur mit HA-DPAK3 oder leerem pcDNA3-HA Vektor transfiziert waren, verwendet. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert und die RhoGTPasen mit anti-Myc Antikörper präzipitiert. Die so isolierten Immunkomplexe wurden, zusammen mit den Lysatproben, durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und DPAK3 und die Rho-GTPasen mit anti-Myc und anti-HA Antikörpern nachgewiesen.

Um die Interaktion von DPAK3 mit diesen kleinen G-Proteinen zu testen, wurden humane HEK293-Zellen mit Expressionsvektoren für HA-DPAK3 und je eine, mit einem 6xMyc-Epitop versehene, RhoGTPase kotransfiziert. Neben den wildtypischen

RhoGTPasen wurden auch Konstrukte verwendet, die die Expression einer konstitutiv aktiven GTPase ermöglichen. In diesen Mutanten ist, analog der aktivierenden Substitution Glycin zu Valin an Position 12 in der GTPase Ras, ein konserviertes Glycin durch ein Valin ersetzt. Hierdurch geht die Fähigkeit der GTPase, GTP in GDP und Phosphat zu hydrolysieren verloren und sie liegt so immer in GTP-gebundener, aktiver Form vor (Geis et al., 1986). Aus den so transfizierten Zellen wurden mit anti-Myc Antikörper die RhoGTPasen präzipitiert, und auf dem Western Blot kopräzipitiertes DPAK3 nachgewiesen (Abb. 4). DPAK3 bindet gleich stark an Rac1^{G12V} und Rac2^{G12V}, bei den wildtypischen GTPasen ist die Interaktion mit Rac1 deutlich stärker als die mit Rac2. Wildtypisches Cdc42 ist nicht in der Lage, DPAK3 zu kopräzipitieren, lediglich die aktivierte Variante zeigt eine Interaktion. Diese ist jedoch deutlich schwächer als die Interaktion mit Rac1 oder Rac2. Mtl wird aufgrund seiner Sequenz und funktioneller Gemeinsamkeiten, zu den Rac-GTPasen gerechnet, ist allerdings nicht in der Lage, DPAK3 zu binden. Wie zu erwarten, zeigt DPAK3 keine Interaktion mit wildtypischem oder aktiviertem Rho-A und Rho-L.

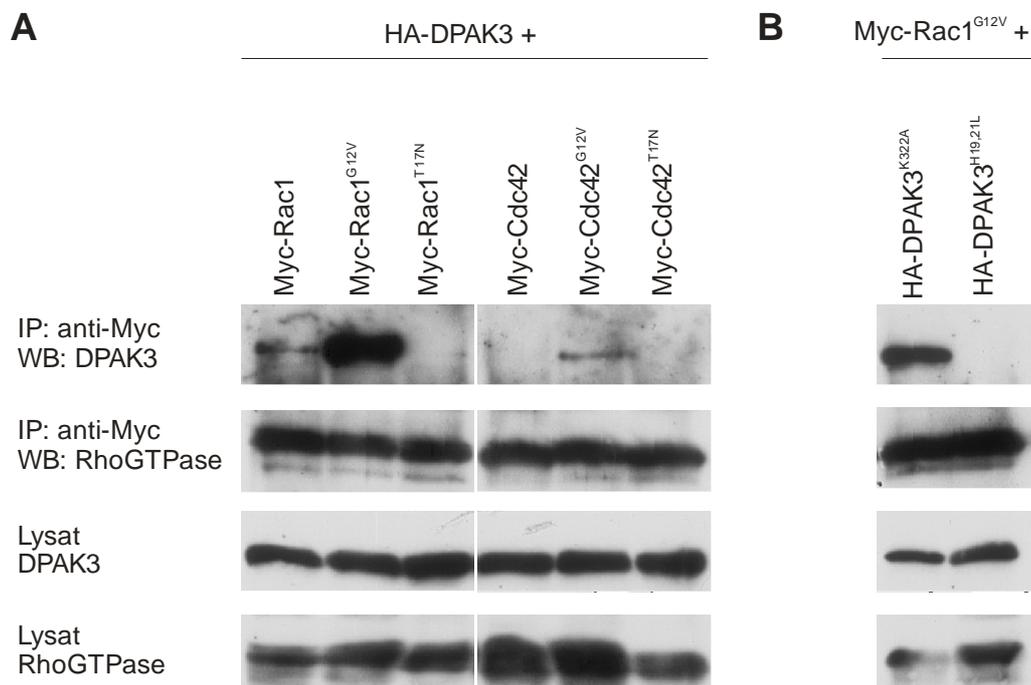


Abb. 5: DPAK3 interagiert nur mit GTP-gebundenen, nicht aber mit GDP-gebundenen GTPasen. (A) HEK293-Zellen wurden mit HA-DPAK3 und wildtypischem, aktiviertem (G12V) und dominant-negativem (T17N) Myc-Rac1 oder Myc-Cdc42 kotransfiziert. Die GTPase wurde mit anti-Myc Antikörper präzipitiert und gebundenes DPAK3 auf dem Western-Blot mit anti-HA Antikörper nachgewiesen. (B) Um die Interaktion von HA-DPAK3^{K322A} und HA-DPAK3^{H19,21L} mit Rho-GTPasen zu testen, wurden beide Mutanten zusammen mit Rac1^{G12V} in HEK293 Zellen transfiziert, das Rac1 aus den Lysaten mit anti-Myc Antikörper präzipitiert und die Proteine auf einem Western Blot nachgewiesen.

Um zu untersuchen, ob DPAK3 nur an GTP-gebundenes, oder auch an GDP-gebundenes Rac und Cdc42 bindet, wurden von beiden Molekülen mutante Konstrukte erzeugt, in welchen das konservierte Threonin an Position 17 durch ein Asparagin ersetzt ist. Dieser Aminosäureaustausch, der zuerst für das Ras-Onkogen beschrieben wurde, erhöht die Bindungsaffinität der kleinen GTPase für GDP gegenüber GTP, so daß diese permanent in inaktiver Konformation vorliegt (Feig und Cooper, 1988). Wiederum wurden Expressionsvektoren für HA-DPAK3 und die wildtypischen, aktivierten und dominant-negativen Varianten von Rac1 und Cdc42 in HEK293-Zellen transfiziert und die GTPase präzipitiert. Dabei zeigt sich daß DPAK3 nur mit der aktivierten, beziehungsweise im Falle von Rac1 auch mit der wildtypischen, GTPase interagiert, aber nicht mit Rac1^{T17N} und Cdc42^{T17N} (Abb. 5A).

3.1.2 Die Interaktion mit RhoGTPasen steigert die Kinaseaktivität von DPAK3

Um herauszufinden, ob die in DPAK3 vorhandene Kinasedomäne aktiv ist, und, wenn ja, ob die Aktivität durch die Interaktion mit RhoGTPasen gesteigert werden kann, wurde eine *in vitro* Kinaseaktivitätsbestimmung (Kinase Assay) durchgeführt. Hierzu wurde DPAK3 allein, mit wildtypischem und mit aktiviertem Rac1 in HEK293-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und DPAK3 mit anti-HA Antikörper immunpräzipitiert. Dieses wurde zusammen mit [γ -³²P]-ATP und MBP (Myelin Basic Protein), einem häufig zur Bestimmung der Aktivität von PAK-Proteinen als Substrat verwendeten Protein, inkubiert. Die Aktivität der Kinase wurde durch die Phosphorylierung von MBP und die Autophosphorylierung von DPAK3 bestimmt. Es zeigt sich, daß DPAK3 allein eine schwache Aktivität besitzt, die durch die Interaktion mit wildtypischem Rac1 ein wenig, und durch die Bindung von aktiviertem Rac1 beträchtlich gesteigert werden kann. Dies gilt sowohl für die MBP- als auch für die Autophosphorylierung (Abb. 6).

Als Kontrollen wurde derselbe Versuch auch mit Kinase-inaktivem DPAK3^{K322A} und p21-bindungsdefizientem DPAK3^{H19,21L} durchgeführt. In DPAK3^{K322A} ist das in allen Serin/Threonin-Kinasen konservierte Lysin, welches für die Bindung des ATP-Moleküls essentiell ist, durch ein Alanin ersetzt. Die Fähigkeit zur Interaktion mit Rho-GTPasen wird durch diese Mutation in keiner Weise beeinträchtigt (Abb. 5B), lediglich das Expressionslevel von DPAK3^{K322A} ist aus unerfindlichen Gründen immer niedriger als bei wildtypischem DPAK3. Diese Mutante zeigt, unabhängig vom Vorhandensein von Rac1, keine Autophosphorylierung und die Menge an phosphoryliertem MBP entspricht

ungefähr der mit Lysat aus nichttransfizierten Zellen inkubierten Probe (Abb. 6).

Ersetzt man die konservierten Histidine in der p21-Bindungsdomäne durch Leucin, wird in humanem PAK1 sowohl die Interaktion mit RhoGTPasen, als auch die Dimerisierung verhindert (Sells et al., 1997, Zhao et al., 1998). Für DPAK3 wurde ein diesem Austausch entsprechendes Konstrukt (DPAK3^{H19,21L}) durch *in vitro* Mutagenese hergestellt. DPAK3^{H19,21L} ist, wie die durchgeführte Immunkopräzipitation zeigt, nicht mehr in der Lage, Rac1 zu binden (Abb. 5B). Die Kinaseaktivität entspricht der von DPAK3 mit Rac1^{G12V} und lässt sich durch Kotransfektion von Rac1 nicht mehr steigern (Abb. 6). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß DPAK3, wie auch die klassischen Gruppe 1 PAKs in inaktivem Zustand als Dimer vorliegt, das durch die Bindung von GTP-gebundenem Rac aufgelöst wird.

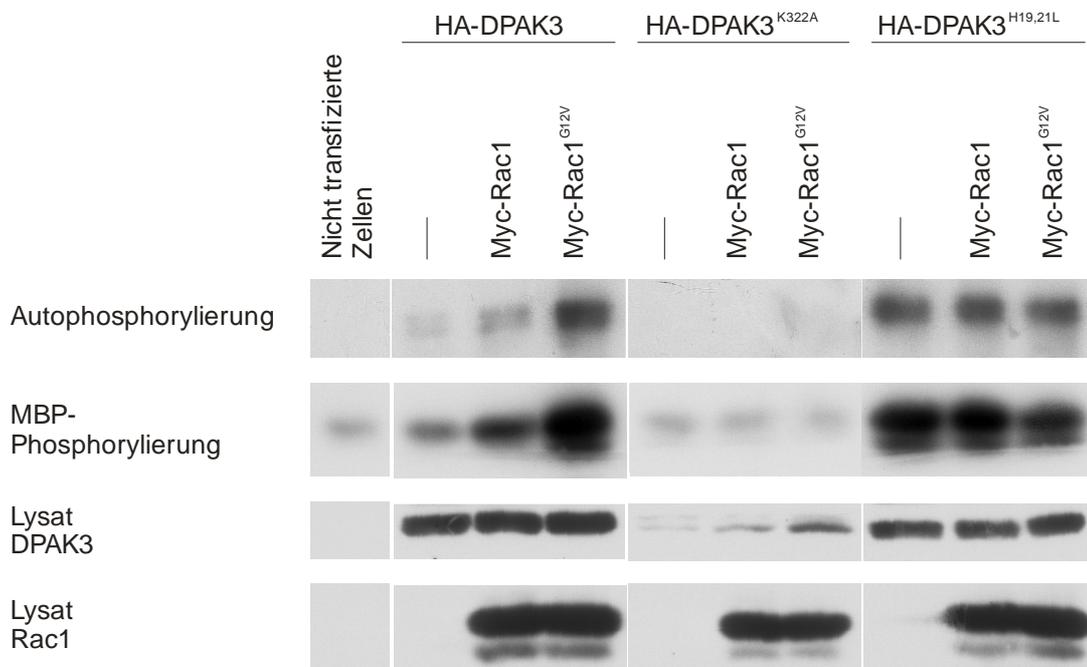


Abb. 6: Regulation der Kinaseaktivität von DPAK3. HA-DPAK3, HA-DPAK3^{K322A} und HA-DPAK3^{H19,21L} wurden allein oder zusammen mit Myc-Rac1 in HEK293 Zellen transfiziert. Diese wurden lysiert, die Kinase mit anti-HA Antikörper präzipitiert und mit [γ -³²P]-ATP und MBP als Substrat inkubiert. Die Proben wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Phosphorylierung von DPAK3 und MBP durch Autoradiographie bestimmt. Lysate aller Proben wurden auf einem Western Blot mit anti-HA und anti-Myc Antikörper analysiert.

3.1.3 DPAK3 liegt in inaktivem Zustand als Dimer vor

Die Gruppe 1 und Gruppe 2 PAK-Proteine unterscheiden sich nicht nur durch ihre Struktur oder die Interaktion mit verschiedenen Rho-GTPasen. Während die Gruppe 1 PAK-Proteine durch die Bindung einer kleinen GTPase aktiviert werden, bewirkt die

Interaktion mit Cdc42 bei den Vertretern der Gruppe 2 keine Steigerung der Kinaseaktivität (Bokoch, 2003, Jaffer & Chernoff, 2002). Die Aktivierung der Gruppe 1 PAK-Proteine kommt dadurch zustande, daß durch die Interaktion mit der RhoGTPase das PAK aus dem inaktiven Dimer in ein aktives Monomer überführt wird (Lei et al., 2000, Parrini et al., 2002). Das Dimer entsteht, indem sich die CRIB-Regionen beider PAK-Moleküle zusammenlagern und die daran anschließende autoinhibitorische Domäne des einen Moleküls an die Kinasedomäne des anderen bindet. Da DPAK3 ebenfalls durch die Bindung von Rac1 beziehungsweise durch Mutationen aktiviert wird, ist zu vermuten, daß DPAK3 in inaktiver Konformation ebenfalls als Dimer vorliegt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Zellen einzeln und gemeinsam mit HA-DPAK3 und Myc-DPAK3 transfiziert und eine Immunkopräzipitation durchgeführt. Dabei konnte, wenn HA-DPAK3 präzipitiert wurde, Myc-DPAK3 auf dem Western Blot nachgewiesen werden (Abb 7). Dies zeigt, daß DPAK3 tatsächlich *in vivo* als Dimer vorliegt.

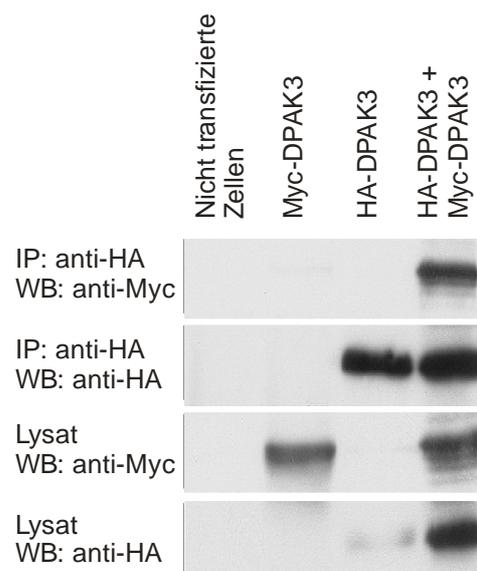


Abb. 7: Dimerisierung von DPAK3. HEK293 Zellen wurden mit HA-DPAK3 und Myc-DPAK3 kotransfiziert. Als Kontrollen wurden Einzeltransfektionen beider PAK-Konstrukte sowie nicht transfizierte Zellen verwendet. Aus den Lysaten wurde mit dem anti-HA Antikörper das HA-DPAK3 präzipitiert, die Proben wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf einer Nitrozellulosemembran mit anti-HA und anti-Myc Antikörpern nachgewiesen.

3.1.4 Kolokalisierung von DPAK3 mit Rac und Einfluß auf das Zytoskelett

Um die Interaktion von DPAK3 und Rac1 weiter zu untersuchen, sollte die Kolokalisierung der beiden Proteine in kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden NIH3T3 Fibroblasten mit Expressionsvektoren für HA-DPAK3 und Myc-Rac1^{G12V} einzeln oder gemeinsam transfiziert. In den doppelt transfizierten Zellen zeigt sich fast vollständige Kolokalisierung von DPAK3 und Rac1^{G12V}. Diese ist sowohl im Zytoplasma als auch an der Zellmembran in den sogenannten „Ruffles“, aktinreichen Veränderungen der Zellmembran, erkennbar (Abb. A, B, D). DPAK3 ist sowohl alleine als auch mit Rac1^{G12V} zusammen in der Lage, die Bildung dieser Strukturen zu bewirken. Ferner wird durch Überexpression von DPAK3 alleine oder in Kombination mit Rac1^{G12V} das normalerweise den gesamten Fibroblasten durchziehende Netzwerk der aus Aktin bestehenden sogenannten „stress fibers“, zerstört und Aktin stattdessen an der Zellmembran lokalisiert. Rac1^{G12V} alleine hingegen bewirkt zwar, daß die Zelle sich flach auf dem als Unterlage dienenden Deckgläschen ausbreitet, jedoch bleibt das Aktinnetzwerk erhalten.

In einer groß angelegten RNA-Interferenz-Studie ergaben sich erste Hinweise darauf, daß die Reduktion der DPAK3 Proteinmenge einen Einfluß auf die Form und das Aktinzytoskelett von *Drosophila* Schneider S2 Zellen hat (Kiger et al., 2003). Um einen möglichen Effekt von DPAK3 auf das Zytoskelett und die Struktur von kultivierten *Drosophila*-Zellen (S2R+) zu untersuchen, wurden ebenfalls RNA-Interferenz Experimente durchgeführt. Nicht behandelte S2R+ Zellen bilden an ihrer Oberfläche filopodienähnliche Fortsätze. Reduziert man nun mittels Gabe von gegen DPAK3 gerichtete dsRNA die Menge an zellulärem DPAK3 (Abb. 9A), so werden signifikant weniger dieser Fortsätze gebildet (Abb. 9C $p < 0,001$). Kontrollzellen bilden im Schnitt 3,5 Fortsätze aus, RNAi-behandelte nur 1,4 Fortsätze (Abb. 9B). Die Anzahl der Fortsätze wird also durch Reduktion der DPAK3-Proteinmenge um durchschnittlich 60 % reduziert.

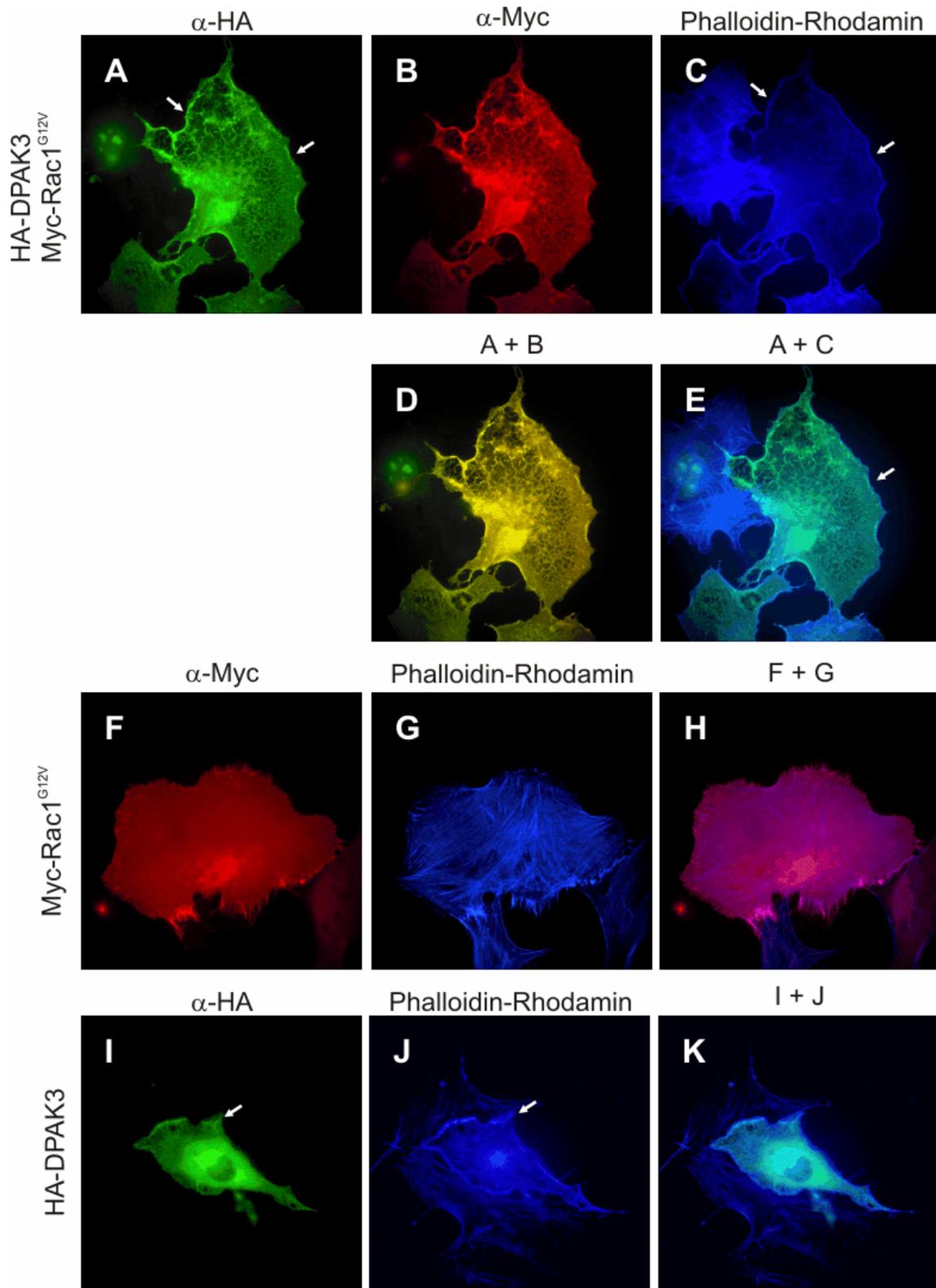


Abb. 8: Kolokalisierung von DPAK3 und Rac1G12V und Einfluß auf das Aktin-Zytoskelett. NIH3T3-Fibroblasten wurden mit Expressionsvektoren für Myc-Rac1^{G12V} und HA-DPAK3 doppelt (A-E) beziehungsweise einzeln für Myc-Rac1^{G12V} (F-H) und HA-DPAK3 (I-K) transfiziert. Die Rac1^{G12V} und DPAK3 wurden mit anti-Myc und anti-HA Antikörpern nachgewiesen, F-Aktin wurde mit Phalloidin-Rhodamin angefärbt.

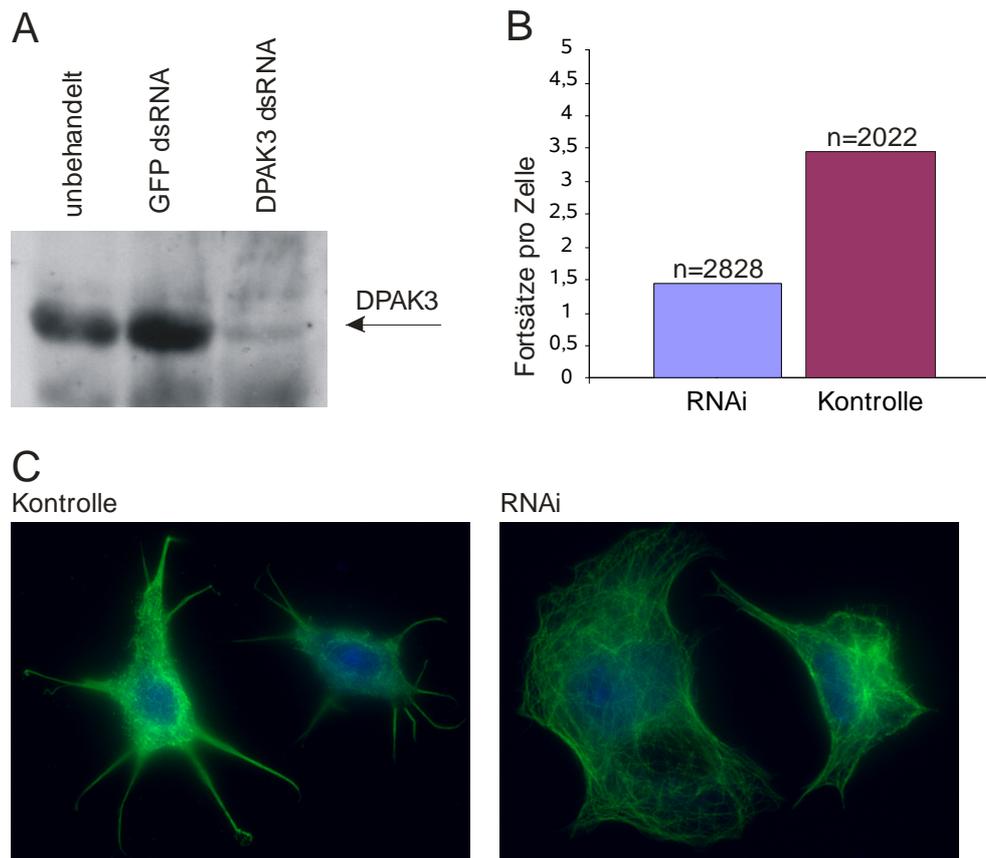


Abb. 9: Effekt von RNA-Interferenz gegen DPAK3. S2R+ Zellen wurden mit dsRNA gegen DPAK3 behandelt und nach dreitägiger Inkubation fixiert, das Mikrotubuli-Netzwerk (grün) mit Maus anti-Tubulin Antikörper und die DNA mit Hoechst-Lösung angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (C). Für die Statistik wurde ein quer über das ganze präparat laufendes Transsect fotografiert und die Fortsätze jeder einzelnen Zelle gezählt. Die Werte für Kontrolle (n=2022 Zellen) und RNAi (n=2828 Zellen) wurden gemittelt und mittels T-Test auf Signifikanz getestet.

3.2 Interaktion und Regulation von Drosophila PAK-Proteinen durch CK2 β

3.2.1 DPAK3 interagiert mit CK2 β *in vivo*

Die Suche nach weiteren Regulatoren von DPAK3 warf die Frage auf, ob die β -Untereinheit der Casein Kinase 2 (CK2 β) als Interaktionspartner von DPAK3 in Frage kommt. Für dieses Protein konnte in verschiedenen Studien eine Bindung an zahlreiche Serin- / Threoninkinasen gezeigt werden, und es wird vermutet, daß es sich bei CK2 β möglicherweise um einen universellen Regulator selbiger Kinasen handelt (Bibby & Litchfield, 2005). Das Casein Kinase 2 Holoenzym ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei katalytisch aktiven α -Untereinheiten und zwei regulatorischen β -Untereinheiten

(Übersicht in Guerra & Issinger, 1999). Während zwischen beiden CK2 α -Molekülen offenbar kein direkter Kontakt besteht, berühren die CK2 β -Moleküle sich sowohl untereinander als auch mit der N-terminalen "Body"-Region das eine und mit der C-terminalen "Tail"-Domäne das andere CK2 α -Molekül. Die Aufklärung der Struktur des humanen CK2-Holoenzym ermöglichte die Ermittlung der an der Interaktion zwischen den α - und β -Untereinheiten beteiligten Aminosäuren (Niefind et al., 2001). Diese befinden sich am N-terminalen Ende der CK2 α -Untereinheit, in und um die ATP-Bindungsstelle. Diese Region ist in allen Serin- / Threoninkinasen vorhanden, wengleich nur wenige Aminosäuren in allen Vertretern dieser Enzymfamilie konserviert sind.

Ein Sequenzvergleich von DPAK3 sowie DPAK1 und Mbt mit den CK2 α -Molekülen aus *Homo sapiens* und *Drosophila melanogaster* zeigt nur wenige vollständig konservierte Aminosäuren. Viele sind in einigen der verglichenen Proteine identisch, in anderen aber durch zumeist ähnliche Aminosäuren ersetzt. Die aus der Kristallstruktur ermittelten, für den Kontakt zwischen humanem CK2 α und CK2 β verantwortlichen Aminosäuren sind in den *Drosophila* PAK-Proteinen nicht konserviert. Dies ist allerdings auch bei A-Raf, CHK1 und c-Mos, für die eine Interaktion mit CK2 β bereits gezeigt werden konnte, der Fall (Niefind et al., 2001, Chen et al., 1997, Lieberman & Rudermann, 2004, Hagemann et al., 1997, Boldyreff & Issinger, 1997, Guerra et al., 2003).

		xx xxxxxx		x x x x		x xx		xx
		****	*	**	*	**	**	**
HCK2alpha	31-105	VEWGNQDDYQLVRKLRGKYSSEVF	EATNINNEKVVVKILRPVKKKI	I--KRETKI	ENLRGGPNII	TLADIVKDP	VS-	
DCK2alpha	28-103	VDWGNQDDYQLVRKLRGKYSSEVF	EATNITTEKCVVKILRPVKKKI	I--KRETKI	ENLRGGTNI	ITLLAVKDP	VS-	
CHK1	1-79	MAVPFVEDMDLVQTLGEGAYGEVQL	AVNRVTEEA	VAVKIVDMKRAVD	CP--ENIKKE	ICTINKMLN	HEENVK	YGHRR
A-Raf	301-374	YWEVFPSEVQLLKRIGTGSEFCTV	FRGRWHG--DVA	VKVLKVSQPTAE	QAQAFKNE	QVLRKTRH	VNILL	FMGF
XlcMos	55-134	WCSIDWEQVLLLEPLGSGGPGSV	VRATYR--G	ETVALKVKV	RSTKN	SLASRQSF	WAE	LNAARL
DPAK1	422-497	SVGDPNRKYTKMEKIQGASCTV	YTALESSTGME	VALKQMNLSQ	QPK--	LLINE	ILVMREN	KHPNV
Mbt	360-435	SAGDPRENLDHFNKTEGSTCTV	CVCIATDK	STGRQVAVK	KMDLR	QQQR--	ELLFNE	VVIMRDY
DPAK3	285-362	NSDDPRERYKTTQEVCKGAS	IVFIAADL	QNESQVAVK	TIDMKN	QSSK--	DLLE	TEIRVLK
								DFNHK
								NVNF
								LDAYL
								LEP

Abb. 10: Vergleich der die ATP-Bindungsstelle umgebenden Aminosäuresequenz verschiedener Serin- / Threoninkinasen. Gezeigt sind CK2 α aus *Homo sapiens* und *Drosophila melanogaster* (HCK2alpha und DCK2alpha), *Homo sapiens* CHK1 und A-Raf, *Xenopus laevis* c-Mos sowie die *Drosophila* PAK Proteine DPAK1, DPAK3, und Mbt. In allen Proteinen konservierte Aminosäuren sind rot auf gelbem Hintergrund dargestellt, blau hinterlegte Aminosäuren sind in einem Teil der Sequenzen konserviert, grün und grau hinterlegte Aminosäuren sind in einem Teil der Proteine nicht konserviert, aber durch eine ähnliche Aminosäuren ersetzt.

Um zu testen, ob DPAK3 mit CK2 β interagiert, wurde eine Immunpräzipitation aus *Drosophila* Schneider S2-Zellen durchgeführt. Diese wurden lysiert und das endogene DPAK3 mit einem, durch Immunisierung von Meerschweinchen mit einem GST-DPAK3-PBD Fusionsprotein gewonnenen, anti-DPAK3 Serum präzipitiert (R. Schulte, 2007, Diplomarbeit). Der Western-Blot zeigt, daß alle fünf in *Drosophila* bekannten CK2 β Isoformen, die anhand der zum Vergleich aufgetragenen Lysate von adulten Männchen und Weibchen identifiziert werden konnten, in S2-Zellen exprimiert werden (Abb. 11, Jauch et al., 2006). Die stärkste Expression ist für die Isoform CK2 β VIIa zu beobachten, gefolgt von CK2 β VIIc und der kleinsten Isoform, CK2 β VIIId-VI. Die verbleibenden Isoformen CK2 β VIIb und CK2 β VIIId werden, wie auch in Fliegen, deutlich schwächer exprimiert. Die Immunpräzipitation zeigt, daß DPAK3 in der Lage ist, alle fünf CK2 β Isoformen zu binden (Abb. 11). Dabei korreliert die Menge des gebundenen CK2 β offensichtlich mit der Stärke der Expression der betreffenden Isoform. Da Isoform CK2 β VIIa die am stärksten exprimierte Isoform ist, wurde, sofern nicht anders angegeben, stets diese Isoform für die folgenden Experimente verwendet.

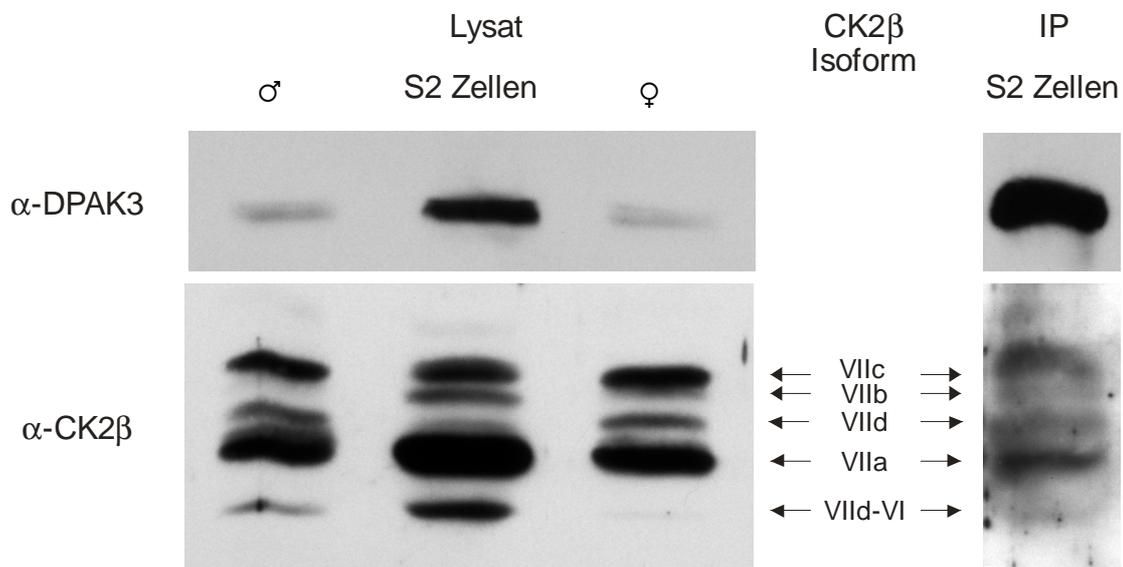


Abb. 11: DPAK3 interagiert mit CK2 β . Schneider S2-Zellen sowie einen Tag alte männliche und weibliche Fliegen wurden homogenisiert und nach SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Auf dem Western Blot wurden anschließend mit anti-DPAK3 und anti-CK2 β Antikörpern beide Proteine nachgewiesen. Die mit anti-DPAK3 Antiserum durchgeführte Immunpräzipitation (IP S2 Zellen) zeigt, daß alle CK2 β Isoformen mit DPAK3 kopräzipitiert werden. Die einzelnen CK2 β Isoformen sind beschriftet.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde in einem weiteren Experiment eine Immunpräzipitation aus HEK293 Zellen, die jeweils mit einem Myc-DPAK3 Vektor und einem Konstrukt, das die Expression jeweils einer *Drosophila* CK2 β Isoform als HA-Fusionsprotein ermöglicht, transfiziert. Nach der Lyse wurde das DPAK3 Protein mit anti-Myc Antikörper präzipitiert, die Proben über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf einem Western-Blot nachgewiesen. Auch hier zeigt DPAK3 eine Interaktion mit allen fünf in *Drosophila* vorkommenden CK2 β Isoformen (Abb. 12). Die Interaktion mit Isoform CK2 β VIIb ist zwar relativ schwach, doch ist dies auf die reproduzierbar schlechte Expression dieses Proteins in HEK293 Zellen zurückzuführen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die folgenden Experimente nur noch mit der Isoform CK2 β VIIa durchgeführt.

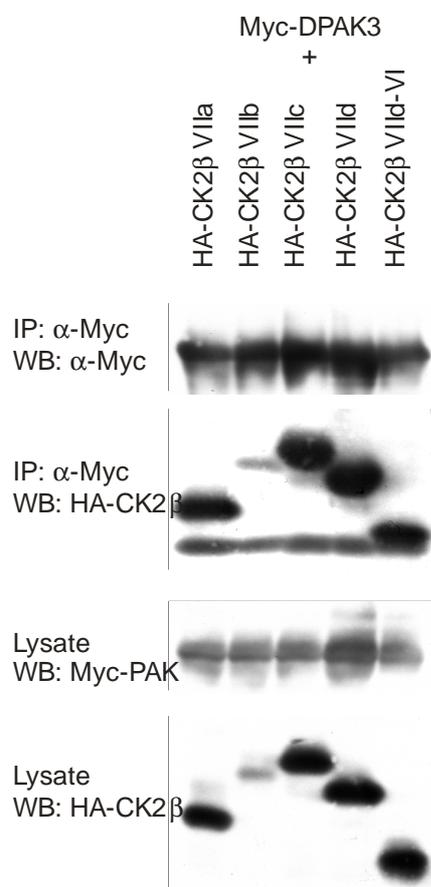


Abb. 12: Alle CK2 β Isoformen binden an DPAK3. HEK293-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Myc-DPAK3 und jeweils eine der 5 CK2 β Isoformen transfiziert. Die Zellen wurden lysiert, DPAK3 mit anti-Myc Antikörper präzipitiert und Myc-DPAK3 und HA-CK2 β auf dem Western Blot nachgewiesen. Zum Nachweis der Expression der Proteine wurden zusätzlich die Zelllysate auf dem Western Blot analysiert.

3.2.2 CK2 β bindet an die Kinasedomäne von DPAK3

Der Sequenzvergleich der CK2 β -bindenden Domänen der bekannten Interaktionspartner zeigt, daß nur wenige Aminosäuren in allen Proteinen konserviert sind. Die für die Herstellung des Kontaktes zwischen CK2 α und CK2 β verantwortlichen Aminosäuren sind weder in den bereits bekannten Interaktionspartnern noch in den

PAK Proteinen vollständig konserviert. Dies läßt vermuten, daß die Interaktion zwischen CK2 β und den p21-aktivierten Kinasen, genau wie bei CK2 α , A-Raf, CHK oder C-Mos auch, über den N-terminalen Teil der Kinasedomäne vermittelt wird. Um zu untersuchen, ob CK2 β mit der Kinasedomäne von DPAK3 oder der N-terminalen regulatorischen Teil des Proteins interagiert, wurden die regulatorische Domäne von DPAK3 (Aminosäuren 1-291) und die Kinasedomäne (Aminosäuren 292-569) als 6xMyc-Fusionsproteine in HEK293 Zellen exprimiert. Expressionsvektoren für diese Fusionsproteine wurden einzeln oder zusammen mit Expressionsvektoren für HA-CK2 β in HEK293 Zellen transfiziert und eine Immunkopräzipitation durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß CK2 β ausschließlich an die Kinasedomäne, nicht aber an das N-terminale Fragment, bindet (Abb. 13).

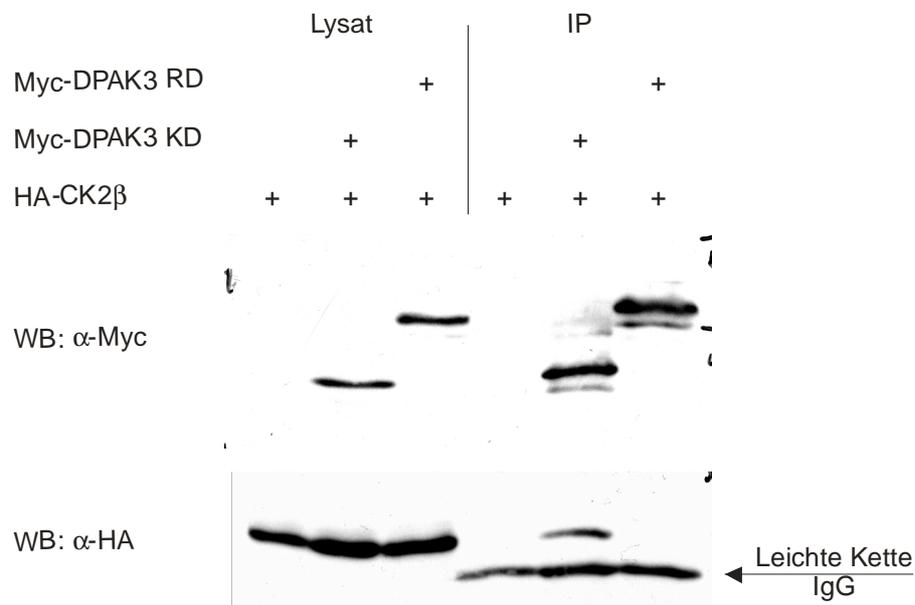


Abb. 13: CK2 β bindet an die Kinasedomäne von DPAK3. Die N-terminale PBD und AID enthaltende regulatorische Domäne von DPAK3 (Aminosäuren 1-291, Myc-DPAK3 RD) sowie die Kinasedomäne (Aminosäuren 292-569, Myc-DPAK3 KD) wurden einzeln oder zusammen mit HA-CK2 β in HEK293 Zellen exprimiert. Die DPAK3-Konstrukte wurden mit anti-Myc Antikörper präzipitiert (IP) und die Proteinkomplexe, zusammen mit Proben der Zelllysate, auf einem Western Blot analysiert (WB).

3.2.3 Alle *Drosophila* PAK Proteine interagieren mit CK2 β

Neben DPAK3 könnten auch DPAK1 und Mbt ebenfalls potentielle Bindungspartner für CK2 β sein. Zudem sind in *Drosophila* drei verschiedene Gene, CK2 β , CK2 β^{testes} und CK2 β' , die unterschiedliche β -Untereinheiten der Casein Kinase 2 kodieren, vorhanden. Es stellt sich also die Frage, ob alle PAK-Proteine in der Lage sind, mit allen CK2 β -

Untereinheiten zu interagieren. Um dies zu untersuchen, wurden wiederum Immunkopräzitationen aus HEK293 Zellen durchgeführt. Diese wurden mit Vektoren zur Expression aller 3 p21-aktivierten Kinasen als Myc-Fusionsproteine in Kombination mit einem Vektor für HA-CK2 β VIIa, HA-CK2 β ' oder HA-CK2 β ^{testes} transfiziert. Als Kontrollen wurden nicht transfizierte Zellen und solche, die jeweils nur einen der möglichen Interaktionspartner exprimieren, verwendet. Es zeigte sich, daß DPAK3 in der Lage ist, an alle drei CK2 β Proteine zu binden (Abb. 14). Ferner zeigen sich hier keine Unterschiede in der Affinität gegenüber CK2 β , CK2 β ' und CK2 β ^{testes}, die Interaktion fällt für alle drei Proteine gleich stark aus. DPAK1 bindet schlechter als DPAK3 an CK2 β ' und CK2 β ^{testes}, lediglich die Interaktion mit CK2 β ist ähnlich stark wie bei DPAK3. Mbt, das einzige Gruppe 2 PAK in *Drosophila*, bindet zwar auch an alle drei CK2 β -Proteine, jedoch ist die Bindung hier am schwächsten ausgeprägt.

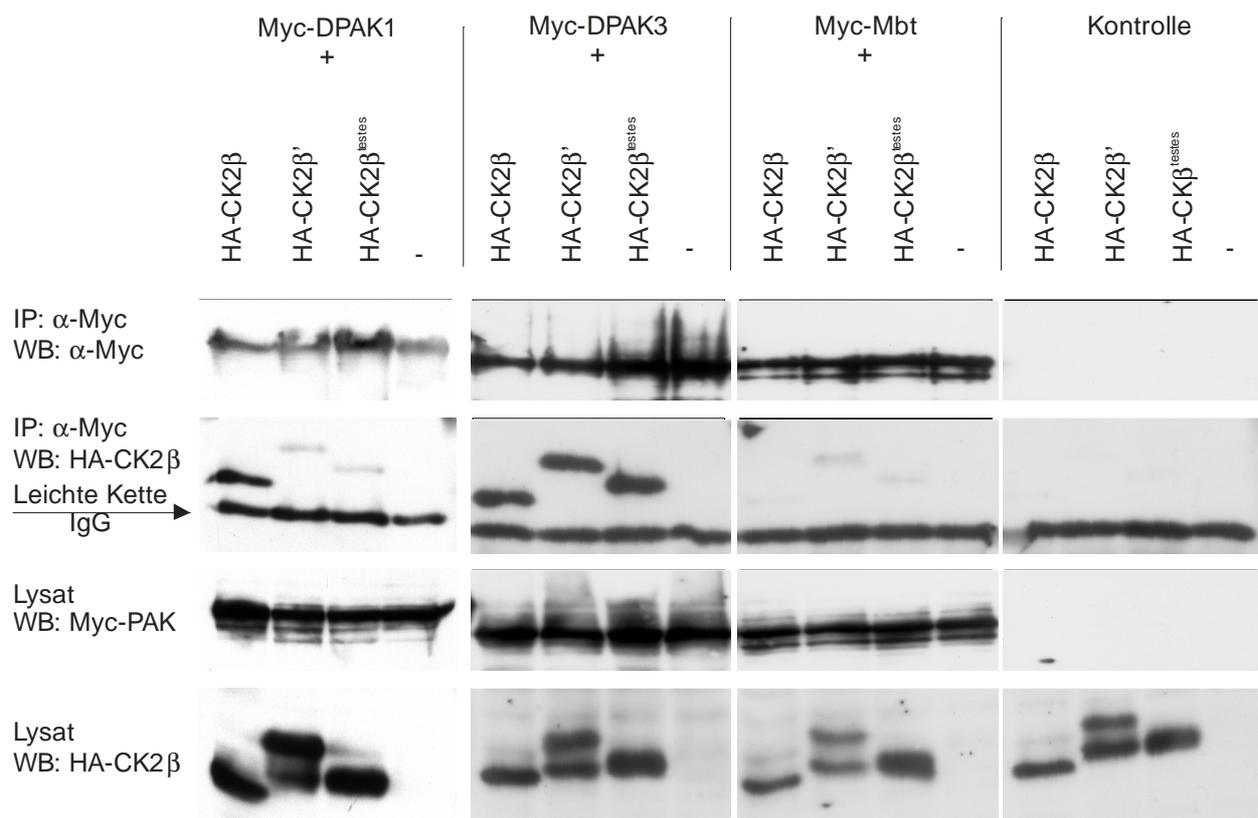


Abb. 14: Alle *Drosophila* PAK-Proteine interagieren mit CK2 β -Proteinen. HA-Fusionsproteine von CK2 β (Isoform VIIa), CK2 β ' und CK2 β ^{testes} wurden einzeln oder zusammen mit Myc-DPAK, Myc-DPAK3 und Myc-Mbt in HEK293 Zellen exprimiert. Die p21-aktivierten Kinasen wurden mit anti-Myc Antikörper präzipitiert und die Proteine auf dem Western Blot mit anti-Myc und anti-HA Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden die Zelllysate ebenfalls analysiert.

3.2.4 Regulation von PAK-Proteinen durch CK2 β

Bei allen Serin- / Threonin-Kinasen, für welche bisher eine Interaktion mit CK2 β nachgewiesen werden konnte, wird die Phosphotransferaseaktivität durch CK2 β beeinflusst. Dabei kann CK2 β sowohl aktivierend als auch hemmend auf die gebundene Kinase wirken. So wurden bei A-Raf und CHK-1 eine durch die Interaktion mit CK2 β erhöhte Substratphosphorylierung gezeigt (Hagemann et al., 1997, Guerra et al., 2003). Bei Mos und CHK2 hingegen wurde ein inhibitorischer Effekt von CK2 β beobachtet (Chen et al., 1997, Bjorling-Poulsen et al., 2005).

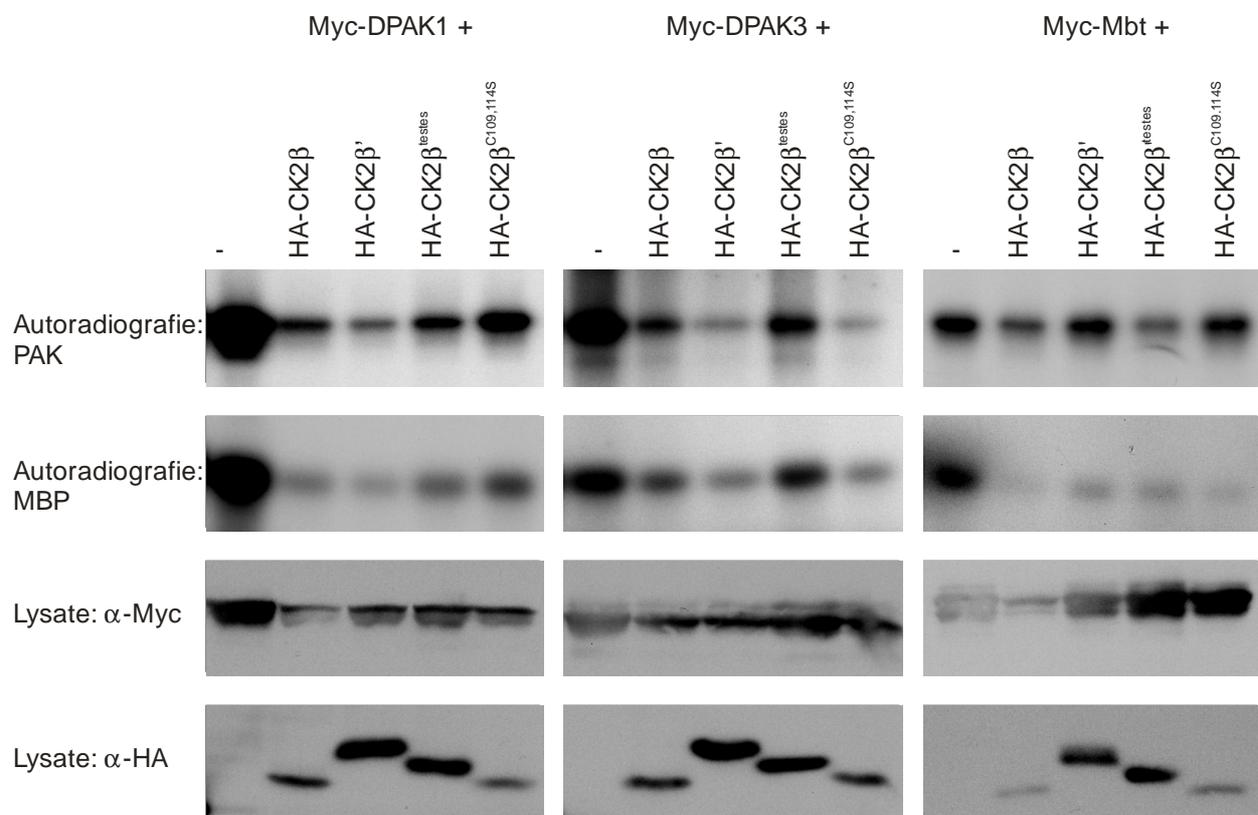


Abb. 15: CK2 β hemmt die Kinaseaktivität von PAK-Proteinen *in vitro*. HEK293 Zellen wurden mit einem Myc-DPAK1, Myc-DPAK3 und Myc-Mbt einzeln oder zusammen mit HA-CK2 β , HA-CK2 β' , HA-CK2 β^{testes} oder dem nicht zur Dimerisierung fähigen HA-CK2 $\beta^{\text{C109,114S}}$ transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und eine Immunpräzipitation mit anti-Myc Antikörper durchgeführt. Die so erhaltenen Proteinkomplexe wurden in Anwesenheit von [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP einem *in vitro* Kinaseassay eingesetzt, bei dem MBP (Myelin basic protein) als Substrat verwendet wurde. Die Autophosphorylierung der p21-aktivierten Kinasen und die Phosphorylierung von MBP wurden nach elektrophoretischer Auftrennung durch Autoradiographie untersucht. Die Expression der verschiedenen PAK und CK2 β Proteine wurde durch Analyse der Zelllysate auf einem Western Blot nachgewiesen.

Für das CK2 Holoenzym wurde gezeigt, daß CK2 β die Aktivität der CK2 α -Untereinheit abhängig vom jeweiligen Substrat sowohl steigern als auch, wie im Falle von Calmodulin, hemmen kann (Meggio et al., 1999). Um die Wirkung von CK2 β auf p21-aktivierte Kinasen zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen mit DPAK1, DPAK3 und Mbt, einzeln oder in Kombination mit verschiedenen CK2 β -Konstrukten, transfiziert. Die jeweilige Kinase wurde präzipitiert und in einem *in vitro* Kinase Assay eingesetzt. Es wurde sowohl die Autophosphorylierung der PAK-Proteine als auch die Phosphorylierung des als Substrat verwendeten MBP (Myelin Basic Protein) analysiert. Es zeigte sich, daß die Aktivität aller drei PAK-Kinasen durch die gleichzeitige Expression von CK2 β sichtbar reduziert wird (Abb. 15). Dies gilt sowohl für die Auto- als auch für die Substratphosphorylierung. Auch wenn die sehr ungleichmäßige Expressionsstärke der CK2 β -Proteine, die möglicherweise auf die Serummangel-Behandlung („Hungern“) der Zellen zurückzuführen ist, einen Vergleich zwischen den einzelnen CK2 β -Isoformen erschwert, lassen sich doch einige Unterschiede zwischen diesen feststellen. So scheint CK2 β ' die Gruppe 1 PAK-Proteine DPAK1 und DPAK3 stärker zu hemmen als CK2 β ^{testes}. Mbt hingegen wird offenbar durch CK2 β ^{testes} stärker inhibiert als durch CK2 β '. CK2 β VIIa scheint ein potenter Inhibitor aller drei PAK-Proteine zu sein.

3.2.5 Posttranslatorische Modifikationen von CK2 β beeinflussen nicht die Interaktion mit DPAK3

Die Fähigkeit von CK2 β , die Aktivität von CK2 α zu regulieren, werden durch posttranslatorische Modifikationen entscheidend beeinflusst. Die Serine an Position 2, 3 und 4 können durch CK2 α phosphoryliert werden (Litchfield et al., 1991, Boldyreff et al., 1993). Die Phosphorylierung dieser drei Aminosäuren scheint die Stabilität von CK2 β zu erhöhen (Zhang et al., 2002).

Führt man eine Immunkopräzipitation mit einem der drei *Drosophila* PAK-Proteine durch, wird stets nur nicht phosphoryliertes CK2 β von der p21-aktivierten Kinase gebunden, und auch im Zellysate findet sich nur ein geringer Anteil an phosphoryliertem CK2 β (Abb. 19). Führt man denselben Versuch mit CK2 α durch, so zeigt sich, daß der überwiegende Teil des in das Holoenzym integrierten CK2 β phosphoryliert ist. Durch die Phosphatgruppen wandert es im Lauf der elektrophoretischen Auftrennung langsamer durch das Polyacrylamidgel. Dies wirft die Frage auf, ob die

Phosphorylierung dieser Aminosäuren die Fähigkeit von CK2 β , mit PAK-Proteinen zu interagieren oder diese zu regulieren, verändert. Ferner enthält CK2 β eine Region, die reich an sauren Aminosäuren ist, den sogenannten „Acidic Loop“. Diese Region liegt im CK2-Holoenzym exponiert an der Oberfläche und ist sowohl Bindungsstelle für Polyamine als auch an der Interaktion von CK2 mit der Zellmembran beteiligt (Leroy et al., 1995, Leroy et al., 1999). Die Bindung von Polyaminen wie Spermin oder Spermidin an diese Region steigert die Kinaseaktivität des CK2-Holoenzym, was zu einer gesteigerten Auto- und Substratphosphorylierung führt (Leroy et al., 1997).

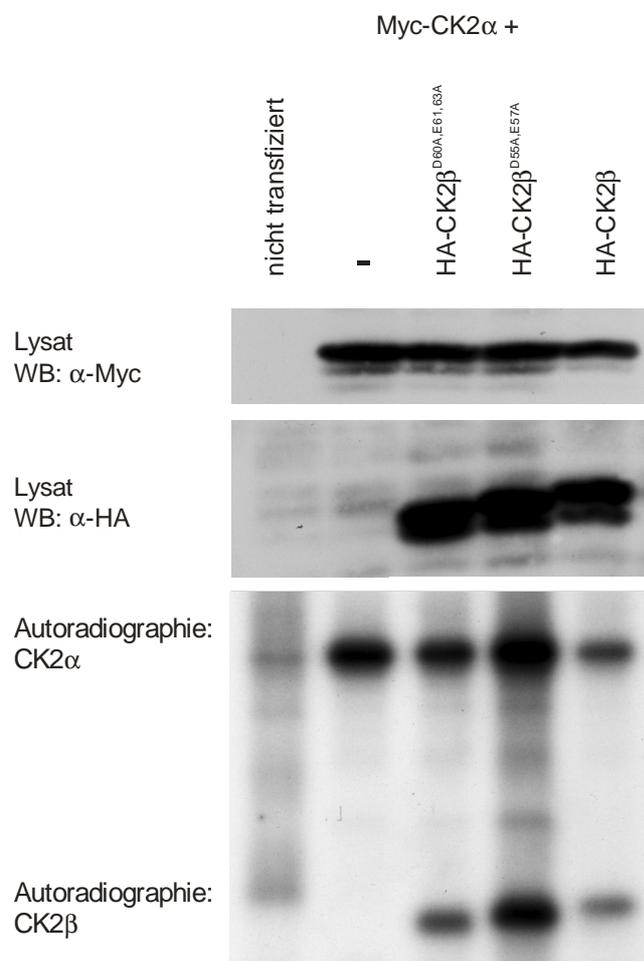


Abb. 16: Mutationen in der "Acidic Loop" Domäne von CK2 β beeinflussen die Aktivität des CK2 Holoenzym. HEK293 Zellen wurden mit Myc-CK2 α einzeln sowie mit HA-CK2 β , HA-CK2 β ^{D60A,E61,63A} oder HA-CK2 β ^{D55A,E57A} transfiziert. Aus den Zelllysaten wurde CK2 α mit anti -Myc Antikörper präzipitiert und damit ein *in vitro* Kinaseassay mit [γ 32P-ATP] durchgeführt. Die Expression der einzelnen Untereinheiten wurde durch Western Blot, die Phosphorylierung durch Autoradiographie nachgewiesen.

Um zu zeigen, daß diese Aktivierung der Casein Kinase 2 auch für *Drosophila* CK2 gilt, wurde ein Kinaseassay durchgeführt. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit Myc-CK2 α einzeln oder zusammen mit wildtypischem CK2 β beziehungsweise den Mutanten CK2 β ^{D55A,E57A} oder CK2 β ^{D60A,E61,63A} transfiziert. Indem in diesen Konstrukten die sauren Aminosäuren der Polyaminbindungsstelle durch das neutrale Alanin ersetzt wurden, soll die Bindung von Polyaminen an CK2 β simuliert werden. Aus dem daraus gewonnenen

Zelllysat wurde Myc-CK2 α präzipitiert und die Aktivität der Kinase anhand der Phosphorylierung von CK2 α und CK2 β analysiert. Hierbei zeigt sich, daß wildtypisches CK2 β die Aktivität des Holoenzym im Vergleich zu einzeln transfiziertem CK2 α verringert (Abb. 16). Wird jedoch stattdessen eine der beiden Mutanten verwendet, so steigt die Aktivität des CK2-Holoenzym wieder an. Auch ist zu beobachten, daß CK2 $\beta^{\text{D55A,E57A}}$ die Aktivität des Holoenzym stärker erhöht als CK2 $\beta^{\text{D60A,E61,63A}}$ (Abb. 16).

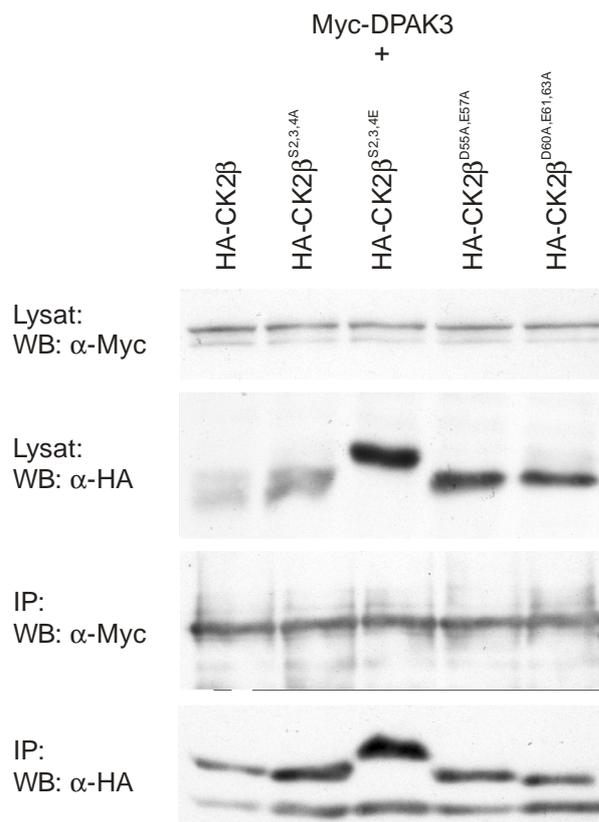


Abb. 17: Keiner der vermuteten Regulationsmechanismen für CK2 β beeinflusst die Interaktion mit DPAK3. HEK293 Zellen wurden mit Myc-DPAK3 sowie verschiedenen HA-CK2 β -Konstrukten transfiziert. DPAK3 wurde mit anti-Myc Antikörper präzipitiert und die Proteine in IP und Lysat auf dem Western Blot mit anti-HA und anti-Myc Antikörpern nachgewiesen.

Um herauszufinden, ob Bindung von Polyaminen oder Phosphorylierung die Interaktion von CK2 β mit DPAK3 verändert, wurde eine Immunkopräzipitation aus HEK293 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden, neben den beiden Polyamin-Bindungsdomänenmutanten, ein CK2 β Protein, welches nicht mehr phosphoryliert werden kann (CK2 $\beta^{\text{S2,3,4A}}$), und CK2 $\beta^{\text{S2,3,4,E}}$, das durch den dreifachen Austausch von Serin zu Glutamat ein phosphoryliertes CK2 β simuliert, eingesetzt. Dabei zeigt sich, daß alle CK2 β -Mutanten mit gleicher Affinität wie wildtypisches CK2 β an DPAK3 binden (Abb. 17). Um einen möglichen Einfluß auf die Regulation von DPAK3 durch CK2 β zu untersuchen, wurde zusätzlich ein *in vitro* Kinaseassay mit den mutanten CK2 β -Konstrukten durchgeführt. Dabei zeigt sich, daß alle vier mutanten CK2 β Proteine die Aktivität von DPAK3 in der gleichen Weise reduzieren wie wildtypisches CK2 β , CK2 β' und CK2 β^{testes} (Abb. 18).

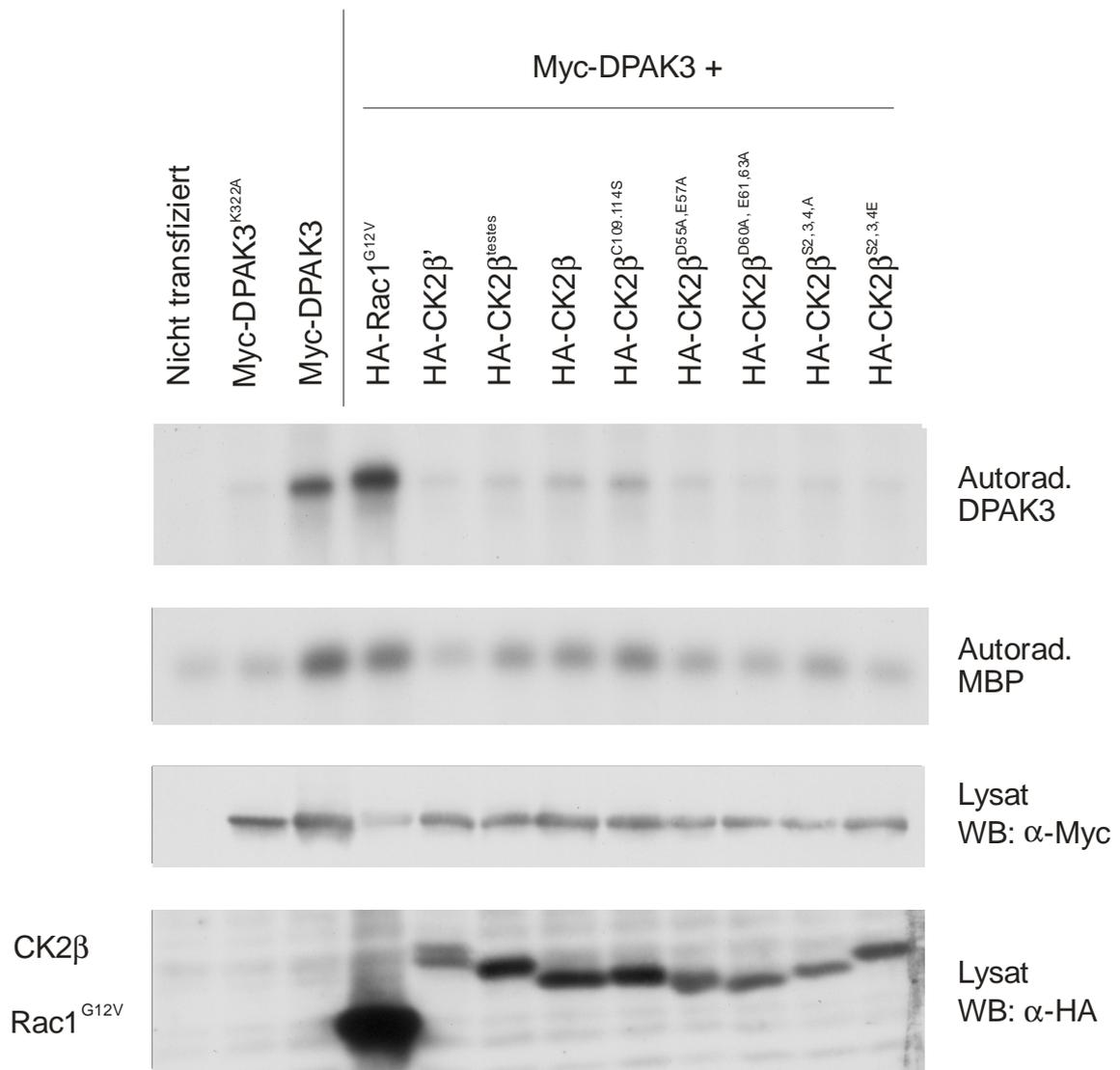


Abb. 18: Die Regulation der Kinaseaktivität von DPAK3 durch CK2 β wird *in vitro* nicht durch die selben Mechanismen beeinflusst wie im CK2 Holoenzym. HEK293 Zellen wurden mit einem Myc-DPAK3 einzeln oder zusammen mit HA-CK2 β , HA-CK2 β^{restes} , HA-CK2 β oder verschiedenen mutanten Konstrukten transfiziert. Als Kontrollen wurden Kinase-inaktives DPAK3^{K322A} und durch Kotransfektion von Rac1^{G12V} aktiviertes DPAK3 verwendet. Die Zellen wurden lysiert und eine Immunpräzipitation mit anti-Myc Antikörper durchgeführt. Die so erhaltenen Proteinkomplexe wurden in Anwesenheit von [γ^{32} P]-ATP in einem *in vitro* Kinaseassay eingesetzt. MBP (Myelin basic protein) wurde als Substrat verwendet. Die Autophosphorylierung von DPAK3 und die Phosphorylierung von MBP wurden nach elektrophoretischer Auftrennung durch Autoradiographie untersucht. Die Expression von DPAK3 und der verschiedenen CK2 β Proteine wurde durch Analyse der Zelllysate auf einem Western Blot nachgewiesen.

3.2.6 DPAK3 interagiert nicht mit dem CK2 Holoenzym

Für einige der mit CK2 β interagierenden Serin- / Threoninkinasen wie zum Beispiel A-Raf, c-Mos oder Chk1 konnte gezeigt werden, daß diese freies CK2 β binden und durch

dieses reguliert werden (Hagemann et al., 1997, Chen et al., 1997, Guerra et al., 2003). Die S6 Kinase 1 II (p90^{rsk}) interagiert sowohl mit CK2 β als auch mit dem Holoenzym, welchem es als Substrat dient (Kusk et al., 1999, Panasyuk et al., 2006). Es stellt sich nun die Frage, ob die p21-aktivierten Kinasen mit freiem CK2 β oder mit dem Holoenzym interagieren und durch dieses reguliert werden.

Um dies zu untersuchen, sollten HA-CK2 β ^{C109,114S} und HA-CK2 β ^{C137,140S} Konstrukte zum Einsatz kommen. In diesen sind jeweils zwei der vier Cysteine, die zusammen den Zinkfinger von CK2 β bilden, durch Serine ersetzt, wodurch diese Struktur zerstört wird. Dieser Zinkfinger ist jedoch zwingend für die Bildung des CK2 β -CK2 β Dimers und damit des CK2 Holoenzym erforderlich (Chantalat et al., 1999, Niefind et al., 2001, Canton et al., 2001). Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den Expressionsvektoren für die *Drosophila* PAK-Proteine in Kombination mit wildtypischem oder einem der beiden dimerisierungsdefizienten CK2 β transfiziert. Als Kontrollen wurden dieselben CK2 β -Vektoren zusammen mit dem Expressionsvektor für CK2 α transfiziert.

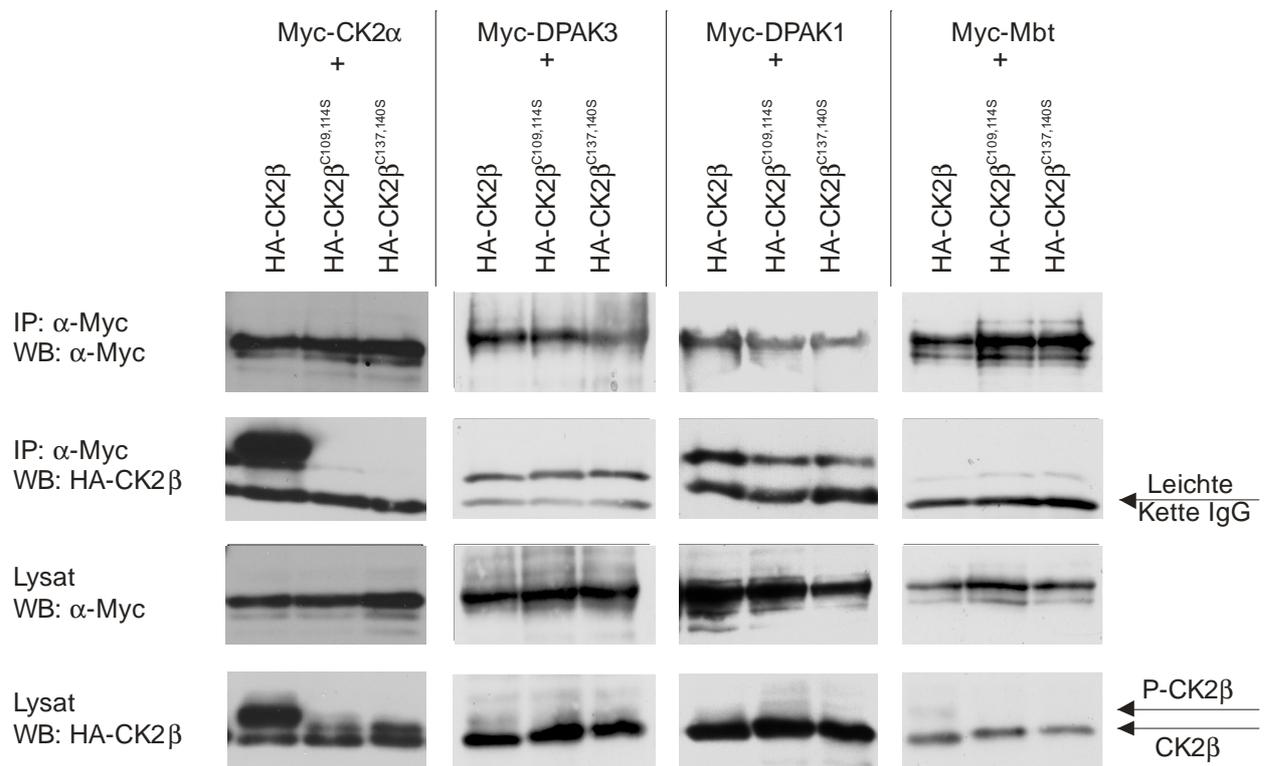


Abb. 19: Die Fähigkeit von CK2 β zur Dimerisierung ist nicht entscheidend für die Interaktion mit p21-aktivierten Kinasen. Myc-DPAK1, Myc-DPAK3, Myc-Mbt und als Kontrolle Myc-CK2 α wurden zusammen mit HA-CK2 β oder den dimerisierungsunfähigen HA-CK2 β ^{C109,114S} und HA-CK2 β ^{C137,140S} exprimiert. Es wurde eine Immunpräzipitation mit anti-Myc Antikörper durchgeführt und die Immunkomplexe auf einem Western Blot analysiert. Die Expression der Proteine wurden durch Western Blot Analyse der Lysate ebenfalls nachgewiesen.

Es zeigt sich, daß DPAK1, DPAK3 und Mbt sowohl an das wildtypische CK2 β als auch an die beiden Zinkfingermutanten binden (Abb. 19). Dabei sind keine Unterschiede zwischen der Affinität eines PAK-Proteins zu wildtypischem oder zu einem der Dimerisierungs-defizienten CK2 β zu beobachten. Auch im Kinaseassay deutet nichts darauf hin, daß die fehlende Fähigkeit zur Dimerisierung und Bildung des CK2-Holoenzym einen Einfluß auf die Regulation der PAK-Kinasen durch CK2 β hat. Die Mutante CK2 $\beta^{C109,114S}$ verringert die Aktivität aller drei PAK-Proteine in gleichem Maße wie wildtypisches CK2 β (Abb. 15, 18). CK2 α hingegen interagiert stark mit dem wildtypischem CK2 β , jedoch kann keine Interaktion mit CK2 $\beta^{C109,114S}$ und CK2 $\beta^{C137,140S}$ festgestellt werden (Abb. 19).

Um eine Interaktion von PAK mit dem CK2-Holoenzym auszuschließen, wurde eine weitere Immunkopräzipitation durchgeführt. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit Vektoren für Myc-CK2 α einzeln oder in Kombination mit HA-DPAK3, HA-CK2 β oder beiden gleichzeitig transfiziert. Aus den aus diesen Zellen gewonnenen Lysaten wurde CK2 α mit dem anti-Myc Antikörper präzipitiert.

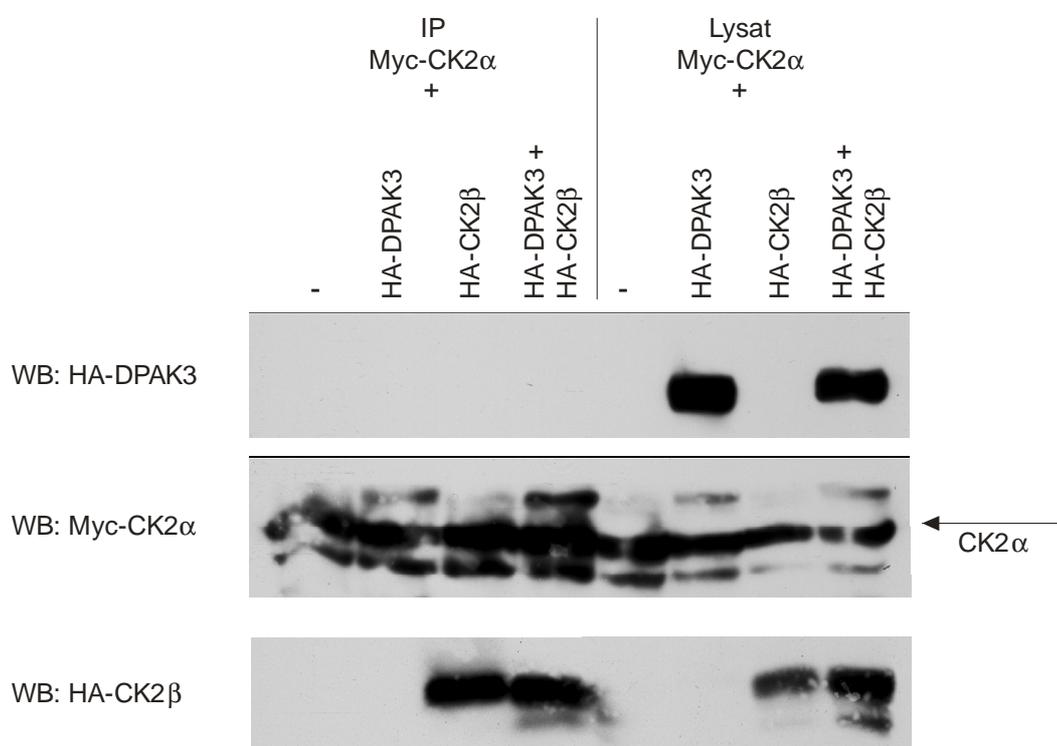


Abb. 20: DPAK3 interagiert mit CK2 β , nicht aber mit dem CK2 Holoenzym. HEK293 Zellen wurden mit Myc-CK2 α , einzeln oder in Kombination mit HA-DPAK3 und HA-CK2 β transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und CK2 α mit anti-Myc Antikörper präzipitiert (IP). Die so isolierten Proteinkomplexe wurden zusammen mit Proben des Zelllysats zur Kontrolle der Proteinexpression auf einem Western Blot (WB) analysiert.

Dabei ist zunächst zu beobachten, daß die Anwesenheit von DPAK3 in den Zellen keinen Einfluß auf die Fähigkeit von CK2 α , die CK2 β -Untereinheit zu binden, hat. Es zeigt sich ferner, daß weder freies CK2 α noch das sich in den dreifach transfizierten Zellen bildende CK2-Holoenzym mit DPAK3 interagieren (Abb. 20). Führt man das Experiment in umgekehrter Richtung durch, d. h. man präzipitiert Myc-DPAK3 und untersucht die Bindung an das Holoenzym oder freies CK2 α , so wird zwar CK2 β gebunden, nicht aber kotransfiziertes CK2 α . Es kann allerdings in diesem Experiment eine sehr schwache Interaktion mit freiem CK2 α festgestellt werden (nicht gezeigt) .

3.3 Genetische und phänotypische Analyse der vorhandenen *Dpak3*-Allele

Im Rahmen des „Drosophila Gene Disruption“ Projektes wurde eine Reihe von Insertionen auf mobilen genetischen Elementen (P oder PiggyBac) basierender Konstrukte in *Dpak3* erzeugt. Die Insertionsorte verteilen sich gleichmäßig auf die 5' untranslatierte Region von *Dpak3* und das einzige Intron des Gens. Desweiteren wurde im Rahmen eines Projektes der Firma Exelixis die molekular definierte Defizienz *Df(3R)Exel9055* hergestellt, die einen großen Teil des *Dpak3*-Gens, darunter die komplette kodierende Sequenz, deletiert (Thibault et al., 2004, Parks et al., 2004).

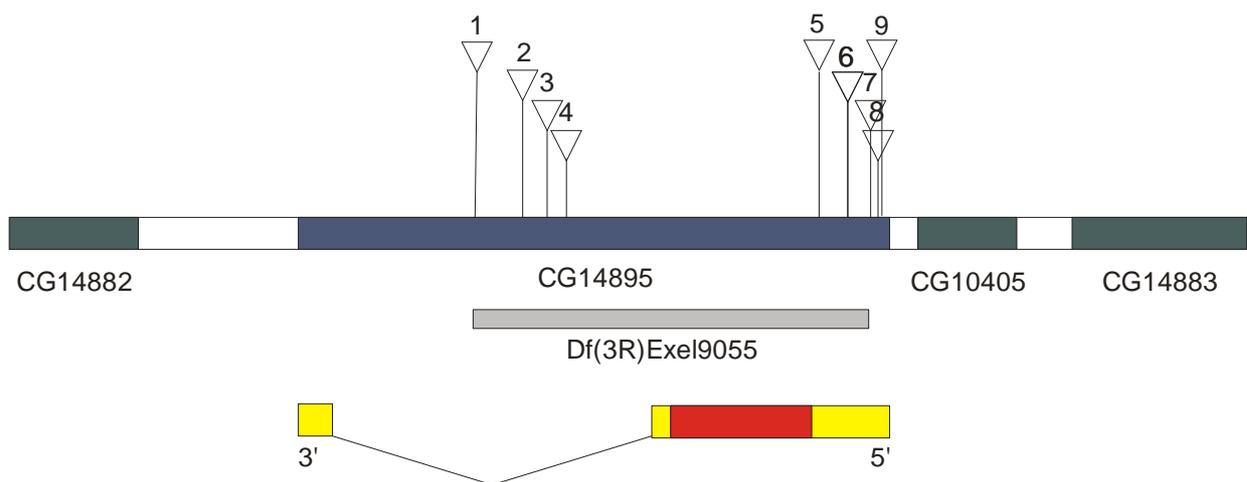


Abb. 21: Genomische Organisation von *Dpak3* mit den bisher bekannten Allelen *P{XP}d02472* (1), *P{SUPor-P}KG00430* (2), *P{RS}CB-0469-3* (3), *P{RS}CB-6089-3* (4), *p{GawB}NP4472* (5), *P{Mae-UAS.6.11}pak3^{P1}* (6), *PBac{RB}e00329* (7), *P{RS}CB-5374-3* (8) und *P{EP}pak3^{EP1191}* (9) sowie der Defizienz *Df(3R)Exel9055*. Die kodierende Region ist rot, die nicht kodierenden Sequenzen der mRNA sind gelb eingezeichnet.

Diese *Dpak3*-Allele zeigen große Unterschiede bezüglich ihrer Lebensfähigkeit, wobei diese in keinerlei offensichtlichem Zusammenhang mit dem Insertionsort steht. Einige, wie zum Beispiel *P{SUPor-P}KG00430* oder *P{Mae-UAS.6.11}pak3^{P1}* sind ohne Einschränkungen vital und fertil. Die Defizienz *Df(3R)Exel9055* sowie die P-Elementinsertionen *p{GawB}NP4472* und *P{EP}pak3^{EP1191}* sind vollständig letal, wobei sich bei *P{EP}pak3^{EP1191}* herausstellte, daß die Letalität von einer weiteren Mutation auf dem dritten Chromosom, nicht aber durch die Insertion in *Dpak3* verursacht wird. Andere, wie *P{XP}d02472* und *PBac{RB}e00329* sind semiletal, das heißt es werden gelegentlich homozygote Larven oder Imagines beobachtet, die allerdings keinen sichtbaren Phänotyp zeigen. Vermutlich handelt es sich bei diesen um hypomorphe Allele.

Um sicherzugehen, daß die Letalität aller homozygot nicht lebensfähigen Allele durch den Verlust der Genfunktion von *Dpak3* verursacht wird, wurde eine Komplementationsanalyse durchgeführt, deren Ergebnis in Tabelle XXX zusammengefaßt ist. Zusätzlich zu den zu testenden Linien wurden größere molekular definierte Defizienzen (*Df(3R)Exel6269* und *Df(3R)Exel7330*), die den *Dpak3* Locus umfassen, verwendet.

Tabelle 1: Komplementationsanalyse der verschiedenen *Dpak3*-Allele

Allel	<i>Dpak3^{P1}</i>	KG00430	e00329	d02472	NP4472	Exel9055	EP1191
<i>pak3^{P1}</i>	+	+	+	+	+	+	+
KG00430	+	+	+	+	+	+	+
e00329	+	+	-	-	-	-	+
d02472	+	+	-	-	-	-	+
NP4472	+	+	-	-	-	-	+
Exel9055	+	+	-	-	-	-	+
EP1191	+	+	-	-	-	-	+
Exel6269	+	+	-	-	-	-	+
Exel7330	+	+	-	-	-	-	+

+ : *in trans* lebensfähig / - : *in trans* nicht lebensfähig

Die beiden homozygot lebensfähigen Insertionen *P{SUPor-P}KG00430* oder *P{Mae-UAS.6.11}pak3^{P1}* sind *in trans* zu allen anderen *Dpak3*-Allelen voll lebensfähig, genauso wie die homozygot letale Insertion *P{EP}pak3^{EP1191}*, für die somit gezeigt werden konnte, daß die Letalität hier nicht durch die Mutation des *Dpak3* Gens verursacht wird. Jede Kombination der semiletalen Allele *P{XP}d02472* und *PBac{RB}e00329* oder der letalen *Df(3R)Exel9055* und *p{GawB}NP4472* untereinander ist nicht lebensfähig. Gleiches gilt auch, wenn eines dieser Allele mit einer der beiden Deletionen *Df(3R)Exel6269* und *Df(3R)Exel7330* kombiniert wird.

Um Rettungsexperimente durchzuführen wurde die kodierende Sequenz von *Dpak3* in den pUAST Transformationsvektor subkloniert. Aus diesen Konstrukten wurde durch Keimbahntransformation transgene Fliegen hergestellt. Damit sollte überprüft werden, ob durch Expression von DPAK3 unter Kontrolle der Actinpromotor-GAL4, Tubulinpromotor-GAL4 oder Hitzeschock-GAL4 die Letalität der *Dpak3* Mutanten gerettet werden kann. Da jedoch jegliche ubiquitäre Überexpression von DPAK3 zum Tod der Tiere führt, mußten andere Wege gefunden werden, um dieses Ziel zu erreichen. Als Ausweg bot sich die Konstruktion genomischer Rettungskonstrukte an.

3.4 Phänotypische Analyse der Defizienz *Df(3R)Exel9055* mit Hilfe genetischer Mosaik

Da es sich bei den semiletalen P-Elementinsertionen *P{XP}d02472* und *PBac{RB}e00329* und vermutlich auch bei der letalen Insertion *P{GawB}NP4472* um hypomorphe Allele unterschiedlicher Stärke handelt, wurde für die weitergehende Analyse zunächst die Defizienz *Df(3R)Exel9055* gewählt. Um das Risiko etwaiger fehlerhafter Ergebnisse aufgrund zusätzlicher Mutationen auf dem zu untersuchenden Chromosom auszuschließen, wurde eine Komplementationsanalyse mit Defizienzen durchgeführt, welche beinahe den gesamten rechten Arm des dritten Chromosoms abdecken. Dabei komplementiert lediglich die Defizienz *Df(3R)sbd104* (89B5;89C2-7) die Letalität von *Df(3R)Exel9055* nicht. Die Defizienz *Df(3R)Exel9055* wurde anschließend auf ein Chromosom rekombiniert, das am proximalen Ende von 3R an Position 82B ein P-Element mit einer FRT-Erkennungssequenz (Flip Recombinase Target) trägt. Die so erhaltenen Fliegen w; FRT82B, *Df(3R)Exel9055* / TM6B wurden anschließend durch genetische Tests und PCR auf das Vorhandensein der Defizienz getestet. Ihre Herstellung stellt die Voraussetzung für die Verwendung der zur

Durchführung klonaler Analysen mit Hilfe der MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) und EGUF/hid (Eyeless-GAL4 UAS-Flippase / head involution defective) Systeme dar (Lee & Luo, 1999, Stowers & Schwarz, 1999).

3.4.1 Phänotypische Analyse von *Df(3R)Exel9055* in der Entwicklung der Pilzkörper von *Drosophila melanogaster*

Die Pilzkörper sind paarige Strukturen im zentralen Nervensystem von Insekten. In *Drosophila* sind sie maßgeblich an olfaktorischem Lernen beteiligt. Mutationen, die die Struktur der Pilzkörper verändern wirken sich negativ auf die Lernfähigkeit der Fliege aus (Heisenberg et al., 1985). Sie bestehen aus Neuronen, deren Axone in insgesamt fünf terminale Loben, drei mediale und zwei dorsale, projizieren (Crittenden et al., 1998). Die Zellkörper liegen in zwei Gruppen am dorsalen Rand des Gehirns, direkt über den aus den Dendriten gebildeten Calyces. Alle Neurone der Pilzkörper werden im Laufe der Entwicklung von *Drosophila* aus vier Neuroblasten in jeder Gehirnhemisphäre gebildet (Ito et al., 1997, Lee et al., 1999). Dabei werden zunächst während der Embryonalentwicklung bis ins dritte Larvenstadium nur die γ -Neuronen gebildet. Diese besitzen zunächst gegabelte Axone, die in den dorsal-frontalen Lobus und den medialen Lobus projizieren. Während der Pupalentwicklung degenerieren die Axone dieser Neurone und wachsen ohne sich zu gabeln erneut aus und bilden den medialen γ -Lobus. Ab dem dritten Larvenstadium werden zunächst die α'/β' Neurone und anschließend die α/β Neurone gebildet. Die Axone dieser Neurone sind stets gegabelt, und sie bilden die α/α' und β/β' Loben der adulten Fliege (Lee et al., 1999).

Um zu untersuchen, ob *Df(3R)Exel9055* einen Phänotyp in den Pilzkörpern verursacht, wurde das MARCM-System verwendet (Lee & Luo, 1999). Die Funktionsweise dieses Systems beruht darauf, daß in heterozygoten Tieren Zellklone erzeugt werden, die homozygot für die zu untersuchende Mutante sind und durch einen Marker, in diesem Fall das ursprünglich aus *Aequorea victoria* stammende grün fluoreszierende Protein (GFP), markiert werden. Die Expression dieses unter der Kontrolle eines UAS-Promoters stehenden Marker-Proteins wird durch eine GAL4-Treiberlinie gesteuert, in diesem Fall durch OK107. Diese Linie exprimiert GAL4 in allen Loben der Pilzkörper, und ermöglicht so besonders gut eine Markierung von Klonen in dieser Struktur. In heterozygoten Zellen wird GAL4 durch GAL80 gehemmt, das von dem auf einem FRT-Chromosom liegenden Konstrukt unter Kontrolle des Tubulinpromoters exprimiert wird.

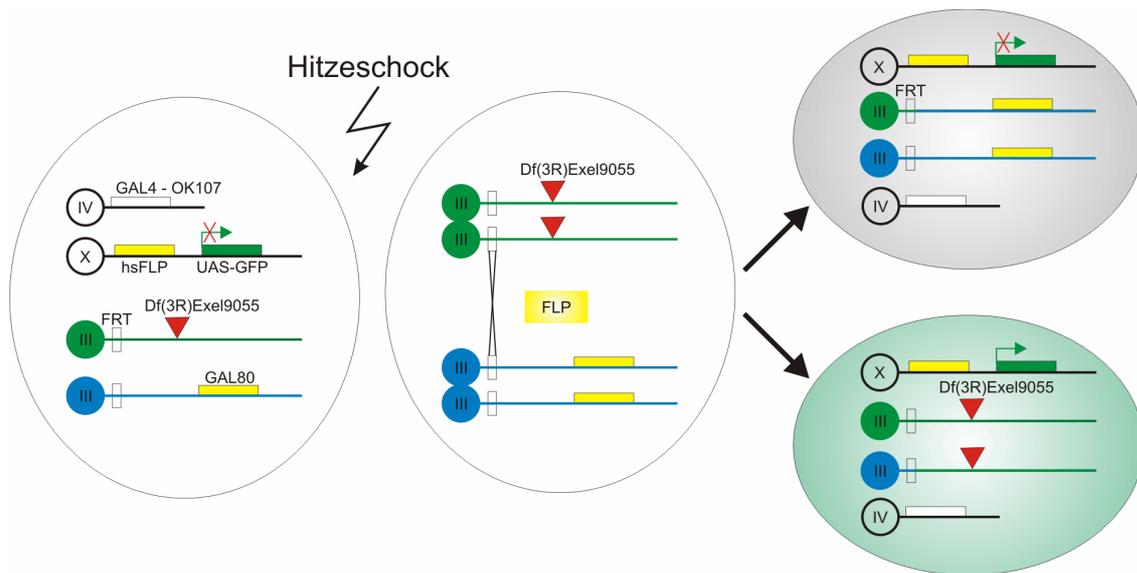


Abb. 22: Schematische Darstellung der Funktionsweise des MARCM-Systems. Um die Übersichtlichkeit der Abbildung zu erhöhen, sind die Chromosomen X und 4 jeweils nur einmal abgebildet.

Durch einen Hitzeschock wird die Flippase aktiviert, was bei der darauffolgenden Zellteilung eine mitotische Rekombination zwischen den beiden FRT-Chromosomen bewirkt. Dadurch entsteht eine Tochterzelle, welche zweimal das FRT82,GAL80 Chromosom enthält und eine, die homozygot für Df(3R)Exel9055 ist und in der GFP unter der Kontrolle von OK107:GAL4 exprimiert wird. Die Neuroblasten teilen sich asymmetrisch, das heißt bei jeder Mitose entsteht wiederum ein Neuroblast und eine Ganglionmutterzelle (GMZ), welche sich dann symmetrisch in zwei Neurone teilt. Da es sich bei der Flippase-basierten Rekombination um ein Zufallsereignis handelt, können Einzelzellklone (Rekombination in der GMZ), Zweizellklone (Rekombination im Neuroblasten, GMZ homozygot) oder Neuroblastenklone (neu entstandener Neuroblast homozygot) entstehen.

$$hsFLP, UAS : GFP ; \frac{FRT82B, TubP-GAL80}{TM3, Sb} ; GAL4 : OK107 \quad x \quad \frac{FRT82B Df(3R)Exel9055}{TM6B, Hu, Tb}$$

↓

$$F1 : \frac{hsFLP, UAS : GFP}{X/Y} ; \frac{FRT82B, TubP-GAL80}{FRT82B, Df(3R)Exel9055} ; \frac{GAL4 : OK107}{+}$$

Abb. 23: Kreuzungsschema für die Erzeugung von Pilzkörperklonen mit dem MARCM-System

Zunächst wurden, wie im Kreuzungsschema dargestellt, Weibchen des Genotyps hsFlp, UAS:GFP; FRT82B, TubP-GAL80/TM3, Sb;GAL4:OK107 und die FRT82,

Df(3R)Exel9055/TM6B Linie gekreuzt. 24 - 48 Stunden nach der Eiablage wurde durch einen Hitzeschock die Expression der Flippase induziert, die Gehirne adulter Fliegen des korrekten Genotyps präpariert, und nach der Antikörperfärbung gegen GFP am Konfokalmikroskop analysiert. Als Kontrolle wurde dieselbe Kreuzung mit Fliegen durchgeführt, deren drittes Chromosom bis auf das FRT82B-Element wildtypisch ist. Betrachtet man Einzelzellklone von Kontrolle und Df(3R)Exel9055, so sind keine Unterschiede bezüglich der Form und Länge des Axons, sowie der Zahl und Struktur der dendritischen Auswüchse festzustellen. (Abb. 24). Dies gilt sowohl für die hier gezeigten γ -Neurone, als auch für α/β -Neurone.

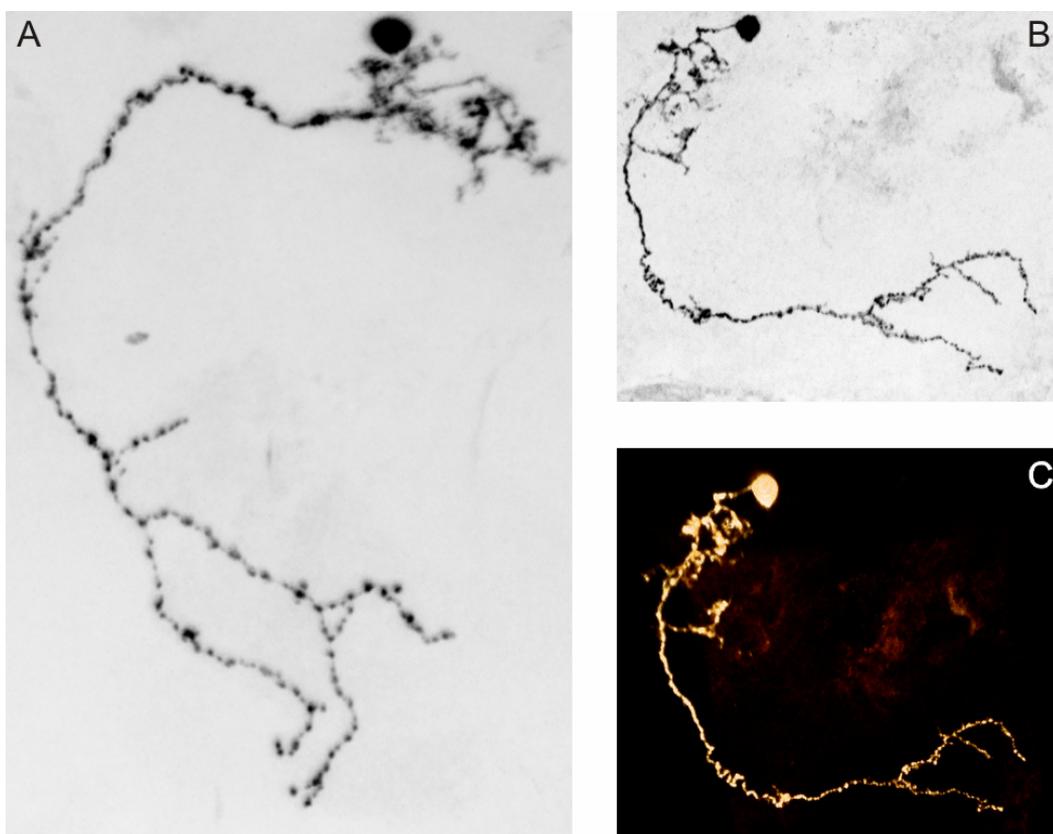


Abb. 24: Einzelzellklone von Kontroll-Fliegen und Df(3R)Exel9055 – Mosaiktieren. Tieren der Genotypen *hsFlp,UAS-GFP; FRT82B/FRT82B, TubGal80; OK107/+* (A) und *hsFlp,UAS-GFP; FRT82B, Df(3R)Exel9055/FRT82B, TubGal80; OK107/+* (B,C) wurde 24h nach der Eiablage ein Hitzeschock verabreicht, die Gehirne der Imagines wurden präpariert, gefärbt und am Konfokalmikroskop ausgewertet. Die Zellen sind als Projektion (A, B) und zusätzlich als 3D-Rekonstruktion (C) dargestellt.

Neuroblastenklone der Kontroll-Fliegen zeigen ebenfalls keinerlei Auffälligkeiten (Abb. 25A). Durch den frühen Induktionszeitpunkt der Klone bilden sich aus dem markierten Neuroblasten noch alle Arten von Neuronen (α/β , α'/β' und γ). Die einzelnen Loben sind deutlich zu sehen, bei der Anzahl der Zellen und Größe der Calyces können keine

Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen festgestellt werden. Ganz anders hingegen Klone, die homozygot für *Df(3R)Exel9055* sind (Abb. 25B). Diese Klone sind wesentlich kleiner, was offensichtlich auf eine geringere Anzahl von Kenyonzellen zurückzuführen ist. Ferner bestehen sie nur aus γ -Neuronen, die α/α' und β/β' Loben fehlen vollständig. Da die γ -Neurone die ersten Pilzkörperneurone sind die gebildet werden, und auch die Einzelzellklone überleben, kann Zelltod der ausdifferenzierten Neurone als Ursache für die verkleinerten Pilzkörper praktisch ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint *Df(3R)Exel9055* die Proliferation oder das Überleben der Neuroblasten zu verhindern.

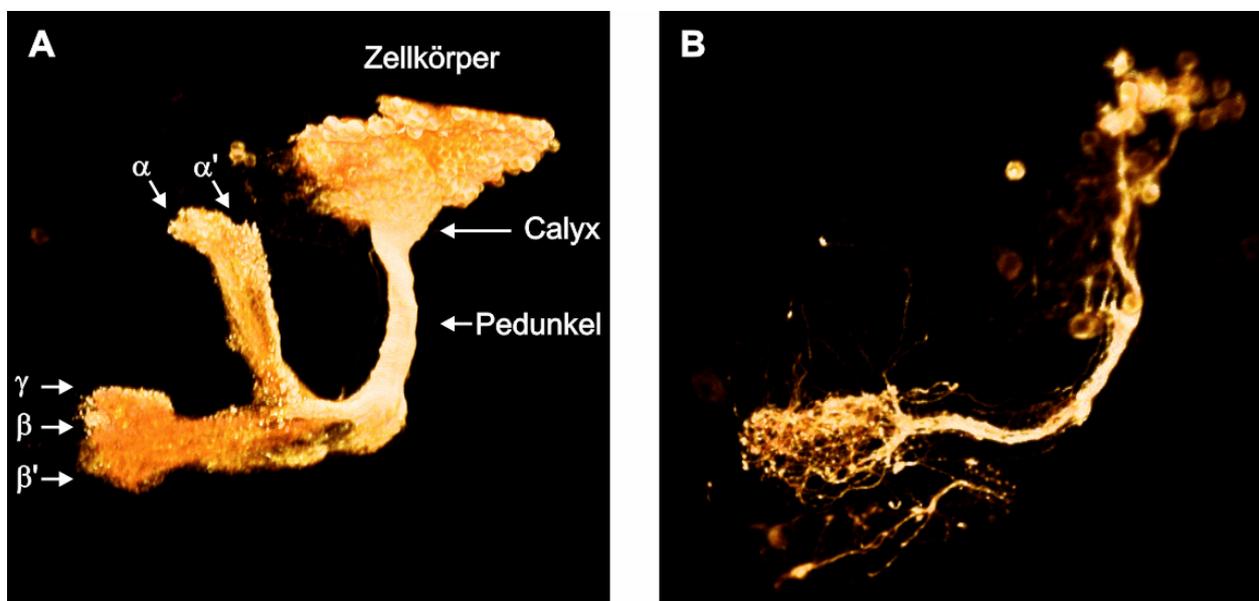


Abb. 25: Neuroblastenklone von Kontroll-Fliegen und *Df(3R)Exel9055* – Mosaiktieren. Fliegen der Genotypen *hsFlp,UAS-GFP; FRT82B/FRT82B, TubGal80; OK107/+* (A) und *hsFlp,UAS-GFP; FRT82B, Df(3R)Exel9055/FRT82B, TubGal80; OK107/+* (B) wurde 24h nach der Eiablage ein Hitzeschock verabreicht, die Gehirne der Imagines wurden präpariert, gefärbt, am Konfokalmikroskop ausgewertet und eine 3D-Rekonstruktion erstellt

3.4.2 Phänotypische Analyse von *Df(3R)Exel9055* in der Augenentwicklung

Neben den Pilzkörpern sollte zudem eine etwaige Funktion von *Dpak3* in der Augenentwicklung untersucht werden. Hierfür wurden wiederum genetische Mosaik erzeugt, allerdings wurde hierfür das EGUF/hid-System verwendet (Stowers & Schwarz, 1999). Bei diesem System werden die wird die Flippase unter der Kontrolle des *eyeless*-Promoters exprimiert, was dazu führt, daß während der gesamten Augenentwicklung Klone erzeugt werden. Ferner werden die Zellen, die homozygot für

Df(3R)Exel9055 sind nicht durch GFP oder ähnliches markiert. Vielmehr werden alle anderen Zellen, auch die heterozygoten, selektiv im Auge abgetötet. Dies geschieht durch die auf dem EGUF/hid Chromosom liegende rezessiv letale Mutation l(3)CL-R sowie ein Konstrukt, das in diesen Zellen unter der Kontrolle des GMR-Promoters das ebenfalls zellletale Protein Hid bildet.

$$ey-GAL4, UAS-FLP; \frac{FRT82B, GMR-Hid, l(3)CL-R}{TM6B, Hu, Tb} \quad x \quad w; \frac{FRT82B, Df(3R)Exel9055}{TM6B, Hu, Tb}$$

↓

$$F1: \frac{ey-GAL4, UAS-FLP}{II}; \frac{FRT82B, GMR-Hid, l(3)CL-R}{FRT82B Df(3R)Exel9055}$$

Abb. 26: Kreuzungsschema für die Erzeugung von Klonen im Komplexauge mit dem EGUF/hid-System.

Als Kontrolle wurde wiederum ein ansonsten wildtypisches FRT82B Chromosom verwendet. Die Augen der Kontrolltiere sehen wildtypisch aus, lediglich vereinzelt lassen sich einzelne raue Stellen erkennen. Die Kombination EGUF/hid mit Df(3R)Exel9055 hingegen sorgt für einen fast vollständigen Verlust der Augen, in den verbliebenen Resten sind keine Photorezeptorzellen mehr zu erkennen.

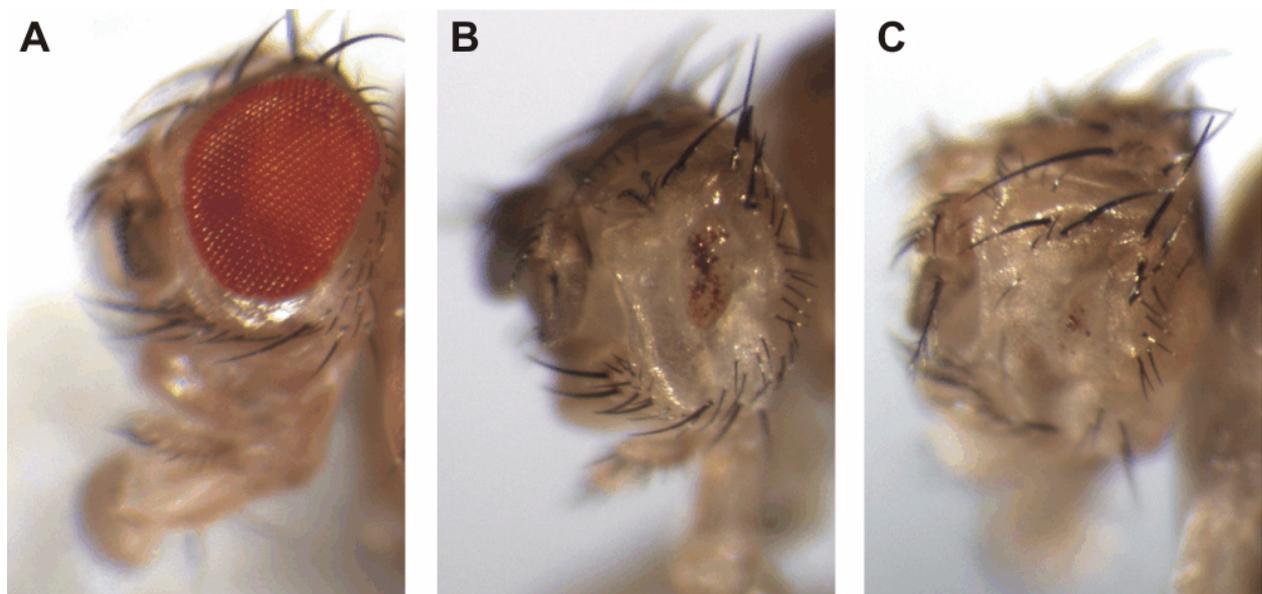


Abb. 27: Augenmosaiken von Df(3R)Exel9055. Das EGUF/hid-System wurde verwendet, um für die Deletion Df(3R)Exel9055 homozygote Augen zu erzeugen (B, C) Als Kontrolle wurden Mosaiken mit einem wildtypischen FRT-Chromosom erzeugt (A).

Die selben Experimente wurden auch mit auf FRT-Chromosomen rekombinierten P{XP}d02472, PBac{RB}e00329 und P{GawB}NP4472 durchgeführt. Dabei konnte der durch Df(3R)Exel9055 erzeugte Phänotyp nicht reproduziert werden, vielmehr sehen

die Augen, bis auf einige kleine Unregelmäßigkeiten, fast vollständig wildtypisch aus. Der Verlust der Augen durch Df(3R)Exel9055 kann auch nicht durch gleichzeitige Expression von DPAK3 durch ein UAS:Myc-DPAK3 Konstrukt gerettet werden. Auch keines der getesteten genomischen Rettungskonstrukte ist in der Lage, diesen Phänotyp zu retten. Mit der neu erzeugten, molekular definierte Defizienz Df(3R)BTM1 und dem EGUF-System hergestellte Klone im Auge zeigen zwar strukturelle Defekte, jedoch keinen offensichtlichen Verlust von Ommatidien. Diese Ergebnisse lassen kaum einen Zweifel daran, daß die mit Df(3R)Exel9055 erzeugten Phänotypen nicht auf dem Verlust der Funktion von *Dpak3*, sondern auf einer anderen, nicht näher charakterisierten Mutation auf diesem Chromosom beruhen.

3.5 Herstellung neuer Defizienzen

Da es sich bei den vorhandenen P-Elementinsertionen in *Dpak3* vermutlich nur hypomorphe Allele unterschiedlicher Stärke handelt und bei der Deletion Df(3R)Exel9055 das Vorhandensein einer weiteren Mutation aufgrund der phänotypischen Analyse und der Rettungsexperimente nie ausgeschlossen werden konnte, war die Erzeugung eines definierten Nullallels erforderlich. Dieses könnte zum Beispiel durch eine "Jump-out" Mutagenese, das heißt das unpräzise Ausschneiden eines in *Dpak3* inserierten P-Elements, hergestellt werden.

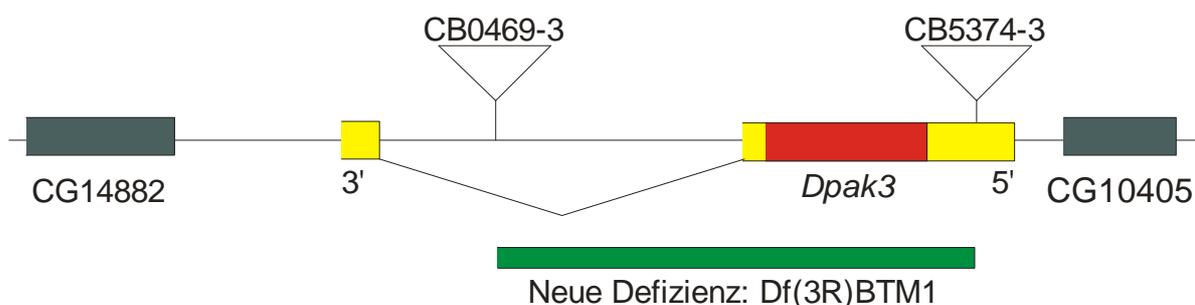


Abb. 28: Schematische Darstellung der neu herzustellenden Defizienz, Df(3R)BTM1 mit den beiden dazu verwendeten P-Elementen P{RS}CB-0469-3 und P{RS}CB-5374-3. Die kodierende Region ist rot und die nicht kodierenden Sequenzen der mRNA gelb dargestellt.

Eine andere, weitaus präzisere Methode ist die Herstellung einer kleinen Deletion zwischen zwei FRT-Rekombinaseerkennungstellen tragenden mobilen genetischen Elementen, welche sich *in trans* auf homologen Chromosomen befinden. (Golic & Golic, 1996). Es existieren zwei Sammlungen solcher Fliegenlinien, die DrosDel-Kollektion und die Exelixis-Kollektion, aus welcher auch Df(3R)Exel9055 erzeugt wurde (Ryder et

al., 2004, Ryder et al., 2007, Thibault et al., 2004, Parks et al., 2004). Insgesamt sind fünf solcher P- und Piggybac-Elemente in *Dpak3* inseriert. Die Suche in der Datenbank des DrosDel-Projektes ergab die Möglichkeit zur Herstellung einer weiteren, von den Exelaxis-Insertionen unabhängigen Deletion, dort beschrieben als FDD-0500018, die ebenso wie Df(3R)Exel9055 das komplette *Dpak3*-Leseraster entfernt (Abb. 28, http://www.drosdel.org.uk/fdd/del_hunter.php).

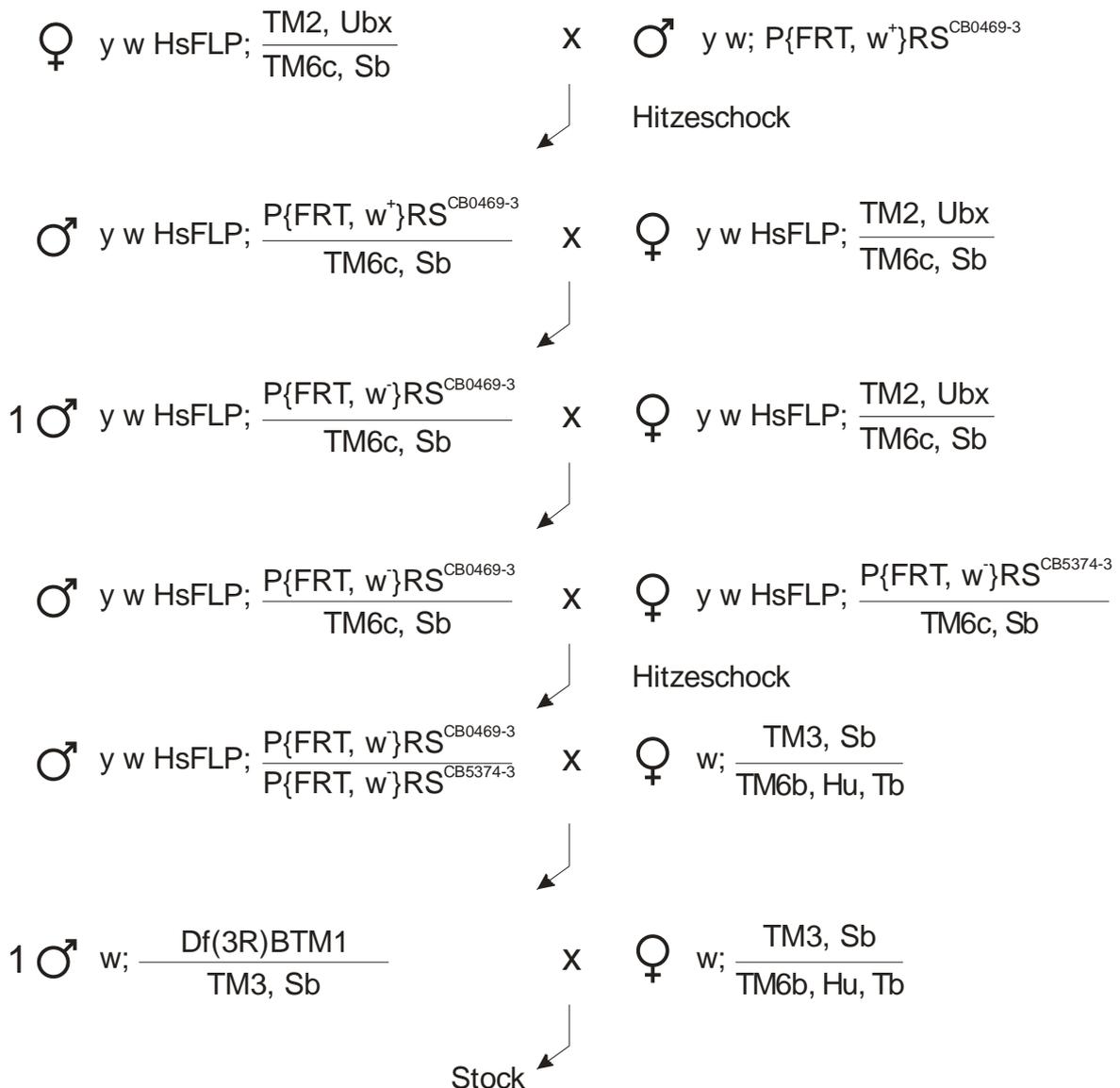
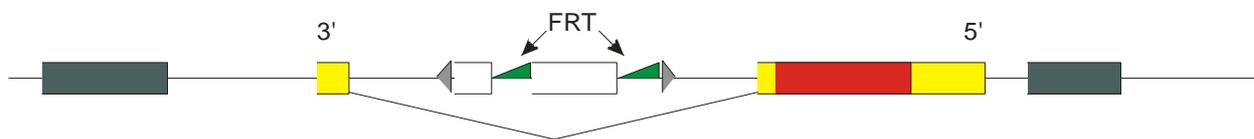


Abb. 29: Kreuzungsschema zur Herstellung der neuen Defizienz

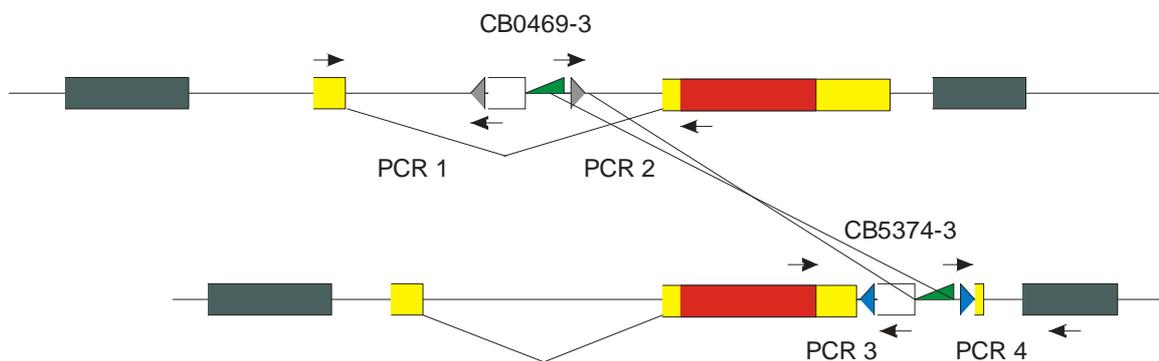
Die beiden zur Erzeugung dieser im folgenden Df(3R)BTM1 genannten Defizienz erforderlichen P-Elemente P{RS}CB-0469-3 und P{RS}CB-5374-3 stammen aus der DrosDel-Kollektion (Ryder et al., 2004). Beide P-Elemente wurden zunächst durch PCR mit jeweils einem internen und einem externen Oligonukleotidprimer auf korrekte

Lokalisierung überprüft. Eine Besonderheit der Linien aus der DrosDel-Kollektion ist, daß sie mit zwei unterschiedlichen P-Elementen hergestellt wurden. Beide enthalten das *mini-white* Konstrukt, das aus zwei Exonen besteht. In einem Konstrukt ist das 5'-Exon von FRT-Stellen flankiert und wird im ersten Schritt der Herstellung der Defizienz entfernt, im anderen das 3'-Exon. Auf diese Weise kann im Fall einer erfolgreichen Rekombination zwischen einem 5' und einem 3' Element wieder ein funktionsfähiges *mini-white* entstehen und die Fliegen mit der neu erzeugten Deletion sind durch die rote Augenfarbe leicht zu erkennen. Da die hier verwendeten Insertionen beide von P-Elementen des selben Typs stammen, kann diese Technik leider hier nicht angewandt werden.

A



B



C

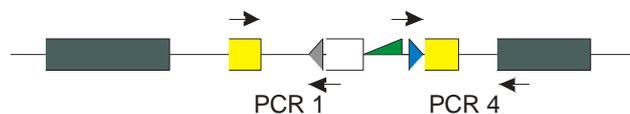


Abb. 30: Schematische Darstellung des Herstellungsablaufs der Defizienz *Df(3R)BTM1*

A) Entfernung der *mini-white* Kassette zusammen mit einer der beiden FRT-Erkennungsstellen. Zur Erhöhung der Übersichtlichkeit ist nur *P{RS}CB-0469-3* dargestellt. B) Ablauf der mitotischen Rekombination. C) Das entstandene Hybrid-P-Element. In B) und C) sind die für die vier zur Verifikation der Deletion durchzuführenden PCRs nötigen Primer eingezeichnet

Zunächst wurde in beiden Linien das *white*-Exon entfernt (Kreuzungsschema Abb. 29, Schematische Darstellung Abb. 30). Dies geschah durch Kreuzung mit einer Linie, die die Expression der FLP-Rekombinase unter Kontrolle des Hitzeschockpromotors

erlaubt. 48 bis 72 Stunden nach der Eiablage wurden den Larven eine Stunde bei 37 °C gehalten ein Hitzeschock gegeben (Abb. 30A). Die zunächst rotäugigen Männchen wurden wiederum mit Weibchen der FLP-Rekombinase Donor-Linie rückgekreuzt. Aus den so entstandenen weißäugigen Fliegen wurden Linien etabliert, die sowohl eines der beiden P-Elemente als auch die Rekombinase enthalten und diese wurden miteinander gekreuzt. In den so entstandenen transheterozygoten Fliegen wurde durch erneuten Hitzeschock die Rekombination zwischen den beiden P-Elementen eingeleitet (Abb. 30B). Die so erzeugten Defizienzen wurden über TM3 Balancer-Chromosomen balanciert und durch vier PCRs mit jeweils einem im P-Element bindenden und einem in der umgebenden genomischen DNS bindenden Primer verifiziert (Abb. 30C). Die verwendeten Primerpaare waren DPAK3-Resc2-For / PRY4 (PCR 1), PLAC1 / ORF-3'-out (PCR 2), PRY4 / ORF-5'-out (PCR 3) und PLAC1 / DPAK3-Resc2-Rev (PCR 4). Dabei entstand ein neues P-Element aus dem 5'-Ende von P{RS}CB-0469-3 und dem 3'-Ende von P{RS}CB-5374-3.

Die erhaltenen Fliegenlinien wurden durch PCR charakterisiert (PCR 1-4, Abb. 30B, C). Als mögliche Kandidaten wurden die Linien gewertet, die Banden bei den beiden nach außen gerichteten PCR-Reaktionen (PCR 1 & 4), nicht aber bei den nach innen gerichteten PCR-Reaktionen (PCR 2 & 3) zeigten. Wie Abbildung 31 zeigt, wurden 4 solcher Linien erhalten (11, 16, 18, 29).

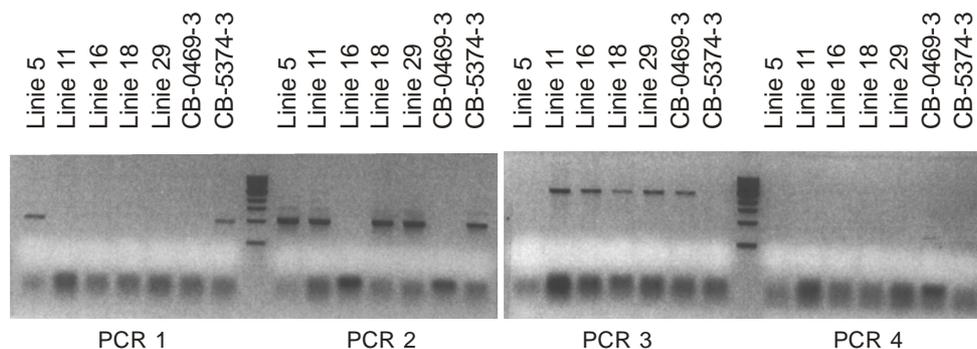


Abb. 31: Ergebnis der PCR zur Verifikation der neuen Deletion. Als Primer wurden DPAK3-Resc2-For / PRY4 (PCR 1), PLAC1 / ORF-3'-out (PCR 2), PRY4 / ORF-5'-out (PCR 3) und PLAC1 / DPAK3-Resc2-Rev (PCR 4) verwendet. Gezeigt sind die vier erfolgreich hergestellten Rekombinanten, als Kontrollen wurden die ursprünglich verwendeten P-Elemente sowie eine Linie, in der die Rekombination nicht erfolgreich war (5) mit auf das Agarosegel aufgetragen.

Die neu erzeugten Defizienzen wurden anschließend auf Komplementation mit den vorhandenen *Dpak3*-Allelen getestet. Wie die Tabelle 2 zeigt, sind die neu hergestellten Defizienzen über allen letalen und semiletalen *Dpak3*-Allelen nicht lebensfähig.

Lediglich der Genotyp $P\{Mae-UAS-6-11\}pak3 / Df(3R)BTM1$ ist lebensfähig.

Tabelle 2: Komplementationsanalyse von $Df(3R)BTM1$

DPAK3-Allel	<i>Df(3R)BTM1-11</i>	<i>Df(3R)BTM1-18</i>	<i>Df(3R)BTM1-29</i>
<i>Df(3R)Exel9055</i>	-	-	-
$P\{pGawB\}NP4472$	-	-	-
$P\{XP\}d02472$	-	-	-
$PBac\{RB\}e00329$	-	-	-
$P\{Mae-UAS-6-11\}pak3$	+	+	+
<i>Df(3R)BTM1-11</i>	-	-	-
<i>Df(3R)BTM1-18</i>	-	-	-
<i>Df(3R)BTM1-29</i>	-	-	-

+ : *in trans* lebensfähig / - : *in trans* nicht lebensfähig

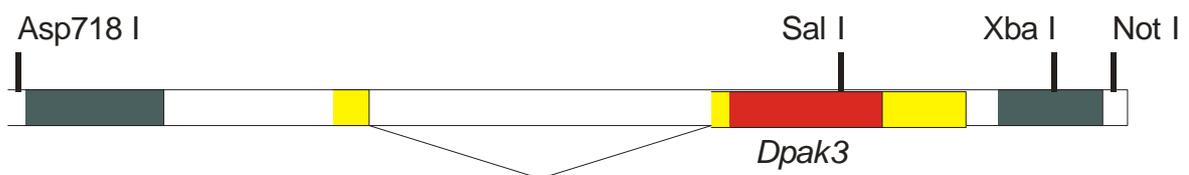
3. 6 Herstellung genomischer Rettungskonstrukte

Um zu untersuchen, ob die bei der Analyse von $Df(3R)Exel9055$ beobachteten Phänotypen durch den Verlust der Genfunktion von *Dpak3* und nicht durch eventuelle weitere auf dem Chromosom enthaltene Mutationen hervorgerufen werden, sollten genomische Rettungskonstrukte eingesetzt werden.

Zunächst wurde durch BLAST-Suche in der Genbank-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) ein BAC-Klon ermittelt (BAC01H23), der die Umgebung des *Dpak3*-Gens enthielt. Durch einen Not I / Asp718 I Restriktionsverdau konnte ein 12 kB großes Fragment isoliert werden, das neben dem *Dpak3*-Gen auch noch das 3' benachbarte Gen CG14882 sowie einen Großteil des 5' benachbarten CG10405 enthielt. Dieses Fragment wurde zunächst in einen pBluescript II SK – Vektor subkloniert. Für das nicht Epitop-markierte Konstrukt wurde dieses Fragment direkt in den pP[W8] Transformationsvektor subkloniert. Das Leseraster wurde sequenziert, um eventuelle Mutationen auszuschließen. Für die Herstellung eines genomischen Konstrukts, welches die Expression eines HA-Epitop-DPAK3-Fusionsproteins ermöglicht, wurde zunächst durch Linker-PCR mit den Primern DPAK3-Resc2-Rev und DPAK3-Rev die Promoterregion und das Leseraster amplifiziert und als Xba I – Sal I Fragment wiederum in pBluescript II SK kloniert. In diesem Fragment

wurde durch Mutagenese eine Nsi I Schnittstelle am Startcodon eingeführt. Diese wurde zum Einfügen des HA-Epitops durch synthetische Oligonukleotide benutzt. Anschließend wurde die Promoterregion des Ursprungskonstrukts durch dieses Fragment ersetzt, die Sequenz auf Fehler überprüft und das komplette genomische Konstrukt in pP[W8] subkloniert (Abb. 28).

A



B

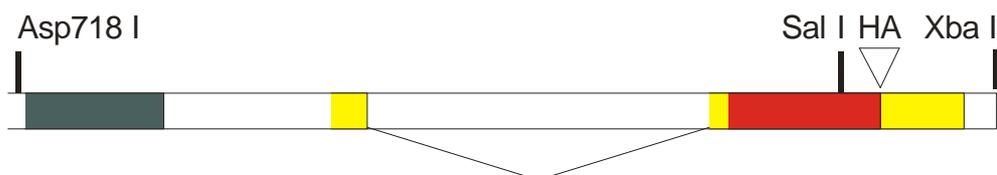


Abb. 32: Schematische Übersicht der hergestellten Rettungskonstrukte.

A) Wildtypisches Rettungskonstrukt, subkloniert aus BAC01H23

B) Rettungskonstrukt zur Expression von DPAK3 mit N-terminal fusioniertem HA-Epitop

Die kodierende Sequenz von *Dpak3* ist rot dargestellt, die nicht kodierenden Bereiche der mRNA gelb.

Für beide Konstrukte wurden durch Keimbahntransformation transgene Linien etabliert. Insgesamt wurden sechs transgene Linien, vier für das HA-DPAK3 Rettungskonstrukt (1M, 2M, 3F, 4F) und zwei für die wildtypischen DPAK3 Konstrukte (WT1, WT2) erhalten. Mit diesen wurde getestet, ob sie die Letalität der verschiedenen *Dpak3*-Allele retten. Das heißt es wurde untersucht, ob Fliegen, welche zusätzlich zu einem der verschiedenen Rettungskonstrukte verschiedene *Dpak3*-Allele homozygot oder *in trans* zueinander tragen, lebensfähig sind. Wie die Tabelle zeigt, werden alle getesteten Allelkombinationen zumindest teilweise gerettet. Lediglich die Letalität der Df(3R)Exel9055 kann nicht in homozygotem Zustand, wohl aber *in trans* zu den anderen getesteten *Dpak3*-Allelen gerettet werden. Dies bestätigt die Vermutung, daß Df(3R)Exel9055 eine zusätzliche Letalmutation enthält und somit nicht zu gebrauchen ist. Die Letalität der neu erzeugten Defizienz Df(3R)BTM1 hingegen wird gerettet, aber auch hier finden sich allerdings nur wenige homozygote adulte Fliegen. Dies spricht

dafür, daß mit Df(3R)BTM1 nun endlich eine saubere Deletion des *Dpak3*-Gens zur Verfügung steht, was eine aussagekräftige phänotypische Analyse ermöglicht.

Tabelle: Funktion der Rettungskonstrukte:

Rettungskonstrukt	HA 1M (X)	HA 3F (X)	HA 4F (X)	WT 1 (II)	WT 2 (III)
Dpak3 Allele					
Df(3R)Exel9055	-	-	-	-	-
P{GawB}NP4472	+	+	+	+	N.T.
Df(3R)BTM1	+	+	+	N.T.	N.T.
Df(3R)Exel9055 / P{GawB}NP4472	N.T.	N.T.	N.T.	+	+
Df(3R)Exel9055 / P{XP}d02472	N.T.	N.T.	N.T.	+	+
Df(3R)Exel9055 / PBac{RB}e00329	N.T.	N.T.	N.T.	+	+
P{GawB}NP4472 P{XP}d02472	N.T.	N.T.	N.T.	+	N.T.
P{GawB}NP4472 PBac{RB}e00329	N.T.	N.T.	N.T.	+	N.T.

+: lebensfähig / - : letal / N.T.: nicht getestet

3.7 Redundanz von DPAK1 und DPAK3 in der Augenentwicklung von *Drosophila*

Obwohl viele Funktionen von PAK-Proteinen im Nervensystem beschrieben sind, wurde in den meisten Studien nur jeweils die Funktion einer p21-aktivierten Kinase untersucht. Nur in wenigen Untersuchungen wurde gezeigt, daß mehrere PAK-Proteine an denselben intrazellulären Prozessen beteiligt sind. So konnte gezeigt werden, daß PAK1 und PAK3 beide in kultivierten Hippocampus-Neuronen von Ratten die Bildung von dendritischen Fortsätzen und Synapsen zu bewirken können (Zhang et al., 2005). In *Caenorhabditis elegans* wurde entdeckt, daß das DPAK1 Homolog PAK1 und das zu DPAK3 verwandte MAX-2 Protein bei der Wanderung von P-Zell Neuroblasten und der Wegfindung von Motorneuronen redundant sind (Lucanic et al., 2006). Dies legte die

Vermutung nahe, daß DPAK1 und DPAK3 ebenfalls teilweise redundante Funktionen haben könnten. Mehrere Studien konnten zeigen, daß DPAK1 eine zentrale Rolle in axonalen Wegfindungsprozessen wie zum Beispiel in der Innervierung der Antennalloben durch die Axone der olfaktorischen Rezeptorzellen spielt (Ang et al., 2003). Verlust der Genfunktion von *Dpak1* führt außerdem zu einem fehlerhaften Projektionsmuster der Axone der Photorezeptorzellen in den optischen Loben (Hing et al., 1999, Newsome et al., 2000). *Dpak1* Mutanten sind homozygot letal. Ein äußerlich oder morphologisch sichtbarer Defekt in der Augenentwicklung durch Verlust der *Dpak1* Funktion wurde jedoch nicht beobachtet (Hing et al., 1999). Verlust der Genfunktion von *mbt* führt zu Defekten in der Differenzierung der Photorezeptorzellen (Melzig et al., 1998, Schneeberger & Raabe, 2003, Menzel et al., 2007). Für die hypomorphen *Dpak3*-Allele konnte kein äußerlich sichtbarer Phänotyp im Auge beobachtet werden. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, daß die beiden Gruppe 1 PAKs möglicherweise in der Augenentwicklung in ihrer Funktion redundant sein könnten. Um dies zu überprüfen wurden unter Verwendung der MARCM und EGUF/hid Systeme genetische Mosaike im Auge und im Pilzkörper erzeugt, um die Phänotypen der Einzel- und Doppelmutanten von *Dpak1* und *Dpak3* zu vergleichen. Im verwendeten Allel *Dpak1*¹⁴ ist Tryptophan 111 durch ein Stoppcodon ersetzt, ein funktionsfähiges DPAK1 Protein kann so nicht mehr gebildet werden (Newsome et al., 2000). Da Df(3R)BTM1 zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht zur Verfügung stand, wurde das letale Allel *Dpak3*^{NP4472} verwendet.

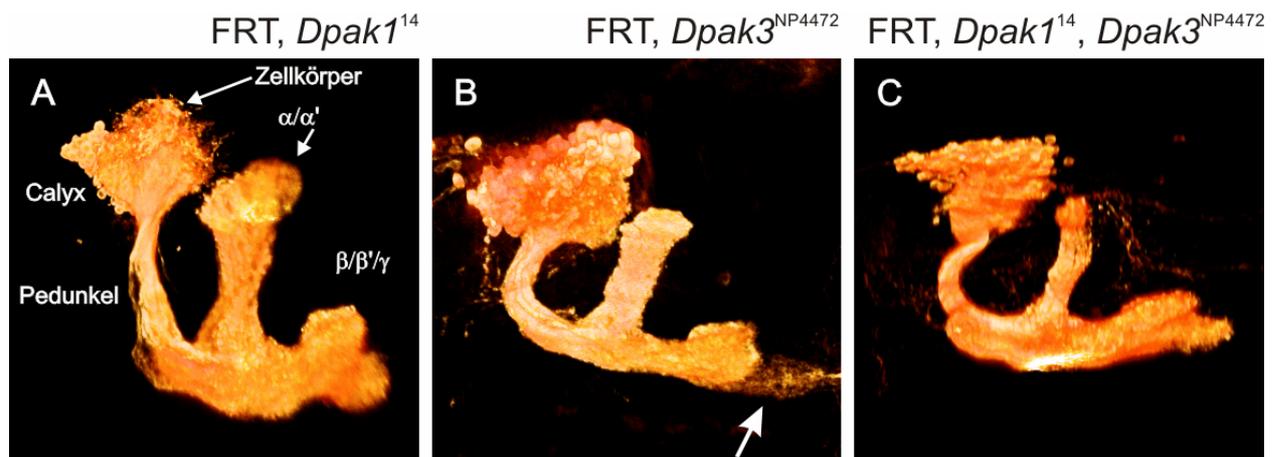


Abb. 33: Neuroblastenklone von *Dpak1* und *Dpak3*

Mit Hilfe des MARCM-Systems wurden Neuroblastenklone für *Dpak1*¹⁴ (A), *Dpak3*^{NP4472} (B) und die Doppelmutante (C) erzeugt. Der Hitzeschock erfolgte im ersten Larvenstadium, die Gehirne der Adulten fliegen wurden präpariert, mit anti-GFP Antikörper und fluoreszenzmarkiertem anti-Kaninchen-Cy3 Antikörper gefärbt und am Konfokalmikroskop analysiert. Die Mittellinie überquerende Axone des medialen Lobensystems sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (B).

Die MARCM Analyse von im ersten Larvenstadium erzeugten Neuroblastenklonen in den Pilzkörpern adulter Fliegen läßt keine deutlichen Effekte der PAK Kinasen auf die Pilzkörperentwicklung erkennen. Klone die homozygot für $FRT82B, Dpak3^{NP4472}$ oder $FRT82B, Dpak1^{14}$ sind, unterscheiden sich meist nicht von wildtypischen Klonen (Abb. 25A, 33A, B). Gleiches gilt auch für die Rekombinationschromosomen, die beide Allele tragen (Abb. 33C). Lediglich vereinzelt kann man ein Auswachsen von einigen wenigen Axonen des medialen Lobensystemes über die Mittellinie beobachten. (Abb. 33B).

Um eine mögliche gemeinsame Funktion von *Dpak1* und *Dpak3* in der Augenentwicklung zu untersuchen, wurden mit Hilfe des EGUF/hid Systems Mosaike im Auge erzeugt. Die Fliegen wurden fixiert und die Phänotypen am Rasterelektronenmikroskop ausgewertet.

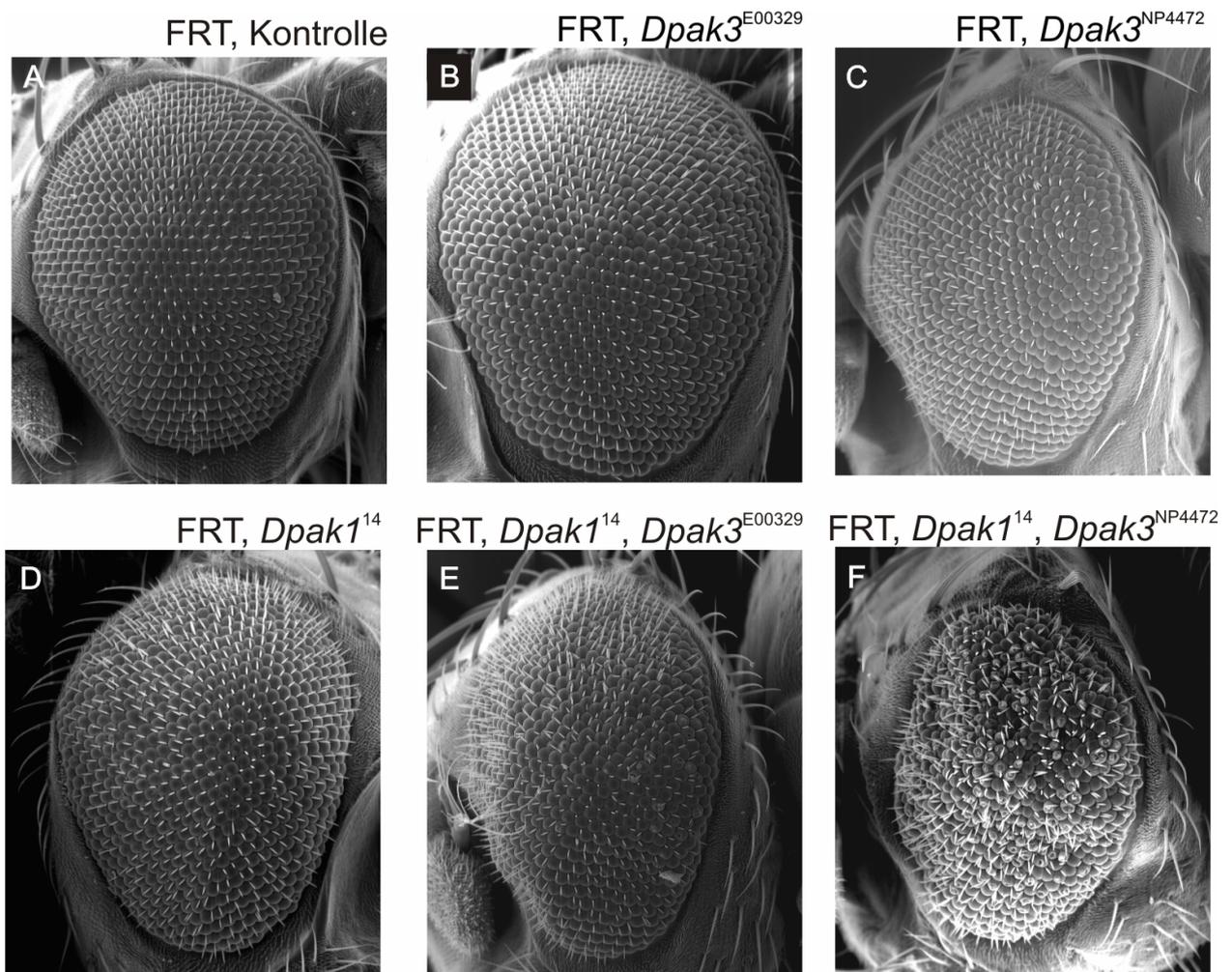


Abb. 34: Augenmosaike von *Dpak1*- und *Dpak3*-Allelen. Das EGUF-System wurde verwendet, um Fliegen mit für die über den Bildern angegebenen Allele homozygote Augen zu erzeugen. Diese wurden fixiert, getrocknet, bedampft und am Raster-Elektronenmikroskop ausgewertet.

Die Augen der Fliegen der Kontrollgruppe, in denen die Mosaik durch Kreuzung der EGUF/hid-Fliegen mit ansonsten wildtypischen FRT82B erzeugt wurden, zeigen fast keine Unregelmäßigkeiten (Abb. 34A). Die Einzelmutanten *Dpak1*¹⁴, *Dpak3*^{e00329} und *Dpak3*^{NP4472} zeigen leichte Defekte wie zum Beispiel einzelne fehlende oder duplizierte Borsten oder einzelne ungleichmäßig geformte Ommatidien (Abb. 34B, C, D). Diese sind zumeist nur unter dem Elektronenmikroskop und nur höchst selten bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Augen sichtbar. Die Doppelmutanten jedoch zeigen stärkere Defekte. Die Gesamtstruktur der Augen ist merklich gestört, die Ommatidien sind mißgestaltet, ihre Größe extrem variabel und zudem platzen sie auf. Die Kombination *Dpak1*¹⁴, *Dpak3*^{NP4472} zeigt massivere Defekte als *Dpak1*¹⁴, *Dpak3*^{e00329} (Abb. 34E, F). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß durch das *Dpak3*^{NP4472} Allel weniger bis gar kein DPAK3 Protein mehr gebildet wird, während in Fliegen, die das semiletale *Dpak3*^{e00329} tragen vermutlich noch eine geringe Menge des DPAK3 Proteins gebildet wird. Zusätzlich wurden Tangentialschnitte der Augen angefertigt. Die Augen der Kontrollfliegen zeigen keine Unregelmäßigkeiten, die Ommatidien und Rhabdomere der Photorezeptorzellen sind regelmäßig angeordnet (Abb. 35A).

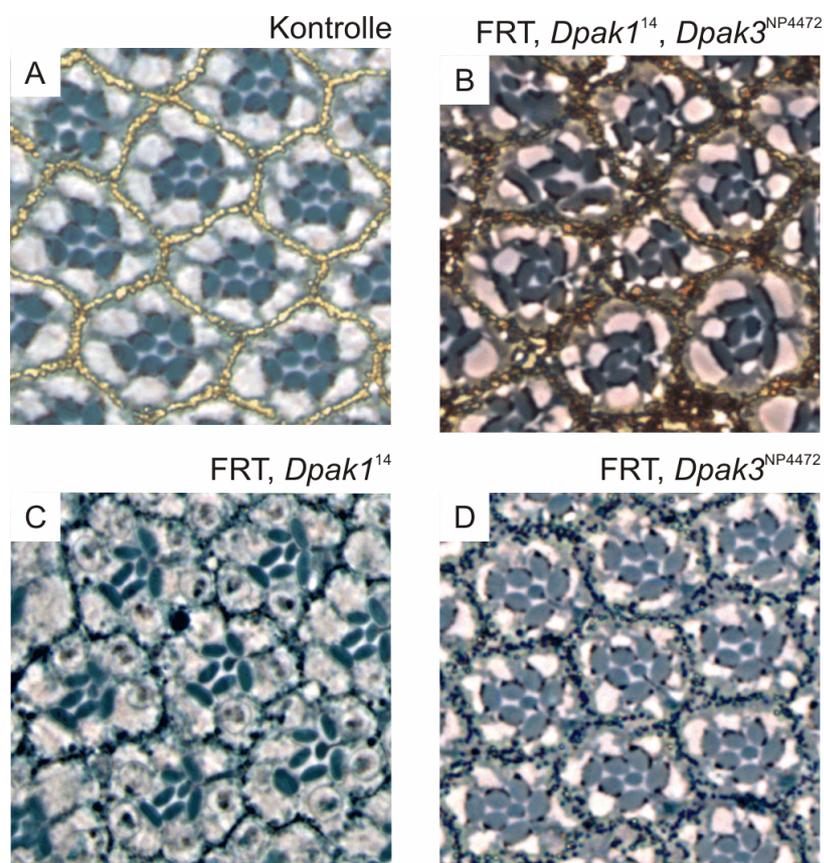


Abb. 35: Semidünnschnitte von *Dpak1*- und *Dpak3* Mosaiken. Genetische Mosaik der über den jeweiligen Bildern angegebenen Genotypen wurden wie beschrieben mit Hilfe des EGUF/hid Systems erzeugt, die adulten Fliegen fixiert, in EPON eingebettet und Tangentialschnitte der Augen hergestellt. Diese wurden mit Toluidinblau / Borax gefärbt und am Phasenkontrastmikroskop ausgewertet.

In den untersuchten Einzelmutanten *Dpak1*¹⁴ und *Dpak3*^{NP4472} kann ebenfalls kein offensichtlicher Defekt gefunden werden (Abb. 35C, D). Lediglich die Rhabdomere der *Dpak1*¹⁴-Fliegen zeigen im Querschnitt eine im Vergleich mit der Kontrolle ovalere Form. Die für beide PAK-Allele homozygot mutanten Augen hingegen weisen etliche Defekte auf (Abb. 35B). Die Ommatidien sind ungleichmäßig groß, die Rhabdomere der Photorezeptorzellen unregelmäßig angeordnet und extrem variabel in ihrer Form. Zudem scheinen immer wieder Photorezeptorzellen zu fehlen. Auch die Anordnung der zwischen den einzelnen Ommatidien befindlichen Pigmentzellen ist gestört, und es entsteht der Eindruck, daß eventuell zu viele dieser Zellen vorhanden sind. Eine genaue Analyse steht noch aus. Insbesondere ist die Frage zu klären, ob durch den Verlust der Genfunktion beider Gruppe 1 PAKs die Rekrutierung, Determinierung, Zellmorphogenese, das Überleben der Zellen oder gar mehrere dieser Prozesse gestört werden.

4. Diskussion

4.1 DPAK3 und seine Homologen bilden eine eigene Untergruppe der p21-aktivierten Kinasen

Die vergleichende Sequenzanalyse der PAK-Proteine aus den Spezies, deren Genome bislang erfolgreich sequenziert wurden, zeigt, daß DPAK3 und seine Homologen aus anderen Insekten sowie dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* eine eigene Untergruppe innerhalb der Gruppe 1 der p21-aktivierten Kinasen bilden, die Gruppe 1* (Mentzel & Raabe, 2005, Abb. 1). Mitglieder dieser Gruppe konnten bislang nur in den Genomen von Nematoden oder Arthropoden, nicht jedoch in Vertebraten, nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Gruppe 1 PAK-Proteinen fehlen DPAK3 und allen anderen bislang bekannten Gruppe 1* PAK-Proteine die beiden Proteinbindungsstellen für die SH2/SH3-Domänenproteine Nck und Grb2 beziehungsweise die homologen Proteine Dock und Drk aus *Drosophila* am N-Terminus des Proteins (Abb. 2, Galisteo et al., 1996, Bokoch et al., 1996, Puto et al., 2003, Hing et al., 1999). Diese Region fehlt auch in allen bislang bekannten Gruppe 2 PAK-Proteinen, so daß DPAK3 und seine Homologen zumindest strukturell eine gewisse Ähnlichkeit mit diesen Proteinen aufweisen (Jaffer & Chernoff, 2002). DPAK3 interagiert präferentiell mit den kleinen GTPasen Rac1, Rac2 und, etwas schwächer, mit Cdc42 (Abb. 4), jedoch bindet es nicht an Rho-A, Rho-L oder Mtl. Es wird nur GTP beladenes Rac oder Cdc42, nicht jedoch die inaktive, GDP-gebundene Form gebunden (Abb. 5). Alle bisher untersuchten Gruppe 1 PAKs wie humanes PAK1-3 und DPAK1 binden ebenfalls GTP-gebundenes Rac und Cdc42, während Gruppe 2 PAKs wie PAK4-6 oder Mbt präferentiell Cdc42 binden (Manser et al., 1994, Harden et al., 1996, Dan et al., 2002, Lee et al., 2002, Pandey et al., 2002, Schneeberger & Raabe, 2003).

DPAK3 wird durch die Interaktion mit den kleinen G-Proteinen aktiviert und ist in der Lage, Dimere zu bilden (Abb. 6, 7). Gruppe 2 PAK Proteine wie PAK4-6 und Mbt werden durch die Interaktion mit kleinen G-Proteinen nicht aktiviert und besitzen auch nicht die Fähigkeit zur Dimerisierung. Die Gruppe 1 PAK Proteine liegen im inaktiven Zustand als Dimer vor, in dem die autoinhibitorische Domäne eines PAK-Moleküls die Kinase-Domäne des anderen PAK-Moleküls blockiert (Lei et al., 2000, Buchwald et al., 2001, Parrini et al., 2002, Conder et al., 2004). Durch die Interaktion mit Rac oder

Cdc42 wird diese Bindung aufgelöst und das Protein geht in eine aktive Konformation über. Die hier durch die Immunkopräzipitation von HA-DPAK3 und Myc-DPAK3 gezeigte Fähigkeit von DPAK3 zur Dimerisierung legt nahe, daß DPAK3 eine funktionsfähige autoinhibitorische Domäne besitzt und durch denselben Mechanismus aktiviert wird (Abb. 7). Gestützt wird diese Hypothese dadurch, daß DPAK3^{H19,21L}, welches aufgrund der Substitution der zwei konservierten Histidine in der CRIB-Region nicht mehr an Rac oder Cdc42 binden, aber auch keine Dimere mehr bilden kann, stets eine gesteigerte Kinaseaktivität aufweist (Abb. 6). Betrachtet man nur die hier durchgeführte biochemische Analyse, so wäre DPAK3 den Gruppe 1 PAK-Proteinen zuzuordnen. In Kombination mit den Ergebnissen der Sequenzanalyse ergibt sich jedoch, daß die Gruppe 1* PAK Proteine eine eigene Untergruppe innerhalb der PAK-Proteine bilden. Vermutlich war diese Untergruppe in den gemeinsamen Vorfahren von Vertebraten, Nematoden und Arthropoden vorhanden, ist in den Vertebraten jedoch verloren gegangen und die Funktionen der Gruppe 1* PAK-Proteine wurden durch klassische Gruppe 1 PAKs übernommen.

4.2 CK2 β als ein neuer Regulator von p21-aktivierten Kinasen in *Drosophila*

Anders als in Säugern, die nur ein CK2 β -Protein besitzen, kodiert das *Drosophila* sieben CK2 β Proteine: CK2 β^l , CK2 β^{testes} und fünf Isoformen von CK2 β (Bidwai et al., 1999, Kalmykova et al., 2002, Jauch et al., 2006).

DPAK3 ist in der Lage, mit allen *Drosophila* CK2 β Untereinheiten zu interagieren und seine Kinaseaktivität wird *in vitro* durch diese Interaktion reduziert (Abb. 11, 12, 14, 15). Auch die anderen *Drosophila* PAK-Proteine DPAK3 und Mbt interagieren mit den verschiedenen CK2 β Proteinen, und auch die Aktivität dieser beiden Kinasen wird *in vitro* gesenkt (Abb. 14, 15). CK2 β bindet dabei an die Kinasedomäne von DPAK3 (Abb. 13). Dies ist auch bei den anderen Kinasen wie A-Raf, c-Mos, CHK1, CHK2, S6 Kinase 1 oder CK2 α der Fall (Boldyreff & Issinger, 1997, Hagemann et al., 1997, Lieberman & Rudermann, 2004, Guerra et al., 2003, Kreutzer & Guerra, 2007, Bjorling-Poulsen et al., 2005, Panasyuk et al., 2006). Für die Interaktion von CK2 β mit CK2 α wurden die Aminosäuren ermittelt, welche den Kontakt zwischen den beiden Proteinen herstellen (Niefind et al., 2001). Diese Aminosäuren sind jedoch in den anderen mit CK2 β interagierenden Kinasen nur teilweise erhalten (Abb. 10). Daher ist es sehr

wahrscheinlich, daß weniger die genaue Aminosäuresequenz für die Fähigkeit, mit CK2 β zu interagieren, entscheidend ist, als vielmehr die räumliche Struktur des Proteins. Da die die ATP-Bindungsstelle umgebende Region jedoch in allen Serin- / Threoninkinasen relativ gut konserviert ist, spricht viel dafür, daß CK2 β Proteine in der Lage sind, mit einem Großteil dieser Kinasen zu interagieren (Bibby & Litchfield, 2005). Für die meisten der bisher untersuchten Kinasen wurde entweder eine aktivierende oder eine inhibierende Wirkung von CK2 β festgestellt. A-Raf und CHK1 werden durch CK2 β aktiviert, während die Phosphotransferaseaktivität von c-Mos und CHK2 reduziert wird (Hagemann et al., 1997, Guerra et al., 2003, Chen et al., 1997, Bjorling-Poulsen et al., 2005). Einzig für CK2 α wurde gezeigt, daß CK2 β , abhängig vom jeweiligen Substrat, die Aktivität sowohl steigern als auch senken kann. Verglichen mit freiem CK2 α sinkt zum Beispiel die Phosphorylierung von Calmodulin und CK2 α ab, wenn CK2 α zusammen mit CK2 β im Holoenzym vorliegt (Abb. 16, Marin et al., 1999). Bei anderen Substraten wie Topoisomerase II oder p53 steigert die CK2 β die Phosphotransferaseaktivität von CK2 α (Bojanowski et al., 1993, Leroy et al., 1999, Appel et al., 1995). Die vorliegenden Ergebnisse lassen mehrere mögliche Mechanismen für die Regulation von PAK-Proteinen durch CK2 β zu. Zum einen könnte CK2 β ein weiterer Negativregulator der PAK-Kinaseaktivität wie zum Beispiel die Phosphatasen POPX-1 und POPX-2 sein (Koh et al., 2002). Möglicherweise ändert die Bindung von CK2 β die Substratspezifität der *Drosophila* PAK-Proteine, wodurch auch die Autophosphorylierung abnimmt, welche ja für die Aktivität aller PAK-Proteine erforderlich ist (Bokoch et al., 2003, Eswaran et al., 2007). Threonin 423 ist in humanem PAK1 für die Aktivierung notwendig und kann sowohl durch PAK1 selbst als auch durch andere Kinasen wie zum Beispiel PDK1 phosphoryliert werden (King et al., 2000). Es ist möglich, daß durch die Bindung von CK2 β an die Kinasedomäne der PAK Proteine die korrespondierende Aminosäure (Threonin 447 in DPAK3) sterisch nicht mehr zugänglich und somit die Aktivierung der PAK Proteine gehemmt wird. Durch die teils aktivierende und teils inhibierende Wirkung von CK2 β auf alle Kinasen, für die eine direkte Interaktion bis jetzt nachgewiesen wurde, kann man jedoch annehmen, daß CK2 β eine zentrale Rolle bei der Kommunikation mehrerer Signalwege untereinander einnimmt. Falls CK2 β kein genereller Inhibitor der PAK-Aktivität ist, sondern nur die Substratspezifität ändert, so wäre es möglich, daß CK2 β '¹, CK2 β ^{testes} und die fünf funktionell nicht voll redundanten Isoformen von CK2 β *in vivo* die Aktivität von DPAK1,

DPAK3 und Mbt dergestalt modulieren, daß je nach gebundenem CK2 β Molekül andere Substrate erkannt und phosphoryliert werden (Jauch et al., 2006).

Die Phosphorylierung von CK2 β an Serin 2, 3 und 4 erhöht die Stabilität von CK2 β *in vivo* und senkt die Aktivität des CK2-Holoenzym (Lin et al., 1994, Zhang et al., 2002). CK2 β wird an diesen Stelle von CK2 α phosphoryliert, dies ist auch bei den *Drosophila* Proteinen der Fall. DPAK1, DPAK3 und Mbt phosphorylieren CK2 β an dieser Stelle nicht (Abb. 19). CK2 $\beta^{S2,3,4E}$, welches phosphoryliertes CK2 β imitiert, und CK2 $\beta^{S2,3,4,A}$, welches nicht mehr phosphoryliert werden kann, interagieren genau wie wildtypisches CK2 β mit DPAK3 und senken genauso die Aktivität der Kinase (Abb. 17, 18). Neben der Phosphorylierung wird das CK2 Holoenzym noch durch Polyamine reguliert. Diese binden an die Saure Region von CK2 β und steigern so die Aktivität des CK2 Holoenzym (Leroy et al., 1999). Mutante CK2 β -Konstrukte, welche gebundene Polyamine imitieren, wirken aktivierend auf *Drosophila* CK2 α (Abb. 16). Diese Proteine, CK2 $\beta^{D55A,E57A}$ oder DmCK2 $\beta^{D60A,E61,63A}$, senken die Aktivität von DPAK3 in gleichem Maß wie wildtypisches CK2 β (Abb 17, 18). Da keine der hier untersuchten posttranslationalen Modifikationen von CK2 β Einfluß auf die Bildung und Aktivität des DPAK3-CK2 β Komplexes hat, ist anzunehmen, daß die Aktivität von p21-aktivierten Kinasen nur über die Menge an vorhandenem freien CK2 β reguliert wird. Es wurde gezeigt, daß zum Beispiel im Gehirn und den Hoden von Mäusen ein Teil des CK2 β als freies, nicht an das Holoenzym gebundenes Protein vorliegt (Guerra et al., 1999).

Neben der direkten Bindung von freiem CK2 β an Serin- / Threoninkinasen ist es auch möglich, daß diese mit dem Holoenzym interagieren und, wie zum Beispiel S6 Kinase 1 I, diesem als Substrat dienen (Panasyuk et al., 2006). DPAK3 interagiert jedoch nicht mit dem CK2 Holoenzym und auch die Bildung eines CK2 α -DPAK3-CK2 β_2 Heterotetramers kann ausgeschlossen werden (Abb. 20). Für die Bildung des CK2 Holoenzym ist außerdem zunächst die Bildung eines β - β Dimers erforderlich, an das sich dann die beiden CK2 α Untereinheiten anlagern (Chantalat et al., 1999, Canton et al., 2001). Dieses β - β Dimer wird von den von vier Cysteinen gebildeten Zinkfingern zusammengehalten. Mutante CK2 β Proteine, die diese Zinkfinger nicht mehr ausbilden können, interagieren dennoch mit DPAK1, DPAK3 und Mbt, nicht aber mit CK2 α (Abb. 19). Auch reduzieren sie genau wie wildtypisches CK2 β die Aktivität der p21-aktivierten Kinasen. Dadurch läßt sich ausschließen, daß die Hemmung zumindest von DPAK1

und DPAK3 durch die Stabilisierung der inaktiven, dimeren Konformation der PAK-Proteine durch ein β - β Dimer zustande kommt. Gegen dieses Modell spricht natürlich auch die Hemmung der Kinaseaktivität von Mbt durch CK2 β , das wie alle Gruppe 2 PAK Proteine keine Dimere bilden kann.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß in *Drosophila* ein Überschuß an zellulärem CK2 β die Aktivität der p21-aktivierten Kinasen durch die Bildung eines PAK-CK2 β Heterodimers hemmt und daß PAK-Proteine weder Interaktionspartner noch Substrate des CK2-Holoenzym sind.

4.3 Mögliche Funktionen von DPAK3 in der Augenentwicklung und im Nervensystem von *Drosophila*

Der Verlust der Genfunktion von *Dpak1* und *Dpak3* führt zu massiven morphologisch und histologisch sichtbaren Defekten in der Struktur der Komplexaugen (Abb. 34, 35). Fehlt jedoch nur eine dieser beiden p21-aktivierten Kinasen, sind nur leichte Defekte festzustellen. Die Funktion von DPAK1 in der Augenentwicklung wurde bereits früher untersucht. Es wurde gezeigt, daß DPAK1 für die korrekte Projektion der Photorezeptorzellaxone in die optischen Loben erforderlich ist (Newsome et al., 2000, Hing et al., 1999). Ein sichtbarer Effekt auf die Struktur der Komplexaugen wurde jedoch nicht gefunden. In dem in dieser Arbeit verwendeten Allel *Dpak1*¹⁴ ist in das Tryptophan 111 von DPAK1 durch ein Stoppcodon ersetzt, und es kann kein funktionelles DPAK1 Protein mehr gebildet werden.

Die Situation bei *Dpak3* stellte sich als schwierig heraus. Es standen mehrere Stämme mit Insertionen mobiler genetischer Elemente in *Dpak3* sowie die durch Rekombination zwischen zwei *in trans* liegenden P-Elementen erzeugte Defizienz Df(3R)Exel9055 zur Verfügung. Nach Durchführung einer Komplementationsanalyse stellte sich heraus, daß es sich bei *Dpak3* um ein letal mutierbares Gen handelt (Tab. 1). Die zunächst mit der Defizienz Df(3R)Exel9055 durchgeführten Experimente erwiesen sich als irreführend, da sich herausstellte, daß dieses Chromosom noch mindestens eine weitere Letalmutation trägt. Deshalb wurde die Analyse im Auge mit dem homozygot letalen Allel *Dpak3*^{NP4472} und dem semiletalen Allel *Dpak3*^{e00329} durchgeführt. Bei *Dpak3*^{e00329} handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um ein hypomorphes Allel. Auch bei *Dpak3*^{NP4472} kann, da die Insertion nicht in der kodierenden Sequenz von *Dpak3* liegt, nicht ausgeschlossen werden, daß es sich auch bei diesem nicht um ein Nullallel

handelt. Ein wichtiges Ziel war deshalb die Herstellung eines neuen, definierten Nullallels. Dies gelang mit der Erzeugung der Deletion Df(3R)BTM1. Die Letalität dieser Defizienz wird durch genomische *Dpak3* Konstrukte gerettet. Mit diesem neuen Allel *Dpak3^{BTM1}* kann nun eine genauere Analyse der Funktionen von *Dpak3*, *Dpak1* und der Doppelmutanten erfolgen.

Welcher Entwicklungsprozess, seien es Rekrutierung, Determinierung, Zellmorphogenese, oder Überleben der sich entwickelnden Zellen durch das Fehlen von DPAK1 und DPAK3 gestört wird, bleibt noch zu klären. Ein möglicher Effektor von PAK-Proteinen in der Entwicklung der Photorezeptorzellen ist der Dynactin-Komplex. Dieser ist beispielsweise an Dynein-vermitteltem Transport entlang der Mikrotubuli beteiligt und besteht aus mehreren Untereinheiten (Übersicht in Schroer, 2004). Die zentralen Bestandteile sind p150^{Glued} und Dynamitin (p50^{Dynactin}). *Drosophila* Dynamitin wird von der p21-aktivierten Kinase Mbt sowie von DPAK3 und DPAK1 gebunden und phosphoryliert (Menzel et al., 2007, K. Manger, 2008, Diplomarbeit, T. Kungl, Diplomarbeit). In zwei Studien, in welchen der Effekt einer dominanten Mutation in p150^{Glued} im Auge von *Drosophila* untersucht wurde, zeigt diese ebenfalls eine gestörte Morphologie der Komplexaugen (McGrail et al., 1995, Fan & Ready, 1997). Im Rahmen einer im Zusammenhang mit diesem Projekt laufenden Diplomarbeit konnte bislang gezeigt werden, daß die Reduktion der Proteinmenge von Dynamitin oder p150^{Glued} ebenfalls massive strukturelle Defekte im Auge von *Drosophila* verursacht (T. Kungl., Diplomarbeit). Es ist möglich, daß die Phosphorylierung von Dynamitin durch DPAK1 und DPAK3 für die korrekte Augenentwicklung erforderlich ist. Weitere potentielle Effektoren für DPAK3 sind die das Aktin-Zytoskelett regulierenden Moleküle LIM Kinase und die Phosphatase Slingshot, die in antagonistischer Weise den Aktindepolymerisierungsfaktor Twinstar (Cofilin) regulieren (Soosarajah et al., 2005). Es wurde gezeigt, daß Mbt, die dritte p21-aktivierte Kinase in *Drosophila* in der Augenentwicklung genetisch mit diesen Proteinen interagiert und daß Twinstar für die Längenausdehnung der Photorezeptorzellen erforderlich ist (Menzel et al., 2006, Pham et al., 2008). Dabei ist es möglich, daß DPAK1 und DPAK3 vergleichbar mit humanem PAK1 die LIM Kinase phosphorylieren, welche dann wiederum Cofilin phosphoryliert (Edwards et al., 1999).

Über eine redundante Funktion von PAK-Proteinen im Nervensystem wurde bereits spekuliert (Boda et al., 2006). Neben den hier vorliegenden Ergebnissen wurde allerdings erst in einer Studie eine solche nachgewiesen. Lucanic et al. (2006) konnten

zeigen, daß im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* das DPAK1 Homolog PAK-1 und das DPAK3 Homolog MAX-2 redundant die Wanderung der P-Zell Neuroblasten von der Flanke zum Bauchmark leiten. In der Wegfindung der ventralen Motoneurone hingegen haben sie nur teilweise redundant Funktionen unterhalb des Guaninnukleotidaustauschfaktors UNC-73 (Trio) und der RhoGTPase Rac. Zusätzlich beeinflußt MAX-2 abhängig von dem Wegfindungsmolekül UNC-6/Netrin, aber unabhängig von PAK-1 die Abstoßung von Axonen von der Mittellinie. Auch für DPAK1 wurde gezeigt, daß die Kinase unterhalb des Guaninnukleotidaustauschfaktors Trio an der Wegfindung der Axone der Photorezeptorzellen beteiligt ist (Hing et al., 1999, Newsome et al., 2000). Für die Wegfindung der Axon der olfaktorischen Rezeptorzellen und der durch den Roundabout (Robo) Rezeptor vermittelten Abstoßung von Axonen an der Mittellinie im sich entwickelten Embryo ist DPAK1 ebenfalls erforderlich (Ang et al., 2003, Fan et al., 2003). An allen genannten Prozessen ist auch das SH2/SH3-Domänenprotein Dreadlocks (Dock) beteiligt. Dieses interagiert über eine N-terminale, in allen klassischen Gruppe 1 PAKs konservierte, SH3-Domänenbindungsstelle mit DPAK1 und rekrutiert die Kinase so an einen in der Zellmembran verankerten Rezeptor wie zum Beispiel DSCAM (Hing et al., 1999, Schmucker et al., 2000). Diese Bindungsstelle ist jedoch in DPAK3 nicht konserviert. Es ist möglich, daß DPAK3 für axonale Wegfindungsprozesse nicht erforderlich ist und daß diese ausschließlich von DPAK1 reguliert werden. Eine andere Möglichkeit besteht jedoch darin, daß DPAK3 über einen bislang unbekanntem Mechanismus an die Membran rekrutiert wird.

Weiterhin sind PAK-Proteine an der für postsynaptische Plastizität erforderlichen Regulation des Zytoskeletts beteiligt (Übersicht in Boda et al., 2006). In *Drosophila* konnte gezeigt werden, daß DPAK1 an der Organisation der Postsynapse der neuromuskulären Endplatte mitwirkt. DPAK1 reguliert dort, zusammen mit Dock, die vorhandene Menge an Glutamatrezeptor und die Spezialisierung der postsynaptischen Membran zusammen mit Dlg (Discs large) (Parnas et al., 2001, Albin & Davis, 2004). An diesen Prozessen ist auch der Guaninnukleotidaustauschfaktor DPix, das einzige *Drosophila* Homolog zu den beiden Cool/Pix Proteinen der Vertebraten, beteiligt (Parnas et al., 2001). DPAK1 und DPAK3 besitzen beide eine Pix-Bindungsstelle zwischen der autoinhibitorischen und der Kinasedomäne, und beide Proteine sind in der Lage, DPix zu binden (R. Schulte, Diplomarbeit). Auch hier kommen als Effektoren von DPAK1, und möglicherweise auch DPAK3, LIMK beziehungsweise der "downstream" Effektor Cofilin in Frage. Für diese wurde gezeigt, daß sie, an der Entstehung der

neuromuskulären und, zusammen mit DPAK1, an der Bildung der Synapsen in den Glomeruli der olfaktorischen Loben beteiligt sind (Ang et al., 2006).

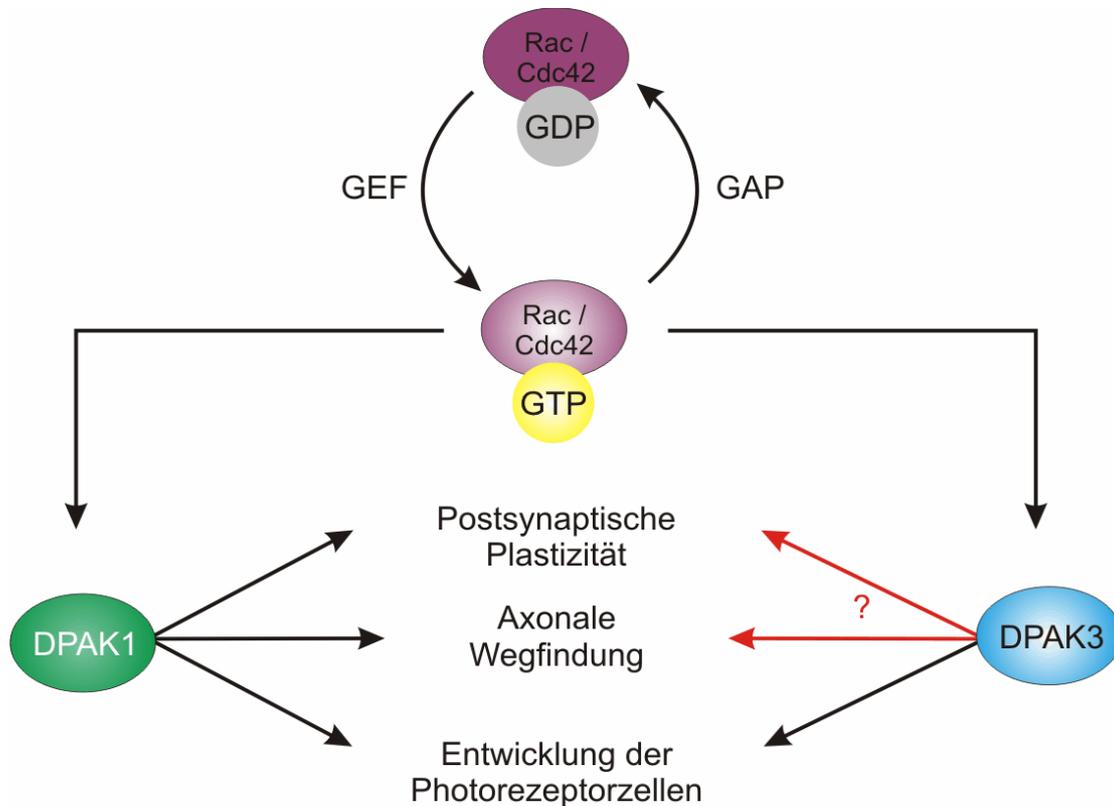


Abb. 36: Schematische Darstellung der möglichen gemeinsamen Funktionsweise von DPAK1 und DPAK3

Zusammenfassend sind bis jetzt drei wichtige Funktionen von Gruppe 1 bzw. 1* PAK-Proteinen im Nervensystem von *Drosophila* möglich, nämlich die Wegfindung von Axonen, die Regulation postsynaptischer Plastizität sowie die Entwicklung der Photorezeptorzellen. Zumindest in letzterem Prozess scheinen DPAK1 und DPAK3 redundante Funktionen zu besitzen. Ob DPAK3 an den anderen ebenfalls beteiligt ist und ob DPAK3 auch noch eigene, von DPAK1 unabhängige Funktionen im Nervensystem hat, wird Gegenstand zukünftiger Studien sein. Solche Untersuchungen waren bislang aufgrund des Fehlens eines gesicherten *Dpak3* Nullallels nicht möglich, können aber mit dem jetzt vorliegenden neuen Allel *Dpak3^{BTM1}* durchgeführt werden. Für die Aufklärung der Funktion von DPAK3 ist ebenfalls die Kenntnis des Expressionsmusters und der subzellulären Lokalisierung erforderlich. Da jedoch bislang kein für die histologische und cytologische Färbungen brauchbares Antiserum hergestellt werden konnte, müssen diese Fragen Gegenstand noch durchzuführender

Studien sein. Wichtig ist außerdem die Suche nach einer gemeinsamen Funktion von CK2 β und DPAK3 *in vivo*. *Drosophila* CK2 ist ebenfalls an der Entwicklung der Komplexaugen beteiligt, und in Fliegen, welche das CK2 β -Allel mbu (mushroom bodies undersized) tragen sind die Pilzkörper verkleinert (Jauch et al., 2002, Karandikar et al., 2004, Bose et al., 2006). Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob CK2 β und DPAK3 eventuell zusammen an der Regulation dieser oder anderer Prozesse beteiligt sind.

5. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist das *Drosophila melanogaster* Protein DPAK3, ein Vertreter der hochkonservierten Familie der p21-aktivierten Kinasen (PAK). DPAK3 und seine Homologen aus anderen Insektenarten und *C. elegans* können aufgrund eines Vergleichs der Proteinsequenz und struktureller Merkmale in eine eigenen Untergruppe 1* innerhalb der Gruppe 1 der PAK-Proteine eingeordnet werden. Das Genom von *Drosophila* kodiert noch für zwei weitere PAK-Proteine, das zur Gruppe 1 gehörende DPAK1 und das Gruppe 2 PAK-Protein Mbt. Wie die klassischen Gruppe 1 PAK-Proteine bildet DPAK3 im inaktiven Zustand Dimere. DPAK3 interagiert mit den GTP-gebundenen Formen der RhoGTPasen Rac1, Rac2 und Cdc42. Durch die Bindung dieser Proteine geht DPAK3 aus dem dimeren in den monomeren Zustand über und seine Kinaseaktivität wird durch diese Bindung gesteigert. DPAK3 ist für die Ausbildung der korrekten Morphologie kultivierter *Drosophila* Zellen erforderlich und beeinflusst die Regulation des Aktinzytoskeletts. Weiterhin konnte CK2 β , die regulatorische Untereinheit der Casein Kinase 2, als neuer Regulator von p21-aktivierten Kinasen identifiziert werden. Das Genom von *Drosophila* besitzt drei Transkriptionseinheiten, die für CK2 β ¹, CK2 β ^{testes} und fünf verschiedene Isoformen von CK2 β kodieren. Eine vergleichende Analyse zeigt, daß alle CK2 β -Proteine mit DPAK1, DPAK3 und in geringerem Maß auch mit Mbt interagieren und in der Lage sind, die Aktivität der PAK-Proteine *in vitro* zu hemmen. Die Bindung von CK2 β an DPAK3 wird, wie bei allen anderen Serin- / Threoninkinasen, die bisher als Interaktionspartner von CK2 β identifiziert wurden, über die Kinasedomäne von DPAK3 vermittelt. Die Bildung des aus zwei katalytischen CK2 α und zwei CK2 β Untereinheiten bestehenden CK2-Holoenzym hängt von der Fähigkeit von CK2 β ab, Dimere zu bilden. Es konnte gezeigt werden, daß die Bildung eines β - β Dimers für die Interaktion mit und Regulation von DPAK3 nicht erforderlich ist.

In vivo wurden die bisher bekannten *Dpak3* Allele untersucht, wobei kein gesichertes Nullallel identifiziert werden konnte. Durch enzymatisch katalysierte Rekombination wurde eine neue Deletion hergestellt, die das komplette Leseraster von *Dpak3* entfernt. Mit Hilfe von genetischen Mosaiken wurde die Rolle von DPAK3 in der Augenentwicklung untersucht. Durch den Verlust der Genfunktion von *Dpak3* wird die Ausbildung der korrekten Struktur der Komplexaugen nur leicht beeinträchtigt. Bei der

Analyse einer *Dpak1* Mutante wurde dasselbe Ergebnis erzielt. Gleichzeitiger Verlust der Genfunktion von *Dpak1* und *Dpak3* hingegen führt zu massiven strukturellen Defekten. DPAK1 und DPAK3 erfüllen somit zumindest teilweise redundante Funktionen in der Augenentwicklung. Es wird Gegenstand zukünftiger Studien sein müssen, die gemeinsamen und getrennten Funktionen dieser PAK-Proteine in *Drosophila* aufzuklären.

6. Summary

Subject of this work is the *Drosophila melanogaster* protein DPAK3, a member of the highly conserved family of p21-activated kinases. Based on the comparison of the amino acid sequence and structural features, DPAK3 and its homologues from other insect species and *C. elegans* can be assigned to a distinct subgroup 1* within the group 1 PAK proteins. The genome of *Drosophila* encodes for two additional PAK proteins, DPAK1 and Mbt, which belong to the group 1 and group 2 p21-activated kinases, respectively. Like the classical group 1 PAK proteins, DPAK3 forms dimers in its inactive conformation. DPAK3 binds to and is activated by the Rho GTPases Rac1, Rac2 and Cdc42. The interaction with these proteins leads to the disruption of the DPAK3 dimer and an increase in the kinase activity of DPAK3. DPAK3 is necessary for the development of the normal morphology of cultured *Drosophila* cells and influences the regulation of the actin cytoskeleton. CK2 β the regulatory subunit of casein kinase 2 was identified as a new regulator of p21 activated kinases. The genome of *Drosophila* possesses three different transcriptional units that encode the proteins CK2 β ', CK2 β ^{testes} and five different isoforms of CK2 β . A comparative analysis shows that all CK2 β proteins interact with DPAK1, DPAK3 and Mbt and negatively regulate the activity of these kinases *in vitro*. CK2 β binds to the kinase domain of DPAK3 which is consistent with previous results obtained from other serine/threonine kinases interacting with CK2 β . The CK2 holoenzyme consists of two catalytically active CK2 α subunits and two regulatory CK2 β subunits. My results show that the ability of CK2 β to form dimers, which is essential for the formation of the CK2 holoenzyme, is not necessary for the regulation of p21 activated kinases. The analysis of the available *Dpak3* alleles *in vivo* revealed the necessity to create a new bona fide loss of function allele. To accomplish this goal, a new deletion which removes the entire *Dpak3* open reading frame was created by enzymatically catalysed recombination. Genetic mosaics were used to study the role of DPAK3 in eye development. The morphology of the complex eyes was only slightly impaired by the loss of *Dpak3* function. The same result was obtained when analysing *Dpak1* mutants, but removal of the gene function of both *Dpak1* and *Dpak3* leads to massive structural defects. This shows that *Dpak1* and *Dpak3* have at least partially redundant functions in eye development. Further studies will be necessary to reveal the common and distinct functions of these p21-activated kinases in *Drosophila*.

7. Literaturverzeichnis

- Abo, A., Qu, J., Cammarano, M. S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B. and Minden, A.** (1998). PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J* **17**, 6527-40.
- Albin, S. D. and Davis, G. W.** (2004). Coordinating structural and functional synapse development: postsynaptic p21-activated kinase independently specifies glutamate receptor abundance and postsynaptic morphology. *J Neurosci* **24**, 6871-9.
- Allen, K. M., Gleeson, J. G., Bagrodia, S., Partington, M. W., MacMillan, J. C., Cerione, R. A., Mulley, J. C. and Walsh, C. A.** (1998). PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet* **20**, 25-30.
- Ang, L. H., Chen, W., Yao, Y., Ozawa, R., Tao, E., Yonekura, J., Uemura, T., Keshishian, H. and Hing, H.** (2006). Lim kinase regulates the development of olfactory and neuromuscular synapses. *Dev Biol* **293**, 178-90.
- Ang, L. H., Kim, J., Stepensky, V. and Hing, H.** (2003). Dock and Pak regulate olfactory axon pathfinding in *Drosophila*. *Development* **130**, 1307-16.
- Appel, K., Wagner, P., Boldyreff, B., Issinger, O. G. and Montenarh, M.** (1995). Mapping of the interaction sites of the growth suppressor protein p53 with the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* **11**, 1971-8.
- Arias-Romero, L. E. and Chernoff, J.** (2008). A tale of two Paks. *Biol Cell* **100**, 97-108.
- Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R. J. and Cerione, R. A.** (1995). Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**, 27995-8.
- Bagrodia, S., Taylor, S. J., Jordon, K. A., Van Aelst, L. and Cerione, R. A.** (1998). A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem* **273**, 23633-6.
- Banerjee, M., Worth, D., Prowse, D. M. and Nikolic, M.** (2002). Pak1 phosphorylation on t212 affects microtubules in cells undergoing mitosis. *Curr Biol* **12**, 1233-9.
- Bibby, A. C. and Litchfield, D. W.** (2005). The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2beta. *Int J Biol Sci* **1**, 67-79.
- Bidwai, A. P., Zhao, W. and Glover, C. V.** (1999). A gene located at 56F1-2 in *Drosophila melanogaster* encodes a novel metazoan beta-like subunit of casein kinase II. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**, 21-8.
- Bienvenu, T., des Portes, V., McDonnell, N., Carrie, A., Zemni, R., Couvert, P., Ropers, H. H., Moraine, C., van Bokhoven, H., Fryns, J. P. et al.** (2000). Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. *Am J Med Genet* **93**, 294-8.

- Bjorling-Poulsen, M., Siehler, S., Wiesmuller, L., Meek, D., Niefind, K. and Issinger, O. G.** (2005). The 'regulatory' beta-subunit of protein kinase CK2 negatively influences p53-mediated allosteric effects on Chk2 activation. *Oncogene* **24**, 6194-200.
- Boda, B., Nikonenko, I., Alberi, S. and Muller, D.** (2006). Central Nervous System Functions of PAK Protein Family: From Spine Morphogenesis to Mental Retardation. *Mol Neurobiol* **34**, 67-80.
- Bojanowski, K., Filhol, O., Cochet, C., Chambaz, E. M. and Larsen, A. K.** (1993). DNA topoisomerase II and casein kinase II associate in a molecular complex that is catalytically active. *J Biol Chem* **268**, 22920-6.
- Bokoch, G. M.** (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* **72**, 743-81.
- Bokoch, G. M., Reilly, A. M., Daniels, R. H., King, C. C., Olivera, A., Spiegel, S. and Knaus, U. G.** (1998). A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids. *J Biol Chem* **273**, 8137-44.
- Bokoch, G. M., Wang, Y., Bohl, B. P., Sells, M. A., Quilliam, L. A. and Knaus, U. G.** (1996). Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). *J Biol Chem* **271**, 25746-9.
- Boldyreff, B. and Issinger, O. G.** (1997). A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 beta subunit. *FEBS Lett* **403**, 197-9.
- Boldyreff, B., James, P., Staudenmann, W. and Issinger, O. G.** (1993). Ser2 is the autophosphorylation site in the beta subunit from bicistronically expressed human casein kinase-2 and from native rat liver casein kinase-2 beta. *Eur J Biochem* **218**, 515-21.
- Bose, A., Kahali, B., Zhang, S., Lin, J. M., Allada, R., Karandikar, U. and Bidwai, A. P.** (2006). Drosophila CK2 regulates lateral-inhibition during eye and bristle development. *Mech Dev* **123**, 649-64.
- Buchwald, G., Hostinova, E., Rudolph, M. G., Kraemer, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Scheffzek, K. and Wittinghofer, A.** (2001). Conformational switch and role of phosphorylation in PAK activation. *Mol Cell Biol* **21**, 5179-89.
- Burbelo, P. D., Drechsel, D. and Hall, A.** (1995). A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem* **270**, 29071-4.
- Burbelo, P. D., Kozak, C. A., Finegold, A. A., Hall, A. and Pirone, D. M.** (1999). Cloning, central nervous system expression and chromosomal mapping of the mouse PAK-1 and PAK-3 genes. *Gene* **232**, 209-15.
- Canton, D. A., Zhang, C. and Litchfield, D. W.** (2001). Assembly of protein kinase CK2: investigation of complex formation between catalytic and regulatory subunits using a zinc-finger-deficient mutant of CK2beta. *Biochem J* **358**, 87-94.
- Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M. J., Chambaz, E. M., Cochet, C. and Dideberg, O.** (1999). Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J* **18**, 2930-

40.

Chen, L. Y., Rex, C. S., Casale, M. S., Gall, C. M. and Lynch, G. (2007). Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. *J Neurosci* **27**, 5363-72.

Chen, M., Li, D., Krebs, E. G. and Cooper, J. A. (1997). The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol Cell Biol* **17**, 1904-12.

Chew, T. L., Masaracchia, R. A., Goeckeler, Z. M. and Wysolmerski, R. B. (1998). Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J Muscle Res Cell Motil* **19**, 839-54.

Chong, C., Tan, L., Lim, L. and Manser, E. (2001). The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem* **276**, 17347-53.

Conder, R., Yu, H., Ricos, M., Hing, H., Chia, W., Lim, L. and Harden, N. (2004). dPak is required for integrity of the leading edge cytoskeleton during *Drosophila* dorsal closure but does not signal through the JNK cascade. *Dev Biol* **276**, 378-90.

Conder, R., Yu, H., Zahedi, B. and Harden, N. (2007). The serine/threonine kinase dPak is required for polarized assembly of F-actin bundles and apical-basal polarity in the *Drosophila* follicular epithelium. *Dev Biol* **305**, 470-82.

Dan, C., Kelly, A., Bernard, O. and Minden, A. (2001). Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol Chem* **276**, 32115-21.

Daniels, R. H., Hall, P. S. and Bokoch, G. M. (1998). Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J* **17**, 754-64.

Daniels, R. H., Zenke, F. T. and Bokoch, G. M. (1999). alphaPix stimulates p21-activated kinase activity through exchange factor-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* **274**, 6047-50.

Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A. and Hall, A. (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* **276**, 1677-80.

Eblen, S. T., Slack, J. K., Weber, M. J. and Catling, A. D. (2002). Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. *Mol Cell Biol* **22**, 6023-33.

Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. and Gill, G. N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* **1**, 253-9.

Eswaran, J., Lee, W. H., Debreczeni, J. E., Filippakopoulos, P., Turnbull, A., Fedorov, O., Deacon, S. W., Peterson, J. R. and Knapp, S. (2007). Crystal Structures of the p21-activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active group II PAKs. *Structure* **15**, 201-13.

Fan, S. S. and Ready, D. F. (1997). Glued participates in distinct microtubule-based activities in *Drosophila* eye development. *Development* **124**, 1497-507.

- Fan, X., Labrador, J. P., Hing, H. and Bashaw, G. J.** (2003). Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* **40**, 113-27.
- Feig, L. A. and Cooper, G. M.** (1988). Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol* **8**, 3235-43.
- Frost, J. A., Khokhlatchev, A., Stippec, S., White, M. A. and Cobb, M. H.** (1998). Differential effects of PAK1-activating mutations reveal activity-dependent and -independent effects on cytoskeletal regulation. *J Biol Chem* **273**, 28191-8.
- Galisteo, M. L., Chernoff, J., Su, Y. C., Skolnik, E. Y. and Schlessinger, J.** (1996). The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J Biol Chem* **271**, 20997-1000.
- Geis, A. M., Nicolson, M. and Goldman, R. A.** (1986). Biochemical and biological activities of N-ras proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **139**, 771-9.
- Goeckeler, Z. M., Masaracchia, R. A., Zeng, Q., Chew, T. L., Gallagher, P. and Wysolmerski, R. B.** (2000). Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J Biol Chem* **275**, 18366-74.
- Golic, K. G. and Golic, M. M.** (1996). Engineering the Drosophila genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics* **144**, 1693-711.
- Guerra, B. and Issinger, O. G.** (1999). Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* **20**, 391-408.
- Guerra, B., Issinger, O. G. and Wang, J. Y.** (2003). Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* **22**, 4933-42.
- Guerra, B., Siemer, S., Boldyreff, B. and Issinger, O. G.** (1999). Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2beta subunit fraction, devoid of the catalytic CK2alpha subunit, in mouse brain and testicles. *FEBS Lett* **462**, 353-7.
- Hagemann, C., Kalmes, A., Wixler, V., Wixler, L., Schuster, T. and Rapp, U. R.** (1997). The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator. *FEBS Lett* **403**, 200-2.
- Harden, N., Lee, J., Loh, H. Y., Ong, Y. M., Tan, I., Leung, T., Manser, E. and Lim, L.** (1996). A Drosophila homolog of the Rac- and Cdc42-activated serine/threonine kinase PAK is a potential focal adhesion and focal complex protein that colocalizes with dynamic actin structures. *Mol Cell Biol* **16**, 1896-908.
- Hayashi, K., Ohshima, T., Hashimoto, M. and Mikoshiba, K.** (2007). Pak1 regulates dendritic branching and spine formation. *Dev Neurobiol* **67**, 655-69.
- Hayashi, K., Ohshima, T. and Mikoshiba, K.** (2002). Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons. *Mol Cell Neurosci* **20**, 579-94.
- Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S. and Byers, D.** (1985). Drosophila mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* **2**, 1-30.
- Hing, H., Xiao, J., Harden, N., Lim, L. and Zipursky, S. L.** (1999). Pak functions

downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* **97**, 853-63.

Howe, A. K. and Juliano, R. L. (2000). Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol* **2**, 593-600.

Ito, K., Suzuki, K., Estes, P., Ramaswami, M., Yamamoto, D. and Strausfeld, N. J. (1998). The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* **5**, 52-77.

Jaffer, Z. M. and Chernoff, J. (2002). p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 713-7.

Jauch, E., Melzig, J., Brkulj, M. and Raabe, T. (2002). In vivo functional analysis of *Drosophila* protein kinase casein kinase 2 (CK2) beta-subunit. *Gene* **298**, 29-39.

Jauch, E., Wecklein, H., Stark, F., Jauch, M. and Raabe, T. (2006). The *Drosophila melanogaster* DmCK2beta transcription unit encodes for functionally non-redundant protein isoforms. *Gene* **374**, 142-52.

Kalmykova, A. I., Shevelyov, Y. Y., Poleskaya, O. O., Dobritsa, A. A., Evstafieva, A. G., Boldyreff, B., Issinger, O. G. and Gvozdev, V. A. (2002). CK2(beta)tes gene encodes a testis-specific isoform of the regulatory subunit of casein kinase 2 in *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem* **269**, 1418-27.

Karandikar, U. C., Trott, R. L., Yin, J., Bishop, C. P. and Bidwai, A. P. (2004). *Drosophila* CK2 regulates eye morphogenesis via phosphorylation of E(spl)M8. *Mech Dev* **121**, 273-86.

Kiger, A. A., Baum, B., Jones, S., Jones, M. R., Coulson, A., Echeverri, C. and Perrimon, N. (2003). A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J Biol* **2**, 27.

King, C. C., Gardiner, E. M., Zenke, F. T., Bohl, B. P., Newton, A. C., Hemmings, B. A. and Bokoch, G. M. (2000). p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *J Biol Chem* **275**, 41201-9.

Kissil, J. L., Wilker, E. W., Johnson, K. C., Eckman, M. S., Yaffe, M. B. and Jacks, T. (2003). Merlin, the product of the Nf2 tumor suppressor gene, is an inhibitor of the p21-activated kinase, Pak1. *Mol Cell* **12**, 841-9.

Koh, C. G., Tan, E. J., Manser, E. and Lim, L. (2002). The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C family. *Curr Biol* **12**, 317-21.

Kreis, P., Thevenot, E., Rousseau, V., Boda, B., Muller, D. and Barnier, J. V. (2007). The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. *J Biol Chem* **282**, 21497-506.

Kreutzer, J. and Guerra, B. (2007). The regulatory beta-subunit of protein kinase CK2 accelerates the degradation of CDC25A phosphatase through the checkpoint kinase Chk1. *Int J Oncol* **31**, 1251-9.

Kusk, M., Ahmed, R., Thomsen, B., Bendixen, C., Issinger, O. G. and Boldyreff, B.

(1999). Interactions of protein kinase CK2beta subunit within the holoenzyme and with other proteins. *Mol Cell Biochem* **191**, 51-8.

Lee, N., MacDonald, H., Reinhard, C., Halenbeck, R., Roulston, A., Shi, T. and Williams, L. T. (1997). Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13642-7.

Lee, S. F., Egelhoff, T. T., Mahasneh, A. and Cote, G. P. (1996). Cloning and characterization of a Dictyostelium myosin I heavy chain kinase activated by Cdc42 and Rac. *J Biol Chem* **271**, 27044-8.

Lee, S. R., Ramos, S. M., Ko, A., Masiello, D., Swanson, K. D., Lu, M. L. and Balk, S. P. (2002). AR and ER interaction with a p21-activated kinase (PAK6). *Mol Endocrinol* **16**, 85-99.

Lee, T., Lee, A. and Luo, L. (1999). Development of the Drosophila mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* **126**, 4065-76.

Lee, T. and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.

Lee, T. and Luo, L. (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for Drosophila neural development. *Trends Neurosci* **24**, 251-4.

Leeuw, T., Wu, C., Schrag, J. D., Whiteway, M., Thomas, D. Y. and Leberer, E. (1998). Interaction of a G-protein beta-subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* **391**, 191-5.

Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M. C., Eck, M. J., Mayer, B. J. and Harrison, S. C. (2000). Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* **102**, 387-97.

Leroy, D., Filhol, O., Delcros, J. G., Pares, S., Chambaz, E. M. and Cochet, C. (1997). Chemical features of the protein kinase CK2 polyamine binding site. *Biochemistry* **36**, 1242-50.

Leroy, D., Filhol, O., Quintaine, N., Sarrouilhe, D., Loue-Mackenbach, P., Chambaz, E. M. and Cochet, C. (1999). Dissecting subdomains involved in multiple functions of the CK2beta subunit. *Mol Cell Biochem* **191**, 43-50.

Leroy, D., Schmid, N., Behr, J. P., Filhol, O., Pares, S., Garin, J., Bourgarit, J. J., Chambaz, E. M. and Cochet, C. (1995). Direct identification of a polyamine binding domain on the regulatory subunit of the protein kinase casein kinase 2 by photoaffinity labeling. *J Biol Chem* **270**, 17400-6.

Li, F., Adam, L., Vadlamudi, R. K., Zhou, H., Sen, S., Chernoff, J., Mandal, M. and Kumar, R. (2002). p21-activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells. *EMBO Rep* **3**, 767-73.

Lieberman, S. L. and Ruderman, J. V. (2004). CK2 beta, which inhibits Mos function, binds to a discrete domain in the N-terminus of Mos. *Dev Biol* **268**, 271-9.

Lin, W. J., Sheu, G. T. and Traugh, J. A. (1994). Effects of autophosphorylation on casein kinase II activity: evidence from mutations in the beta subunit. *Biochemistry* **33**,

6998-7004.

Litchfield, D. W., Lozeman, F. J., Cicirelli, M. F., Harrylock, M., Ericsson, L. H., Piening, C. J. and Krebs, E. G. (1991). Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2. *J Biol Chem* **266**, 20380-9.

Lu, J., Sun, Q., Chen, X., Wang, H., Hu, Y. and Gu, J. (2005). Identification of dynein light chain 2 as an interaction partner of p21-activated kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 153-8.

Lucanic, M., Kiley, M., Ashcroft, N., L'Etoile, N. and Cheng, H. J. (2006). The *Caenorhabditis elegans* P21-activated kinases are differentially required for UNC-6/netrin-mediated commissural motor axon guidance. *Development* **133**, 4549-59.

Ma, Q. L., Yang, F., Calon, F., Ubeda, O. J., Hansen, J. E., Weisbart, R. H., Beech, W., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (2008). P21-activated kinase aberrant activation and translocation in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Biol Chem*.

Manger, K. (2008). Untersuchungen zur Interaktion der p21-aktivierten Kinase DPAK3 mit dem Dynactin-Komplex sowie die Identifikation neuer Interaktionspartner von DPAK3 in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.

Manser, E., Huang, H. Y., Loo, T. H., Chen, X. Q., Dong, J. M., Leung, T. and Lim, L. (1997). Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol* **17**, 1129-43.

Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S. and Lim, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**, 40-6.

Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. and Lim, L. (1998). PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* **1**, 183-92.

Marin, O., Meggio, F. and Pinna, L. A. (1999). Structural features underlying the unusual mode of calmodulin phosphorylation by protein kinase CK2: A study with synthetic calmodulin fragments. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 442-6.

Mayhew, M. W., Webb, D. J., Kovalenko, M., Whitmore, L., Fox, J. W. and Horwitz, A. F. (2006). Identification of protein networks associated with the PAK1-betaPIX-GIT1-paxillin signaling complex by mass spectrometry. *J Proteome Res* **5**, 2417-23.

McGrail, M., Gepner, J., Silvanovich, A., Ludmann, S., Serr, M. and Hays, T. S. (1995). Regulation of cytoplasmic dynein function in vivo by the *Drosophila* Glued complex. *J Cell Biol* **131**, 411-25.

Meggio, F., Marin, O., Sarno, S. and Pinna, L. A. (1999). Functional analysis of CK2beta-derived synthetic fragments. *Mol Cell Biochem* **191**, 35-42.

Melzig, J., Rein, K. H., Schafer, U., Pfister, H., Jackle, H., Heisenberg, M. and Raabe, T. (1998). A protein related to p21-activated kinase (PAK) that is involved in neurogenesis in the *Drosophila* adult central nervous system. *Curr Biol* **8**, 1223-6.

Meng, J., Meng, Y., Hanna, A., Janus, C. and Jia, Z. (2005). Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J Neurosci* **25**, 6641-50.

- Mentzel, B.** (2003). Funktionelle Analyse der p21-aktivierten Kinase DPAK3 in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Mentzel, B. and Raabe, T.** (2005). Phylogenetic and structural analysis of the *Drosophila melanogaster* p21-activated kinase DmPAK3. *Gene* **349**, 25-33.
- Menzel, N., Schneeberger, D. and Raabe, T.** (2007). The *Drosophila* p21 activated kinase Mbt regulates the actin cytoskeleton and adherens junctions to control photoreceptor cell morphogenesis. *Mech Dev* **124**, 78-90.
- Newsome, T. P., Schmidt, S., Dietzl, G., Keleman, K., Asling, B., Debant, A. and Dickson, B. J.** (2000). Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. *Cell* **101**, 283-94.
- Ng, J. and Luo, L.** (2004). Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron* **44**, 779-93.
- Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I. and Issinger, O. G.** (2001). Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J* **20**, 5320-31.
- Panasyuk, G., Nemazanyy, I., Zhyvoloup, A., Bretner, M., Litchfield, D. W., Filonenko, V. and Gout, I. T.** (2006). Nuclear export of S6K1 II is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation at Ser-17. *J Biol Chem* **281**, 31188-201.
- Pandey, A., Dan, I., Kristiansen, T. Z., Watanabe, N. M., Voldby, J., Kajikawa, E., Khosravi-Far, R., Blagoev, B. and Mann, M.** (2002). Cloning and characterization of PAK5, a novel member of mammalian p21-activated kinase-II subfamily that is predominantly expressed in brain. *Oncogene* **21**, 3939-48.
- Parnas, D., Haghighi, A. P., Fetter, R. D., Kim, S. W. and Goodman, C. S.** (2001). Regulation of postsynaptic structure and protein localization by the Rho-type guanine nucleotide exchange factor dPix. *Neuron* **32**, 415-24.
- Parrini, M. C., Lei, M., Harrison, S. C. and Mayer, B. J.** (2002). Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell* **9**, 73-83.
- Pham, H., Yu, H. and Laski, F. A.** (2008). Cofilin/ADF is required for retinal elongation and morphogenesis of the *Drosophila* rhabdomere. *Dev Biol* **318**, 82-91.
- Puto, L. A., Pestonjamas, K., King, C. C. and Bokoch, G. M.** (2003). p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *J Biol Chem* **278**, 9388-93.
- Rashid, T., Banerjee, M. and Nikolic, M.** (2001). Phosphorylation of Pak1 by the p35/Cdk5 kinase affects neuronal morphology. *J Biol Chem* **276**, 49043-52.
- Rennefahrt, U. E., Deacon, S. W., Parker, S. A., Devarajan, K., Beeser, A., Chernoff, J., Knapp, S., Turk, B. E. and Peterson, J. R.** (2007). Specificity profiling of Pak kinases allows identification of novel phosphorylation sites. *J Biol Chem* **282**, 15667-78.
- Roig, J., Tuazon, P. T., Zipfel, P. A., Pendergast, A. M. and Traugh, J. A.** (2000). Functional interaction between c-Abl and the p21-activated protein kinase gamma-PAK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14346-51.

- Rudel, T. and Bokoch, G. M.** (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* **276**, 1571-4.
- Ryder, E., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Drummond, J., Webster, J., Johnson, G., Morley, T., Chan, Y. S., Blows, F., Coulson, D. et al.** (2007). The DrosDel deletion collection: a Drosophila genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* **177**, 615-29.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G. et al.** (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in Drosophila melanogaster. *Genetics* **167**, 797-813.
- Sanders, L. C., Matsumura, F., Bokoch, G. M. and de Lanerolle, P.** (1999). Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**, 2083-5.
- Schmucker, D., Clemens, J. C., Shu, H., Worby, C. A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J. E. and Zipursky, S. L.** (2000). Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* **101**, 671-84.
- Schneeberger, D. and Raabe, T.** (2003). Mbt, a Drosophila PAK protein, combines with Cdc42 to regulate photoreceptor cell morphogenesis. *Development* **130**, 427-37.
- Schulte, R.** (2006). Untersuchungen zur Regulation der Bindung von RhoGTPasen an die p21-aktivierte Kinase DPAK3 durch Rho-Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren im Modellorganismus Drosophila melanogaster. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Schurmann, A., Mooney, A. F., Sanders, L. C., Sells, M. A., Wang, H. G., Reed, J. C. and Bokoch, G. M.** (2000). p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol* **20**, 453-61.
- Sells, M. A. and Chernoff, J.** (1997). Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends Cell Biol* **7**, 162-7.
- Sells, M. A., Knaus, U. G., Bagrodia, S., Ambrose, D. M., Bokoch, G. M. and Chernoff, J.** (1997). Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* **7**, 202-10.
- Shekarabi, M., Moore, S. W., Tritsch, N. X., Morris, S. J., Bouchard, J. F. and Kennedy, T. E.** (2005). Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci* **25**, 3132-41.
- Slack-Davis, J. K., Eblen, S. T., Zecevic, M., Boerner, S. A., Tarcsafalvi, A., Diaz, H. B., Marshall, M. S., Weber, M. J., Parsons, J. T. and Catling, A. D.** (2003). PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J Cell Biol* **162**, 281-91.
- Soosairajah, J., Maiti, S., Wiggan, O., Sarmiere, P., Moussi, N., Sarcevic, B., Sampath, R., Bamburg, J. R. and Bernard, O.** (2005). Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J* **24**, 473-86.
- Stowers, R. S. and Schwarz, T. L.** (1999). A genetic method for generating Drosophila

- eyes composed exclusively of mitotic clones of a single genotype. *Genetics* **152**, 1631-9.
- Talukder, A. H., Meng, Q. and Kumar, R.** (2006). CRIPak, a novel endogenous Pak1 inhibitor. *Oncogene* **25**, 1311-9.
- Tang, Y., Zhou, H., Chen, A., Pittman, R. N. and Field, J.** (2000). The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. *J Biol Chem* **275**, 9106-9.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L. et al.** (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* **36**, 283-7.
- Vadlamudi, R. K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T. P. and Kumar, R.** (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol* **4**, 681-90.
- Vadlamudi, R. K., Li, F., Barnes, C. J., Bagheri-Yarmand, R. and Kumar, R.** (2004). p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Rep* **5**, 154-60.
- van Leeuwen, F. N., van Delft, S., Kain, H. E., van der Kammen, R. A. and Collard, J. G.** (1999). Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol* **1**, 242-8.
- Walter, B. N., Huang, Z., Jakobi, R., Tuazon, P. T., Alnemri, E. S., Litwack, G. and Traugh, J. A.** (1998). Cleavage and activation of p21-activated protein kinase gamma-PAK by CPP32 (caspase 3). Effects of autophosphorylation on activity. *J Biol Chem* **273**, 28733-9.
- Wang, J., Frost, J. A., Cobb, M. H. and Ross, E. M.** (1999). Reciprocal signaling between heterotrimeric G proteins and the p21-stimulated protein kinase. *J Biol Chem* **274**, 31641-7.
- Wirth, A., Schroeter, M., Kock-Hauser, C., Manser, E., Chalovich, J. M., De Lanerolle, P. and Pfitzer, G.** (2003). Inhibition of contraction and myosin light chain phosphorylation in guinea-pig smooth muscle by p21-activated kinase 1. *J Physiol* **549**, 489-500.
- Wittmann, T., Bokoch, G. M. and Waterman-Storer, C. M.** (2003). Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J Cell Biol* **161**, 845-51.
- Wu, C., Lee, S. F., Furmaniak-Kazmierczak, E., Cote, G. P., Thomas, D. Y. and Leberer, E.** (1996). Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *J Biol Chem* **271**, 31787-90.
- Xia, C., Ma, W., Stafford, L. J., Marcus, S., Xiong, W. C. and Liu, M.** (2001). Regulation of the p21-activated kinase (PAK) by a human Gbeta-like WD-repeat protein, hPIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6174-9.
- Zenke, F. T., King, C. C., Bohl, B. P. and Bokoch, G. M.** (1999). Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J Biol Chem* **274**, 32565-73.

Zhang, C., Vilk, G., Canton, D. A. and Litchfield, D. W. (2002). Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2beta subunit. *Oncogene* **21**, 3754-64.

Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S. and Horwitz, A. F. (2005). A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci* **25**, 3379-88.

Zhao, L., Ma, Q. L., Calon, F., Harris-White, M. E., Yang, F., Lim, G. P., Morihara, T., Ubeda, O. J., Ambegaokar, S., Hansen, J. E. et al. (2006). Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease. *Nat Neurosci* **9**, 234-42.

Zhao, Z. S., Manser, E., Chen, X. Q., Chong, C., Leung, T. and Lim, L. (1998). A conserved negative regulatory region in alphaPAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* **18**, 2153-63.

8. Anhang

8.1 Sequenzen

Dpak3 – cDNS

AGTCTGCAATTTTCAAGAATTACACACGCGCGGATGTTTTTCGGTTCATCCTAAGAAACATAAA
ATTGCAACGCAAAGAGCAGCTTAAAATCGCGAATTAACCTTTAGGCTTAATAGTAAAAATAAAG
AGTGTACATCGTACACAATTCGCATTTGTTCGGCACAATTGGTTCGAGTTCGACAACAATAGCAG
GCCGAGTGCAGCAGTTCGATTGCAGCAAAGCGAAGGGAAAAACCAAAGAAGTTATTAATTTTCGG
AGTGTTCCTCTGAAAGCGGCTTAGATATACCCAAATCAACAATATACTTCCGTATAGTTATGGA
AGCTTGGAAAGGGCTAACAAAAACTATACGGGAAGGCAGTTTTTCGGCCCCGCGTAAGAACAGCAA
CAACAACAGACACTGGAAGAACAAGACTGCGACGGCCACTCCTTTTGTGTCCGACTTCGAGATG
TGTGCGTGTTCGTGTCCGCGTCCGCCTTTGTGTGTTGAGCAATTGAAAACCTGGTGATTGCTGAA
TAAATTAAGGTAGCTAAATTAATAATTAGCAAAGCGAGTGGGGCCAATAAAAAGTGAAAATCTT
CTGCGTTTTTCGTAAAGCGAAAGAACTACAGCTACAGTTAGAGATAAGAAGAGCTCTCGCACAC
ATACACAAAGCGCAGGCCGAACGAGCGAGTGTGCGTGCTTGTGCATGTGTTTATGACTCACGGC
TGGTTCACTGAGAGAGAGAAAGAGAGCGAGAGTGGTGGCTTGAAGTAACAGTAACATTAACAATA
CCGAACGCGAAACAACAACAATCTGCCGAGCGTTTGAATTTCCAAGTCGAGCGTTACTAAA
CGCATTGAAGAAAATCCCCCCCACCCACACACTCTTATACAATAAAGAGAGAGAAAGCCGCT
GGAAAATGAGCTTCACCAAGTGGTTCAAGAAGAAGGGCGGAGATGGGGGATCGATCTCAGAGAT
CGGTGCACCCACAAACTTCCAACGGCACTTCCATGTCTCGCGCAACCAGGAAACCGGCGACCTG
GAGGGGCTTCCAGCTCCATGGCTGCGCCTAATGAACTCACAGATCACTCGCGATGAGCAGGACA
AGAATCCAGATGCTGCCTACCATGCCGTTAAGTACTACAACCTATTCGATTAAGAAGAAAGAGAA
CGAGGTCTTCAAGCCCTTCATCACCCGAGATGTGATCCACGAGGAGTCCAAGGAGATAGAAAAC
TATGTCAACTACAAAAACAAGCACAAGTCTCAGGATCCCGAAAAGTCCGACGACGATGGCAGTT
CGACGGCCACGGAGACGGAAAGTAGCAGCGGTTGTGGCTCCTCGGCAGGTAATAGTAACAGCAG
CAGCATCAACGACAGCAGCCAGCAGTCGACGGTGCCGCTGGACGCCCTAGAGGAGGTGTTCAAG
GAGCTCAAGACCAATCTGGAGCACCCGCGAAACGCTGAAGGCCGACCCGCAAGAGCCTCCACCAG
TACCGCCCAAGAAATCGCCCCACACCATAACCGCCCAAACCGCAAATCAAGCCCAAACCTCGTGT
CACACAGAAGTTCTCACGCACTTCGGATATACGTTCGAGATGAGGACTCCGACAACCAGCACAAG
ATCAACACAGACACAATCATCATCAAGCCAGCCGTAGGGGCCAGGATGCTGGAGCGGATGATA
ATCCCGACGAGACGATACTGCGCCGCTCCAAGGAGAAGAGGGGCCAGAAAACCGATGCCGAAAT
CTACGTTGAGCTGCGGGTAATTTGCAATTCAGATGACCCAAGGGAACGCTACAAGACAACCCAG
GAGGTGGGCAAGGAGCTTCTGGCATAGTTTTTCATAGCCCGCATTGTCAGAACGAATCGCAGG
TGGCCGTCAAGACCATCGATATGAAGAACCAGTCTCGAAGGATCTCATACTCACAGAAATCCG
AGTGCTCAAGGACTTCAACCACAAGAATCTGGTAAACTTTCTGGATGCCTACCTTCTGGAGCCC
GAGGACCAACTGTGGGTAGTCATGGAGTACATGGATGGCGGCCATTGACTGACGTCGTTACCG
AGACTGTGATGAAGGAGCGCCAGATTGCCTGCGTCTGCCGCGAGACACTCTACGCTATTAGTTT
TCTGCACGCTAAGGGCATTATCCACCGGGACATCAAGTCAGACAACGTGCTGCTGGGCATGGAT
GGCAGTGTAAAGGTGACGGACTTTGGGTTCTGCGCCAACATCGAGGGCGATGAGAAGCGCCAGA
CAATGGTGGGAACGCCGTACTGGATGGCGCCGAAGTGGTCACGCGCAAGAAGTACGGCAAGAA
GGTGGACATCTGGTCTATCGGCATCATGGCCATCGAGATGATCGAAGGCCAGCCACCCGACCTA
TACGAGACTCCACTCCGCGCCCTCTACCTGATCGCCGCCAACGGTCGGCCGGATATCAAGAGCT
GGGATAAGCTGAGTCCCAACCTTCAAGACTTTCTCGATCGCTGTCTCCAGGTGGAGGTGGACCG
AAGGGCCACCGCCGACGAGTTGCTCAGCCATCCGTTCTCAACGACTGCAGCGAGGTCAAGGCC
CTCGTGCCCAACATCAAGGCGGCCAAGAAGGTGCTCCGACGCAACGTATAGTTGCTATGCAATC
ACCGGACGGCCAGGCTGCTCTACGCGTGATCGGAAGCGGAATCGGGTTTCGGGATCTGC

CCCGTGTGTATAATGAGTTTTCAATGTAAATTTGTTTTGTGTGGACGAAACCGGAACTGGA
 GGAATAGAATGCTGACCGTAGTCTTTGTAGTATGTACAACCGTAGAAATGGCGAAAGCAGGACT
 AGGACCCGCAACTCCCCTTCGAAAACAGCACGAGTCAGCGAGGACAGAGAGATGAGCAGGGGC
 CGAAAACTCGAAGGAAACCGTCGCCAAACCGTGGATCCATATCGCATCGCTCGAGCAGTTCAT
 CGATGGCAGGGGGGGGGGTTATCGCTTAGATTAGATTGTCTTATGGCAAATTAGCTTACTTCA
 ACAACGCACACAAACACGCACATATGATATACATAGATACTGTATTATTAAATGTAGGGACATA
 AGTTTGATTACTCTTTATATACCCGTATATATACATAATTGTGATTTAAGCGATTTTATCAAAT
 CAGCATTATGCGACTCTTTATAAAATTCGTCGTAGTCAGTAAGTGCAAACGAACCCTAACGGAG
 AACATGCAATACTTGTGTACATTACCAAAAAACAAAAA

Das Startcodon ist blau und das Stoppcodon ist rot markiert.

DPAK3 Aminosäuresequenz

MSFTKWFKKKGGDGGSEISEIGAPTQNFQRHFHVS RNQETGDLEGLPAPWLRRLMNSQITRDEQDKN
 PDAAYHAVKYNYNSIKKKENEVFKPFITGDVIHEESKEIENYVNYKNKHKSQDPEKSDDDGSST
 ATETESSSGCGSSAGNSNSSSINDSSQQSTVPLDALEEVFKELKTNLEHRETLKAAPQEPVPPV
 PPKSPHTIPPKPQIKPKPRVTQKFSRTSDIRREDSNDQHKINTDTIIIKPAVGAQDAGADDNP
 DETILRRSKEKRAQKTDAEIYVELRVICNSDDPRERYKTTQEVGKGASGIVFIAADLQNESQVA
 VKTIDMKNQSSKDLILTEIRVLKDFNHKNLVNFLDAYLLEPEDQLWVMEYMDGGPLTDVVTET
 VMKERQIACVRETLYAISFLHAKGIHRDIKSDNVLLGMDGSVKVTDGFCANIEGDEKRQTM
 VGTPYWMPEVVTRKKYKGVKDIWSIGIMAIEMIEGQPPDLYETPLRALYLIAANGRPDIKSWD
 KLSPNLQDFLDRCLQVEVDRRATADELLSHPFLNDCSEVKALVPNIKAACKVLRNV

8.2 Wichtige Abkürzungen

AID	Autoinhibitorische Domäne
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
CK2	Casein Kinase 2
COOL	Cloned out of library
CRIB	CDC42 / RAC interactive binding
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DOCK	Dreadlocks
DRK	Downstream of receptor tyrosine kinase
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EGUF	Eyeless Gal4 - UAS Flippase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
GTP	Guanosintri-phosphat
IP	Immunkopräzipitation
KD	Kinasedomäne

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MARCM	Mosaic analysis with a repressible cell marker
Mbt	Mushroom bodies tiny
MLCK	Myosin light chain kinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
PAK	P21-aktivierte Kinase
PBD	P21-Bindungsdomäne
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	3-phosphoinositide-dependent Kinase
PIX	PAK interacting exchange factor
POPX	Partner of Pix
R-MLC	Regulatory myosin light chain
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
WB	Western Blot