

**Molekulare und funktionelle Analyse der p21-aktivierten
Kinase Mbt (mushroom bodies tiny) in der Augen- und
Pilzkörperentwicklung von *Drosophila melanogaster***

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

vorgelegt von

Daniela Schneeberger
aus Schweinfurt

Würzburg, im November 2002

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

Gutachter:.....

Gutachter:.....

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Daniela Schneeberger
Mittelweg 22b
20148 Hamburg

Lebenslauf

18. September 1973	geboren in Schweinfurt
07. September 2001	Heirat mit David Schneeberger
1980-1981	Besuch der Grundschule Hohenroth
1981-1984	Besuch der Grundschule Waigolshausen
1984-1993	Besuch des Olympia-Morata-Gymnasiums Schweinfurt
Juli 1993	Abschluß des Abiturs am Olympia-Morata- Gymnasium Schweinfurt
November 1993- Januar 1999	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg, abgeschlossen mit dem Diplom unter Vorlage der Diplomarbeit
März 1999- November 2002	Promotion an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie; ab Januar 2001 im Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
November 2002	Beantragung des Promotionsverfahrens an der Universität Würzburg

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 wurden. Alle aus der Literatur entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die 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, 08. November 2002

Daniela Schneeberger

Dankeschön!

Bei Thomas möchte ich mich herzlich bedanken für die klasse Betreuung und dass sein Office immer für mich und meine Anliegen offen stand. Die unkomplizierte und freundliche Atmosphäre in der Raabe-Gruppe hat sicher ihren Teil dazu beigetragen, dass ich gerne und motiviert (jedenfalls meistens ;-)) ins Labor gegangen bin! Außerdem weiß ich's zu schätzen, dass er sich Mühe gab, meiner eigenwilligen Farbgebung diverser Graphiken und Abbildungen etwas positives abzugewinnen. Vielen Dank auch an Heike W., die mich sowohl praktisch („inclusion bodiiiiiiies!“) als auch mental („ich sag nur „Hmmm“) superklasse unterstützt hat. Hat von Anfang an echt gepasst! Dem Rest der Raabe-Gruppe, ob schon ausgeschieden oder grade angefangen oder mittendrin, möchte ich für den freundschaftlichen Umgang bedanken. Eike und Mandy mit ihren zwei F's alles Gute! Herrn Heisenberg vielen Dank, dass ich einen Teil der Arbeit auch nach dem Umzug „oben“ machen durfte! Den Genetik-Leuten möchte ich für die schöne Zeit danken, und bei den TA's im speziellen für's Breikochen und Telefonzentrale spielen! Den Kollegen im MSZ herzlichen Dank für die Hilfsbereitschaft gerade am Anfang! Ganz begeistert war ich auch von unserem Sequenzier-As Reinhold!

Mit Anna und Susanne hatte ich sehr entspannende Mittagspausen und jetzt weiß ich (fast) alles übers Kinderkriegen ;-). Vielen Dank für die nicht-wissenschaftlichen Gespräche!

David möchte ich danken, weil er für mich da war als „mein Fels“, den nix so schnell umwirft. (Mach dich schon mal warm, die Brandung kommt nach Hamburg!)

Bekki und Trixi danke ich für ihr engagiertes Korrekturlesen.

Meiner Mutter möchte ich danken, weil sie für mich da ist, interessiert war und sich echt bemüht hat, zu verstehen, was ich mache. Johh, Jakob! Danke das ich bei Euch wohnen konnte!

Niko und der Katze danke ich für die nette Gesellschaft während der Schreiberei.

Inhaltsverzeichnis

<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>1.1 Die Familie der p21-aktivierten Kinasen</u>	2
1.1.1 <u>Strukturmerkmale von PAK-Proteinen</u>	2
1.1.2 <u>Funktion von PAK-Proteinen</u>	3
1.1.3 <u>p21-aktivierte Kinasen in <i>Drosophila</i></u>	5
<u>1.2 Der <i>mbt</i>-Phänotyp</u>	5
<u>1.3 Ziel der Arbeit</u>	6
<u>2. MATERIALIEN</u>	8
<u>2.1 Chemikalien</u>	8
<u>2.2 Enzyme und Reagenzien</u>	8
<u>2.3 Medien</u>	8
<u>2.4 Kits</u>	8
<u>2.5 Vektoren</u>	8
<u>2.6 Puffer</u>	9
<u>2.7 Proteaseinhibitoren</u>	10
<u>2.8 Antikörper</u>	10
2.8.1 <u>Primäre Antikörper</u>	10
2.8.2 <u>Sekundäre Antikörper</u>	11
<u>2.9 Fliegenstämme</u>	11
<u>2.10 Software</u>	13
<u>2.11 Zelllinien</u>	13
<u>2.12 Konstrukte</u>	14
<u>3. METHODEN</u>	15
<u>3.1 Präparation von Plasmid-DNS</u>	15
<u>3.2 Präparation von Plasmid-DNS aus Hefe</u>	15
<u>3.3 Präparation von genomischer DNS aus adulten Fliegen</u>	15
<u>3.4 Linker-PCR</u>	16
<u>3.5 PCR</u>	16

<u>3.6 Einführen von Punktmutationen in Plasmid-DNS</u>	16
<u>3.7 SDS-PAGE und Western Blot</u>	17
<u>3.8 Transfektion von Säugerzellen</u>	17
<u>3.9 Co-Immunpräzipitation zum Nachweis der Interaktion zwischen Mbt und möglichen Interaktionspartnern</u>	17
<u>3.10 In vitro Kinase-Assay</u>	18
<u>3.11 Phosphatase Assay</u>	18
<u>3.12 Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins</u>	18
<u>3.13 Pulldown Assay</u>	19
<u>3.14 Isolation von „inclusion bodies“ für die Immunisierung</u>	19
<u>3.15 Immunfluoreszenzfärbung von larvalen und pupalen Augenscheiben</u>	20
<u>3.16 Semidünnschnitte von Augen adulter Fliegen</u>	20
<u>3.17 Mosaik Analyse mit einem repressible Zellmarker (MARCM)</u>	21
<u>3.18 Paraffinschnitte von adulten Köpfen</u>	22
<u>3.19 Volumenbestimmung auf Paraffinschnitten: Planimetrie</u>	22
<u>3.20 Färbungen von Augenscheiben mit Acridinorange (nach Spreji et al., 1971)</u>	22
<u>3.21 Keimbahntransformation von Fliegen</u>	22
<u>3.22 Remobilisation eines P-Elements auf dem dritten Chromosom</u>	23
<u>4. ERGEBNISSE</u>	24
<u>4.1 Der <i>mbt</i>-Phänotyp</u>	24
4.1.1 Lokalisierung von Mbt an den Adhärenzverbindungen in sich entwickelnden Photorezeptorzellen	24
4.1.2 Mbt spielt eine Rolle in der Photorezeptorzellmorphogenese.....	26
4.1.3 Mbt wird nicht für die Rekrutierung von Photorezeptorzellen benötigt, aber für deren Überleben	29
4.1.4 Mbt ist für die korrekte Ausbildung der Rhabdomere wichtig.....	31
<u>4.2 Interaktion von Mbt mit kleinen GTPasen</u>	32
4.2.1 Mbt interagiert mit aktiviertem Cdc42.....	34
<u>4.3 Untersuchungen zur Kinaseaktivität von Mbt <i>in vitro</i></u>	35
4.3.1 Bindung von Cdc42 reguliert die Kinaseaktivität von Mbt <i>in vitro</i>	35
<u>4.4 Test der Mbt-Konstrukte <i>in vivo</i></u>	37
4.4.1 Die Kinasedomäne und die Cdc42-Bindungsdomäne sind für die Funktion von Mbt während der Augenentwicklung essentiell.....	38

4.4.2 Cdc42 vermittelt die Lokalisation von Mbt an Adhärenzverbindungen	39
4.4.3 Die Kinaseaktivität und die Cdc42-Bindungsdomäne sind essentiell für die Funktion von Mbt während der Pilzkörperentwicklung	43
4.5 Suche nach Mbt-Interaktionspartnern	48
4.5.1 Der Yeast-Two-Hybrid Screen	49
4.5.2 Der genetische Screen	54
4.5.3 Test möglicher Mbt Interaktionspartner	62
4.5.4 Hinweise auf eine Beteiligung von Mbt im ERK-Signalweg.....	63
5. DISKUSSION	65
5.1 Mbt wird durch aktiviertes Cdc42 reguliert.....	65
5.2 Mbt hat auch kinaseunabhängige Funktionen	65
5.3 Cdc42 vermittelt die Lokalisation von Mbt an Adhärenzverbindungen während der Morphogenese der Photorezeptorzellen.....	67
5.4 Unterschiede in der Funktion von Mbt in Augen- und Pilzkörperentwicklung.....	68
5.5 Kann Mbt Apoptose regulieren?	68
5.6 CG8818 und CG14880 sind potentielle Interaktionspartner und Phosphorylierungssubstrate von Mbt.....	69
5.7 Canoe und Eip75B sind genetische Interaktionspartner von Mbt.....	70
5.8 Slingshot und Twinstar bilden eine Verbindung von Mbt zum Cytoskelett.....	71
5.10 Mbt und Crumbs spielen eine Rolle für die Adhärenzverbindungen während der Morphogenese der Photorezeptorzellen.....	72
5.9 Modell für die Funktion von Mbt während der Augenentwicklung	73
5.11 Hinweise auf eine Funktion von Mbt im Raf-MEK-Erk-Signalweg	74
6. ZUSAMMENFASSUNG	75
7. SUMMARY.....	77
8. LITERATUR.....	79
9. ANHANG	87
9.1 Primer.....	87
9.2 Sequenzen.....	88
9.2.1 Mbt	88
9.2.2 Cdc42.....	90
9.2.3 Rac1.....	90
9.2.4 Rho1	91

<u>9.2.5 CG8818</u>	91
<u>9.2.6 CG14880</u>	92
<u>9.3 Abkürzungen</u>	93

1. Einleitung

Immer wieder wird mir die Frage gestellt, was mich an *Drosophila* interessiert und warum ich nicht versuche, etwas herauszufinden, was den Menschen betrifft. Ein Beispiel, um zu unterstreichen, wie erstaunlich ähnlich manche Vorgänge vor allem auf molekularem Niveau in den unterschiedlichsten Spezies sind, ist die menschliche Krankheit *Aniridia*, bei der aufgrund eines Defekts in einer Kopie des Pax6 Gens die Iris reduziert ist oder fehlt. Sind beide Kopien defekt, weist der Fötus schwere Gehirnschäden auf, Augen und Nase fehlen und er kann nicht überleben. Mäuse mit den entsprechenden Mutationen in Pax6 zeigen die gleichen Phänotypen. Pax6, das eine wichtige Rolle in der Augen- und Gehirnentwicklung spielt, kommt in fast allen Tierstämmen (z.B. Säuger, Amphibien, Insekten, Mollusken, Hohltiere), die Licht wahrnehmen können vor. Obwohl diese Tiere unterschiedliche Augentypen haben, verwenden sie alle das hochkonservierte Protein Pax6 als Induktor für die Augenentwicklung. Expression eines Pax6-Proteins z.B. aus Mensch, Maus, Xenopus oder *Caenorhabditis* in *Drosophila* führt zur Induktion von ektopischen Augen. Umgekehrt kann auch das *Drosophila* Pax6-Homolog *eyeless* Augenentwicklung in Xenopus induzieren. Es handelt sich bei Pax6/*eyeless* also um einen während der Evolution beibehaltenen Hauptschalter, der die Mechanismen in Gang setzt, die für die Augenentwicklung benötigt werden (Gehring 2002). Durch die Untersuchungen an *eyeless* wurde viel über die Wirkungsweise der Pax6-Proteine herausgefunden.

Ein weiteres interessantes Beispiel für einen konservierten, molekularen Mechanismus sind die Mitogen aktivierten Protein Kinase Kaskaden (MAPK Kaskaden). Diese Signalkaskaden leiten ein Signal von der Zelloberfläche in den Nukleus, wo Genexpression reguliert wird. Viele Erkenntnisse über diese Signalwege stammen wiederum aus *Drosophila*, z.B. von den Arbeiten über den Sevenless (Sev) Signalweg während der Augenentwicklung (Raabe, 2000) oder über den *Drosophila* epidermal growth factor (DER) Signalweg während der Augen- und Embryonalentwicklung (Freeman, 1997). Um Aspekte der Krebsentstehung verstehen zu lernen, in die MAPK-Kaskaden involviert sind, wurde ebenfalls *Drosophila* als Modellsystem benutzt (Casici et al., 1999). Auch morphogenetische Prozesse während der Embryonalentwicklung, die eine Umorganisation des

Cytoskeletts erfordern, werden über MAPK-Kaskaden gesteuert (Noselli 1998; Bagrodia 1999). Die in diesen Kaskaden mitwirkenden Signalmoleküle sind wiederum hochkonserviert.

Zu diesen Signalmolekülen zählen die p21-aktivierten Kinasen (PAK). Sie kommen z.B. in Mensch, Maus, Ratte, *Drosophila*, *C. elegans*, *Xenopus* und Hefe (*S. cerevisiae*) vor und können aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz in eine verwandtschaftliche Beziehung gebracht werden (Abb.1-1). Mit Mbt (mushroom bodies tiny), einem Mitglied dieser Familie aus *Drosophila*, beschäftigt sich diese Arbeit.

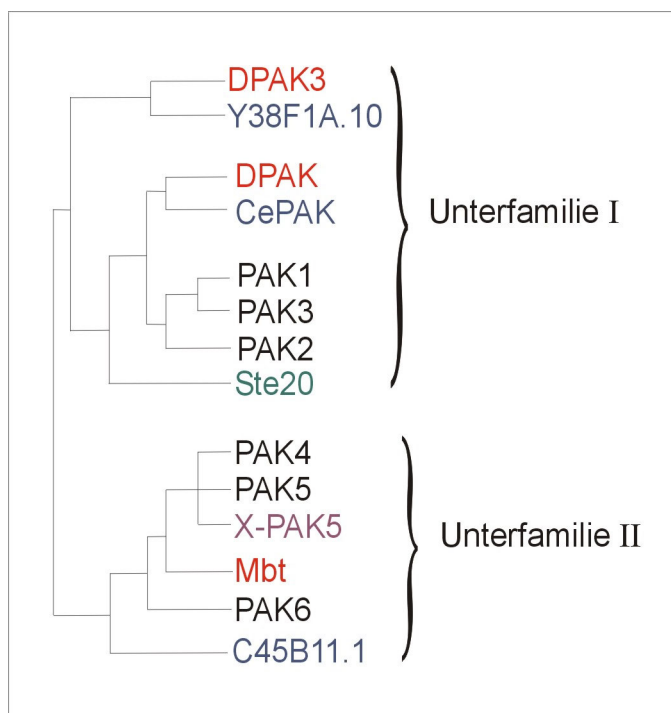


Abb 1-1: Phylogenetischer Stammbaum von PAK-Proteinen (nach Dan, 2001)

Dargestellt sind PAKs aus *Drosophila* (rot), *C.elegans* (blau), Mensch (schwarz), *Xenopus* (magenta) und *S.cerevisiae* (grün). Die Familie der PAKs kann aufgrund von Sequenzunterschieden außerhalb der p21-Bindungsdomäne und der Kinasedomäne in zwei Unterfamilien eingeteilt werden.

1.1 Die Familie der p21-aktivierten Kinasen

1.1.1 Strukturmerkmale von PAK-Proteinen

Aufgrund ihres Aufbaus können PAK Proteine in zwei Unterfamilien eingeteilt werden (s. Abb.1-1). Beiden gemeinsam ist die C-terminale Serin/Threonin-Kinasedomäne (KD) und eine N-terminale Bindungsdomäne für GTPasen der Rho-Familie (p21-Bindungsdomäne, PBD). PAK1-3 und DPAK besitzen zusätzlich C-terminal der PBD eine Kinase-Inhibitor-Domäne (KID). Diese interagiert im inaktiven Zustand der

Kinase mit der KD. Durch Bindung von GTP-gebundenem, aktiven Cdc42 oder Rac wird die intramolekulare Interaktion aufgebrochen, die Kinase kann in der Aktivierungsschleife ein bestimmtes Threonin (T423 in PAK1) autophosphorylieren und wird aktiviert (Zenke et al., 1999; Buchwald et al., 2001; Chong et al., 2001; Lei et al., 2000). PAK4-6 dagegen besitzen in der Aktivierungsschleife an der entsprechenden Stelle ein Serin, sie binden präferentiell an aktives Cdc42 und schwächer an aktives Rac und diese Interaktion führt nicht zur Aktivierung der Kinase (Abo et al., 1998; Pandey et al., 2002; Cau et al., 2001; Lee et al., 2002). In Mbt ist die PBD ebenfalls konserviert, eine Interaktion mit Cdc42 oder Rac ist jedoch noch nicht nachgewiesen (Melzig et al., 1998). PAK1-3 und DPAK enthalten außerdem ein prolinreiches Sequenzmotiv am N-terminalen Ende, das als Bindungsstelle für die SH3-Domänen des Adapterprotein Nck (*Drosophila*: Dock) dient. Diese Interaktion könnte einen Signalweg von membranständigen Rezeptortyrosinkinasen, über Nck/Dock und PAK zu morphogenetischen Prozessen (z.B. axonales Wachstum) darstellen (Galisteo et al., 1996; Hing et al., 1999; Lu et al., 1997; Lu and Mayer, 1999; Zhao et al., 2000). Desweiteren besitzen PAK1-3 und DPAK ein N-terminales prolinreiches Motiv, das an die SH3-Domäne der Proteine PIX/Cool bindet. PIX/Cool sind eine Gruppe von Guanin Nukleotid Austauschfaktoren für Rho-GTPasen, die je nach Isoform aktivierend oder hemmend auf PAK-Proteine wirken können (Manser et al., 1998; Bagrodia et al., 1998; Bagrodia et al., 1999). Diese Strukturmerkmale fehlen in der Unterfamilie II (s.Abb 1-2). Am äußersten C-terminalen Ende befindet sich in Ste20, dem PAK-Homolog aus Hefe, ein Bindungsmotiv für die G β -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins, das essentiell für den Pheromonsignalweg ist. Es ist hochkonserviert und funktionell in mPAK3, hochkonserviert in PAK1,2 und DPAK und fehlt in PAK4-6 und Mbt (Leeuw et al., 1998; Leberer et al., 2000; Yang et al., 2001; Blattner, 1999).

1.1.2 Funktion von PAK-Proteinen

PAK-Proteine spielen hauptsächlich bei der Organisation des Cytoskeletts und in der Regulation von MAPK-Kaskaden eine Rolle. PAK2 kann Raf-1 und MEK direkt phosphorylieren und so Einfluss auf die MAPK-Kaskade nehmen (King et al., 1998; Sun et al., 1999; King et al., 2001), die wiederum Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen steuert. Für PAK6 konnte gezeigt werden, dass es den Androgenrezeptor (AR) binden, in den Nukleus wandern und dort AR-vermittelte

Transkription verhindern kann (Yang et al., 2001). Außerdem spielen PAK1 und PAK4 als Apoptoseinhibitoren eine Rolle. Sie phosphorylieren Bad und hemmen so

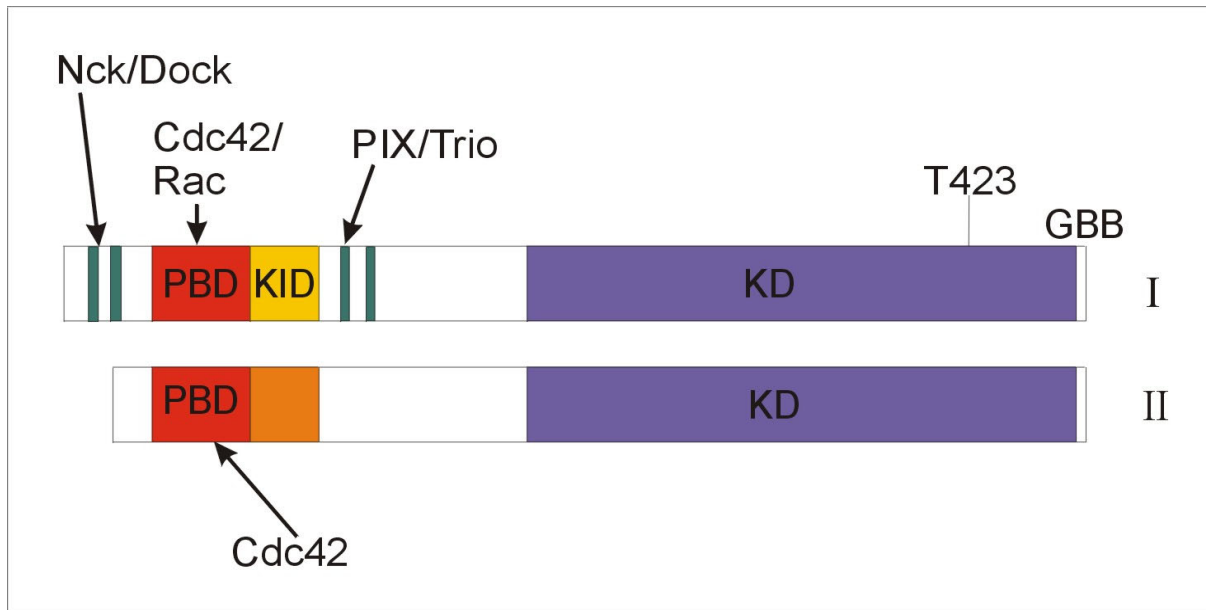


Abbildung 1-2: Struktur der PAK-Proteine

Die schematische Darstellung zeigt den Aufbau von PAK-Proteinen der Unterfamilien I und II. Konservierte Domänen sind gleichfarbig gezeichnet. Bindungspartner mit bekannten Bindungsstellen sind durch Pfeile mit diesen verbunden. Das für die Autophosphorylierung und Aktivierung wichtige Threonin 423 ist ebenfalls eingezeichnet. Die Abkürzungen bedeuten: PBD: p21-Bindungsdomäne, KID: Kinase-Inhibitor-Domäne, KD: Kinasedomäne, GBB: G β -Bindungsdomäne. Grün dargestellt sind Prolinreiche Sequenzmotive.

dessen proapoptotische Wirkung (Tang et al., 2000; Schürmann et al., 2000; Gnesutta et al., 2001). PAK2 dagegen wird von Caspase-3 gespalten, wodurch eine aktive C-terminale Kinase Domäne entsteht, die die Bildung von „apoptotic bodies“ induzieren kann (Rudel et al., 1997). Zellen, die aktiviertes PAK4 exprimieren, verlieren ihre Stressfasern und Fokalkontakte und können unabhängig davon in Soft Agar wachsen, was auf eine Transformation der Zellen hindeutet (Qu et al., 2001).

Wie oben erwähnt, spielen PAK-Proteine eine Rolle bei der Reorganisation des Cytoskeletts. Dabei sind sie als Effektoren für Cdc42 bzw. Rac1 aktiv, die für die Bildung von Lamellipodien, Filopodien, Membranfalten und den Verlust von Fokalkontakten verantwortlich sind (Daniels et al., 1999; Bagrodia et al., 1999). In Endothelzellen und Fibroblasten werden für die Zellwanderung essentielle Umstrukturierungen vorgenommen, die von PAK-Proteinen gesteuert werden (Sells et al., 1999; Kiosses et al., 1999). Während der chemotaktisch ausgerichteten Bewegung in trachealen Muskelzellen (tracheal smooth muscle cells, TSMC; Dechert et al., 2001) und Endothelzellen (EC) bei der Angiogenese (Master et al., 2001) ist PAK1 beteiligt. Als Effektor für PAK1 und PAK4 in der Reorganisation des

Cytoskeletts wurde außerdem LIMK-1 identifiziert. Durch Phosphorylierung wird LIMK-1 aktiviert, kann vermehrt Cofilin phosphorylieren und so dessen aktindepolymerisierende Wirkung hemmen (Dan et al., 2001; Edwards et al., 1999). Desweiteren kann PAK1 MLCK (myosin light chain kinase) hemmen, wodurch die Menge an phosphorylierter regulatorischer MLC (myosin light chain) sinkt und die Abflachung von Zellen verhindert wird (Sanders et al., 1999). X-PAK5 kann Mikrotubuli binden und sie stabilisieren. Durch Interaktion mit Rac oder Cdc42 verändern sich die Bindungseigenschaften und X-PAK5 kolokalisiert mit Aktin statt mit Mikrotubuli (Cau et al., 2001).

1.1.3 p21- aktivierte Kinasen in *Drosophila*

In *Drosophila* sind drei PAK-Proteine bekannt: DPAK und das aus der Genomsequenz vorhergesagte DPAK3 gehören der Unterfamilie I an. Mbt ist aufgrund von Sequenzhomologien der Unterfamilie II zugeordnet (Abb.1-1). DPAK assoziiert zusammen mit DRac mit dynamischen Aktinstrukturen in den Saumzellen während der dorsalen Schließung des Embryos (Harden et al., 1996; Harden et al., 1999). Außerdem spielt DPAK eine Rolle beim korrekten Auswachsen von Axonen in sich entwickelnden Photorezeptorzellen. Dabei bindet das Rezeptormolekül Dscam an das Adapterprotein Dock, welches mit DPAK interagiert. Zusätzlich bindet Dock an den Guanin Nukleotid Austauschfaktor Trio, der über Aktivierung von DRac DPAK reguliert (Hing et al., 1999; Schmucker et al., 2000; Newsome et al., 2000). Mutationen in *mbt* führen nicht zu axonalen Wachstumsdefekten, sondern zum Verlust von Photorezeptorzellen und Kenyonzellen, den Neuronen des Pilzkörpers, einer Gehirnstruktur, die an olfaktorischen Lern- und Gedächtnisleistungen beteiligt ist (Melzig et al., 1998). Außerdem zeigen *mbt*-mutante Fliegen missgestaltete Borsten (Melzig et al., 1998).

1.2 Der *mbt*-Phänotyp

In einem Screen von lebensfähigen X-chromosomalen P-Element-Insertionslinien nach Gehirnstrukturdefekten wurden zwei *mbt*-Allele gefunden: Die *mbt*^{P1}-Mutation hat den kompletten Verlust der *mbt*-Expression zur Folge, während in *mbt*^{P2}-Embryonen ein zu großes Transkript nachgewiesen werden kann. Beschriebene Phänotypen der *mbt*-Mutationen sind der Verlust von Kenyon- und Photorezeptorzellen (Abb. 1-3). Zweiteres äußert sich in einem „rauhe Augen“-

Phänotyp. Ein drittes Allel, *mbt*^{P3}, wurde aufgrund seines „rauhe-Augen-Phänotyps“ entdeckt. Es ist ein hypomorphes Allel und führt nur zu einem Verlust von Photorezeptorzellen. Der Pilzkörperphänotyp kann im transheterozygoten (*mbt*^{P3}/*mbt*^{P1}) Zustand oder durch unpräzises Ausschneiden der P-Element-Insertion aufgedeckt werden (Melzig und Raabe, unveröffentlicht). Es ist nicht bekannt, ob die *mbt*-Phänotypen auf einen Fehler bei Proliferation, Determination oder Absterben von Zellen zurückzuführen sind (Melzig et al., 1998).

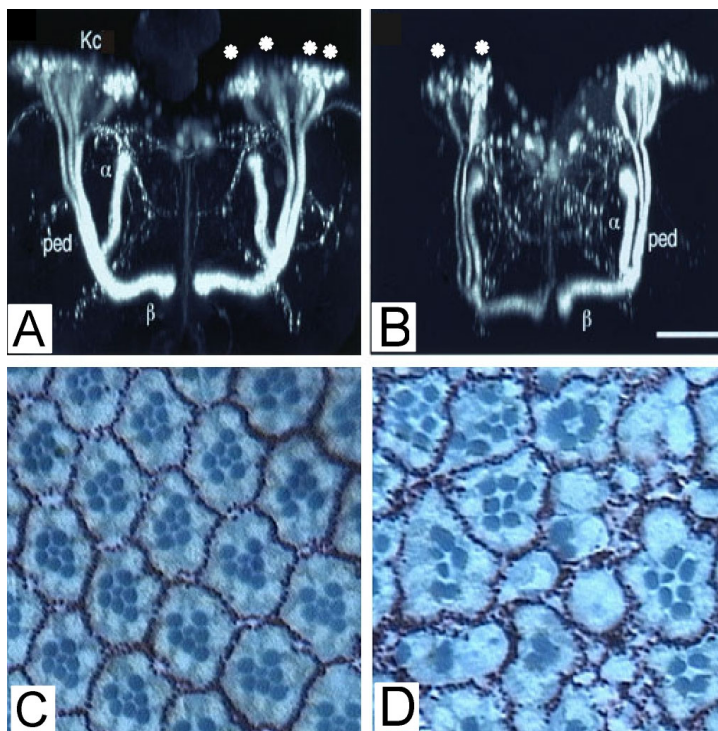


Abbildung 1-3: Der *mbt*-Phänotyp

Blick frontal auf eine dreidimensionale Rekonstruktion des adulten (A) wildtypischen und (B) *mbt*^{P1} Pilzkörpers nach Anfärbung mit der Gal4-Linie 17d. Diese wird nur in einem Teil jeder Einheit klonalen Ursprungs (Sterne) exprimiert. Im *mbt*^{P1} Pilzkörper sind weniger Kenyonzellen (Kc) vorhanden, wodurch auch die Faserbündel, die die Axone darstellen und die den Pedunkel (ped) und die α - und β -Loben formen, dünner sind. In diesem Beispiel (B) fehlen im linken Pilzkörper zwei klonale Einheiten (Sterne), was wahrscheinlich auf ein Fehlen zweier von vier Pilzkörper-neuroblasten zurückzuführen ist (Melzig et al., 1998). (C) und (D) zeigen tangentielle Schnitte durch adulte Augen von (C) wildtypischen und (D) *mbt*^{P1}-Fliegen. Es ist deutlich zu sehen, dass Photorezeptorzellen, kenntlich gemacht durch die dunkle Färbung ihrer Rhabdomere, fehlen.

1.3 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte das *Drosophila* PAK-Protein Mbt näher charakterisiert werden. In Struktur-Funktionsanalysen *in vivo* und *in vitro* sollte die Bedeutung der jeweiligen Domänen für die Mbt-Funktion während der Augen- und Pilzkörperentwicklung untersucht werden. Dazu sollten wildtypische und mutante Formen von Mbt mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems in der Fliege exprimiert und auf deren Fähigkeit zur Rettung des *mbt*-Phänotyps verglichen werden. In biochemischen Interaktionstests sollten mögliche Interaktionspartner von Mbt identifiziert und charakterisiert werden (z.B. Rho-GTPasen), während in Aktivitätsstudien der Einfluss von Interaktionspartnern und von verschiedenen Punktmutationen Mbt *in vitro* untersucht werden sollte. Außerdem sollte der *mbt*-Phänotyp mittels histologischer Verfahren besser

charakterisiert werden, um Rückschlüsse auf die Funktion von Mbt ziehen zu können. Ein weiteres Ziel war, Interaktionspartner von Mbt aus einem genetischen Screen (Raabe, unveröffentlicht) und aus einem Yeast-two-hybrid Screen (Kröhning, 1999) zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Diese Interaktionspartner sollten ebenfalls Aufschluß geben über die Prozesse, in die Mbt involviert ist.

2. Materialien

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von folgenden Firmen bezogen: Applichem, Roth, Sigma, Serva, Roche, Biorad.

2.2 Enzyme und Reagenzien

Enzyme wurden von Roche, New England Biolabs, Invitrogen und Stratagene bezogen. Das Polyfect Transfectionsreagenz war von Qiagen.

2.3 Medien

Dulbecco's Modified Eagle Medium, Fötale Kälberserum, Penicillin-Streptavidin und Glutamin waren von Invitrogen. Medien für die Bakteriologie wurden nach Sambrook et al. hergestellt.

2.4 Kits

Site-Directed-Mutagenesis-Kit	Stratagene
Opti-Prime-Kit	Stratagene
pET-System	Novagen
phospho-Antibody-Sampler	New England Biolabs
Plasmid-Midi/Maxi-Kit	Qiagen
Gel-Extraction Kit	Qiagen
PCR-Purification Kit	Qiagen
Abi-Prism Sequencing Kit	Perkin Elmer

2.5 Vektoren

Name	Verwendung	
pUAST	Keimbahntransformation	Brand und Perrimon, 1993
pUCh π Δ 2-3	Helferplasmid mit Transposasegen	Rio und Rubin, 1985
pcDNA3	Transfektion von Säugerzellen	Invitrogen
pBluescript II SK	Klonierung	Stratagene
pET28b	Expression von bakteriellem His-Fusionsprotein	Novagen
pGEX	Expression von bakteriellem GST-Fusionsprotein	Amersham

2.6 Puffer

Lysispuffer 1: (IP)	25mM Tris pH7,5 150mM NaCl 2mM EDTA 2mMEGTA 10% Glycerol 0,1% NP-40
Lysispuffer 2 : (Aufreinigung GST-Fusions- Protein)	50mM Tris pH7,5 100mM EDTA pH 7,5 0,1% Tween
Lysispuffer 3 : (Pulldown)	50mM Tris pH7,6 150mM NaCl 1% Nonidet P-40 1mM NaVO ₃
Lysispuffer 4 : (Aufreinigung Inclusion bodies)	50mM Tris pH8,0 0.25%(w/v) Saccharose 1mM EDTA pH 8,0
Kinasepuffer:	20mM HEPES pH7,6 20mM MgCl ₂ 10mM β-Glycerophosphat 20mM p-Nitrophenylphosphat immer frisch dazu aus Stocklösung: 0,5mM Na ₃ VO ₄ 2mM DTT 50μM ATP + 5μCi [γ- ³² P]ATP +5μg MBP

5xSDS-Gelladepuffer: 185mM Tris, pH6,8
 50% Glycerol
 10% SDS
 625mM DTT
 0,05% Bromphenolblau

2.7 Proteaseinhibitoren

Name	Stocklösung	Solvenz	Lagerung	Verdünnung
Antipain	5mg/ml	H ₂ O	-20°C	1:1000
Aprotinin	1mg/ml	H ₂ O	4°C	1:100
Leupeptin	0,5mg/ml	H ₂ O	-20°C	1:1000
PepstatinA	0,7mg/ml	Methanol	-20°C	1:1000
PMSF	100mg/ml	DMSO	RT	1:500

2.8 Antikörper

2.8.1 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung/ Menge	Block	Verwendung	Herkunft
Mbt (s. Blattner, 1999)	Hase	1:500	3% Normales Ziegen serum (NZS), 5% Milchpulver	Immunfluoreszenz (IF), Western Blot (WB)	Eurogentec
HA (12CA5)	Maus	1:1000	5% Milchpulver	WB	Roche
HA(12CA5)	Maus	8µl	-	IP	MSZ
myc (9E10)	Maus	1:2000, 3µl	3% NZS, 5% Milchpulver	IF, WB	Santa Cruz
Armadillo (N71A)	Maus	1:50	3% NZS	IF	E. Knust
canoe	Hase	1:500	10% NPS 5% Milchpulver	IF, WB	D. Yamamoto
mCD8a	Ratte	1:200	3% NZS	IF	Caltag
Fasciclin II (1D4)	Maus	1:10	10% NZS	IF	Hybridoma Bank
Discs large	Hase	1:1000	3% NZS	IF	A. Wodarz
Crumbs	Maus	1:5	3% NZS	IF	E. Knust
GST	Hase	1:1000	5% Milchpulver	WB	S. Ludwig

2.8.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper/ Fluorochrom	Spezies	Verdünnung	Block	Verwendung	Herkunft
Maus-Cy3	Ziege	1:250	-	IF	MoBiTec
Hase-Cy3	Ziege	1:250	-	IF	MoBiTec
Maus-Alexa488	Ziege	1:250	-	IF	MoBiTec
Hase-Alexa488	Ziege	1:250	-	IF	MoBiTec
Ratte-Alexa488	Ziege	1:200	-	IF	MoBiTec
Phalloidin-Rhodamin	-	1:20	in 1% NZS	IF	Molecular Probes

2.9 Fliegenstämme

Stamm	Kommentar	Beschriftung	Herkunft	Zweck
w;P{UAS-mbt}	pUAST-mbt	TR26	T. Raabe	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt}	pUAST-mbt	TR67	T. Raabe	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{T525A} }2	pUAST-mbt ^{T525A} , II.Chromosom	T2	Blattner, 1999	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{T525A} }4	pUAST-mbt ^{T525A} , II.Chromosom	T4	Blattner, 1999	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{T525A} }5	pUAST-mbt ^{T525A} , III.Chromosom	T5	Blattner, 1999	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{Gβ} }1	pUAST-mbt ^{Gβ} , II.Chromosom	G1	Blattner, 1999	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{Gβ} }3	pUAST-mbt ^{Gβ} , II.Chromosom	G3	Blattner, 1999	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{Gβ} }7	pUAST-mbt ^{Gβ} , III.Chromosom	G7	Blattner, 1999	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-hPAK4}4	pUAST-hPAK4, III.Chromosom	4/4	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-hPAK4}11	pUAST-hPAK4, II.Chromosom	4/11	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{H19,22L} }3	pUAST-mbt ^{H19,22L} , III.Chromosom	HL3	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{H19,22L} }9	pUAST-mbt ^{H19,22L} , II.Chromosom	HL9	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{H19,22L} }10	pUAST-mbt ^{H19,22L} , III.Chromosom	HL10	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{H19,22L-CAAX} }10	pUAST-mbt ^{H19,22L-CAAX} , III.Chromosom	HLC10	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{H19,22L-CAAX} }12	pUAST-mbt ^{H19,22L-CAAX} , II.Chromosom	HLC12	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{H19,22L-CAAX} }15	pUAST-mbt ^{H19,22L-CAAX} , III.Chromosom	HLC15	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{K397M} }4	pUAST-mbt ^{K397M} , III.Chromosom	KT4	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{K397M} }5	pUAST-mbt ^{K397M} , III.Chromosom	KT5	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{S492E/S520N} }3	pUAST-mbt ^{S492N/S520E} , II.Chromosom	DM3	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{S492E/S520N} }5	pUAST-mbt ^{S492N/S520E} , III.Chromosom	DM5	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
w;P{UAS-mbt ^{S492E/S520N} }8b	pUAST-mbt ^{S492N/S520E} , II.Chromosom	DM8b	diese Arbeit	Rescuekonstrukt
cn ¹ ; In(3L)8h, pur ² Eip78C ^{8h} ry ⁵⁰⁶	Mutation in <i>eip78C</i>	4907	Blooming- ton	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}

w ¹¹¹⁸ , P{w ^{+mGT} =GT1}hdc ^{BG002} 37/TM6B, P35UZ}DB1; Tb ¹	P-Elementinsertion in <i>headcase</i>	12410	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
ry ⁵⁰⁶ P{ry ^{+17.2} =PZ}gish ⁰⁴⁸⁹⁵ / MKRS	P-Elementinsertion in <i>gish</i>	11790	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
ry ⁵⁰⁶ P{ry ^{+17.2} =PZ}Tm1 ⁰²²⁹⁹ / TM3, ry ^{RK} , Sb ¹ , Ser ¹	P-Elementinsertion in <i>tropomyosin1</i>	11564	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
P{ry ^{+17.2} =PZ}Baldspot ⁰² 281 ry ⁵⁰⁶ / TM3, ry ^{RK} , Sb ¹ , Ser ¹	P-Elementinsertion in <i>baldspot</i>	11563	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
ru ¹ , h ¹ , th ¹ , st ¹ , cno ² , cu ¹ , sr ¹ , e ^S , ca ¹ /TM3, Sb ¹ , Ser ¹	Mutation in <i>canoe</i>	3107	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
ru ¹ , h ¹ , th ¹ , st ¹ , cno ² , cu ¹ , sr ¹ , e ^S , ca ¹ /TM6B, Tu, Hu, e	Mutation in <i>canoe</i>	3107/TM6	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
P{BmD-w}cno ^{misty} /TM3	Mutation in <i>canoe</i>	cno ^{mis}	D. Yamamoto	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
P{ry ^{+17.2} =PZ}Eip75B ⁰⁷⁰ 41 ry ⁵⁰⁶ /TM3, ry ^{RK} , Sb ¹ , Ser ¹	P-Elementinsertion in <i>eip75B</i>	11712	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)009105/TM3	Mutation in <i>canoe</i>	9105	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)071901/TM3	Mutation in <i>eip78c</i>	71901	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)024838/TM3	Mutation in <i>gish</i>	24838	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)144011/TM3	Mutation in <i>eip78c+baldspot</i>	144011	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)023802/TM3	Mutation in <i>Tm1</i>	23802	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)041509/TM3	Mutation in <i>headcase</i>	41509	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)052318/TM3	P-Elementinsertion zwischen CG6494, CG5950	52318	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)068607/TM3	P-Elementinsertion	68607	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)071710/TM3	P-Elementinsertion in CG6072	71710	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)14603/TM3	P-Elementinsertion in CG4919	14603	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)074103/TM3	P-Elementinsertion zwischen CG12600, CG7552	74103	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)084013/TM3	P-Elementinsertion in CG2094	84013	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)092301/TM3	P-Elementinsertion zwischen CG11962, CG10901 und in CG3628	92301	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)146907/TM3	P-Elementinsertion zwischen CG6983, CG6964 und zwischen CG5728, CG6413	146907	P.Deak	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
Δ2-3, Sb/TM3, Ser		Δ2-3	Stocksammlung	Transposasequelle
I(3)009105Δ2	jump out-Allel von I(3)009105	9105Δ2	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)009105Δ4	jump out-Allel von I(3)009105	9105Δ4	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)009105Δ6	jump out-Allel von I(3)009105	9105Δ6	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)009105Δ9	jump out-Allel von I(3)009105	9105Δ9	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)009105Δ18	jump out-Allel von I(3)009105	9105Δ18	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)071901Δ4	jump out-Allel von I(3)071901	71901Δ4	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)071901Δ5	jump out-Allel von I(3)071901	71901Δ5	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
I(3)071901Δ7	jump out-Allel von I(3)071901	71901Δ7	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}

l(3)071901Δ16	jump out-Allel von l(3)071901	71901Δ16	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
l(3)071901Δ17	jump out-Allel von l(3)071901	71901Δ17	diese Arbeit	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
<i>mbt</i> ^{P1}	Null-Allel von <i>mbt</i>	P1	Melzig et al., 1998	
<i>mbt</i> ^{P3} /FM7	hypomorphes Allel von <i>mbt</i>	P3/FM7	Raabe, unveröffentlicht	
w1118	<i>white</i> -Mutante	w	Stocksammlung	Ausgangsstamm für Transgene Linien, Kontrolllinie
FRT19A, tub-Gal80, hsFlp;UAS-mCD8a/GFP		MARCM4	L. Luo	klonale Analyse
Cdc42 ³ , FRT19A/FM7	Cdc42 ^{G114N} , letale Mutation	Cdc42 ³ -FRT19A/FM7	R. Fehon	klonale Analyse
Cdc42 ⁴ , FRT19A/FM7	G370A-Basenaustausch, führt zu abnormalen Splicing, letale Mutation	Cdc42 ⁴ -FRT19A/FM7	R. Fehon	klonale Analyse
FM7;GMR-Gal4/SM6,CyO		FM7;GMR-Gal4/CyO	Stocksammlung	augenspezifische Gal4-Treiberlinie
FM7;elav-Gal4/SM6,CyO		FM7;elav-Gal4/CyO	Stocksammlung	neuronale Gal4-Treiberlinie
FM7;SM6,CyO/Sco		FM7; CyO/Sco		Balancer-Kombination für X und II.
w;TM3,Sb,e/TM6B,Tu,Hu,e		TM3/TM6	Stocksammlung	Balancer für III.
w; SM6,CyO/Sco		CyO/Sco	Stocksammlung	Balancer für II.
P{ry ^{+17.2} =PZ}kst ⁰¹²¹⁸ l(3)72Dg ⁰¹²¹⁸ , ry ⁵⁰⁶ /TM3, ry ^{RK} , Sb ¹	P-Elementinsertion in <i>karst</i> (β _H -Spectrin)	11528	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
y ¹ w ¹¹¹⁸ ,P{w ^{+mc} =lacW} crb ^{1B5} /TM3, Sb ¹	P-Elementinsertion in <i>crumbs</i>	10331	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
ru ¹ , h ¹ , th ¹ , st ¹ , cu ¹ , sr ¹ , e ^S , crb ² , ca ¹ /TM3, Sb ¹ Ser ¹	Mutation in <i>crumbs</i>	3448	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
ry ⁵⁰⁶ P{ry ^{+17.2} =PZ}ssh ⁰¹²⁰⁷ /TM3, ry ^{RK} Sb ¹ Ser ¹	P-Elementinsertion in <i>slingshot</i>	11524	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}
y ¹ w 6 7 c 2 3 ; P{w ^{+mc} =lacW}tsr ^{k05633} /CyO	P-Elementinsertion in <i>twinstar</i>	12201	Bloomington	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}

2.10 Software

Adobe Photoshop 6.0

CorelDraw 8.0

AMIRA 2.3 (TGS)

Microsoft Word, Excel, Powerpoint

2.11 Zelllinien

Für die Expression von Proteinen mittels des pcDNA3-Vektors wurden Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) verwendet. Standardkulturbedingungen: 5% CO₂, 37°C, umsetzten 1:5 -1:10 zweimal in der Woche.

2.12 Konstrukte

Konstrukt	Vektor	Insert	Klonierungsenzyme
pBSSK-mbt(PCR)	pBS SK ⁻	pTW77; PCR: Mbt/Eco-F, Mbt901-R	EcoRI, PmlI
pBSSK-mbt ^{CAAX}	pBSSK-mbt-XBA	pTW48; PCR: CAAX/BglII-F, CAAX/Asp-R	BglII, Asp718
pBSSK-mbt ^{H19,22L}	pBS SK ⁻	pTW77; Mut: H19,22L-1, H19,22L-2	-
pBSSK-mbt ^{H19,22L-CAAX}	pBS SK ⁻	pBSSK-mbt ^{CAAX} ; Mut: H19,22L-1, H19,22L-2	-
pBSSK-mbt ^{S520E}	pBSSK ⁻	pBSSK-mbt(PCR); Mut: mbt/S492N-F, mbt/S492N-R + mbt/S520E-F, mbt/S520E-R	AlwNI
pBSSK-mbt ^{T525A}	pBS SK ⁻	pTW77; Mut: T525A-1, T525A-2	-
pBSSK-mbt-XBA	pBS SK ⁻	pTW77; Mut: XBA-FOR, XBA-REV1	-
pcDNA3-HA-mbt	pcDNA3-HA1	pDB17	EcoRI, ApaI
pcDNA3-HA-Mbt ^{H19,22L}	pcDNA3-HA-mbt	pBSSK-mbt ^{H19,22L} ; PCR: Mbt/Eco-F, Mbt901-R	EcoRI, PmlI
pcDNA3-HA-mbt ^{H19,22L-CAAX}	pcDNA3-HA1	pBSSK-mbt ^{H19,22L-CAAX} ; PCR: Mbt/Eco-F, Mbt901-R	EcoRI
pcDNA3-HA-Mbt ^{K397M}	pcDNA3-HA1	pcDNA3-HA-mbt; Mut: K397M-1, K397M-2	EcoRI, ApaI
pcDNA3-HA-mbt ^{S520E}	pcDNA3-HA1	pBSSK-mbt ^{S520E}	EcoRI, ApaI
pcDNA3-HA-mbt ^{T525A}	pcDNA3-HA-mbt	pBSSK-mbt ^{T525A}	XhoI
pTW77	pBS SK ⁻	LD18914 (<i>mbt</i> -cDNS)	EcoRI, XhoI
pUAST-hPAK4	pUAST	pEGFP-C3-HA-hPAK4; PCR: hPak4/Eco-F, hPak612-R	EcoRI, XbaI
pUAST-mbt (pTW79)	pUAST	pBSSK-mbt	NotI, Asp718
pUAST-mbt ^{CAAX}	pUAST	pBSSK-mbt ^{CAAX}	EcoRI
pUAST-mbt ^{Gβ}	pUAST	pBSSK-mbt ^{Gβ}	NotI, Asp718
pUAST-mbt ^{H19,22L}	pUAST	pBSSK-mbt ^{H19,22L}	NotI, Asp718
pUAST-mbt ^{H19,22L-CAAX}	pUAST	pBSSK-mbt ^{H19,22L-CAAX}	EcoRI
pUAST-mbt ^{S520E}	pUAST	pBSSK-mbt ^{S520E}	NotI, Asp718
pUAST-mbt ^{T525A}	pUAST	pBSSK-mbt ^{T525A}	NotI, Asp718

3. Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden durchgeführt, wie in Sambrook et al. (1989) beschrieben.

3.1 Präparation von Plasmid-DNS

Plasmid-DNS wurde mit dem Plasmid-Midi/Maxi-Kit von Qiagen aus Bakterien isoliert. Für Klonierungen wurde Plasmid-DNS im Mini-Maßstab nach der Methode der alkalinen Lyse präpariert (Sambrook et al., 1989).

3.2 Präparation von Plasmid-DNS aus Hefe

Eine 2ml Übernachtskultur der Hefen in Drop-out Medium (2,0g Bacto®Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (Difco), je 16,5mg Tyrosin/Uracil/Adenin, 3ml Drop-out Solution (Clontech); nach dem Autoklavieren 30ml 20% Glucose zugeben) wurde abzentrifugiert und das Pellet in 100µl STET-Puffer (8% Sucrose, 50mM EDTA pH 8,0, 59mM Tris-Cl pH 8,0, 5% Triton X-100) resuspendiert. Nach der Zugabe von 100µl säuregewaschener Glaskügelchen (0,45mm) wurde 5min gevortext. Danach wurden 100µl STET-Puffer dazugegeben, kurz gevortext und 3min gekocht. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Zellreste 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 85µl 7,5M Ammoniumacetat gemischt, bei -20°C für 30min inkubiert und dann 10min abzentrifugiert. 200µl des Überstandes wurden in 500µl vorgekühltes EtOH überführt, gemischt und für 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und in 50µl Wasser resuspendiert. Diese DNS-Lösung wurde zum Transformieren von Bakterien verwendet.

3.3 Präparation von genomischer DNS aus adulten Fliegen

50 Fliegen wurden in 0,5ml Homogenisierungspuffer (100mM NaCl, 100mM Tris pH8,0, 50mM EDTA, 0,5% SDS) homogenisiert und für 30min bei 68°C inkubiert. Durch Zugabe von 75µl 8M KAc und anschließendem 5minütigen Zentrifugieren wurden Proteine und Cuticulareste vom nukleinsäurehaltigen Überstand abgetrennt. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß, in dem 1ml 100% Ethanol vorgelegt war, überführt. Nach mehrmaligem Invertieren und 5min Inkubation bei RT die Nukleinsäuren aus durch 5minütiges Zentrifugieren pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 360µl dH₂O gelöst. Danach erfolgte ein

RNAse-Verdau mit 5µl RNAse (10mg/ml) für 30min bei 37°C. Nach der Zugabe von 40µl 3M NaAc wurde die DNS durch eine Phenol- und Chloroform/Isoamylalkoholextraktion (1:1) weiter aufgereinigt. Nach dem letzten Extraktionsschritt wurde die DNS mit 1ml 100% Ethanol ausgefällt, für 5 min abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40µl H₂O gelöst.

3.4 Linker-PCR

Standardprogramm:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Wiederholung
1	94	3	1x
2	94	0,5	
3	Tm1[Primer]	1	
4	72	1/kb	5x
5	94	0,5	
6	Tm2[Primer]	1	
7	72	1/kb	25x
8	5	hold	

Tm: siehe Primertabelle (9.1)

3.5 PCR

Standardprogramm:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Wiederholung
1	94	3	1x
2	94	0,5	
3	Tm[Primer]	1	
4	72	1/kb	30x

Tm: siehe Primertabelle (9.1)

3.6 Einführen von Punktmutationen in Plasmid-DNS

Dazu wurde der „site-directed-mutagenesis kit“ von Stratagene benutzt, wie im Handbuch beschrieben. Verwendete Primer sind in 9.1 aufgeführt.

3.7 SDS-PAGE und Western Blot

Alle Puffer wurden wie im Biometra-Handbuch beschrieben angesetzt und verwendet.

3.8 Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte mit dem Polyfect-Reagenz von Qiagen nach dem Handbuch des Herstellers. Als Expressionsvektor wurde sowohl der pcDNS3-Vektor (Invitrogen) verwendet, als auch ein pcDNA3-HA und ein pcDNA3-myc-Vektor, um entsprechende Fusionsproteine zu exprimieren.

3.9 Co-Immunpräzipitation zum Nachweis der Interaktion zwischen Mbt und möglichen Interaktionspartnern

HA-Mbt oder verschiedene HA-Mbt-Konstrukte wurden einzeln oder zusammen mit putativen Interaktionspartnern in HEK293-Zellen transfiziert. Nach 20-24h wurde das Medium gegen Hungermedium (0,3% FKS) ausgetauscht um mitogene Signalkaskaden auszuschalten. Nach 42-48h wurden die Zellen in PBS geerntet. Ab hier wurde bei 4°C oder auf Eis gearbeitet. Die Lyse erfolgte 30-40min in Lysispuffer 1 (25mM Tris pH7,5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 10% Glycerol, 0,1% NP-40) auf dem Nutator. Unlösliche Zellreste wurden 20min bei 4°C abzentrifugiert und mit dem Überstand eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Eingesetzt wurden 100-400µg Protein, wobei alle Proben auf 500µl mit Lysispuffer aufgefüllt wurden. Um Proteine, die unspezifisch an die Protein-G-Agarose (PGA; Roche) banden, zu entfernen, wurden die Lysate für 30-60min mit 10µl PGA rotierend inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der PGA wurden die Lysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit je 8µl α -HA-Antikörper (12CA5, MSZ) für 10min rotierend inkubiert. Zur Präzipitation wurden 30µl PGA zugegeben. Diese erfolgte mindestens 2h rotierend. Danach wurde die PGA zweimal mit je 1ml Lysispuffer gewaschen und nach vollständigem Absaugen des Puffers in 30µl 5x SDS-Gelladepuffer für 5min gekocht. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die Proteine mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

3.10 *In vitro* Kinase-Assay

HA-Mbt oder verschiedene HA-Mbt-Konstrukte wurden einzeln oder zusammen mit myc-Cdc42 oder myc-Cdc42^{V12} in HEK293-Zellen transfiziert. Nach 20-24h wurde das Medium gegen Hungermedium (0,3% FKS). Nach 42-48h wurde eine Co-Immunpräzipitation mit dem α -HA-Antikörper durchgeführt. Dem zweimaligen Waschen der PGA mit je 1ml Lysispuffer, wurden ein Waschschrift mit 1ml 0,5M NaCl und zwei weitere mit je 1ml Kinasepuffer angeschlossen. Die Reaktion erfolgte in 30 μ l Kinasepuffer mit 5 μ g MBP als Substrat und 5 μ Ci γ [P³²]-ATP für 30min bei 30°C. Durch 5minütiges Kochen in 5x Proteinpuffer wurde die Reaktion abgestoppt, die Proteine durch SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Einbau von radioaktivem Phosphor wurde mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.11 Phosphatase Assay

myc-CG8818 und myc-CG14880 wurden einzeln (als nicht-phosphorylierte Kontrolle) oder als jeweils doppelter Ansatz zusammen mit HA-Mbt^{S520E} in HEK293-Zellen exprimiert. Nach 20-24h wurde das Medium gegen Hungermedium (0,3% FKS) ausgetauscht um mitogene Signalkaskaden auszuschalten. Nach 42-48h wurde eine Co-Immunpräzipitation mit dem α -myc-Antikörper durchgeführt. Die doppelten Ansätze wurden geteilt. Die eine Hälfte wurde zweimal mit Phosphatasepuffer gewaschen und anschließend mit 80U Phosphatase in 800 μ l 1x Phosphatasepuffer (Roche) für 90min bei 30°C inkubiert, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Nach dem Absaugen des Puffers wurden die Proben 5min in 30 μ l 5x SDS-Gelladepuffer gekocht, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern.

3.12 Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins

Die für das aufzureinigende Protein kodierende Sequenz wurde in den pGEX-Vektor kloniert und in DH5 α transformiert. Mit einer Übernachtskultur dieser Bakterien wurde 1l Medium angeimpft (1:20) und 3h bei 37°C geschüttelt. Die Induktion der Expression erfolgte mit 1mM IPTG für 2h bei 37°C. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert, das Pellet in 10ml Lysispuffer 2 (1% Triton-X 100, 100mM EDTA, 1x PBS +Proteaseinhibitoren, 1mM Na₃VO₄) resuspendiert und für viermal 2min auf Eis

sonifiziert. Die unlöslichen Bakterienrückstände wurden 30min bei 15000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 600µl GSH-Beads (Pharmacia) für 2 h auf dem Nutator bei 4°C inkubiert und danach auf eine Säule (Biorad) gegeben. Gewaschen wurden die GSH-Beads einmal mit Lysispuffer 2 und dreimal mit GSH-Waschpuffer (50mM Tris pH 7,5, 100mM Na₂EDTA pH7,5 , 0,1% Tween 20). Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit 600µl reduziertem Glutathion (Sigma) für 2-3h bei 4°C auf dem Nutator. Anschließend wurde für 36-48h gegen 50mM Tris pH 7,5 dialysiert.

3.13 Pulldown Assay

Pro Ansatz wurden je 60µg GST-Cdc42 (1µg/µl) bzw. 30µg GST (1µg/µl) mit Lysispuffer 3 (50mM Tris pH 7,6, 150mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 1mM NaVO₃ (immer frisch dazu)) auf 500µl Endvolumen aufgefüllt und mit je 50µl GSH-Beads (1:3 in PBS) für 2h bei 4°C auf dem Nutator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 1ml Aktivierungspuffer (50mM HEPES-NaOH pH 7,4, 100mM KCl, 1mM DTT (immer frisch dazu)) wurde die Flüssigkeit komplett abgesaugt und je 100µl Aktivierungspuffer auf die Beads gegeben. Nun erfolgte die Inkubation mit je 2mM GTP bzw. GDP bei 37°C für 4min unter gelegentlichen schütteln. Die Reaktion wurde mit 20mM MgCl₂ abgestoppt. Danach wurden die Beads mit Lysaten (500-800µg Proteinmenge in Lysispuffer 3) von transient HA-Mbt exprimierenden HEK293-Zellen für 4h bei 4°C auf dem Nutator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Lysispuffer 3 wurden die Beads in je 50µl Protein- Gelladepuffer aufgenommen, 5min aufgeköcht und 30µl auf einem SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western-Blot wurden mit den entsprechenden Antikörpern die Proteine von Interesse nachgewiesen.

3.14 Isolation von „inclusion bodies“ für die Immunisierung

Bakterien mit entsprechendem Plasmid wurden in 1,5l Medium angeimpft, induziert und pelletiert wie in 3.11 beschrieben. Alle Schritte wurden auf Eis oder im 4°C-Raum durchgeführt. Das Pellet wurde in 80ml Lysispuffer 4 (50mM Tris pH 8,0, 0,25% Saccharose, 1mM EDTA pH 8,0) resuspendiert, die Suspension mit 200mg Lysozym in 20ml Lysispuffer 4 aufgefüllt und 30min inkubiert. Nach zehnteiliger Sonifizieren wurden 200ml Detergentpuffer (20mM Tris pH 7,5, 2mM EDTA pH 8,0, 200mM NaCl, 1% Deoxycholat, 1% Nonidet P-40) dazugegeben, gemixt und zentrifugiert. Das Pellet wurde solange mit Waschpuffer (0,5% Triton-X 100, 1mM

EDTA pH 8,0) gewaschen, bis ein kompaktes Pellet übrigblieb (ca. drei- bis viermal). Anschließend wurde es einmal gründlich mit 250ml 70% Ethanol gewaschen, in einem kleinen Volumen 1x PBS resuspendiert und sonifiziert bis die Suspension durch eine 23G Nadel paßte. Die Proteinmenge wurde auf einem SDS-PAGE bestimmt. Für die Immunisierung wurde 500-800µg pro Injektion benötigt.

3.15 Immunfluoreszenzfärbung von larvalen und pupalen Augenscheiben

Die Augenscheiben wurden aus den jeweiligen Stadien herauspräpariert und in PBS auf Eis gelagert bis zur Fixierung. Diese erfolgte in PLP (720µl 3,7% Paraformaldehyd, 200µl 0,2M NaI₄, 1ml 0,15M Lysin, 60µl 1M NaHPO₄ pH6,8) für 25min auf Eis. Danach wurden die Präparate dreimal je 10min in PBT (PBS mit 0,3% Triton X-100) gewaschen und 2h in Blocklösung (0,3% normales Ziegenerum bzw. 10% normales Pferdeserum in PBT) bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper in Blocklösung erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurde dreimal mindestens 30min mit PBT bei RT gewaschen und dann mit dem zweiten, fluorochromgekoppelten Antikörper für 2h bei RT im Dunkeln inkubiert. Zum Schluß wurden die Präparate mindestens über Nacht mit PBT gewaschen, anschließend in VectaShield H-1000 (Alexis) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die fertigen Präparate wurden am Konfokalen Laser Scan Mikroskop (Leica) analysiert und die erhaltenen Dateien mit der Amira Software (TGS) bearbeitet.

3.16 Semidünnschnitte von Augen adulter Fliegen

Köpfe von adulten Fliegen wurden abgetrennt und auf einem Objektträger mit einer frischen Rasierklinge in der Mitte durchgeschnitten. Sie wurden in PBS auf Eis gelagert bis zur Fixierung. Diese erfolgte in Fixierlösung (460µl H₂O, 250µl 0,2M Na-Cacodylat pH 7,3, 40µl 50%Glutaraldehyd in Wasser, 250µl 4%OsO₄) in Coagulations-Glasröhrchen für 30min auf Eis. Danach wurden die Köpfe 2mal mit eiskaltem 0,1M Na-Cacodylat gewaschen und für 2-4h in 2% OsO₄ auf Eis nachfixiert. Anschließend wurde 1mal mit 0,1M Na-Cacodylat gewaschen und mittels Durchführung einer Alkoholreihe (je 10min 50%, 70%, 90%, 96%, 2x100% Ethanol) die Präparate entwässert. Nach zweimaliger 20minütiger Inkubation in Propylenoxid, wurden die Köpfe in einem 1:1 Epon-Propylenoxidgemisch über Nacht bei RT

stehengelassen. Am nächsten Tag wurden sie in Epon eingebettet. Die Polymerisation erfolgte 3-4 Tage bei 50-60°C.

1-2µm Schnitte wurden am Ultramikrotom angefertigt und in einem Wassertropfen auf einem Objektträger aufgenommen. Um die Schnitte zu färben, wurde das Wasser auf einer Heizplatte bei 100°C verdampft, die Schnitte mit Färbelösung (1% Toluidinblau, 1% Borax) mindestens 1min auf einer 60°C-Wärmeplatte inkubiert und die Färbelösung mit Wasser abgespült. Nach dem Trocknen wurden sie in DePex (Serva) eingedeckelt und mit einem Gewicht beschwert bei 60°C getrocknet.

3.17 Mosaik Analyse mit einem repressible Zellmarker (MARCM)

Lee und Luo entwickelten 1998 das MARCM-System (Mosaik Analyse mit einem repressiblen Zellmarker). Mit Hilfe dieses Systems können in einem bezüglich einer Mutation heterozygoten Tier homozygot durch Flp/FRT-vermittelte mitotische Rekombination mutante Zellklone induziert werden, die durch Expression eines Reportergens positiv markiert sind.

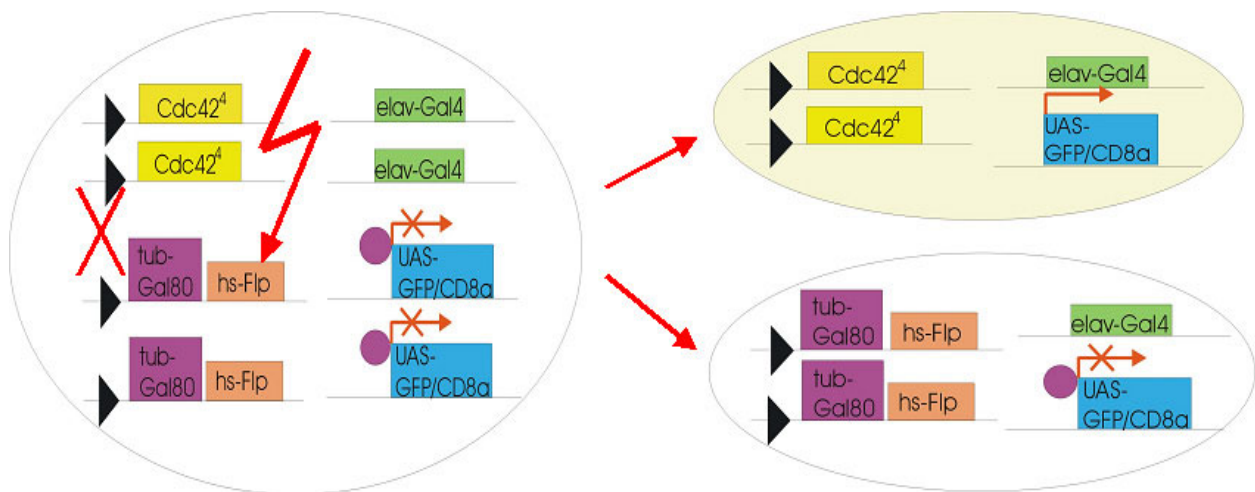


Abbildung 3-1: Das MARCM-System

Links ist die Zelle eines weiblichen Tieres dargestellt, in dem die *cdc42⁴*-mutanten Klone induziert wurden. Es sind Zweichromatidchromosomen dargestellt. *cdc42⁴* liegt auf dem X-Chromosom, das eine FRT-Stelle (schwarze Dreiecke), eine Angriffsstelle der Flippase, besitzt. Auf dem zweiten X-Chromosom, das ebenfalls eine FRT-Stelle trägt, liegen ein Gal80-Gen unter der Kontrolle des Tubulinpromotors (violett) und ein Flippasegen unter der Kontrolle eines Hitzeschockpromotors (orange). Auf den Autosomen liegen ein Gal4-Gen unter der Kontrolle des neuronalen Elav-Promotors (grün) und ein GFP/CD8a-Fusionsprotein unter UAS-Kontrolle (blau). In dieser Situation wird die Expression des Reportergens durch Gal4 durch den Repressor Gal80 verhindert. Durch den Hitzeschock (roter Pfeil) wird die Expression der Flippase angeschaltet, die an den FRT-Stellen Rekombination induzieren kann. Findet eine Rekombination statt, finden wir nach der Mitose rechts dargestellte Tochterzellen, wobei die gelb gefärbte die interessante ist (dargestellt sind Einchromatidchromosomen). Die Zelle ist homozygot für die Mutation *cdc42⁴* und das Gen für den Transkriptionsrepressor Gal80 ist durch die Rekombination nicht mehr in der Zelle vorhanden. Das GFP/CD8a-Fusionsprotein kann durch Gal4 exprimiert werden. Durch Färbungen mit einem Antikörper gegen CD8a können diese Zellen sichtbar gemacht werden.

3.18 Paraffinschnitte von adulten Köpfen

Fliegen wurden mit Äther betäubt, jeder Kragen mit je 15 Fliegen bestückt und die Kragen mit der Fliegenkopfseite nach unten auf Eis gelagert. Die Fixierung erfolgte für 4h in Carnoy-Fixierlösung (30ml Ethanol, 15ml Chloroform, 5ml Eisessig) bei RT. Nacheinander folgten nun folgende Inkubationsschritte bei RT: 2mal 30min in Ethanol, 1h in trockenem Ethanol und über Nacht in Methylbenzoat. Nach einer Inkubation in einem 1:1 Paraffin-Methylbenzoatgemisch für 1h bei 58°C, wurden die Kragen 8mal je 30min bei 58°C in Paraffin gegeben. Danach wurden die Krägen in Silikonförmchen in Paraffin eingebettet und bei 18°C gelagert bis die 7µm Schnitte angefertigt wurden. Um das Paraffin abzulösen, wurden die Objektträger 2mal 30min in Xylol gegeben und danach sofort in Entellan eingebettet.

3.19 Volumenbestimmung auf Paraffinschnitten: Planimetrie

Die Volumenbestimmung der Pilzkörper-Calices wurde nach Heisenberg et al. (1995) durchgeführt. Als interner Referenzwert wurde der Ellipsoidkörper mitbestimmt, um auszuschließen, dass Volumenunterschiede zwischen verschiedenen Fliegen in den Calices auf der unterschiedlichen Größe des gesamten Gehirns beruhen.

3.20 Färbungen von Augenscheiben mit Acridinorange (nach Spreji et al., 1971)

Larvale bzw. pupale Augenscheiben wurden in AcridinorangeLösung ($1,6 \times 10^{-6} \text{M}$ in PBS) präpariert, in PBS überführt und bis zum Einbetten in PBS gelagert. Die Präparate wurden sofort am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.21 Keimbahntransformation von Fliegen

Die Keimbahntransformation von Fliegen wurde mit geringen Abweichungen nach dem Protokoll von T. Twardzik (1993) durchgeführt.

3.22 Remobilisation eines P-Elements auf dem dritten Chromosom

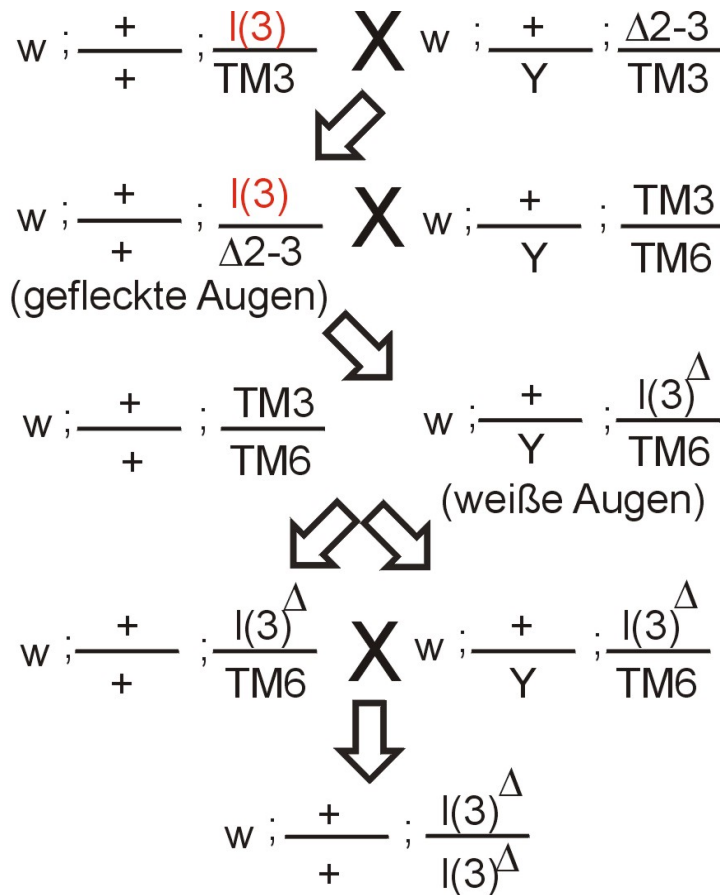


Abbildung 3-2: Kreuzungsschema für die Remobilisierung (jumpout) eines P-Elements auf dem III. Chromosom

Das II. Chromosom wurde der Übersicht wegen nicht dargestellt. $I(3)$ steht für die P-Elementinsertion, die rote Augen hervorruft. $I(3)^\Delta$ steht für das Chromosom, aus dem das P-Element remobilisiert wurde. $\Delta 2-3$ stellt das Chromosom, welches das Transposasegen trägt, dar.

Um ein P-Element zu remobilisieren, wurden ein P-Element-Stamm und ein Transposasegen tragender Stamm verpaart (Abb. 3-2). Die Nachkommen, in denen Remobilisationsergebnisse stattgefunden hatten, konnten an rot-weiß gefleckten Augen erkannt werden. Durch Rückkreuzung dieser Tiere mit einem drittchromosomalen Balancerstamm wurden homozygote Linien etabliert (Abb. 3-2).

4. Ergebnisse

4.1 Der *mbt*-Phänotyp

Wie Melzig et al. 1998 zeigen, ist der *mbt*-Phänotyp durch den Verlust von Kenyon- und Photorezeptorzellen gekennzeichnet. Die folgenden Untersuchungen beschränken sich zunächst auf den Augenphänotyp. Die Augen von *Drosophila* eignen sich als Versuchssystem sehr gut, da sie während ihrer ganzen Entwicklung leicht zugänglich sind.

Um der Ursache des *mbt*-Augenphänotyps auf den Grund zu gehen, wurden verschiedene Entwicklungsstadien näher charakterisiert.

4.1.1 Lokalisierung von Mbt an den Adhärenzverbindungen in sich entwickelnden Photorezeptorzellen

Die Differenzierung der Photorezeptorzellen in der larvalen Augenscheibe ist ein schrittweiser Prozess, der in der morphogenetischen Furche initiiert wird, die sich von posterior nach anterior über die Augenscheibe bewegt (Wolff und Ready, 1993). Färbungen von larvalen Augenscheiben von *w¹¹¹⁸*-Fliegen mit α -Mbt zeigten, dass Mbt in allen Zellen und in einem höheren Maße in Photorezeptorzellen exprimiert wird und an der apiko-lateralen Membran lokalisiert ist (Abb. 4-1, A). In *mbt^{P1}*-Augenscheiben ist kein Mbt-Protein detektierbar (Abb. 4-1, B). Dadurch wird die Aussage von Melzig et al. (1998), dass es sich bei *mbt^{P1}* um ein Null-Allel handelt bestätigt. Doppelfärbungen mit α -Arm gegen Armadillo (*Drosophila* β -Catenin), einem Adhärenzverbindungsprotein, zeigten eine Kollokalisierung von Arm und Mbt in Adhärenzverbindungen (AV) (Abb. 4-1, C und E).

Zu Beginn der Pupalentwicklung drehen sich die ommatidialen Cluster. Die Drehung wird bei 37% Pupalentwicklung (Abb. 4-2, pupal development: p.d.) abgeschlossen. Dann beginnen sich die AV von distal nach proximal zu strecken. Nach 67% p.d. erstrecken sich die AV über die ganze distal-proximale Länge der Photorezeptorzellen. Während dieser Prozesse bleibt Mbt mit Arm an den AV lokalisiert (Abb. 4-3).

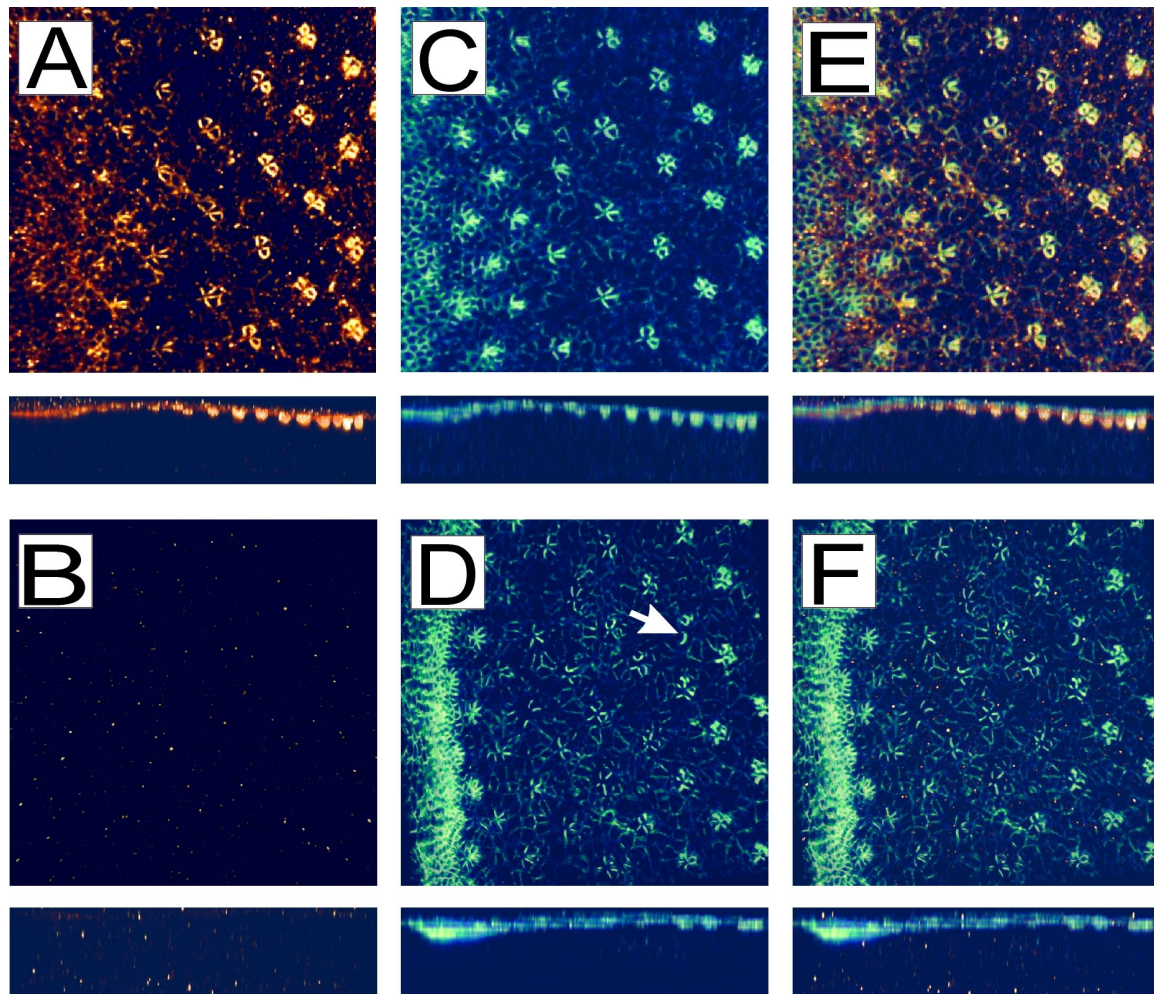


Abbildung 4-1: Der mbt^{P1} -Phänotyp in der Augenscheibe der dritten Larve

Es handelt sich um apikal-basale Projektionsansichten von wildtypischen (A,C,E) bzw. mbt^{P1} -Augenscheiben (B,D,F), die mit α -Mbt (A,B) und α -Arm (C,D) gefärbt wurden. Eine Doppelfärbung ist in E und F gezeigt. Unter den Aufsichten sind jeweils die entsprechenden apikal-basalen Querschnitte gezeigt, um die apikale Lokalisation von Arm und Mbt zu verdeutlichen. Die morphogenetische Furche, in der die Rekrutierung der Photorezeptorzellen beginnt, befindet sich links. Mbt kolokalisiert mit Arm in den rekrutierten Photorezeptorzellen (E). In mbt^{P1} -Augenscheiben ist kein Mbt-Protein detektierbar (B). Adhärenzverbindungen werden zwar gebildet, allerdings sehen sie unorganisiert aus (Pfeil in D).

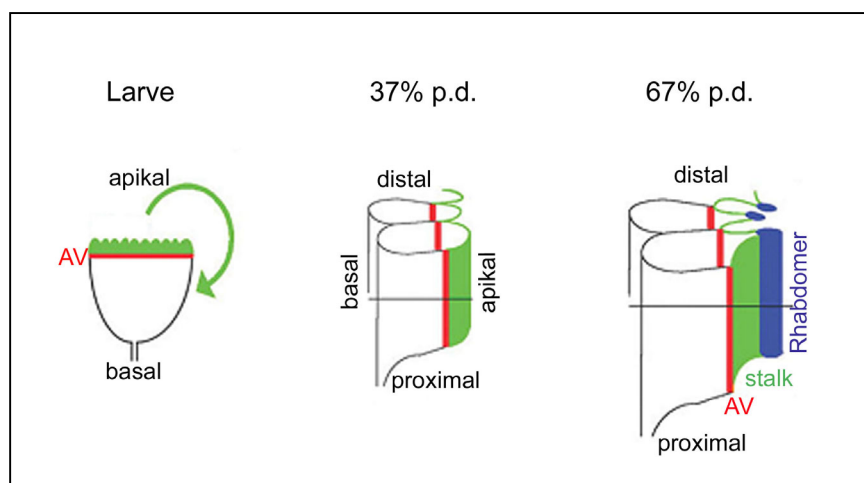


Abbildung 4-2: Morphogenetischen Prozesse in sich entwickelnden Photorezeptorzellen

AV: Adhärenzverbindungen, p.d. „pupal development“ (Pupalentwicklung)

4.1.2 Mbt spielt eine Rolle in der Photorezeptorzellmorphogenese

Durch α -Arm-Färbungen konnte gezeigt werden, dass auch in der *mbt^{P1}*-Augenscheibe AV zwischen den Photorezeptorzellen gebildet werden (Abb. 4-1, D und F). Diese bilden jedoch kein gleichmäßiges Netzmuster, sondern sind unorganisiert. Während der in der Puppe stattfindenden Morphogenese verstärkt sich dieser Phänotyp (Abb. 4-3). Nachdem die Drehung der ommatidialen Cluster nach 37% p.d. abgeschlossen ist, wird die Unregelmäßigkeit der AV deutlicher und sie erstrecken sich zum Teil basolateral. Nach 50% p.d. sind oft fragmentierte, völlig disorganisierte AV zu sehen (Abb. 4-3). Um auszuschließen, dass der beobachtete Defekt auf eine fehlerhafte Lokalisation von Arm zurückzuführen ist, wurden zusätzlich Färbungen mit einem Antikörper durchgeführt, der das Protein Canoe erkennt, was ebenfalls ein Bestandteil von AV darstellt (Matsuo et al., 1999). In wildtypischen Augenscheiben ist das Expressionsmuster von Canoe und Mbt kaum zu unterscheiden. Canoe kolokalisiert ebenfalls mit Arm in AV (Abb. 4-4 und 4-1, A). In *mbt^{P1}*-Augenscheiben dagegen ist Canoe mislokalisiert (Abb. 4-4, E, Pfeile). Auch während der Pupalentwicklung der *mbt^{P1}*-Augenscheiben bleiben Arm und Canoe kolokalisiert (Matsuo et al., 1999 und Abb. 4-4). Es handelt sich also tatsächlich um einen strukturellen Defekt und nicht um die Mislokalisation eines einzelnen Proteins. Um die Morphologie der Zellen in *mbt^{P1}*-Gewebe näher zu untersuchen, wurden wildtypische und *mbt^{P1}*-Augenscheiben mit einem Antikörper gegen Crumbs (Crb) und gegen Discs large (Dlg) gefärbt. Crb ist ein Transmembranprotein, lokalisiert apikal der AV und wird zur Bildung und Aufrechterhaltung von AV während der Photorezeptorzellmorphogenese benötigt (Izassoost et al., 2002; Pellikka et al., 2002). Dlg ist ein Protein der Septumverbindungen, die in epithelialen Zellen basal der AV zu finden sind. In Abbildung 4-5 ist zu sehen, dass auch diese Proteine in *mbt^{P1}*-Augenscheiben einen Lokalisationsdefekt zeigen. So lokalisieren sowohl Crb als auch Dlg hier mehr lateral als in wildtypischen Augenscheiben. Das deutet darauf hin, dass sich der strukturelle Defekt in *mbt^{P1}*-Fliegen über die ganze Photorezeptorzelle erstreckt und nicht auf die AV beschränkt ist. Im Hinblick auf die Tatsache, dass in der Puppe bereits Photorezeptorzellen fehlen (vgl. 4.1.3, Abb. 4-6), könnte es auch sein, dass Zell-Zellkontakte nicht oder nur fehlerhaft gebildet werden können, da oft die zu kontaktierende Nachbarzelle fehlt.

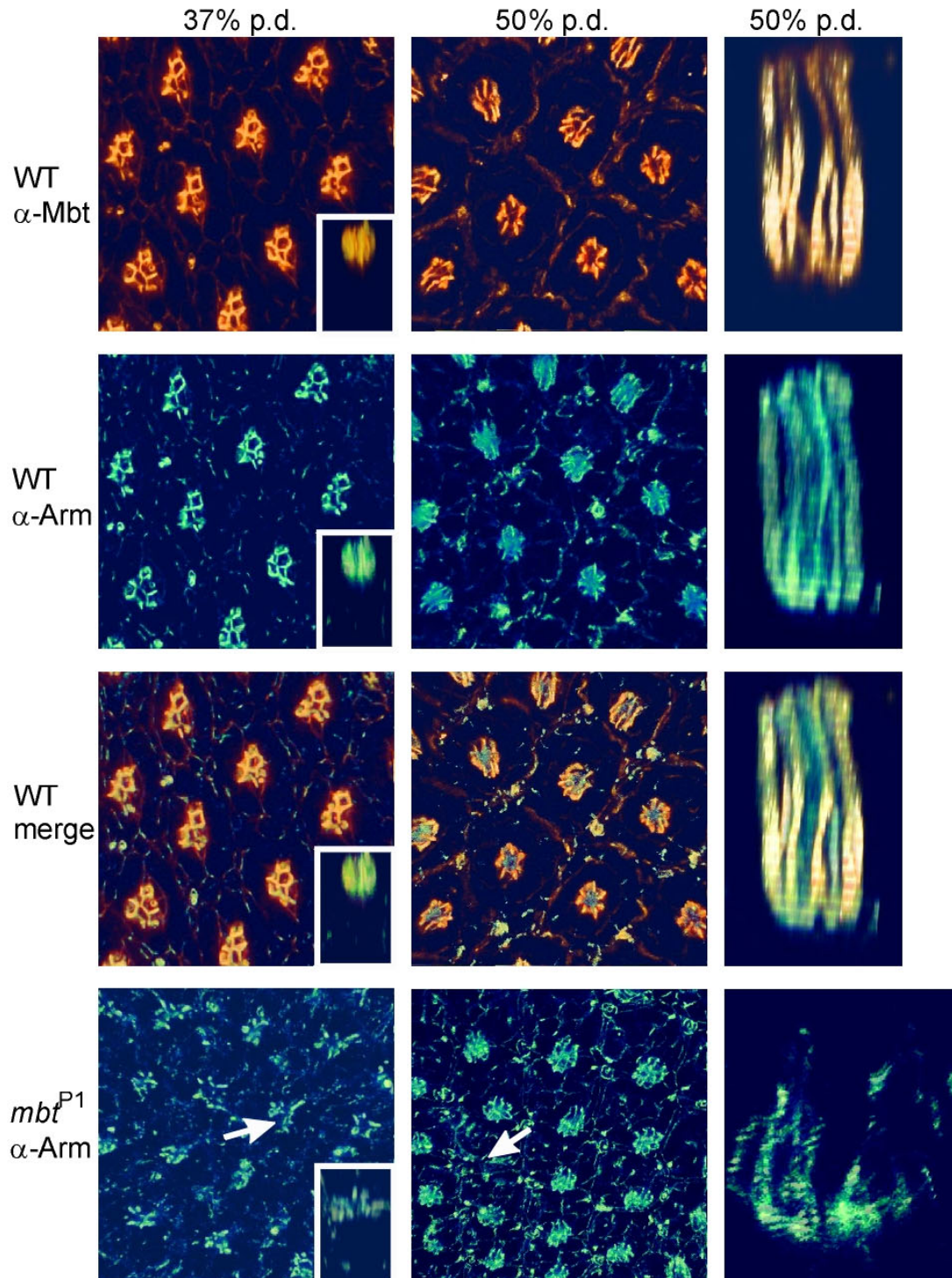


Abbildung 4-3: Der mbt^{P1} -Phänotyp in pupalen Augenscheiben

Gezeigt sind distal-proximale Projektionen von pupalen Augenscheiben nach 37%p.d (linke Spalte) und 50% p.d. (mittlere Spalte), die mit α -Mbt und α -Arm gefärbt wurden. Mbt und Arm kolokalisieren in den sich entwickelnden Photorezeptorzellen sowie in Pigment- und Borstenzellen (WT merge). 3D-Rekonstruktionen von einzelnen Photorezeptorzellclustern sind bei 37% p.d (linke Spalte, Nebenbild) und 50% p.d. (rechte Spalte) dargestellt. Die massive distal-proximale Streckung der AV wird deutlich. In α -Arm-Färbungen von mbt^{P1} -Augenscheiben wird die Disorganisation der AV sichtbar (mbt^{P1} , α -Arm). Sie erstrecken sich teilweise basolateral (Pfeil, 37% p.d.). Bei 50% p.d. erstrecken sie sich nicht wie im Wildtyp über die ganze distal-proximale Ausdehnung der Photorezeptorzellen (Pfeil, 50% p.d., rechte Spalte).

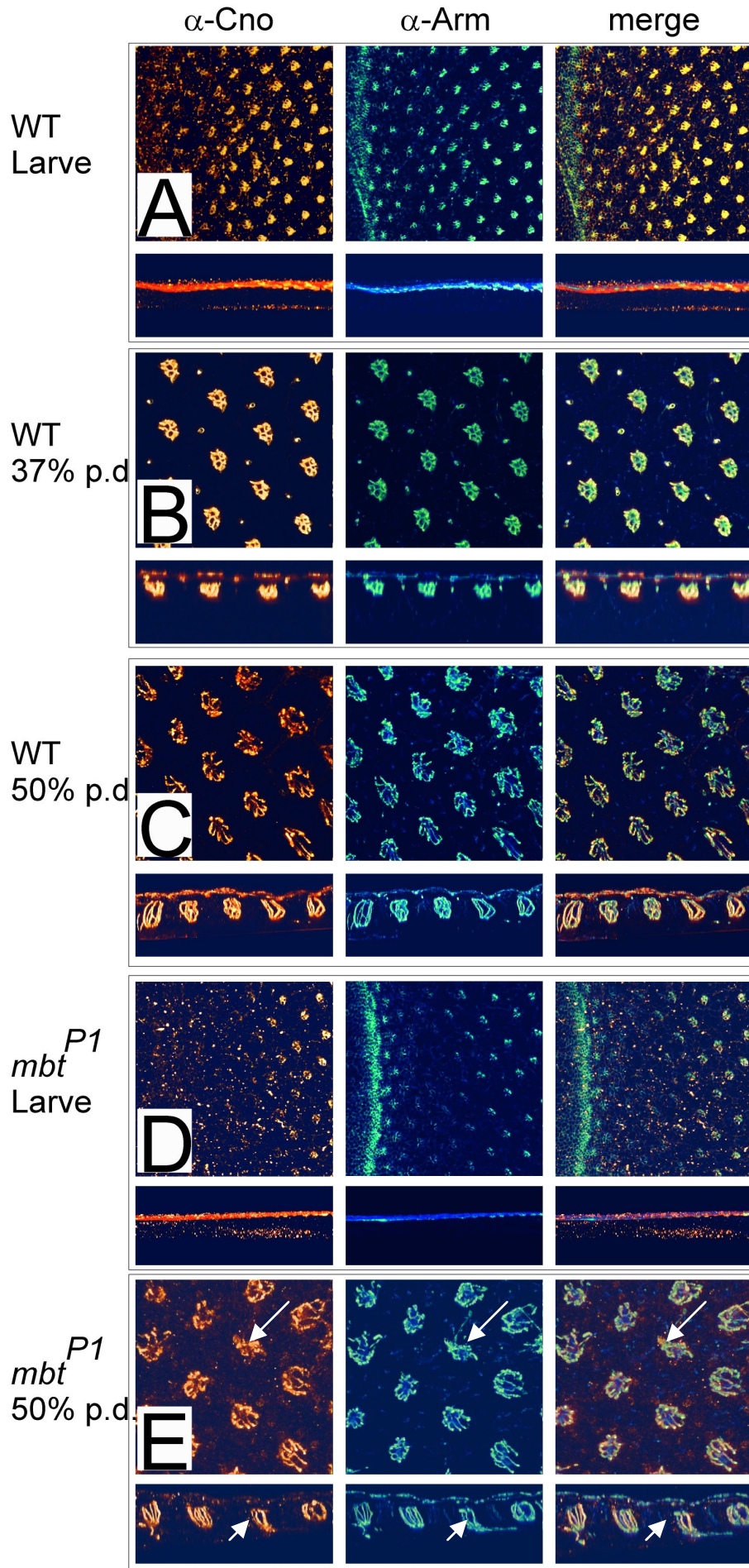
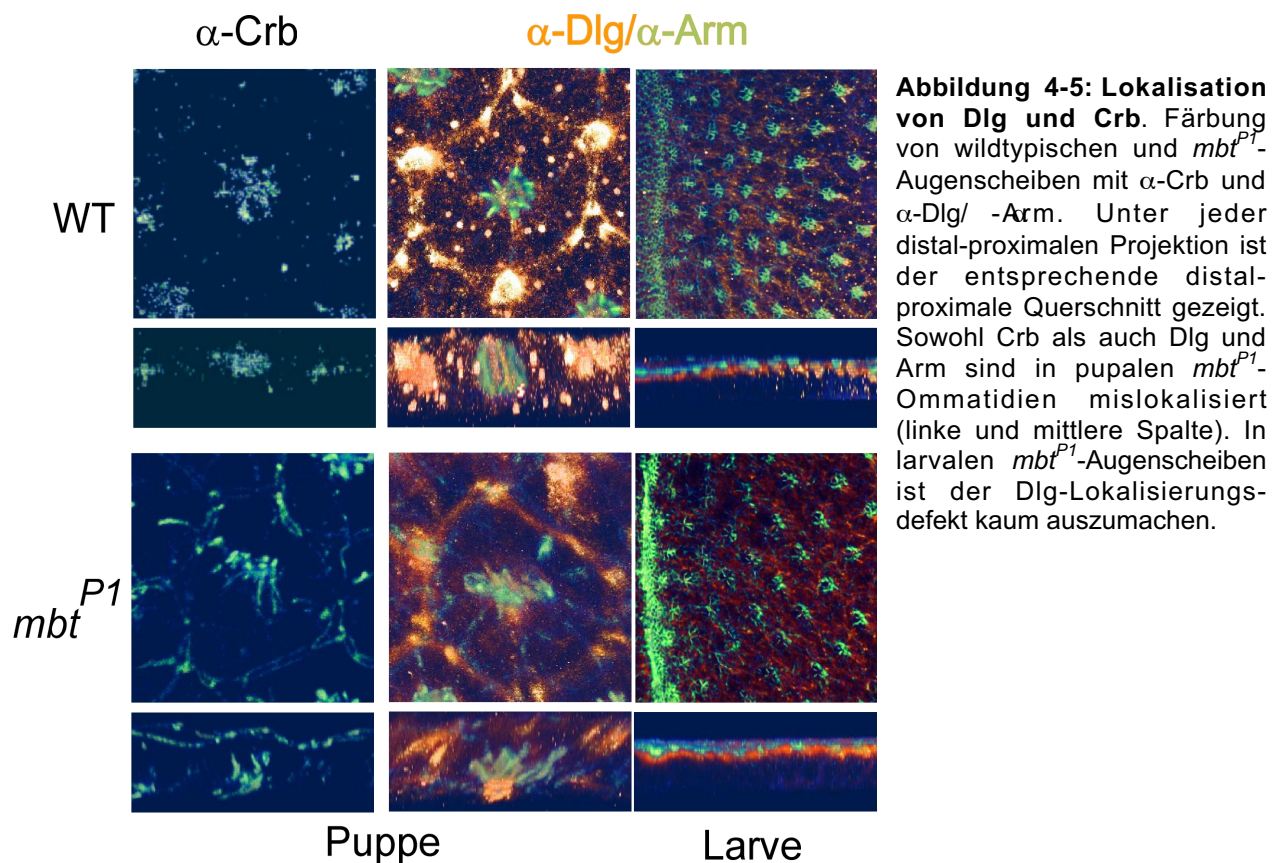


Abbildung 4-4:
Lokalisation des
AV-Proteins Canoe

Gezeigt sind larvale und pupale Augenscheiben aus wildtypischen (A-C) und *mbt*^{P1}-mutanten Tieren (D und F), die mit α -Cno/ α -Arm gefärbt sind. In der linken Spalte ist die α -Cno-Färbung, in der mittleren Spalte die α -Arm-Färbung und in der rechten Spalte die Doppel-färbung abgebildet.



4.1.3 Mbt wird nicht für die Rekrutierung von Photorezeptorzellen benötigt, aber für deren Überleben

In *mbt*-mutanten Augen fehlen Photorezeptorzellen. Die Frage ist nun, warum diese Zellen fehlen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten: die Proliferation der Vorläuferzellen kann gestört sein, das Überleben der Zellen oder ihre Differenzierung. Die Differenzierung der Photorezeptorzellen findet in der dritten Larve statt, wo in der Morphogenetischen Furche der Augenimaginalscheibe die Rekrutierung mit der R8- Zelle beginnt und in einem schrittweisen Prozess posterior der Morphogenetischen Furche fortgesetzt wird (Wolff and Ready, 1993). Um zu überprüfen, ob die Rekrutierung der Photorezeptorzellen, also die Differenzierung zu neuronalen Zellen, gestört ist, wurden Antikörperfärbungen von larvalen wildtypischen und *mbt^{P1}*-Augenscheiben gegen den neuronalen Differenzierungsmarker Elav durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Anzahl der rekrutierten Photorezeptorzellen in larvalen *mbt^{P1}*-Augenscheiben kaum reduziert war. Man kann nur vereinzelt Ommatidien beobachten, denen Zellen fehlen (Abb. 4-6). Mit dem Differenzierungsmarker HRP wurde das gleiche Ergebnis gefunden (nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die Zahl der Photorezeptorzellen während der Pupalentwicklung reduziert ist, wurden pupale Augenscheiben (ca. 37% p.d.) ebenfalls mit einem Antikörper gegen Elav gefärbt. In pupalen *mbt^{P1}*-Augenscheiben ist ein Verlust an neuronalen Zellen zu verzeichnen (Abb. 4-6). Während sich die Elav-Expressionsmuster von wildtypischen und *mbt^{P1}*-larvalen Augenscheiben kaum unterscheiden, ist in pupalen Augenscheiben ein deutlicher Unterschied zu erkennen. *mbt^{P1}*-Augenscheiben besitzen weniger neuronale Zellen. Zusätzlich scheinen die gefärbten Zellkerne kleiner oder dichter gepackt als in wildtypischen pupalen Augenscheiben. Da die Rekrutierung der Photorezeptorzellen in der Larve nicht in dem Maße gestört ist, dass damit der adulte *mbt^{P1}*-Phänotyp erklärt werden kann (vgl. Abb. 1-3), und gleichzeitig in pupalen *mbt^{P1}*-Augenscheiben neuronale Zellen fehlen, müssen die Zellen während der Pupalentwicklung verschwinden. Um zu überprüfen, ob ein vermehrtes Absterben der Photorezeptorzellen stattfindet, wurden Acridinorangegefärbungen durchgeführt. Acridinorange lagert sich in toten Zellen in der DNS ein. In larvalen und pupalen Augenscheiben von wildtypischen und *mbt^{P1}*-Fliegen konnte kein Unterschied in der Anzahl von toten Zellen festgestellt werden. Dies wurde jedoch nur einmal versucht und kann deshalb nicht als verlässliches Ergebnis gezählt werden.

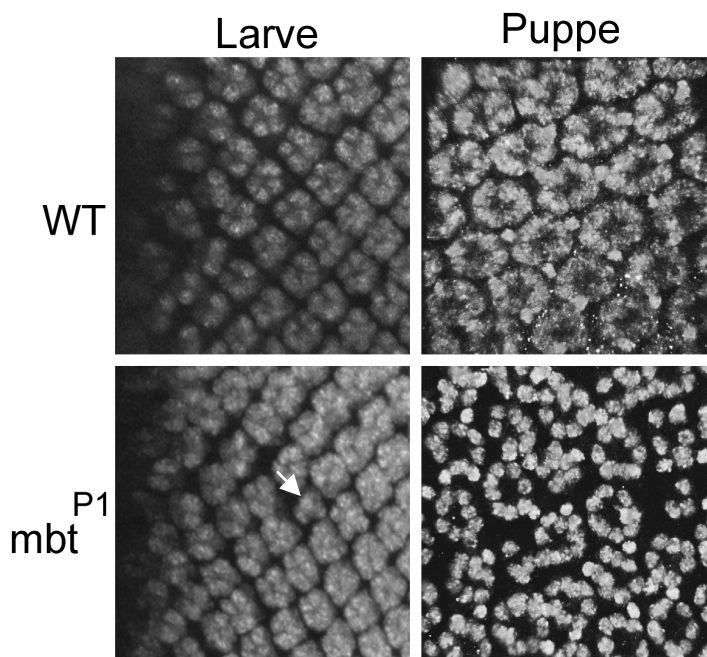


Abbildung 4-6: Färbung von larvalen und pupalen wildtypischen und *mbt^{P1}*-Augenscheiben gegen den neuronalen Differenzierungsmarker Elav. In larvalen *mbt^{P1}*-Augenscheiben fehlen gelegentlich neuronale Zellen (Pfeil). Dagegen fehlen in pupalen *mbt^{P1}*-Augenscheiben mehr Elav-positive Zellen, außerdem scheinen die gefärbten Zellkerne kleiner oder dichter gepackt als im Wildtyp.

4.1.4 Mbt ist für die korrekte Ausbildung der Rhabdomere wichtig

Aus Melzig et al. (1998) ist bekannt, dass *mbt^{P1}*-Fliegen weniger Photorezeptorzellen besitzen, die vorhandenen jedoch normale Axone ausbilden. Um den *mbt^{P1}*-Phänotyp weiter zu untersuchen, wurden zusätzlich zu den tangentialen auch distal-proximale Semidünnschnitte von adulten Augen hergestellt. Es wurde festgestellt, dass sich der *mbt^{P1}*-Phänotyp nicht nur durch Verlust von Photorezeptorzellen äußert (Abb. 4-7, B). Vielmehr weisen die Rhabdomere der übrigen Photorezeptorzellen morphologische Defekte auf. Sie sind zum Teil in sich verdreht, verdickt, fragmentiert und berühren sich gegenseitig (Abb. 4-7, B und D). Die meisten durchziehen nicht wie im Wildtyp die ganze distal-proximale Ausdehnung der Photorezeptorzellen (Abb. 4-7, C und D).

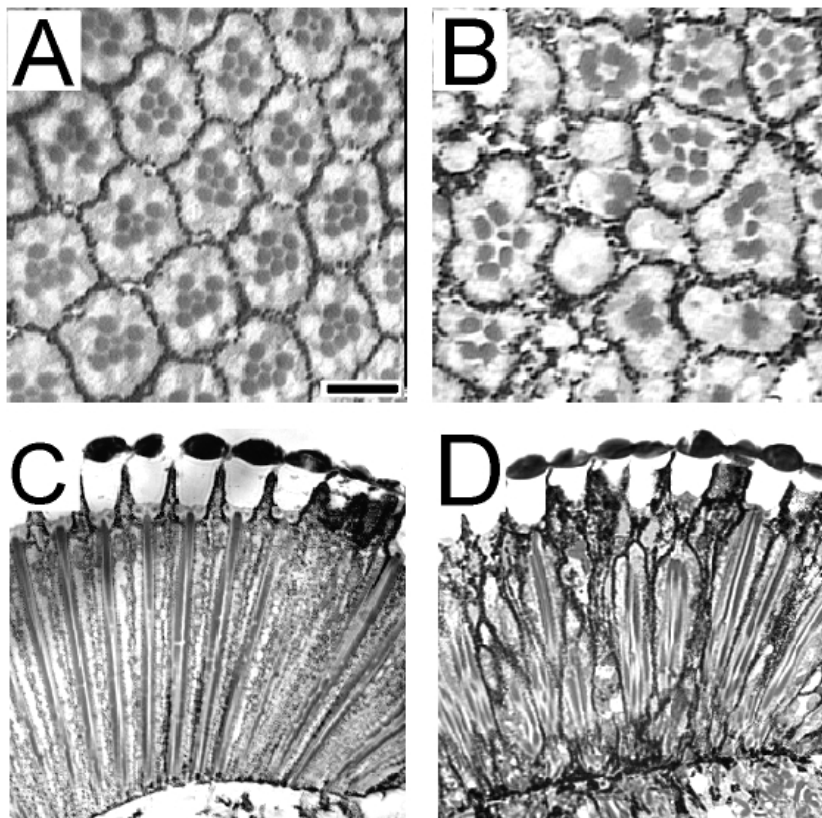


Abbildung 4-7: D e r adulte *mbt^{P1}*-Augenphänotyp

Gezeigt sind tangentielle Schnitte durch wildtypische (A) und *mbt^{P1}*-Augen (B). Im Wildtyp sind die Ommatidien sehr regelmäßig angeordnet. Jedes enthält acht Photorezeptorzellen, von denen in dieser Ebene nur sieben Rhabdomere zu sehen sind. In *mbt^{P1}*-Augen fehlen Photorezeptorzellen und die ommatidiale Ordnung ist gestört. In distal-proximalen Schnitten durch wildtypische (C) und *mbt^{P1}*-Augen (D) werden die Defekte an den Rhabdomeren sichtbar. Sie durchspannen nicht wie im Wildtyp die gesamte Ausdehnung der Photorezeptorzellen und sind fragmentiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Mbt durch die gesamte Photorezeptorzellentwicklung an den AV lokalisiert ist. Außerdem führen Mutationen in *mbt* zur Mislokalisierung sowohl von polarisiert lokalisierten Proteinen (Crb, Dlg), als

auch von an Zell-Zell-Verbindungen lokalisierten Proteinen (Arm, Cno). Dies könnte bedeuten, dass die Morphologie der Photorezeptorzellen gestört ist. In Augen adulter *mbt^{P1}*-Fliegen weisen die Photorezeptorzellen ebenfalls morphologische Defekte auf. Die Rekrutierung der neuronalen Photorezeptorzellen während der larvalen Entwicklung ist jedoch nicht gestört, während in der Puppe bereits neuronale Zellen fehlen. Diese Ergebnisse lassen auf eine gestörte Morphogenese der Photorezeptorzellen und deren Verlust während der Pupalentwicklung schließen.

4.2 Interaktion von Mbt mit kleinen GTPasen

Für PAK1-3/DPAK ist bekannt, dass sie mit den Rho-GTPasen Cdc42 und Rac aber nicht mit Rho interagieren, und durch diese Interaktion aktiviert werden. PAK4 und PAK5 binden präferentiell an Cdc42, diese Bindung wirkt jedoch nicht stimulierend auf die Kinaseaktivität (Abo 1998, Dan 2002, Pandey 2002). Um die Bindungseigenschaften von Mbt bezüglich der Rho-GTPasen zu untersuchen, wurden ein HA-getaggtetes Mbt zusammen mit Myc-getaggten Formen von *Drosophila* Cdc42, Rac1, RhoA und den jeweiligen aktivierten Versionen in HEK293-Zellen exprimiert und eine Koimmunopräzipitation durchgeführt. Es zeigte sich, dass Mbt präferentiell an Cdc42 bindet und zwar stärker an die aktivierte Version. Eine schwache Bindung an Rac1 ist ebenfalls detektierbar, während mit RhoA keine Interaktion nachweisbar ist (Abb. 4-8, A). Eine Mutation in der p21-Bindungsdomäne (PBD) von Mbt (Mbt^{H19,22L}) verhindert jegliche Bindung an Cdc42 (Abb. 4-8, A). Das zeigt, dass die Interaktion über die PBD vermittelt wird. Zwei unterschiedliche katalytisch inaktive Mutanten von Mbt (Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M}), sowie eine aktivierte Version (Mbt^{S520E}) verhielten sich bezüglich der Cdc42-Bindung wie wildtypisches Mbt (Abb. 4-8, B, Beschreibung der Punktmutationen: siehe 4.3.2).

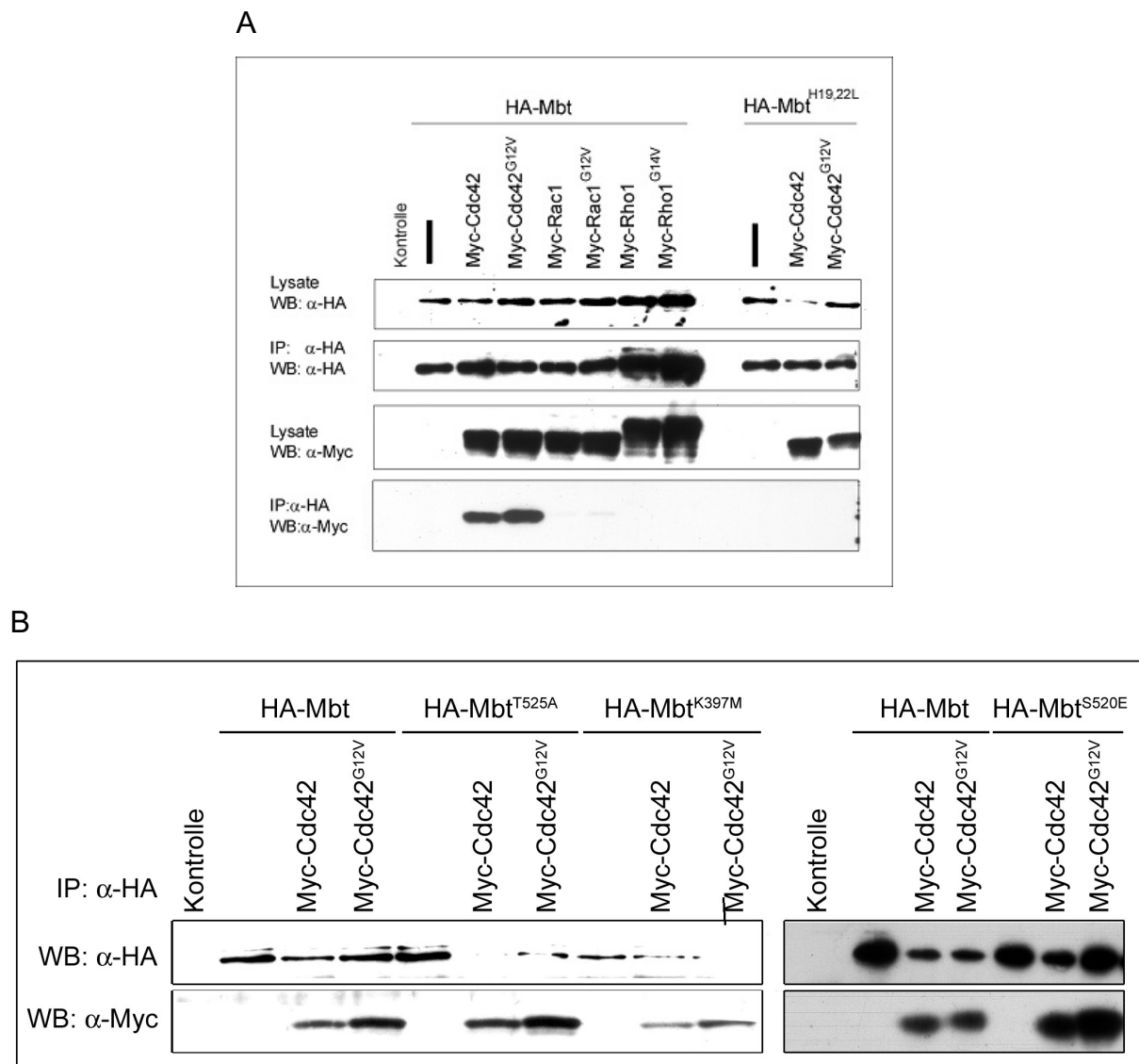


Abbildung 4-8: Interaktion von Mbt mit kleinen GTPasen

(A) HA-Mbt oder HA-Mbt^{H19,22L} wurden alleine oder zusammen mit myc-getaggten Cdc42, Rac1, RhoA oder den entsprechenden aktivierten Formen in HEK293-Zellen transient exprimiert. Die Expression der Proteine wurde durch Western Blot (Lysate, WB) nachgewiesen. HA-Mbt wurde mit einem α -HA-Antikörper präzipitiert und im Präzipitat nachgewiesen, kopräzipitierte GTPasen wurden mit dem α -Myc-Antikörper detektiert. Die Interaktion von Cdc42 und Cdc42^{G12V} mit Mbt wird durch Mutation der PBD (Mbt^{H19,22L}) unterbunden. (B) HA-getaggte Mbt-Konstrukte wurden alleine oder zusammen mit myc-getaggten Cdc42 oder Cdc42^{G12V} transient in HEK293-Zellen exprimiert, eine Koimmunopräzipitation mit dem α -HA-Antikörper durchgeführt und die Proteine mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Sowohl die katalytisch inaktiven Konstrukte (Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M}) als auch die aktivierte Version (Mbt^{S520E}) interagieren mit Cdc42 und Cdc42^{G12V}.

4.2.1 Mbt interagiert mit aktiviertem Cdc42

Das aktivierte, GTP-beladene Cdc42^{G12V} bindet effizienter an Mbt. Für PAK4 und PAK5 ist gezeigt, dass sie *in vitro* nur mit der GTP-beladenen, aktiven Form von Rac bzw. Cdc42 interagieren (Abo et al., 1998; Dan et al., 2002; Pandey et al., 2002). Um zu untersuchen, ob für die Interaktion von Mbt und Cdc42 GTP-Beladung tatsächlich eine Rolle spielt, wurde ein Pull-Down-Assay durchgeführt. Dazu wurde zunächst die für Cdc42 kodierende Sequenz in den pGex-Vektor kloniert. Das GST-Cdc42-Fusionsprotein wurde in Bakterien exprimiert und über eine GSH-Säule aufgereinigt (Abb. 4-9, A). Aufgereinigtes GST-Cdc42 wurde an Glutathionagarose immobilisiert, mit GDP, GTP oder gar nicht beladen und mit Zelllysaten von HEK293-Zellen, die transient HA-Mbt exprimierten, inkubiert. Nach dem Waschen der Glutathionagarose und der Elution der gebundenen Proteine wurde HA-Mbt mittels Western Blot nachgewiesen. Mbt interagierte ausschließlich mit GTP-beladenem Cdc42 (Abb 4-9, B).

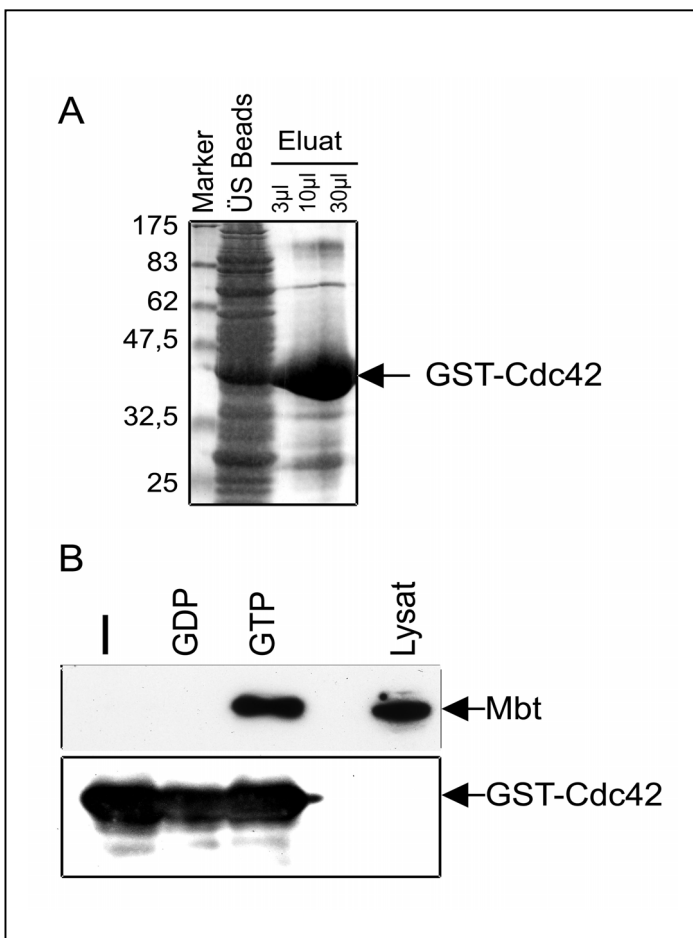


Abbildung 4-9: Mbt interagiert mit aktiviertem Cdc42

(A) GST-Cdc42 wurde in *E. coli* exprimiert und über eine GSH-Säule aufgereinigt. ÜS Beads: Überstand des Bakterienlysats nach Bindung an die Säule. (B) An Glutathion immobilisiertes GST-Cdc42 wurde gar nicht, mit GDP oder GTP beladen und mit Lysaten aus HEK293-Zellen inkubiert, die transient HA-Mbt exprimierten. An Cdc42 gebundenes HA-Mbt wurde mit dem α -HA-Antikörper im Western Blot detektiert. Als Kontrolle diente das eingesetzte Gesamtlysat (Lysat) der transient HA-Mbt exprimierenden HEK293-Zellen. Gleiche Mengen von GST-Cdc42 wurden mit einem α -GST-Antikörper nachgewiesen.

4.3 Untersuchungen zur Kinaseaktivität von Mbt *in vitro*

4.3.1 Bindung von Cdc42 reguliert die Kinaseaktivität von Mbt *in vitro*

In PAK1-3/DPAK führt die Bindung von Cdc42 oder Rac zum Aufbrechen der intramolekularen Interaktion der Kinase-Inhibitor-Domäne (KID) mit der Kinasedomäne und damit zur Aktivierung der Kinase. Die aktive Konformation wird durch Autophosphorylierung stabilisiert (Zenke et al., 1999; Buchwald et al., 2001; Chong et al., 2001; Lei et al., 2000). PAK4-6 werden durch Bindung von Cdc42 oder Rac nicht aktiviert. Die Sequenzen von PAK4-6/Mbt unterscheiden sich C-terminal der PBD von der KID von PAK1-3/DPAK (Unterfamilie I), innerhalb der Unterfamilie II ist dieser Bereich allerdings konserviert (Abb. 4-10). Das könnte ein Hinweis auf einen gemeinsamen Regulationsmechanismus von PAK4-6/Mbt sein. Die Deletion der PBD führt zu einer erhöhten Kinaseaktivität von PAK4 und PAK6, was ebenfalls auf eine Regulationsfunktion des N-terminalen Bereichs, der die PBD beinhaltet, hindeutet. Wird die PBD in PAK5 deletiert, hat das jedoch keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität (Abo et al., 1998; Pandey et al., 2002; Yang et al., 2001).

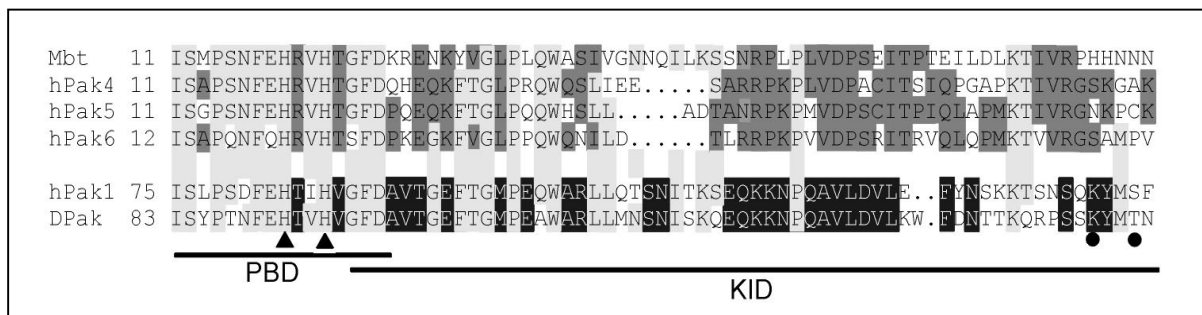


Abbildung 4-10: Sequenzvergleich der p21-bindungs Domäne

(PBD) und der Kinase-inhibitor-domäne (KID) von humanem PAK1 und DPAK (Unterfamilie I) mit der entsprechenden Region in humanem PAK4-6 und Mbt (Unterfamilie II). Hochkonservierte Aminosäuren sind hellgrau unterlegt. Aminosäuren, die zwischen hPAK1/DPAK oder hPAK4-6/Mbt konserviert sind, sind dunkelgrau oder schwarz unterlegt. Ein regulatorisches Lysin 141 und Serin144, ein Ziel für Autophosphorylierung (o), die beide an der Regulation der PAK1 Kinaseaktivität beteiligt sind, fehlen in hPAK4-6/Mbt. Die Histidinreste, die verändert wurden, um ein p21-bindungsdefizientes Mbt (Mbt^{H19,22L}) zu erhalten, sind mit Dreiecken gekennzeichnet.

Um zu untersuchen, ob die Bindung von Cdc42 einen Effekt auf die Kinaseaktivität von Mbt hat, wurden wildtypisches Mbt und Cdc42-bindungsdefizientes Mbt^{H19,22L} alleine oder zusammen mit der wildtypischen oder aktivierten Version von Cdc42 in HEK293-Zellen exprimiert, kopräzipitiert und ein *in vitro* Kinaseassay mit Myelin-

Basischem Protein (MBP) als Substrat in der Gegenwart von radioaktiv markiertem γ [P³²]-ATP durchgeführt. Autophosphorylierung und Substratphosphorylierung wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Mbt und Mbt^{H19,22L} wurden im gleichen Maße autophosphoryliert. Wildtypisches Mbt phosphorylierte MBP unabhängig von der gleichzeitigen Überexpression von Cdc42, dagegen wurde die Phosphorylierung von MBP in Anwesenheit von aktiviertem Cdc42^{G12V} leicht verringert, wobei die Autophosphorylierung nicht beeinflusst war. Mbt^{H19,22L} konnte MBP deutlich stärker phosphorylieren als Mbt und zwar unabhängig von der gleichzeitigen Überexpression von Cdc42 (Abb. 4-11), was konform mit der Tatsache läuft, dass Mbt^{H19,22L} Cdc42 nicht binden kann. Cdc42 scheint also *in vitro* für die Regulation der Mbt-Aktivität eine Rolle zu spielen.

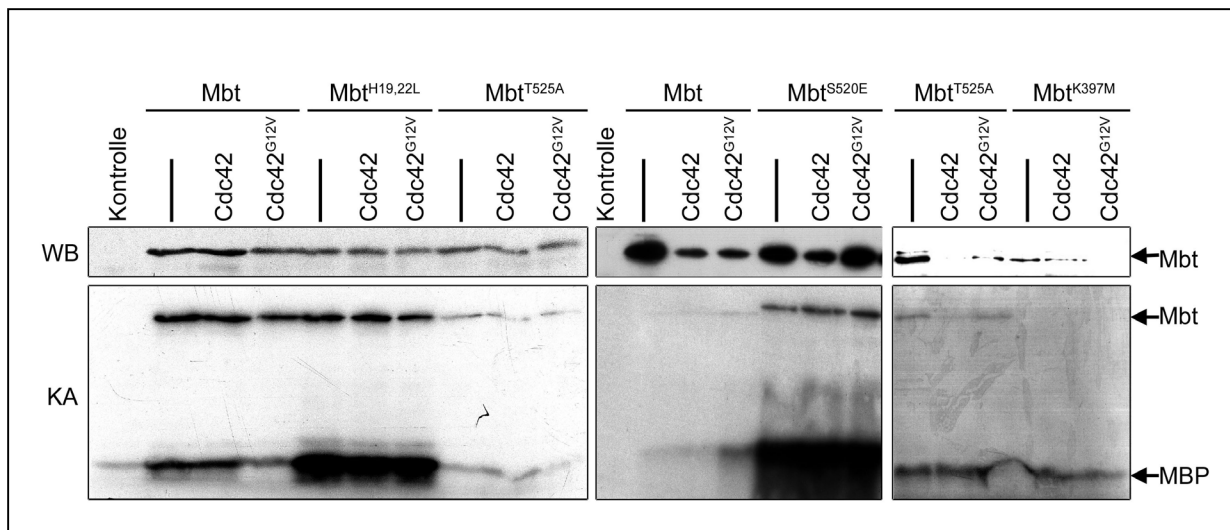


Abbildung 4-11: Kinaseaktivität von Mbt *in vitro*

HA-Mbt oder verschiedene Mbt-Versionen wurden alleine oder zusammen mit Myc-Cdc42 bzw. Myc-Cdc42^{G12V} in HEK293-Zellen exprimiert, gehungert und eine Koimmunopräzipitation durchgeführt. Mit den Präzipitaten wurde in Anwesenheit von γ [P³²]-ATP und mit MBP als Substrat ein *in vitro* Kinaseassay durchgeführt. Autophosphorylierung und Substratphosphorylierung wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht (KA). Expression der Mbt-Konstrukte wurde im Western Blot (WB) überprüft. Die gegeneinander abgegrenzten Blots stammen von drei unterschiedlichen Experimenten. Sie wurden nur innerhalb ein und desselben Experiments verglichen.

Durch einen Aminosäureaustausch in einem für PAK-Proteine charakteristischen Motiv in der Kinasedomäne (T(S)LVGT**P**YWMA(S)PE), wo ein Threonin, das möglicherweise ein Ziel für regulatorische Phosphorylierung darstellt (Sells and Chernoff, 1997), gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, sollte ein katalytisch inaktives Mbt hergestellt werden. Eine entsprechende Mutation wurde auch im Hefe PAK-Protein Ste20 eingeführt, was zum Verlust dessen Aktivität führte (Wu et al.,

1995; Blattner, 1999). Die so hergestellte Version von Mbt wird als Mbt^{T525A} bezeichnet. Eine zweite katalytisch inaktive Mutante wurde nach dem Beispiel von inaktivem PAK4 (PAK4^{K350M}) hergestellt (Abo et al., 1998). Ein Lysin in der Aktivierungsschleife wurde gegen ein Methionin ausgetauscht (Mbt^{K397M}).

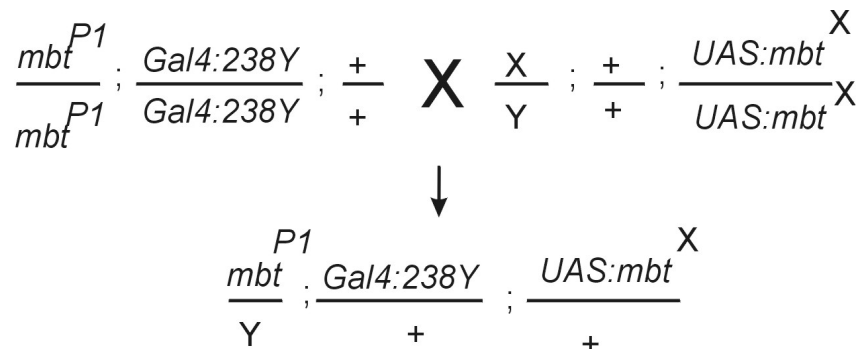
Um ein konstitutiv aktives Mbt zu erhalten, wurde ebenfalls dem Beispiel von einer Arbeit an PAK4 (Qu et al., 2001) gefolgt. Zwei potentielle Ziele für regulatorische Phosphorylierung, Serin492 und Serin520 in Mbt, wurden gegen Arginin bzw. Glutamat ausgetauscht (Mbt^{S492N/S520E}). Diese negativ geladenen Aminosäuren sollten eine aktivierende Phosphorylierung nachahmen. Im Folgenden wird dieses Konstrukt aus redaktionellen Gründen als Mbt^{S520E} bezeichnet.

Um die Aktivität dieser Konstrukte zu untersuchen, wurde ein Kinaseassay durchgeführt, wie in 4.3.1 beschrieben. Mbt^{T525A} wird weniger stark autophosphoryliert als wildtypisches Mbt. Die Phosphorylierung von MBP übersteigt nicht den Level der Kontrolle (Leervektor). Im Falle von Mbt^{K397M} ist keine Autophosphorylierung detektierbar und die Substratphosphorylierung ist vergleichbar mit Mbt^{T525A} (Abb. 4-11, linker und rechter Blot). Mbt^{S520E} kann MBP in deutlich höherem Maße phosphorylieren als wildtypisches Mbt und auch als Mbt^{H19,22L}, was selbst auch aktiver ist als wildtypisches Mbt (Abb. 4-11, linker und mittlerer Blot). Die Fähigkeit zur Autophosphorylierung ist im Vergleich zu wildtypischem Mbt ebenfalls erhöht (Abb. 4-11, mittlerer Blot). Der Expressionslevel in transient transfizierten HEK293-Zellen von aktiviertem Mbt^{S520E} war höher, der von katalytisch inaktiven Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M} war niedriger als von wildtypischem Mbt, trotz gleicher Menge transfizierter DNS. Um auszuschließen, dass die Aktivitätsunterschiede auf unterschiedliche Proteinmengen zurückzuführen sind, wurde die transfizierte DNS-Menge entsprechend geändert, so dass im Western Blot vergleichbare Mengen von Mbt-Protein nachgewiesen werden konnten.

4.4 Test der Mbt-Konstrukte *in vivo*

Die Cdc42-bindungsdefiziente, die beiden katalytisch inaktiven und die konstitutiv aktive Version von Mbt (s. 4.2 und 4.3) sollten auf ihre Funktionalität *in vivo* getestet werden. Dazu wurden transgene Linien hergestellt, welche die verschiedenen Konstrukte 3' einer „upstream activating sequence“ (UAS) aus Hefe trugen. Durch Einkreuzung von Gal4-Linien konnten sie zell- und gewebsspezifisch in der Fliege exprimiert werden. Die Gal4-Linie 238Y (Yang et al., 1995) wird während der

gesamten Entwicklung in Augen und Pilzkörpern exprimiert. Das Expressionsmuster in der Augenimaginalscheibe ist dem von endogenem Mbt sehr ähnlich (Abb. 4-14). Der *mbt*^{P1}-Augen- und Pilzkörperphänotyp kann durch Expression der wildtypischen *mbt*-cDNS unter Kontrolle der Gal4-Linie 238Y gerettet werden (Melzig et al., 1998; Blattner, 1999; Abb. 4-12, A). Deshalb wurden die im Folgenden beschriebenen Experimente mit dieser Linie nach folgendem Kreuzungsschema durchgeführt:



4.4.1 Die Kinasedomäne und die Cdc42-Bindungsdomäne sind für die Funktion von Mbt während der Augenentwicklung essentiell

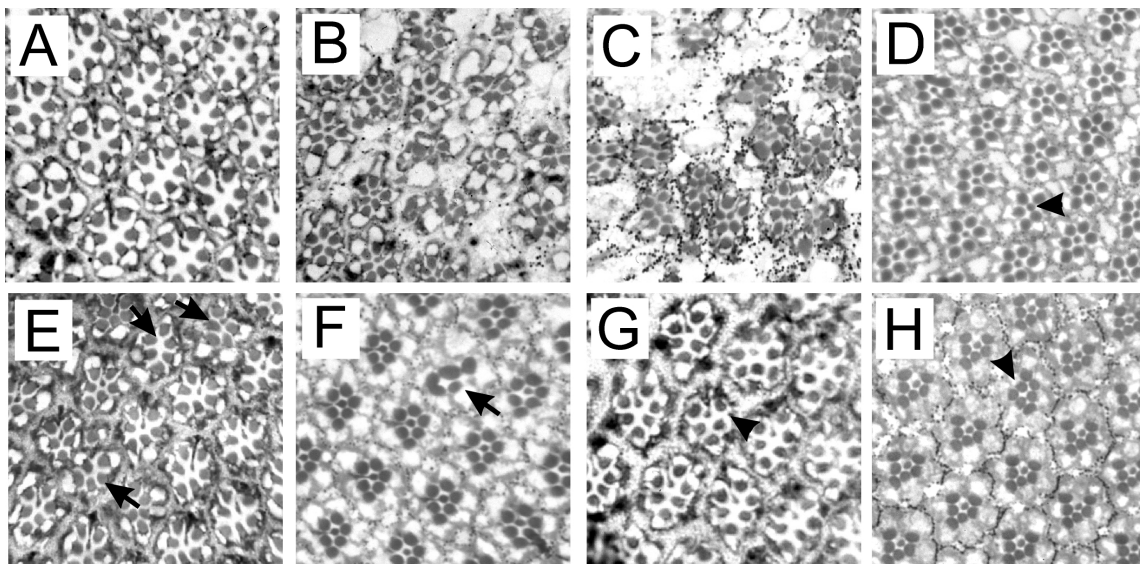


Abbildung 4-12: Rettung des *mbt*-Augenphänotyps durch transgene Konstrukte

Tangentiale Augenschnitte von Fliegen folgender Genotypen sind zu sehen: (A) *mbt*^{P1}/*Y*; *UAS:mbt*⁺/*+*; *Gal4:238Y*/*+*, (B) *mbt*^{P1}/*Y*; *UAS:mbt*^{H19,22L}/*+*; *Gal4:238Y*/*+*, (C) *mbt*^{P1}/*Y*; *UAS:mbt*^{H19,22L-CAAX}/*+*; *Gal4:238Y*/*+*, (D) *+/Y*; *UAS:mbt*^{S520E}/*+*; *Gal4:238Y*/*+*, (E) *mbt*^{P1}/*Y*; *UAS:mbt*^{T525A}/*+*; *Gal4:238Y*/*+*, (F) *mbt*^{P1}/*Y*; *UAS:mbt*^{K397M}/*+*; *Gal4:238Y*/*+*, (G) *+/Y*; *UAS:mbt*^{T525A}/*+*; *Gal4:238Y*/*+*, (H) *+/Y*; *UAS:mbt*^{K397M}/*+*; *Gal4:238Y*/*+*. Die Expression der *mbt*-cDNA unter der Kontrolle der Gal4-Linie 238Y führt zur Rettung des *mbt*-Phänotyps (vgl. A und Abb. 4-6, B). *Mbt*^{T525A} (E) und *Mbt*^{K397M} (F) können den *mbt*-Phänotyp nur teilweise retten (Pfeile). Außerdem verursachen sie im Wildtypintergrund exprimierte dominante Effekte (G und H, Pfeilspitzen). *Mbt*^{H19,22L} (B) und *Mbt*^{H19,22L-CAAX} (C) können den *mbt*-Phänotyp nicht retten. Die Expression von aktiviertem *Mbt*^{S520E} im Wildtypintergrund führt gelegentlich zum Verlust von Photorezeptorzellen (Pfeilspitze in D).

Beide katalytisch inaktive Konstrukte, Mbt^{T525A} (Abb. 4-12, E) und Mbt^{K397M} (Abb. 4-12, F) können den *mbt^{P1}*-Augenphänotyp partiell retten, während das Cdc42-bindungsdefiziente Mbt^{H19,22L} den *mbt^{P1}*-Augenphänotyp nicht retten kann (Abb. 4-12, B). Um zu testen, ob die artifizielle Lokalisation von Mbt an die Zellmembran ausreicht, oder ob die Cdc42-Bindungsdomäne essentiell ist für die Mbt-Funktion, wurde das Cdc42-bindungsdefiziente Mbt^{H19,22L} mit einem Membrananker (CAAX: Myristylierungssequenz) versehen. Dieser Membrananker anstelle der Cdc42-Bindungsstelle im Mbt^{H19,22L-CAAX}-Protein konnte die Fähigkeit, den *mbt^{P1}*-Augenphänotyp zu retten, nicht wieder herstellen (Abb. 4-12, C), was die Wichtigkeit der PBD unterstreicht. Mbt^{T525A} (Abb. 4-12, G) und Mbt^{K397M} (Abb. 4-12, H) hatten außerdem einen dominanten Effekt, nämlich den Verlust von Photorezeptorzellen, wenn sie im Wildtyphintergrund exprimiert wurden. Das konnte für Mbt^{H19,22L} und Mbt^{H19,22L-CAAX} nie beobachtet werden. Das konstitutiv aktive Mbt^{S520E}-Konstrukt mit Gal4(238Y) exprimiert führte zum Tod der Tiere in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Dies war auch bei Expression im Wildtyphintergrund zu beobachten. Die seltenen überlebenden Tiere hatten oft nur noch Stummelflügel, die Borsten waren missgebildet und die Augen leicht rauh. Entsprechend wurden in tangentialen Augenschnitten einige Ommatidien mit weniger Photorezeptorzellen beobachtet (Abb. 4-12, D). Ob noch andere ommatidiale Zellen fehlen, kann in dieser Analyse nicht festgestellt werden.

Die Kinaseaktivität spielt für die *in vivo* Funktion von Mbt eine Rolle, dennoch können katalytisch inaktive Konstrukte den *mbt^{P1}*-Augenphänotyp partiell retten, während das Cdc42-bindungsdefiziente Mbt nicht funktionsfähig ist. Eventuell hat Mbt Funktionen, die unabhängig von seiner Kinaseaktivität sind. Die Cdc42-Bindungsstelle ist essentiell für die Mbt-Funktion. Es stellt sich nun die Frage, ob die Bindung von Cdc42 zusätzlich zur Regulation der Kinaseaktivität noch weitere Funktionen hat. PAK4 wird durch aktiviertes Cdc42 an den Golgi-Apparat rekrutiert (Abo et al., 1998). Aufgrund dieser Überlegungen wurde die Bedeutung der Cdc42-Bindung für die Mbt-Lokalisation an AV untersucht.

4.4.2 Cdc42 vermittelt die Lokalisation von Mbt an Adhärenzverbindungen

Die unterschiedlichen Mbt-Konstrukte wurden mit der Gal4-Linie 238Y im *mbt^{P1}*-Hintergrund exprimiert und Färbungen mit dem α -Mbt-Serum in larvalen und pupalen

Augenscheiben durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation der transgenen Mbt-Proteine zu untersuchen.

Das transgene wildtypische Mbt-Protein gleicht in seiner Lokalisation dem endogenen Protein (Abb. 4-13, A und 4-14, A, vgl. 4-1, A und 4-3), ebenso wie die katalytisch inaktiven Konstrukte Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M} (4-13, D und E). Die Proteine akkumulieren apikal an der Membran an den AV, was durch Doppelfärbungen mit einem α -Arm-Antikörper in den pupalen Augenscheiben deutlich wird (Abb. 4-14). Die Lokalisation scheint also unabhängig von der Kinaseaktivität zu sein. Mbt^{H19,22L} ist im ganzen Cytoplasma verteilt (Abb. 4-13, B und 4-14, D), während Mbt^{H19,22L-CAAX} an der Zellmembran lokalisiert, aber nicht in AV angereichert ist (Abb. 4-13, C und 4-14, E). Die Cdc42-Bindungsstelle ist demnach wichtig für die Lokalisation von Mbt.

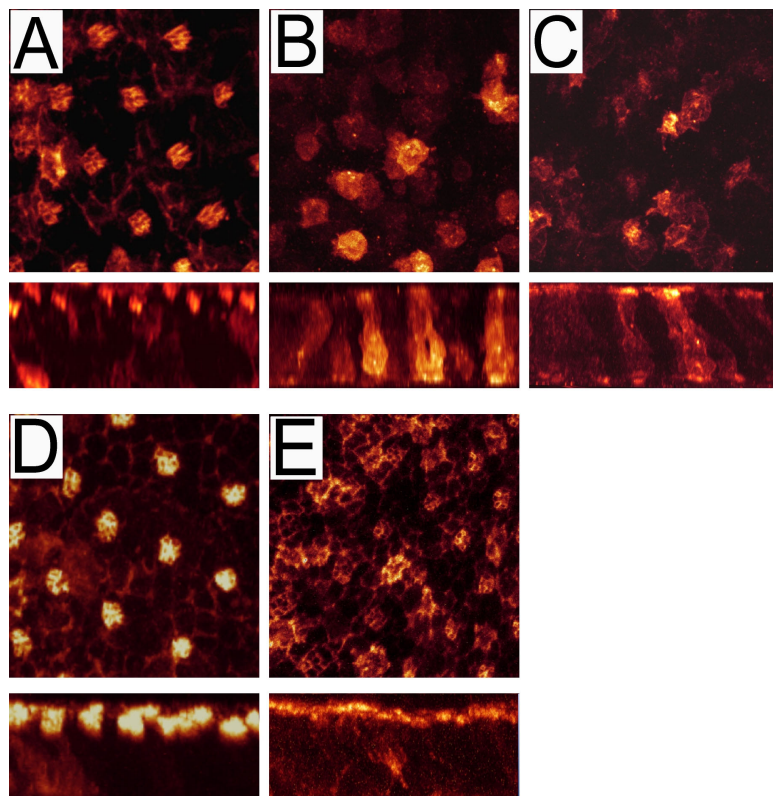


Abbildung 4-13: Subzelluläre Lokalisation der Mbt-Konstrukte in larvalen Augenscheiben

Gezeigt sind Aufsichten bzw. apikal-basale Ansichten von α -Mbt-gefärbten Augenscheiben von Tieren folgender Genotypen: (A) *mbt^{P1}/Y; UAS:mbt+; Gal4:238Y/+*, (B) *mbt^{P1}/Y; UAS:mbt^{H19,22L}/+; Gal4:238Y/+*, (C) *mbt^{P1}/Y; UAS:mbt^{H19,22L-CAAX}/+; Gal4:238Y/+*, (D) *mbt^{P1}/Y; UAS:mbt^{T525A}/+; Gal4:238Y/+*, (E) *mbt^{P1}/Y; UAS:mbt^{CAAX}/+; Gal4:238Y/+*. Das wildtypische Konstrukt ist ähnlich wie endogenes Mbt (vgl. Abb. 4-1) apikal an der Membran lokalisiert, wie auch das katalytisch inaktive Mbt^{T525A} (D) und Mbt^{CAAX} (E). Cdc42-bindungsdefizientes Mbt^{H19,22L} ist im Cytoplasma verteilt und die gefärbten Cluster sind nicht so regelmäßig geordnet wie im Falle des wildtypischen Konstrukts. Der Membrananker in Mbt^{H19,22L-CAAX} stellt zwar die Membranständigkeit von Mbt wieder her, allerdings entlang der ganzen Zellmembran. Außerdem sind auch hier die gefärbten Cluster nicht regelmäßig angeordnet (C).

Durch die Doppelfärbung mit α -Arm konnte die Struktur der AV, die in *mbt^{P1}*-Mutanten missgebildet sind, in Verbindung mit den unterschiedlichen Mbt-Konstrukten untersucht werden. Übereinstimmend mit der Fähigkeit den adulten

mbt^{P1}-Augenphänotyp zu retten, bilden sich in Augenscheiben, die wildtypisches Mbt im *mbt^{P1}*-Hintergrund exprimieren, die AV normal aus und strecken sich zwischen 37% und 67% p.d. von distal nach proximal (Abb. 4-14, A). Die Expression der katalytisch inaktiven Konstrukte Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M} im *mbt^{P1}*-Hintergrund führte zwar zu einer teilweisen Rettung des AV-Defekts, allerdings erschien die Struktur der AV unregelmäßig, obwohl sie sich recht normal streckten (Abb. 4-14, B und C). Dies erinnert an die partielle Rettung des *mbt^{P1}*-Phänotyps durch diese Konstrukte, die schon im adulten Auge beobachtet werden konnte (Abb. 4-12, E und F). Wie schon in den larvalen Augenscheiben festgestellt, ist auch in den pupalen Mbt^{H19,22L} nicht an den AV lokalisiert (Abb. 4-14, D). Außerdem kann dieses Konstrukt den AV-Phänotyp nicht retten, was mit den Ergebnissen im adulten Auge übereinstimmt (Abb. 4-12, B). Mbt^{H19,22L-CAAX} akkumuliert ebenfalls nicht an AV, sondern an der Zellmembran. In den pupalen Augenscheiben scheinen die AV normal ausgebildet (Abb. 4-14, E), während Mbt^{H19,22L-CAAX} den *mbt^{P1}*-Phänotyp im adulten Auge nicht retten kann (Abb. 4-12, C). Eventuell kann die Membranlokalisierung von Mbt während der Morphogenese in der Pupalentwicklung eine Weile den Verlust der Akkumulation von Mbt an den AV kompensieren und der Defekt entwickelt sich erst später. Um das zu untersuchen, müssten entsprechende Experimente in späteren Puppenstadien durchgeführt werden. Um sicherzugehen, dass die artifizielle Verankerung von Mbt^{H19,22L-CAAX} an die Zellmembran keinen Effekt auf die Lokalisierung an AV hat, wurde ein wildtypisches Mbt-Konstrukt mit einem Membrananker versehen (Mbt^{CAAX}) und ebenfalls untersucht. Mbt^{CAAX} lokalisierte wie das wildtypische Transgen in den AV und rettete wie dieses den larvalen AV-Phänotyp und den adulten *mbt^{P1}*-Phänotyp (Abb. 4-14, F und nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindung von Cdc42 an die p21-Bindungsdomäne die Lokalisation von Mbt an AV vermittelt. Um ausschließen zu können, dass nicht ein anderes Protein für die Lokalisation verantwortlich ist, sollte die subzelluläre Lokalisation von endogenem Mbt in Cdc42-defizienten Zellen untersucht werden. Das Problem dabei war, dass Mutationen in Cdc42 letal sind. Wir bedienten uns daher der Mosaik Analyse mit einem repressiblen Zellmarker (MARCM, Lee and Luo, 1999). In diesem System werden durch mitotische Rekombination homozygot mutante Zellen in einem bezüglich der Mutation heterozygoten Gewebe erzeugt, die durch die Expression eines GFP-mCD8a-

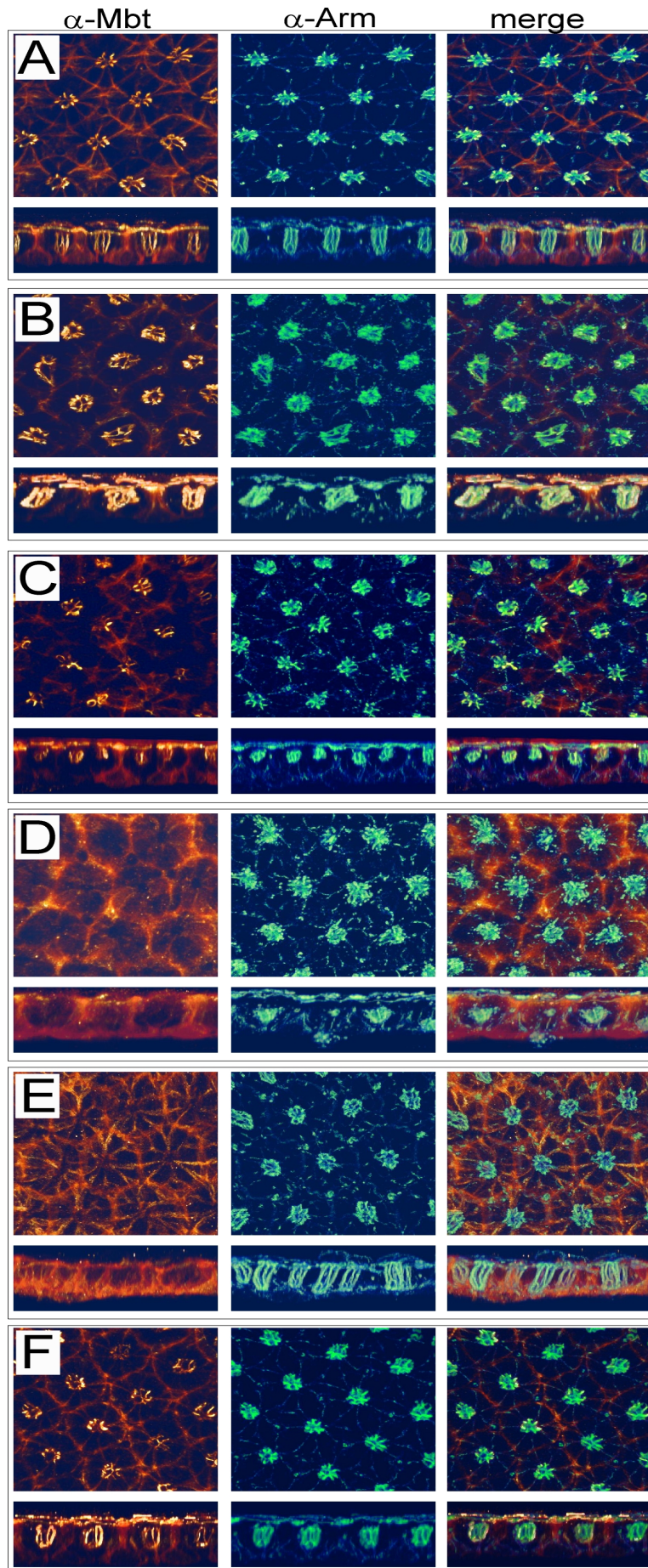


Abbildung 4-14: Subzelluläre Lokalisation der Mbt-Konstrukte in pupalen Augenscheiben (40%p.d.)

Gezeigt sind distal-proximale Projektionsansichten und distal-proximale Querschnitte von α -Mbt/ α -Arm gefärbten Augenscheiben mit den folgenden Genotypen: (A) $mbt^{P1}/Y; UAS:mbt/+; Gal4:238Y/+$, (B) $mbt^{P1}/Y; UAS:mbt^{T525A}/+; Gal4:238Y/+$, (C) $mbt^{P1}/Y; UAS:mbt^{K397M}/+; Gal4:238Y/+$, (D) $mbt^{P1}/Y; UAS:mbt^{H19,22L}/+; Gal4:238Y/+$, (E) $mbt^{P1}/Y; UAS:mbt^{H19,22L-CAAX}/+; Gal4:238Y/+$, (F) $mbt^{P1}/Y; UAS:mbt^{CAAX}/+; Gal4:238Y/+$.

Transgenes wildtypisches Mbt (A), Mbt^{T525A} (B), Mbt^{K397M} (C) und Mbt^{CAAX} (F) lokalisieren an Adhärenzverbindungen. Im Gegensatz zu wildtypischem Mbt und dem Kontrollkonstrukt Mbt^{CAAX} können die katalytisch inaktiven Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M} den mbt^{P1} -AV-Defekt nur teilweise retten (A-C). Cdc42-bindungsdefizientes Mbt^{H19,22L} ist im Cytoplasma verteilt (D) und kann den mbt^{P1} -AV-Defekt nicht retten. Mbt^{H19,22L-CAAX} ist nicht an AV lokalisiert, sondern an der Zellmembran (E). Die AV sehen recht wildtypisch aus.

Fusionsproteins positiv markiert sind. Dieses membranständige Protein kann entweder direkt durch Anregung von GFP oder indirekt durch eine Antikörperfärbung gegen mCD8a sichtbar gemacht werden. Durch eine Doppelfärbung mit dem α -Mbt-Serum konnte die Lokalisation von Mbt in Beziehung zu Mutationen in *cdc42* gebracht werden. Die meisten in der Larve erhaltenen *cdc42³/cdc42⁴*-mutanten Zellklone bestanden aus nur wenigen Zellen. Diese Zellen besaßen meist Axone, was für ihre normale Rekrutierung als Photorezeptorzellen sprach. Dies wurde auch schon früher beobachtet (Genova et al., 2000). Einer der wenigen größeren Klone ist in Abb. 4-15, K-M in Aufsicht gezeigt. Es ist sichtbar, dass die Photorezeptorzellcluster, die im Bereich der Cdc42-mutanten Zellen liegen, Veränderungen im Mbt-Expressionsmuster zeigen (Abb. 4-15, K und M, Pfeilspitzen). Genauer konnte diese Veränderung in einer Augenscheibe untersucht werden, in der nur eine einzige Zelle eines ommatidialen Clusters homozygot für Cdc42⁴ war (Abb. 4-15, A-I). Betrachtet man die am apikalen Ende gelegenen Schnitte (Abb. 4-15, D-F) in Aufsicht und zusätzlich einen apikal-basalen Schnitt (Abb. 4-15, G-I), wird deutlich, dass die apikale Lokalisation von Mbt in Cdc42-defizienten Zellen verloren geht. Wichtig ist hervorzuheben, dass die Zelle ein Axon besitzt (Abb. 4-15, I, Pfeil), was zeigt, dass sie eine neuronale, lebende Zelle ist. Das heißt, dass nicht der Tod der Zelle zur Delokalisation von Mbt führt. Also ist Cdc42 der Vermittler der Lokalisation von Mbt an AV.

cdc42⁴-Klone in adulten Augen (Abb. 4-15, N-P) haben eine Ähnlichkeit zu *mbt^{P1}*-mutanten Augen (vgl. Abb. 4-7) insofern, dass sie ebenfalls weniger Photorezeptorzellen besitzen, die Rhabdomere verdickt sind und sich berühren. Dies ist ein weiteres Indiz, dass Cdc42 im gleichen Signalweg wie Mbt während der Morphogenese der Photorezeptorzellen eine Rolle spielt.

4.4.3 Die Kinaseaktivität und die Cdc42-Bindungsdomäne sind essentiell für die Funktion von Mbt während der Pilzkörperentwicklung

Mutationen in *mbt* führen außer zu einem Augendefekt auch zu einem Pilzkörperphänotyp, der sich im Verlust von Pilzkörperneuronen, den Kenyonzellen, äußert. Durch Expression der wildtypischen *mbt*-cDNS mittels der Gal4-Linie 238Y im *mbt^{P1}*-Hintergrund kann der Pilzkörperphänotyp ebenso wie der Augenphänotyp gerettet werden (Melzig et al., 1998; Kap. 4.4.2). Um die Funktionalität der verschiedenen Mbt-Konstrukte auch in der Pilzkörperentwicklung zu studieren,

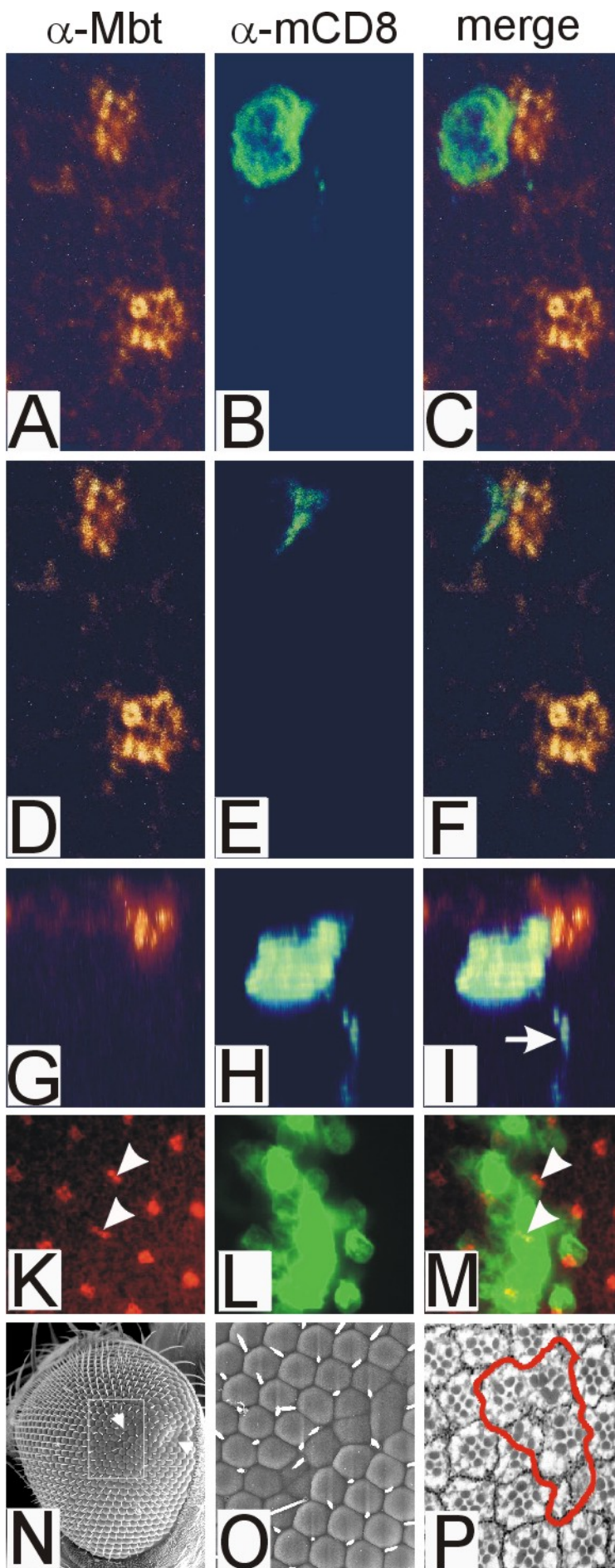


Abbildung 4-15: Cdc42 vermittelt apikale Lokalisation von Mbt

In II.Larven des Genotyps *cdc42⁴,FRT19A/tubP-Gal80,hs-Flp,FRT19A; GMR-Gal4/ UAS:mCD8-GFP* wurde durch einen Hitzeschock (37°C) mitotische Rekombination induziert. Es wurden Klone erzeugt, die homozygot für *cdc42⁴* waren und denen der Gal4-Repressor Gal80 fehlte. Dadurch konnte mCD8-GFP in homozygoten *cdc42⁴*-Zellen unter der Kontrolle von GMR-Gal4 exprimiert werden. Augenscheiben aus den sich entwickelnden III.Larven wurden mit α -Mbt/ α -mCD8a gefärbt, um die Mbt-Lokalisation in Zellen, die homozygot für *cdc42⁴* waren, zu untersuchen. In (A-F) sind 3D-Rekonstruktionen einer Augenscheibe zu sehen, die einen Einzelzellklon trägt. (A-C) zeigt den ganzen optischen Bilderstapel in einer apikal-basalen Projektionsansicht, (D-F) nur die apikalsten Bilder. In (G-I) ist ein apikal-basaler Querschnitt der Augenscheibe zu sehen. Der Pfeil in (I) deutet auf das Photorezeptorzellaxon. In (K-M) ist die lichtmikroskopische Aufnahme eines großen Klons aus *cdc42⁴*-Zellen gezeigt. In (N) ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines adulten Auges mit *cdc42⁴*-Klonen zu sehen. Deutlich sind zwei Dellen auszumachen (Pfeil-spitzen). Eine Vergrößerung des in (N) umrahmten Bereichs ist in (O) dargestellt. In (P) ist ein tangentialer Schnitt durch einen *cdc42⁴*-Klon zu sehen.

wurden diese ebenfalls im mbt^{P1} -Hintergrund mit der Gal4-Linie 238Y exprimiert. Es wurden Paraffinschnitte der adulten Fliegenköpfe angefertigt und das Volumen der Calyces planimetrisch bestimmt (Abb. 4-16, obere Graphik). Das wildtypische Mbt-Konstrukt konnte den mbt^{P1} -Phänotyp retten (Abb. 4-16, hellgraue Balken), im Gegensatz zu allen Linien mit den katalytisch inaktiven Mbt-Konstrukten (Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M}). Nur eine der beiden Mbt^{K397M}-Linien (Mbt^{K397M4}) schien teilweise retten zu können (Abb. 4-16, blaue Balken). Die zweite Linie (Mbt^{K397M3}) war nicht fähig, den mbt^{P1} -Pilzkörperphänotyp zu retten, und beide Linien konnten den mbt^{P1} -Augenphänotyp nur partiell retten (vgl. Abb. 4-12). Da Mbt^{K397M3} und Mbt^{K397M4} unterschiedliche Ergebnisse liefern, kann über die Funktionalität von Mbt^{K397M} während der Pilzkörperentwicklung keine eindeutige Aussage gemacht werden. Deshalb sollten unbedingt noch andere unabhängige Linien getestet werden. Die Linie Mbt^{T525A4} schien den mbt^{P1} -Phänotyp zu verstärken. Da dies bei keiner anderen Linie mit einem katalytisch inaktiven Mbt-Konstrukt der Fall war, könnte dieser Effekt auf den Insertionsort des Mbt^{T525A}-Konstrukts zurückzuführen sein. Wie schon den mbt^{P1} -Augenphänotyp, konnte das Cdc42-bindungsdefiziente Mbt^{H19,22L} den mbt^{P1} -Pilzkörperphänotyp nicht retten (Abb. 4-15, rote Balken). Die Linie Mbt^{H19,22L10} schien den mbt^{P1} -Phänotyp zu verstärken, was eventuell auf den Insertionsort des Konstrukts zurückzuführen war, da Mbt^{H19,22L3} diesen Effekt nicht hervorrief. Ein Membrananker in Mbt^{H19,22L-CAAX} konnte ebenfalls die Funktion von Mbt^{H19,22L} nicht wieder herstellen (Abb. 4-16, orange Balken). Im Gegenteil verstärkten die getesteten Mbt^{H19,22L-CAAX}-Konstrukte den mbt^{P1} -Phänotyp. Das Kontrollkonstrukt Mbt^{CAAX} verhielt sich bezüglich seiner Funktionalität wie das wildtypische Mbt-Konstrukt (Abb. 4-16, vgl. hellgraue und gelbe Balken), nur Mbt^{CAAX11} war nicht funktionell. Dies könnte auf den Insertionsort des Konstrukts zurückzuführen sein. Die Kinasedomäne und die Cdc42-Bindungsdomäne sind also in der Pilzkörperentwicklung wie auch in der Augenentwicklung essentiell für die Mbt-Funktion. Ein Konstrukt mit einer ablatierten putativen Bindungsstelle für die G β -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins (Mbt^{G β}) konnte den mbt^{P1} -Phänotyp retten. Das war zu erwarten, da das Motiv nicht perfekt konserviert ist (Leeuw, 1998, Leberer 2000). Ein humanes Homolog von Mbt, hPAK4, wurde ebenfalls getestet, um festzustellen, ob hPAK4 die Mbt-Funktion übernehmen kann. hPAK4 war nicht in der Lage den mbt^{P1} -Phänotyp zu retten (Abb. 4-16, grüne Balken).

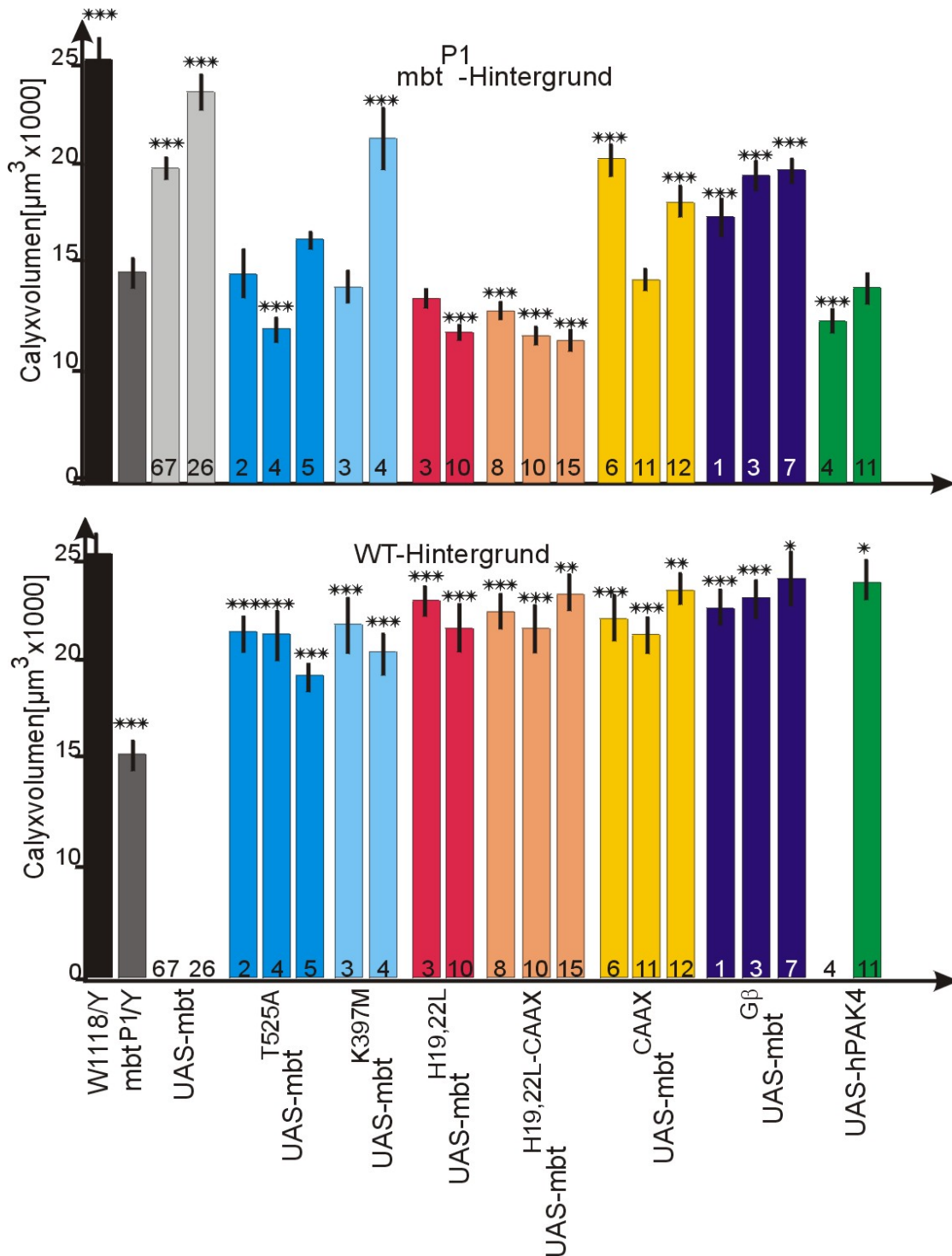


Abbildung 4-16: Rescue des *mbt^{P1}*-Pilzkörperphänotyps

Um die Rescuekonstrukte im *mbt^{P1}*-Hintergrund zu exprimieren (obere Graphik) wurden *mbt^{P1}/mbt^{P1}; Gal4:238Y/Gal4:238Y;+/+* -Weibchen mit *X/Y;+/+;UAS:mbt^X/UAS:mbt^X* - Männchen verpaart. Von Köpfen männlicher Nachkommen mit dem Genotyp *X/Y;Gal4:238Y/+;UAS:mbt^X/+* wurden Paraffinschnitte angefertigt und die Volumina der Calyces planimetrisch bestimmt. *UAS:mbt^X* bezeichnet das jeweils in der Graphik angegebene Rescuekonstrukt. Um die Rescuekonstrukte im Wildtyp-Hintergrund zu exprimieren wurde mit männlichen Nachkommen aus der Kreuzung *x/x;Gal4:238Y/Gal4:238Y;+/+* *X x/Y;+/+; UAS:mbt^X/UAS:mbt^X* entsprechend verfahren (untere Graphik). Als Vergleichswerte sind die Calyxvolumina von männlichen *w¹¹¹⁸*-Fliegen (schwarz) und männlichen *mbt^{P1}*-Fliegen (dunkelgrau) aufgetragen. Gleiche Farben kennzeichnen gleiche Rescuekonstrukte. Die Nummern in den Balken bezeichnen die unabhängigen getesteten Linien. Die Sterne in der oberen Graphik bezeichnen den Unterschied zu Calyxvolumina von *mbt^{P1}*-Fliegen, die in der unteren Graphik den zu Calyxvolumina von wildtypischen Fliegen. *** : $p < 0,001$, ** : $0,01 < p \leq 0,001$, * : $p > 0,01$

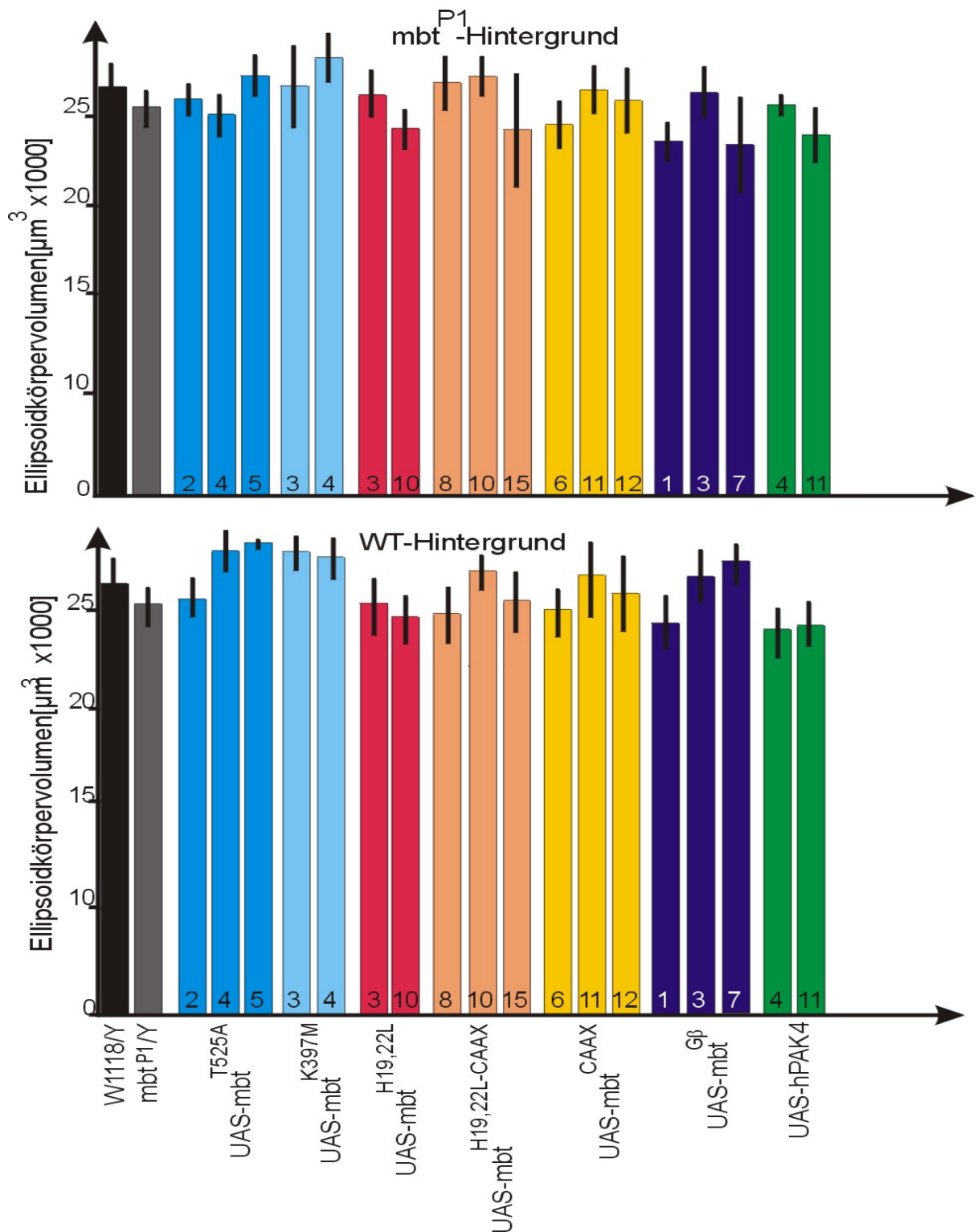


Abbildung 4-17: Effekt der Expression der Rescuekonstrukte auf das Ellipsoidkörpervolumen
 Um die Rescuekonstrukte im *mbt^{P1}*-Hintergrund zu exprimieren (obere Graphik) wurden *mbt^{P1}/mbt^{P1}*; *Gal4:238Y/Gal4:238Y;+/+* -Weibchen mit *X/Y;+/+*; *UAS:mbt^X/UAS:mbt^X* -Männchen verpaart. Von Köpfen männlicher Nachkommen mit dem Genotyp *X/Y;Gal4;238Y;+/+*; *UAS:mbt^X/+* wurden Paraffinschnitte angefertigt und die Volumina des Ellipsoidkörpers planimetrisch bestimmt. *UAS:mbt^X* bezeichnet das jeweils in der Graphik angegebene Rescuekonstrukt. Um die Rescuekonstrukte im Wildtyphintergrund zu exprimieren wurde mit männlichen Nachkommen aus der Kreuzung *x/x;Gal4:238Y/Gal4:238Y;+/+* *X x/Y;+/+*; *UAS:mbt^X/UAS:mbt^X* entsprechend verfahren (untere Graphik). Als Vergleichswerte sind die Ellipsoidkörpervolumina von männlichen *w¹¹¹⁸*-Fliegen (schwarz) und männlichen *mbt^{P1}*-Fliegen (dunkelgrau) aufgetragen. Gleiche Farben kennzeichnen gleiche Rescuekonstrukte. Die Nummern in den Balken bezeichnen die unabhängigen getesteten Linien.

Allerdings gibt es drei humane Homologe: hPAK4, hPAK5 und hPAK6. Eventuell teilen sich im Menschen diese drei Proteine die Aufgaben, die Mbt in der Fliege übernimmt und hPAK4 alleine kann die Mbt-Funktion während der Pilzkörperentwicklung nicht erfüllen.

Um zu testen, ob die Mbt-Konstrukte dominante Effekte verursachen, wurden sie unter der Kontrolle der Gal4-Linie 238Y im Wildtyphintergrund exprimiert. Alle getesteten Linien verursachten eine Verkleinerung der Pilzkörper um 6-29%, wobei die Linien mit den katalytisch inaktiven Konstrukten (Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M}) mit 16,5-29% den deutlichsten Effekt hatten. Im Auge verursachten diese Konstrukte dominante Effekte, was sich im Pilzkörper zu bestätigen schien. Ein wildtypisches Mbt-Konstrukt im Wildtyphintergrund wurde nicht getestet, ebensowenig wurden die Calyxvolumina in der Gal4-Linie 238Y bestimmt. Das sollte unbedingt nachgeholt werden, da sonst nicht auszuschließen ist, dass 238Y selbst einen Effekt auf die Größe der Pilzkörper hat.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die katalytisch inaktiven Mbt-Konstrukte den Pilzkörperphänotyp nur partiell, das Cdc42-Bindungsdefiziente Mbt^{H19,22L} diesen gar nicht retten konnten. Dieses Ergebnis ist konsistent mit dem Ergebnis der Rettungsexperimente im Auge. Auch während der Pilzkörperentwicklung scheint Mbt kinaseunabhängige Funktionen zu haben und die Cdc42-Bindungsstelle essentiell zu sein.

Die *mbt*^{P1}-Mutation hat kaum einen Effekt auf das Volumen anderer Gehirnstrukturen, wie den Ellipsoidkörper (Melzig et al., 1998). Um sicher zu sein, dass sich die in Abb. 4-16 dargestellten Effekte der Mbt-Konstrukte auf den Pilzkörper beschränken, wurde parallel das Volumen des Ellipsoidkörpers bestimmt. Weder die Expression der Mbt-Konstrukte im *mbt*^{P1}-Hintergrund (Abb. 4-17, obere Graphik) noch im Wildtyphintergrund (Abb. 4-17, untere Graphik) hatten eine signifikante Veränderung des Ellipsoidköpervolumens zur Folge.

4.5 Suche nach Mbt-Interaktionspartnern

Cdc42 konnte als Interaktionspartner von Mbt identifiziert werden. Die Interaktion der beiden Proteine ist essentiell für die Lokalisation von Mbt in AV, die wiederum wichtig für die Mbt-Funktion ist. Cdc42 reguliert -zumindest *in vitro*- die Mbt-Kinaseaktivität, und wirkt in der Signalkaskade oberhalb von Mbt. Um die Funktion von Mbt weiter zu charakterisieren, ist es wichtig, auch Effektormoleküle zu identifizieren, die von Mbt

reguliert werden. Um solche Effektoren zu finden, wurden Interaktionscreens durchgeführt. Ann-Katrin Kröhning hat in ihrer Diplomarbeit 1999 einen Yeast-Two - Hybrid Screen durchgeführt mit dem Ziel, direkte Interaktionspartner von Mbt zu finden (Kröhning, 1999). Als zweiter Weg wurde ein Screen nach genetischen Interaktionspartnern gewählt. Dabei sollten Proteine gefunden werden, die unterhalb von Mbt in der Signalkaskade eine Funktion haben, aber nicht unbedingt direkt mit Mbt interagieren müssen. Im Folgenden sollen beide Ansätze erklärt und die identifizierten Interaktionspartner vorgestellt werden.

4.5.1 Der Yeast-Two-Hybrid Screen

Der Yeast-Two-Hybrid Screen birgt die Möglichkeit, aus einer Sammlung von Proteinen (prey: engl. für „Beute“) die herauszufischen, die mit einem bestimmten Protein (bait: engl. für „Raubtier“) interagieren. Dabei werden bestimmte Eigenschaften der Hefe ausgenutzt. So besitzt Gal4, ein Transkriptionsaktivator, eine DNS-Binde- und eine Aktivierungsdomäne. Um die Expression eines Gens zu starten, muss Gal4 an seine Erkennungssequenz in der DNS binden (UAS: upstream activating sequence) und kann dann mit seiner Aktivierungsdomäne die Transkription starten. Fusioniert man nun die für die DNS-Bindedomäne kodierende Sequenz mit den für eine Sammlung von Proteinen kodierenden Sequenzen (hier: embryonale Bibliothek) und die Aktivierungsdomäne mit dem „bait“-Protein (hier: Mbt) und bringt diese zusammen in Hefen, werden DNS-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne in unmittelbare Nähe zueinander gebracht, wenn Mbt mit einem dieser Proteine interagiert. In diesem Fall kann ein Reporter gen (z.B. β -Galactosidase) unter der Kontrolle der UAS-Sequenz exprimiert werden. Auf diese Weise können Hefeklonen identifiziert werden, die Mbt-interagierende Proteine exprimieren. Nach Umklonierung der Plasmide in Bakterien können diese leicht isoliert und sequenziert werden. (Für die genaue Durchführung des Screens: siehe Kröhning, 1999.)

4.5.1.1 Umklonierung und Sequenzierung der Mbt Interaktionspartner

Aus der Diplomarbeit von Ann-Katrin Kröhning lagen 14 Hefeklonen vor, die mit Mbt interagierende Proteine exprimieren sollten (Kröhning, 1999, s.S.50). Die für diese Proteine kodierenden Plasmide wurden aus den Hefeklonen isoliert und in Bakterien transformiert, da eine DNS-Isolation aus Bakterien wesentlich effektiver ist. Die Plasmid-DNS der 14 Klone wurde verdaut und Plasmide, die ein DNS-Fragment

zusätzlich zum Vektorfragment zeigten, sequenziert. Zwei der Klone enthielten kein zusätzliches Fragment. Sechs Klone konnten auch nach mehrmaligen Versuchen nicht sequenziert werden. Zwei Klone enthielten die kodierende Sequenz für das SV40T-Antigen. Es blieben vier Klone mit drei unterschiedliche Sequenzen, die jeweils einen Teil einer vorhergesagten kodierenden Sequenz umfassten. Nach Sequenzvergleich mit den Datenbanken (NCBI, Flybase) konnten keine homologen Proteine aus einer anderen Spezies gefunden werden. In CG15370 wurde eine prolinreiche Domäne gefunden. Solche Domänen vermitteln oft Protein-Proteininteraktionen. In CG14880 wurde eine putative Chitinbindedomäne identifiziert. Da nur für CG8818 und CG14880 cDNA-Klone kommerziell erhältlich waren, wurde im Folgenden mit diesen weitergearbeitet (Tab. 4-1). Die offenen Leseraster wurden mittels PCR amplifiziert und in den pcDNA3-myc Vektor kloniert, um sie in Zellkultur exprimieren zu können.

Hefeklon Nr.	Lokalisation	Gen	cDNS	Proteingröße	Homologie	vorhergesagte Funktion/Domäne
5	49A10	CG8818	GH04007	430AS	-	-
6 und 9	89B22	CG14880	RE15157	643AS	-	Chitinbindedomäne
13	8D4	CG15370	-	-	-	prolinreiche Domäne

Tabelle 4-1: Interaktionspartner von Mbt aus dem Yeast-Two-Hybrid Screen (Kröhnig, 1999)

4.5.1.2 Verifikation der Interaktion

Es ist bekannt, dass in Yeast-Two-Hybrid Screens oft falsch positive Proteine identifiziert werden. Deshalb ist es wichtig, die Interaktion in einem zusätzlichen Test zu verifizieren. Dazu wurde HA-getaggttes Mbt zusammen mit myc-getaggttem CG8818 und CG14880 in HEK293-Zellen exprimiert und mit dem α -Myc-Antikörper eine Immunpräzipitation durchgeführt. Kopräzipitiertes Mbt wurden mit dem α -HA-Antikörper nachgewiesen. Interessanterweise interagierte CG8818 ausschließlich mit aktiviertem Mbt^{S520E} (Abb. 4-18). Dass dennoch wildtypisches Mbt im Yeast-Two-Hybrid Screen mit CG8818 interagiert, mag damit zusammenhängen, dass ein Yeast-Two-Hybrid Screen weniger stringent ist als eine Koimmunopräzipitation. Für

CG14880 konnte eine direkte Interaktion in der Koimmunopräzipitation nicht verifiziert werden (Abb. 4-18).

4.5.1.3 CG8818 und CG14880 sind *in vitro* Phosphorylierungssubstrate von Mbt

Es stellte sich die Frage, ob CG8818 und CG14880 Phosphorylierungssubstrate von Mbt sind. Um das zu beantworten, wurden myc-CG8818 und myc-CG14880 alleine oder zusammen mit dem konstitutiv aktiven HA-Mbt^{S520E} in HEK293-Zellen exprimiert, die Zellen gehungert und myc-CG8818 und myc-CG14880 mit dem α -Myc-Antikörper präzipitiert. Falls eine Phosphorylierung von CG8818 oder CG14880 durch Mbt^{S520E} in den Zellen stattgefunden hatte, sollte diese die Präzipitation überdauern. Die Probe, die potentiell phosphoryliertes myc-CG8818 bzw. myc-CG14880 enthielt, wurde geteilt und eine Hälfte mit Phosphatase behandelt, während die andere Hälfte unbehandelt blieb.

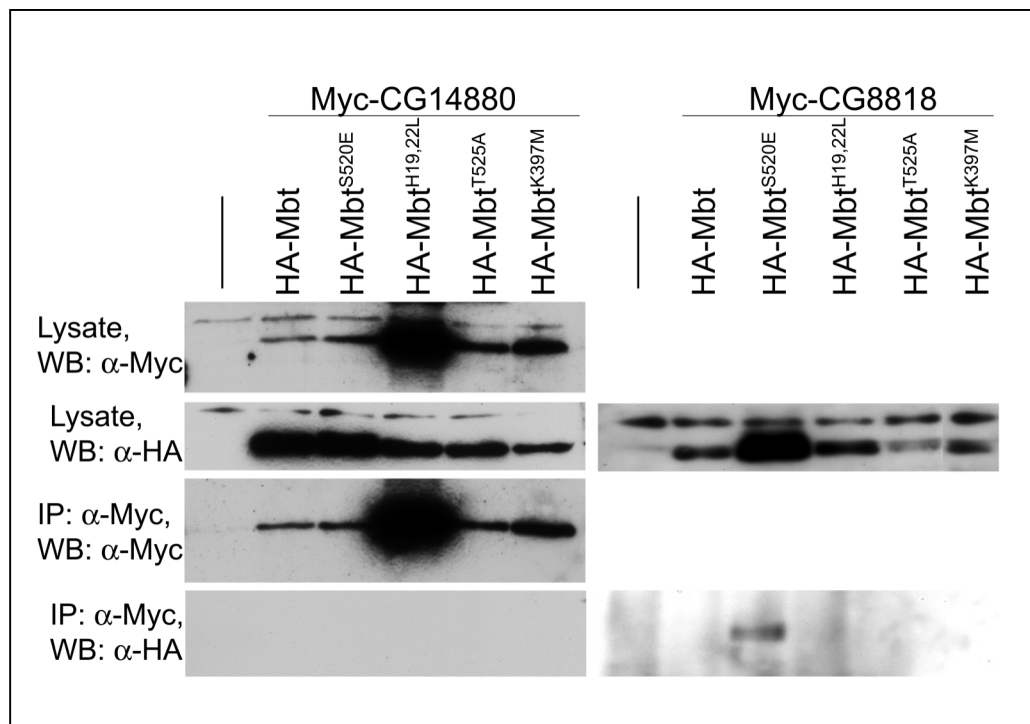


Abbildung 4-18: Interaktion von CG8818 und CG14880 mit Mbt. Myc-getaggttes CG8818 oder CG14880 wurden mit HA-Mbt oder verschiedenen Mbt-Konstrukten in HEK293-Zellen exprimiert und eine Koimmunopräzipitation mit dem α -Myc-Antikörper durchgeführt. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurden die Proteine mit dem entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (IP). Die Expression der Proteine wurden ebenfalls durch Western Blot und Antikörpernachweis überprüft (Lysate). In den Zelllysaten, die HA-Mbt^{H19,22L} und Myc-CG14880 enthielten, wurde mehr Myc-CG14880 exprimiert, als in den anderen Proben. Dies könnte auf einen Pipettierfehler zurückzuführen sein. Für Myc-CG8818 wurde kein Western Blot durchgeführt.

Mbt^{S520E} ein Unterschied im Laufverhalten der phosphatasebehandelten und der nichtbehandelten Probe erkennbar sein. Als Referenz für ein unphosphoryliertes CG8818 oder CG14880 dienten die alleine transfizierten Proben. Tatsächlich konnte sowohl für CG8818 als auch für CG14880 eine solche Veränderung beobachtet werden (Abb. 4-19). Dass dieser Unterschied im Laufverhalten tatsächlich auf Phosphorylierung zurückzuführen ist, wird durch die Reversibilität durch Phosphatasebehandlung gezeigt. In diesem Experiment sind beide Proteine Ziele für Phosphorylierung durch Mbt. Für CG14880 kann keine Interaktion mit Mbt in der Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden, jedoch kann im Phosphataseassay die Phosphorylierung durch Mbt beobachtet werden. Das deutet auf eine transiente Interaktion hin, die nur für die Dauer der Reaktion anhält.

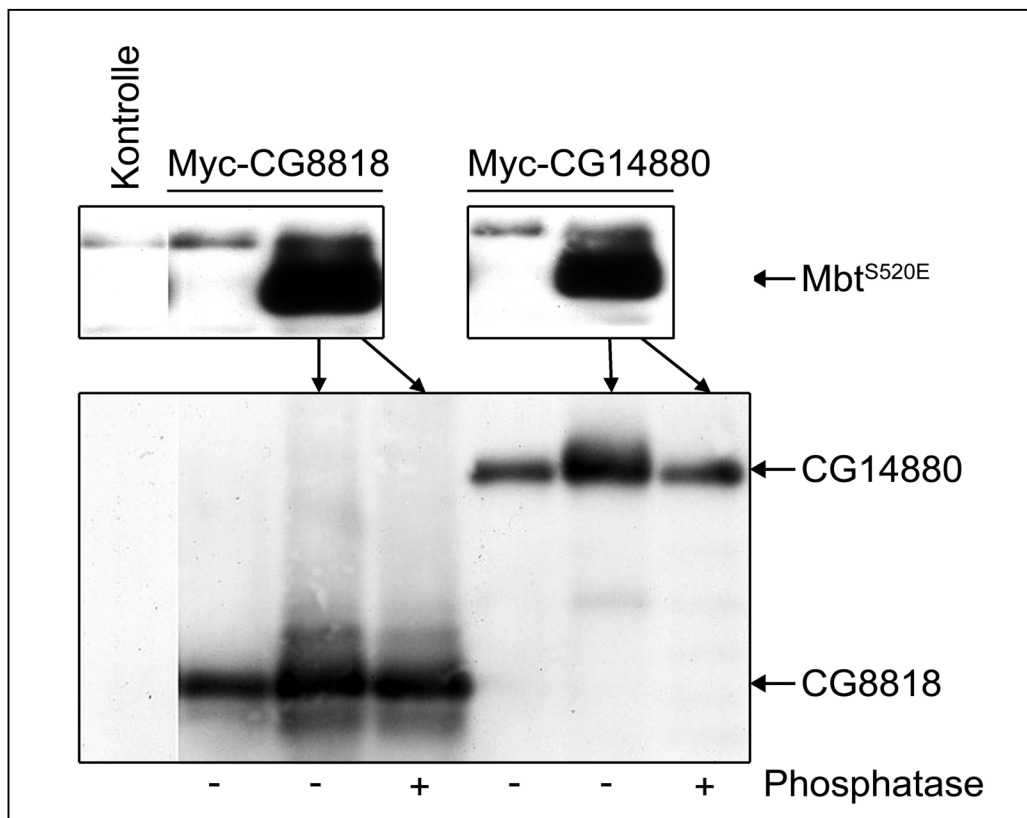


Abbildung 4-19: CG8818 und CG14880 werden von Mbt phosphoryliert

Myc-getaggttes CG8818 oder CG14880 wurden alleine oder zusammen mit aktiviertem Mbt^{S520E} in HEK293-Zellen exprimiert. Nach dem Hungern der Zellen wurden sie lysiert und Myc-CG8818 und Myc-CG14880 mit dem α -Myc-Antikörper präzipitiert. Die doppelt transfizierten Proben wurden geteilt. Eine Hälfte wurde mit Phosphatase inkubiert, die andere Hälfte blieb unbehandelt. Nach SDS-Page und Western Blot konnten Unterschiede im Laufverhalten der behandelten und der unbehandelten Probe beobachtet werden.

4.5.1.4 Aufreinigung von CG8818 zur Immunisierung von Kaninchen

Für CG8818 konnte eine spezifische Interaktion mit der aktivierten Form Mbt^{S520E} gezeigt werden. Außerdem stellt CG8818 im Phosphataseassay ein Substrat für Mbt dar. Deshalb sollte dieses Protein näher charakterisiert werden. Es sollte ein Antiserum hergestellt werden, um das Expressionsmuster von CG8818 untersuchen zu können. Dazu wurde die kodierende Sequenz in den bakteriellen Expressionsvektor pET28b-Vektor kloniert und in E.coli als His-Fusionsprotein exprimiert. Das Protein wurde in großen Mengen hergestellt, war aber in „inclusion bodies“ eingeschlossen. Deshalb war eine Aufreinigung über eine Ni²⁺-Säule nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die „inclusion bodies“ durch mehrere Waschschriffe von Bakterienresten getrennt und angereichert (Abb. 4-20). In dieser Form eignen sie sich zur Immunisierung von Kaninchen und wurden einem kommerziellen Anbieter übergeben, der die Immunisierung durchführte. Die Menge betrug 1mg pro Injektion. Die Kaninchen sollten je dreimal injiziert werden. Die Charakterisierung des Serums steht noch aus.

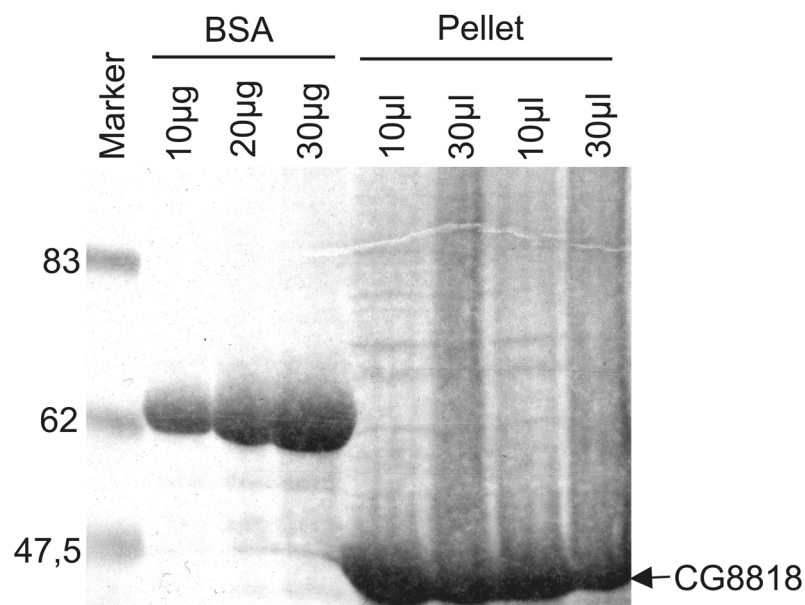


Abbildung 4-20: Aufreinigung des unlöslichen CG8818

His-CG8818 wurde mit dem pET-System (Novagen) in E.coli exprimiert. Da das Protein in „inclusion bodies“ eingeschlossen war, wurde eine „inclusion bodies“-Präparation durchgeführt. Gezeigt ist ein commissiegefärbtes SDS-PAGE. Zum Vergleich wurde Bovines Serum Albumin (BSA) als Mengenstandard aufgetragen. Je 10 µl und 30 µl von zwei verschiedenen Präparationen wurden aufgetragen. Mit „Pellet“ sind die aufgereinigten „inclusion bodies“ bezeichnet.

4.5.2 Der genetische Screen

Durch den genetischen Screen sollten Proteine gefunden werden, die zusammen mit Mbt in einer Signalkaskade wirken. Ein hypomorphes Allel von Mbt, mbt^{P3} , verursacht einen milden Augenphänotyp, d.h. leicht rauhe Augen, die sowohl von wildtypischen, als auch von mbt^{P1} -mutanten Augen zu unterscheiden waren. In diesen mbt^{P3} -Hintergrund wurden Fliegen-Linien eingekreuzt, die auf dem III. Chromosom eine letale P-Elementinsertion trugen. Durch die jeweilige P-Elementinsertion wurde die Gendosis einer etwaigen Signalkomponente, die unterhalb von Mbt wirkt, reduziert, was zur Abschwächung oder Verstärkung des mbt^{P3} -Phänotyps führte. In den männlichen Nachkommen wurde dann nach solch einer Verstärkung oder Suppression des mbt^{P3} -Augenphänotyps gesucht. Aus den Fliegen-Linien, die einen Effekt verursachten, wurde durch Plasmid-Rescue das Gen identifiziert, das die P-Elementinsertion trug.

4.5.2.1 Die Strategie

mbt^{P3} homozygote Weibchen wurden mit Männchen verpaart, die auf dem III. Chromosom eine letale P-Elementinsertion trugen. In den männlichen Nachkommen, die hemizygot für mbt^{P3} und heterozygot für die P-Elementinsertion waren, wurde nach Verstärkung oder Suppression des mbt^{P3} -Augenphänotyps gesucht (Abb. 4-21, A). In Abb. 4-21, B sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen in Abb. 4-21, A angegebenen Genotypen gezeigt. In diesem Fall handelt es sich um eine schwache Verstärkung des mbt^{P3} -Augenphänotyps.

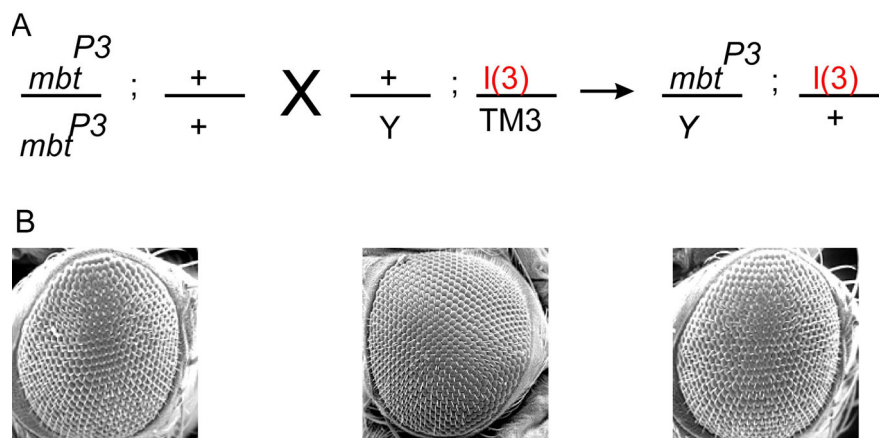


Abbildung 4-21: Strategie des Screen nach genetischen Interaktionspartnern von Mbt. (A) Kreuzungsschema für den Screen: homozygote mbt^{P3} -Weibchen wurden mit Männchen verpaart, die auf dem III. Chromosom eine letale P-Elementinsertion (rot) trugen. Männliche Nachkommen des Genotyps $mbt^{P3}/Y;l(3)/+$ wurden auf Verstärkung oder Suppression des mbt^{P3} -Phänotyps durchsucht. (B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Fliegen mit den in (A) angegebenen Genotypen. Als Beispiel ist die Verstärkung des mbt^{P3} -Phänotyps durch Verlust einer Kopie des *canoe*-Gens gezeigt ($mbt^{P3}/Y;3107/+$).

4.5.2.2 Kandidatengene

2000 Fliegenstämme mit letalen P-Elementinsertionen auf dem III. Chromosom (Deák et al., 1997) wurden auf genetische Interaktion mit *mbt^{P3}* getestet (Thomas Raabe, pers. Mitteilung). 5 Linien verstärkten und 9 supprimierten den *mbt^{P3}*-Augenphänotyp. Nach der Durchführung eines Plasmid-Rescues und der Analyse der das P-Element flankierenden Sequenz konnten die betroffenen Gene identifiziert werden. Vier der untersuchten Linien enthielten Insertionen von zwei P-Elementen in unterschiedlichen Chromosomenstellen (Tab. 4-2, kursiv). In der Linie I(3)24838 war eine zweite Insertion auf dem II.Chromosom in einem nicht charakterisierten Gen (CG4648). Die Kandidaten konnten grob in drei Gruppen eingeteilt werden: Proteine, die mit dem Cytoskelett assoziiert sind (Tab. 4-2, grün), Proteine, die während der Metamorphose in der Pupalentwicklung eine Funktion haben (Tab. 4-2, violett) und andere, für die keine Funktion bekannt war oder die nicht einer der ersten Gruppen zugeordnet werden konnten (Tab. 4-2, schwarz). Da PAK-Proteine als Regulatoren des Cytoskeletts bekannt sind und der *mbt*-Phänotyp sich während der Pupalentwicklung ausbildet wurden die farblich gekennzeichneten Kandidaten weiter charakterisiert.

Linie	Lokalisation der Insertion	Gen	cDNA	unabhängige Mutation (vgl. Kap.2.9)	vorhergesagte Funktion, Domänen
I(3)009105 (V)	82F8	CG2534 (canoe)	LD24616	3107	aktinbindend, Augenentwicklung
I(3)023802 (V)	88E10-11	CG4898 (TM1)	LD37158	11564	Tropomyosin1, aktinbindend
I(3)24838 (V)	21B1-2	CG4648	-	-	-
I(3)24838 (V)	89B17-19	CG6963 (gish)	LD28216 SD09393	11790	Casein Kinase I, Neuronale Entwicklung
I(3)041509 (S)	99F1-3	CG15532 (hdc)	LD44381	12410	headcase, Imaginalscheiben
I(3)071901 (S)	75A9-B6	CG8127 (Eip75B)	GM04985 GM02640	11712	Ecdysoninduziertes Protein, Augenentwicklung
I(3)144011 (V)	73B	CG3971 (baldspot)	LD10431 GH11554	EP(3)3433, I(3)0228	Transmembranprotein

I(3)144011 (V)	78C4-7	CG18023 (Eip78C)	-	4907	Ecdyson-induziertes Protein, RNA-Polymerasell Transkriptionsfaktor (TF)
I(3)052318 (S)	66D12-14	CG6494(h), CG5950 (SrpRbeta)	- GM04779	- -	RNA-Polymerasell TF Ras-Protein
I(3)068607 (S)	78C1-3	NEW	LD11488	-	-
I(3)071710 (S)	89 13	CG6072 (nebula)	LD15403	EP(3)3462, GTD7496	-
I(3)14603 (S)	94C3	CG4919	GH03051	-	-
I(3)074103 (S)	88D1	CG12600, CG7552	- -	I(3)02404	- -
I(3)084013 (S)	100F	CG2094 (PBT)	LD03185	I(3)03429	Polypyrimidintract-bindendes Protein, Splicing
I(3)092301 (V)	89D12	CG11962, CG10901 (oskar)			
I(3)092301 (V)	67B4	CG3628	LD13887	-	-
I(3)146907 (S)	66D1-2	CG6983, CG6964 (grunge)	GM13032 LD10989	- -	- Myb-DNA-Bindungsmotiv, Nukleäre Lokalisationssequenz
I(3)146907 (S)	95F6-8	CG5728, CG6413 (Dis3)	LD41803 LD08354	- -	S1-Motiv, RNA-Bindungsmotiv Ribonuclease II-Domäne

Tabelle 4-2: Kandidaten aus dem genetischen Screen

(S) bzw. (V) bedeutet „Suppressor“ oder „Verstärker“ des *mbt^{P3}*-Phänotyps. Betroffene Gene sind mit ihrer „Celera Genomics“-Nummer (CG) angegeben, falls das Gen beschrieben ist, ist der Genname in Klammern aufgeführt. Wo zwei Gene als betroffen angegeben sind, ist das P-Element zwischen diesen beiden inseriert, ansonsten inseriert es im Gen. Linien, die zwei Insertionen enthalten, sind kursiv gedruckt. Grün hervorgehoben sind Kandidaten, die potentiell mit dem Cytoskelett interagieren können. Violett dargestellt sind Kandidaten, die wahrscheinlich während der Pupalentwicklung eine Rolle spielen. Kandidaten, die sich keiner der beiden ersten Gruppen zuordnen lassen oder für die keine Vorhersage existiert, sind schwarz gedruckt.

4.5.2.3 Verifikation der Kandidaten aus dem genetischen Screen

Da bei einer P-Element-Linie eine zusätzliche Mutation an einer anderen Stelle nicht ausgeschlossen werden kann, ist nicht sichergestellt, dass der beobachtete Effekt auf die Insertion im identifizierten Gen zurückzuführen ist. Das trifft insbesondere dann zu, wenn eine zweite Insertion gefunden wird. Deshalb wurden jeweils unabhängige Mutationen in den Kandidatengenen (Tab. 4-2, violett und grün) im gleichen System getestet, in dem der Screen durchgeführt wurde (4.5.2.1). Es zeigte sich, dass alle ausgetesteten Linien einen Effekt auf den *mbt^{P3}*-Augenphänotyp hatten. Mutationen in *eip78C*, *baldspot*, *tm1* und *gish* wurden im Screen als Verstärker gefunden, die jeweils zusätzlich ausgetesteten Mutationen verursachten dagegen eine Suppression des *mbt^{P3}*-Augenphänotyps. Durch Kreuzungen gegen entsprechende Balancerstämme konnte die Mutation in der Linie I(3)024838 auf dem III.Chromosom in *gish* von der P-Elementinsertion auf dem II.Chromosom (in CG4648) getrennt werden. Die Mutation in *gish* alleine hatte dann keinen Effekt mehr auf den *mbt^{P3}*-Phänotyp. Mit diesen Linien wurde nicht weitergearbeitet. Mutationen in *eip75b* und *hdc* wurden als Suppressoren und Mutationen in *canoe* als Verstärker bestätigt (Tab. 4-3).

Kandidat	Linie	unabhängige Mutation (vgl. Kap. 2.9)	Effekt der unabhängigen Mutation
Eip78C	144011(V)	4907	Suppressor
baldspot	144011(V)	11563	Suppressor
Tm1	023802(V)	11564	Suppressor
gish	024838(V)	11790	Suppressor
Eip75B	071901(S)	11712	Suppressor
hdc	041509(S)	12410	Suppressor
canoe	009105(V)	3107/TM3 (rauhe Augen) 3107/TM6 cno^{misty}	schwacher Verstärker schwacher Verstärker schwacher Verstärker

Tabelle 4-3: Verifikation der Kandidaten durch Test von unabhängigen Mutationen

Unabhängige Mutationen wurden nach dem Schema in Abb. 4-19 ausgetestet. Die Tabelle zeigt, dass zwar Mutationen in *eip78C*, *baldspot*, *tm1* und *gish* als Verstärker des *mbt^{P3}*-Phänotyps im Screen gefunden wurden, unabhängige Mutationen hatten jedoch den entgegengesetzten Effekt. Mutationen in *eip75B* und *headcase* (*hdc*) wurden als Suppressoren, Mutationen in *canoe* als Verstärker des *mbt^{P3}*-Phänotyps bestätigt. Bestätigte Linien sind farbig dargestellt: violett: Funktion während der Metamorphose, grün: Assoziation mit dem Cytoskelett.

Außerdem wurde getestet, ob der Effekt der jeweiligen P-Elementinsertion auf den mbt^{P3} -Phänotyp durch Remobilisierung desselben („jump out“) rückgängig gemacht werden konnte. Leider konnten nur von zwei Linien, I(3)009501 (canoe) und I(3)071901 (Eip75B) lebensfähige Linien etabliert werden. Bei diesen Linien wurde davon ausgegangen, dass es sich um eine präzises Ausschneiden des P-Elements handelte, so dass das betroffene Gen wieder in den wildtypischen Zustand zurückversetzt wurde. Diese Linien wurden, wie in Abb. 4-21 dargestellt, mit mbt^{P3} gekreuzt und die männlichen Nachkommen auf eine Veränderung des mbt^{P3} -Augenphänotyps untersucht. Es stellte sich heraus, dass sie keinen Effekt auf den mbt^{P3} -Augenphänotyp hatten. Die Entfernung des Mutagens hob also die Wirkung auf den mbt^{P3} -Phänotyp auf. Mutationen in *eip75B* und *canoe* konnten in beiden Verifikationsschritten bestätigt werden und stellen somit wirkliche genetische Interaktionspartner von Mbt dar.

4.5.2.4 Mutationen in *canoe* beeinflussen den mbt^{P3} -Pilzkörperphänotyp

Die Analyse und Verifikation der genetischen Interaktionspartner *Eip75B* und *Canoe* beschränkte sich bisher auf den Augenphänotyp. Eine Mutation in *eip75b* supprimiert, eine in *canoe* verstärkt den mbt^{P3} -Augenphänotyp. Eine Null-Mutation in *mbt*, mbt^{P1} , führt zum Verlust von Kenyonzellen, den Neuronen der Pilzkörper, und somit zu einem kleineren Pilzkörper (Melzig et al., 1998). Für mbt^{P3} -Fliegen ist beschrieben, dass sie weniger Photorezeptorzellen haben, aber normale Pilzkörper. Allerdings kann in transheterozygoten Tieren (mbt^{P1}/mbt^{P3}) der Pilzkörperphänotyp aufgedeckt werden (Melzig und Raabe, unveröffentlicht). Es stellte sich nun die Frage, ob die im genetischen Screen gefundenen Kandidaten außer den mbt^{P3} -Augenphänotyp auch den Pilzkörperphänotyp beeinflussten. Von Tieren, die hemizygot für mbt^{P3} und heterozygot für die zu testende Mutation waren, wurden 7µm Paraffin-Gehirnschnitte angefertigt und das Volumen der Calyces planimetrisch bestimmt (Abb. 4-22, obere Graphik). Es zeigte sich, dass die mbt^{P3} -Calyces größtmäßig zwischen den w^{1118} -und und den mbt^{P1} -Pilzkörpern lagen (Abb. 4-22, hellgrauer Balken). Mutationen in *canoe* (Abb. 4-22, 9105 und 3107, mittelblaue Balken) verstärkten den mbt^{P3} -Phänotyp, wie das auch schon im Auge zu beobachtet war. Mutationen in *eip75b* (Abb 4-22, 71901 und 11712, mittelgrüne Balken), die den mbt^{P3} -Phänotyp im Auge supprimierten, hatten auf den Pilzkörperphänotyp eher

einen verstärkenden Effekt. Dabei war das Messergebnis nur für 71901 signifikant verschieden von mbt^{P3} . Sowohl die Remobilisation des P-Elements in *canoe* (Abb. 4-22, 9105, dunkelblaue Balken) als auch in *eip75b* (Abb. 4-22, 71901, dunkelgrüne Balken) hoben die jeweiligen Effekte auf. 9105 Δ 2 verursachte laut Statistik einen signifikant kleineren Pilzkörper als mbt^{P3} . Es kommt vor, dass ein P-Element bei seiner Remobilisation einen Teil des Gens, in das es inseriert ist, mitnimmt, so dass dieses kein voll funktionstüchtiges Protein mehr hervorbringen kann. Das könnte in dieser Linie der Fall sein, so dass der Gendefekt in *canoe* zwar keine Letalmutation verursacht, aber zu einem schwachen Effekt auf den mbt^{P3} -Phänotyp führt. Der Null-Phänotyp in mbt^{P1} -Fliegen wurde durch Mutationen in *canoe* oder *eip75b* nicht signifikant verändert (Abb. 4-22, hellblaue und hellgrüne Balken). Melzig et al. (1998) zeigten, dass Mutationen in *mbt* keinen messbaren Effekt auf das Volumen des Ellipsoidkörpers haben. Um sicherzustellen, dass ein beobachteter Effekt einer Mutation auf den mbt^{P3} -Pilzkörperphänotyp nicht auf das veränderte Volumen des gesamten Gehirns zurückzuführen war, sondern tatsächlich auf das veränderte Volumen der Pilzkörper, wurde zum Vergleich das Volumen des Ellipsoidkörpers parallel mitbestimmt. mbt^{P1} -Fliegen hatten in dieser Messung leicht verkleinerte Ellipsoidkörper, was in vorherigen Messungen nicht der Fall war (Abb. 4-17; Melzig et al., 1998). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. In mbt^{P3} -Fliegen war das Volumen des Ellipsoidkörpers nicht unterschiedlich zu w^{1118} -Kontrollfliegen. Keine der getesteten Linien hatten statistisch signifikante Auswirkungen auf das Volumen des Ellipsoidkörpers (Abb. 4-22, untere Graphik). Mutationen in *canoe* verstärken also tatsächlich neben dem mbt^{P3} -Augenphänotyp auch den mbt^{P3} -Pilzkörperphänotyp, während Mutationen in *eip75b* eher einen verstärkenden Effekt auf den mbt^{P3} -Pilzkörperphänotyp haben. Die Wechselwirkung von Mbt und Eip75b wurde nicht weiter untersucht.

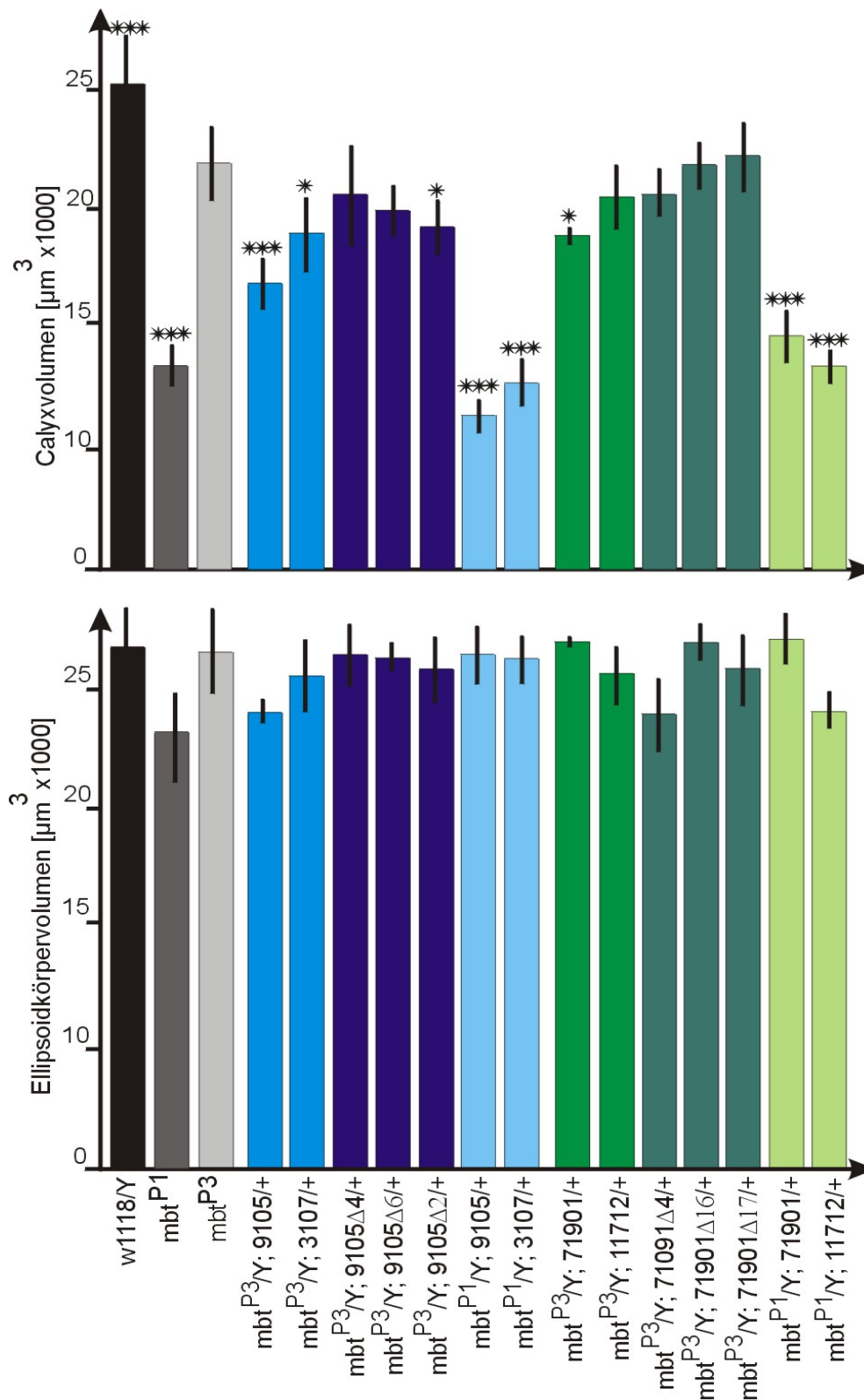


Abbildung 4-22: Effekt der Mutationen in *canoe* und *eip75b* auf den *mbt^{P3}*-Pilzkörperphänotyp

Wie in Abb. 4-21 beschrieben, wurden homozygote *mbt^{P3}/mbt^{P3}*-Weibchen mit Männchen verpaart, die auf dem III.Chromosom eine Letalinsertion in *canoe* (blau) oder in *eip75b* (grün) trugen oder mit entsprechenden „jump out“-Linien. Von Köpfen männlicher Nachkommen, die hemizygot für *mbt^{P3}* und heterozygot für die Mutation waren, wurden Paraffinschnitte angefertigt und die Volumina der Calyces planimetrisch bestimmt. Werte, die sich signifikant von *mbt^{P3}*-Werten unterschieden, sind mit Sternen gekennzeichnet. Stellvertretend für das Volumen des gesamten Gehirns wurde in den jeweiligen Linien die Volumina der Ellipsoidkörper bestimmt (untere Graphik). *** : $p < 0,001$, ** : $0,01 < p < 0,001$, * : $p > 0,01$

4.5.2.5 Direkte Interaktion von Canoe und Mbt

Canoe und Mbt interagieren genetisch miteinander. Canoe kolokalisiert mit Arm und Mbt an den Adhärenzverbindungen der sich entwickelnden Photorezeptorzellen (Matsuo et al., 1999; Abb. 4-3 und 4-4). In *mbt^{P1}*-Augenscheiben ist seine Lokalisation gestört (Abb. 4-4). Mutationen in *canoe*, ähnlich wie Mutationen in *mbt* (Abb. 4-7), verhindern die Elongation der Photorezeptorzellen während der morphogenetischen Umgestaltungsprozesse in der Pupalentwicklung (Matsuo et al., 1999). Außerdem ist Canoe ein putativ aktinbindendes Protein (Matsuo et al., 1999). PAK-Proteine sind als Regulatoren des Cytoskeletts bekannt. PAK4 kann durch Phosphorylierung von LIMK1, die wiederum den Aktindestabilisator Cofilin reguliert, auf das Cytoskelett einwirken (Dan et al., 2001). Mbt könnte direkt mit Canoe interagieren und durch diese Wechselwirkung das Cytoskelett regulieren. Um diese Hypothese zu testen, wurde das offene Leseraster der *canoe*-cDNS in den pcDNA-myc-Vektor kloniert, zusammen mit HA-Mbt in HEK293-Zellen exprimiert und eine Koimmunopräzipitation mit dem α -Myc-Antikörper durchgeführt. Myc-Canoe und HA-Mbt wurden mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Für keines der Mbt-Konstrukte konnte eine direkte Interaktion mit Canoe gezeigt werden (Abb. 4-23).

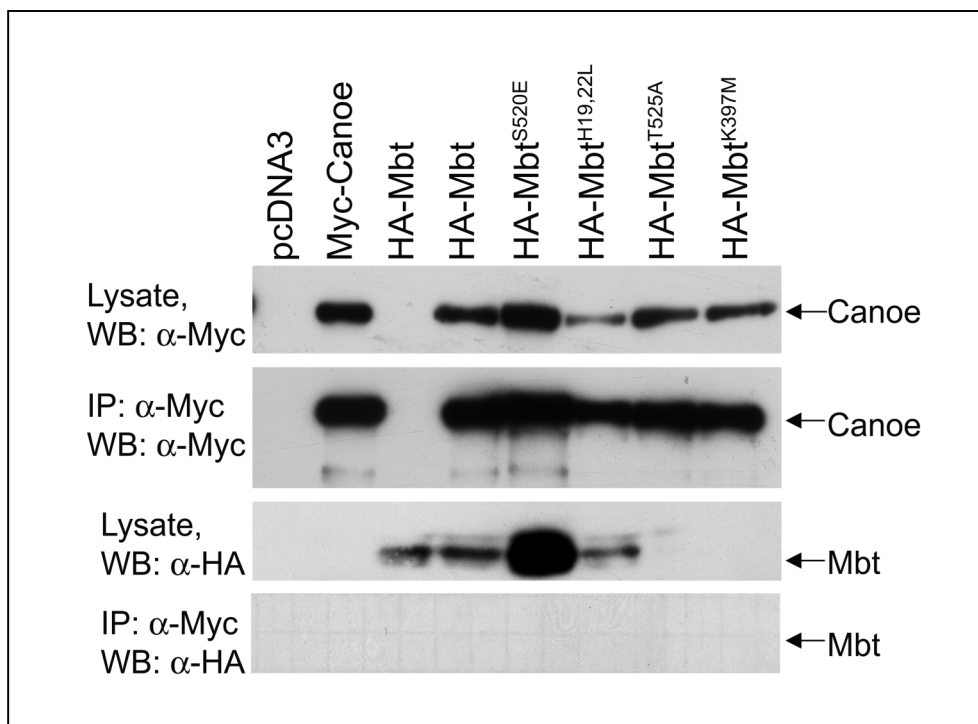


Abbildung 4-23: Interaktion von Mbt mit Canoe. Myc-Canoe wurde alleine oder zusammen mit HA-Mbt oder angezeigten Mbt-Konstrukten in HEK293-Zellen exprimiert und eine Koimmunopräzipitation mit dem α -Myc-Antikörper durchgeführt. Im Western Blot wurden präzipitierte Proteine (IP) nachgewiesen sowie die Expression der Proteine überprüft (Lysate). HA-Mbt^{T525A} HA-Mbt^{K397M} wurden sehr schwach exprimiert.

4.5.3 Test möglicher Mbt Interaktionspartner

Für PAK-Proteine der Unterfamilie II sind wenige Effektormoleküle bekannt. PAK4 kann LIMK1 phosphorylieren. LIMK1 wird dadurch aktiviert und kann Cofilin verstärkt phosphorylieren. Durch Phosphorylierung von Cofilin wird seine aktindepolymerisierende Funktion inhibiert. Auf diese Weise kann PAK4 regulierend auf das Cytoskelett einwirken (Dan et al., 2001). Als Gegenspieler fungiert eine Serin/Threonin-Phosphatase, die Cofilin dephosphorylieren kann. In *Drosophila* sind sowohl für Cofilin (*twinstar*), als auch für die Phosphatase (*slingshot*) Mutanten isoliert (Edwards et al., 1994; Niwa et al., 2002). Es lag nahe, *twinstar*- und *slingshot*-Mutanten auf genetische Interaktion mit *mbt^{P3}* zu testen.

Ein weiterer Kandidat, der getestet wurde, war Crumbs (Crb). Crb ist ein Transmembranprotein, das apikal der Adhärenzverbindungen der Photorezeptorzellen im sogenannten „stalk“ lokalisiert. Der „stalk“ ist die Verbindung zwischen Rhabdomer und dem Rest der Zelle (Abb. 4-2). Es ist für den Aufbau der Adhärenzverbindungen und ihre Integrität während der distal-proximalen Streckung in der Pupalentwicklung wichtig (Pellikka et al., 2002; Izaddoost, et al., 2002). Mutationen in Crb verursachen auch eine Verkürzung der „stalk“-Membran, die durch eine Null-Mutation in β_H -Spectrin (*karst*) noch verstärkt wird (Pellikka et al., 2002). *karst* wurde ebenfalls auf eine genetische Interaktion mit *mbt^{P3}* getestet.

Gen	getestete Linie (vgl. Kap. 2.9)	Effekt auf den <i>mbt^{P3}</i> -Phänotyp
twinstar	12201	Suppressor
slingshot	11524	Suppressor
crumbs	3448, 10331	Suppressoren
karst	11528	kein Effekt

Tabelle 4-4: Genetische Interaktionspartner von *mbt^{P3}*

Mutationen in *twinstar* und *slingshot* schwächten den *mbt^{P3}*-Phänotyp ab. Zusammen mit der genetischen Interaktion von *mbt^{P3}* und Mutationen in *canoe* ist das ein weiterer Hinweis auf eine Rolle von Mbt bei der Regulation des Cytoskeletts. Zwei unterschiedliche Mutationen in *crumbs* supprimierten den *mbt^{P3}*-Phänotyp, während eine Mutation in *karst* keinen Effekt hatte.

4.5.4 Hinweise auf eine Beteiligung von Mbt im ERK-Signalweg

Sowohl PAK4 als auch PAK5 können den Jun-N-terminal Kinase (JNK)-Signalweg aktivieren. Beide Kinasen aktivieren nicht den Erk-Signalweg und nur sehr schwach den p38-Signalweg (Qu et al., 2001; Abo et al., 1998; Dan et al., 2002). Für eine Beteiligung von Mbt in einem dieser MAP Kinase-Signalwege spricht die Beobachtung, dass der mbt-Phänotyp durch Einkreuzen einer aktivierten Form von *Drosophila* Erk (*Rl^{sem}*) verstärkt wird (Raabe, pers. Mitteilung). Es stellte sich die Frage, ob Mbt wirklich in einem MAP Kinase-Signalweg aktiv ist, oder ob es sich bei der genetischen Interaktion um akkumulative Effekte handelte. In HEK293-Zellen wurden wildtypisches Mbt, aktiviertes Mbt^{S520E} und inaktives Mbt^{T525A} oder Mbt^{K397M} transient exprimiert. Die Zelllysate wurden mit dem α -HA-Antikörper auf Expression der Mbt-Konstrukte getestet. Mit phosphospezifischen Antikörpern gegen phospho-Erk, phospho-JNK und phospho-p38 wurden die jeweiligen endogenen aktivierten Kinasen nachgewiesen. Als Positivkontrollen dienten die Erk-Aktivierung durch Serumstimulation und die JNK-/p38-Aktivierung durch Anisomycin (Abb. 4-24). Auf die Aktivierung von JNK und p38 hatte keines der Mbt-Konstrukte einen Effekt (Abb. 4-24, B).

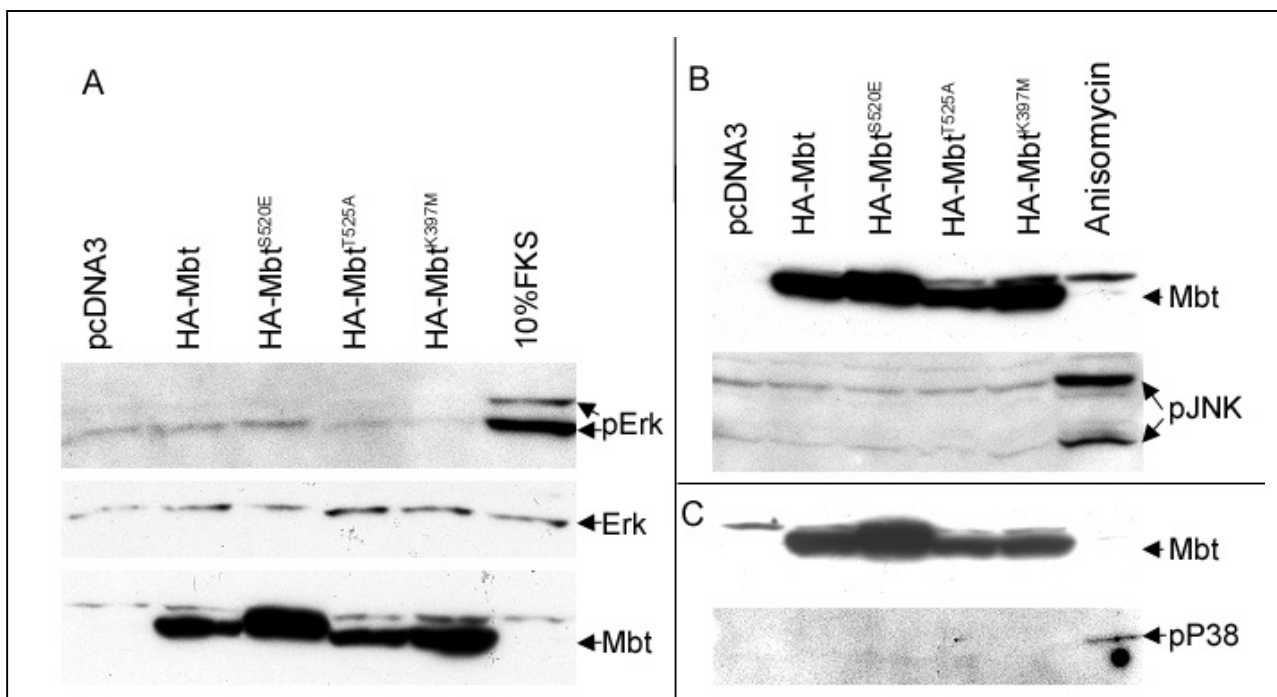


Abbildung 4-24: Mbt hat Einfluss auf den ERK-Signalweg

HEK293-Zellen wurden mit Konstrukten für HA-Mbt, HA-Mbt^{S520E}, HA-Mbt^{T525A} oder HA-Mbt^{K397M} transfiziert, nach 24h in Hungermedium überführt und nach 48h lysiert. Die Expression der Mbt-Konstrukte wurde mit dem α -HA-Antikörper nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente der leere Vektor (pcDNA3). Als Positivkontrolle für aktiviertes ERK dienten Zellen, die 10min mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) stimuliert wurden, für aktiviertes JNK und p38 wurden Zellen 30min mit Anisomycin stimuliert.

In den Zellen, die transient Mbt^{T525A} oder Mbt^{K397M} exprimierten, wurde weniger aktiviertes Erk nachgewiesen als in den Zellen, die wildtypisches Mbt oder aktiviertes Mbt^{S520E} exprimierten, obwohl die gesamte Menge an Erk-Protein vergleichbar war. Allerdings konnte in Zellen mit konstitutiv aktivem Mbt^{S520E} nicht mehr phospho-Erk nachgewiesen werden (Abb. 4-24, A). Anscheinend ist Mbt in den Erk-Signalweg involviert. Dieses Experiment ist als Vortest anzusehen. Um die Rolle von Mbt im Erk-Signalweg genauer zu untersuchen, bedarf es weiterer Experimente.

5. Diskussion

PAK-Proteine sind hochkonservierte Signalmoleküle, die ursprünglich als Interaktionspartner von Rac und Cdc42 entdeckt wurden. Sie spielen bei der Regulation so diverser Vorgänge wie Genexpression, Zellmorphology, Zellmobilität und Apoptose eine Rolle (Daniels und Bokoch, 1999; Bagrodia und Cerione, 1999; Jaffer und Chernoff, 2002).

5.1 Mbt wird durch aktiviertes Cdc42 reguliert

Mbt wird aufgrund von Sequenzhomologie der PAK-Unterfamilie II zugerechnet (Abb. 1-1). Mbt zeigt ähnliche Bindungseigenschaften bezüglich der Rho-GTPasen wie PAK4-6, Mitglieder der Unterfamilie II, nämlich eine starke Interaktion mit aktiviertem Cdc42 und eine schwache Interaktion mit aktiviertem Rac1, während keine Bindung an aktiviertes Rho1 detektierbar ist (Abb. 4-8 und 4-9, B). Eine weitere Gemeinsamkeit von PAK4-6 und Mbt ist, dass die Bindung an aktiviertes Cdc42 *in vitro* nicht zur Erhöhung der Kinaseaktivität führt (Abb. 4-11; Abo et al., 1998; Dan et al., 2002; Pandey et al., 2002; Lee et al., 2002), im Falle von Mbt scheint die Kinaseaktivität sogar verringert (Abb. 4-11). Dagegen führt die Mutation oder Deletion der p21-Bindungsdomäne (PBD) in Mbt, PAK4 und PAK6 zu einer erhöhten Kinaseaktivität (Abb. 4-11; Abo et al., 1998; Yang et al., 2001). Im Unterschied zu PAK4-6/Mbt können PAK1-3/DPAK aktiviertes Cdc42 und Rac binden, wodurch die intramolekulare Interaktion der Kinase-Inhibitor-Domäne (KID) mit der katalytischen Domäne (KD) aufgebrochen wird, was zur Aktivierung der Kinase führt (Zenke et al.; 1999, Buchwald et al., 2001; Chong et al., 2001; Lei et al., 2000). PAK4-6/Mbt sind C-terminal der PBD von PAK1-3/DPAK verschieden, untereinander aber hochkonserviert (Abb. 4-10). Die Unterschiede in der Struktur, in der Interaktion mit kleinen GTPasen und der resultierenden Veränderung der Kinaseaktivität von PAK4-6/Mbt zu PAK1-3/DPAK lassen auf einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus schließen. Aufgrund der Ähnlichkeit innerhalb von PAK4-6/Mbt kann man einen einheitlichen Regulationsmechanismus in der Unterfamilie II vermuten.

5.2 Mbt hat auch kinaseunabhängige Funktionen

Der *mbt^{P1}*-Augen- und Pilzkörperphänotyp kann durch Expression der *mbt*-cDNS im *mbt^{P1}*-Hintergrund unter der Kontrolle der Gal4-Linie 238Y (Yang et al., 1998)

gerettet werden (Melzig et al., 1998; Abb. 4-12 und 4-16). In Rettungsexperimenten mit mutierten *mbt*-cDNS-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die PBD und die KD essentiell sind. In pupalen sich entwickelnden Photorezeptorzellen können katalytisch inaktive Versionen von Mbt (Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M}) den *mbt^{P1}*-AV-Phänotyp partiell retten, während das Cdc42-bindungsdefiziente Mbt^{H19,22L} trotz erhöhter Kinaseaktivität das nicht kann. Außerdem ist Mbt^{H19,22L} nicht an AV lokalisiert, sondern im Cytoplasma verteilt, während Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M} wie das wildtypische Mbt-Konstrukt an AV lokalisiert sind (Abb. 4-13 und 4-14). Im adulten Auge spiegelt sich dieses Ergebnis wider: Mbt^{T525A} und Mbt^{K397M} können den *mbt^{P1}*-Augenphänotyp partiell retten, während das Cdc42-bindungsdefiziente Mbt^{H19,22L} nicht funktionell ist (Abb. 4-12). Den *mbt^{P1}*-Pilzkörperphänotyp können Mbt^{T525A}, Mbt^{K397M} und Mbt^{H19,22L} nicht retten (Abb. 4-16). Die Expression aller getesteter Mbt-Konstrukte mit der Gal4-Linie 238Y im Wildtyphintergrund führt zu leicht verringerten Calyxvolumina, so dass ein Effekt der Gal4-Linie 238Y auf die Größe der Pilzkörper nicht ausgeschlossen werden kann. Dieser Effekt ist im Falle der katalytisch inaktiven Konstrukte ausgeprägter. Wie im Auge scheinen diese Mbt-Konstrukte also auch im Pilzkörper im Gegensatz zum Cdc42-bindungsdefizienten Konstrukt einen dominanten Effekt zu haben. Widersprüchlich scheint, dass Cdc42-bindungsdefizientes Mbt^{H19,22L} trotz erhöhter Kinaseaktivität den *mbt^{P1}*-Phänotyp nicht retten kann, während katalytisch inaktives Mbt den *mbt^{P1}*-Phänotyp partiell retten kann. Dies könnte auf kinaseunabhängige Funktionen von Mbt zurückzuführen sein, die über die PBD vermittelt werden. Der Grund, warum Mbt^{H19,22L} in Gegensatz zu katalytisch inaktivem Mbt keinen dominanten Effekt verursacht, könnte in der Kinaseaktivität liegen. Katalytisch inaktives Mbt könnte als dominant negatives Konstrukt den Mbt-Signalweg blockieren, während die Kinaseaktivität in Mbt^{H19,22L} nur leicht erhöht ist und eventuell nicht ausreicht, um dominante Effekte zu erzielen. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die Expression eines konstitutiv aktiven Mbt^{S520E}, dessen Aktivität im Vergleich mit Mbt^{H19,22L} beträchtlich erhöht ist, mit Gal4(238Y) im Wildtyphintergrund zum Tod der Tiere in verschiedenen Entwicklungsstadien führt. Die wenigen überlebende Tiere zeigen Defekte wie Stummelflügel, missgebildete Borsten und einen Verlust von Photorezeptorzellen.

5.3 Cdc42 vermittelt die Lokalisation von Mbt an Adhärenzverbindungen während der Morphogenese der Photorezeptorzellen

Es stellt sich nun die Frage, was die Funktion der Interaktion von Mbt und Cdc42 ist. Zum einen reguliert aktiviertes Cdc42 die Mbt-Kinaseaktivität *in vitro*. Transgenes Cdc42-bindungsdefizientes Mbt^{H19,22L} lokalisiert nicht an AV und in *cdc42*-mutanten Photorezeptorzellen lokalisiert endogenes Mbt nicht an AV. Das heißt, dass Cdc42 Mbt mittels der PBD an die AV rekrutiert (Abb. 4-13, 4-14 und 4-15). Diese spezifische Lokalisation an AV scheint für die Mbt-Funktion wichtig zu sein, da Rekrutierung von Mbt an die Zellmembran durch einen Membrananker in Mbt^{H19,22L-CAAX} die Funktion nicht wieder herstellen kann (Abb. 4-12, 4-13 und 4-14). Spezifische Lokalisierung an bestimmte Zellkompartimente ist auch für die Funktion anderer PAK-Proteine wichtig. Durch Interaktion der PBD mit aktiviertem Cdc42 wird PAK4 an den Golgi-Apparat rekrutiert, was essentiell für die PAK4-vermittelte Aktinreorganisation ist (Abo et al., 1998). X-PAK5 kann Mikrotubuli binden und sie stabilisieren. Durch Interaktion mit aktiviertem Rac oder Cdc42 verändern sich die Bindungseigenschaften und X-PAK5 kolokalisiert mit Aktin statt mit Mikrotubuli. So kann eine Regulation des Aktin- und Mikrotubulinetzwerks erreicht werden (Cau et al., 2001). Für PAK1 wird eine kinaseunabhängige Funktion als Gerüstprotein beim Auswachsen von Neuriten in PC12-Zellen postuliert, die abhängig von Membranlokalisation ist (Daniels et al., 1998). Das Rezeptormolekül Dscam bindet an das Adapterprotein Dock, welches mit DPAK interagiert. Zusätzlich bindet Dock an den Guanin Nukleotid Austauschfaktor Trio, der über Aktivierung von DRac DPAK reguliert. So kann durch kombinatorische Regulation über Dscam/Dock und Trio DPAK räumlich begrenzt in den Wachstumskegeln aktiviert werden und das Auswachsen der Photorezeptorzellaxone steuern (Hing et al.; 1999, Schmucker et al., 2000; Newsome et al., 2000).

Mbt bindet nur aktiviertes Cdc42 und Cdc42 vermittelt die Lokalisation von Mbt an AV, was bedeutet, dass eine lokale Aktivierung von Cdc42 stattfinden muss. In Säugerepithelzellen konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin, das Transmembranprotein der AV, Cdc42 aktivieren kann (Kim et al., 2000). *Drosophila* DE-Cadherin wird während der Augenentwicklung in Photorezeptorzellen exprimiert (Izaddoost et al., 2002; Dumstrei et al., 2002), eine Aktivierung von Cdc42 durch DE-Cadherin ist allerdings noch nicht gezeigt. Zusammenfassend kann eine Rolle von Mbt als Effektor von Cdc42 während der Morphogenese der Photorezeptorzellen postuliert werden.

5.4 Unterschiede in der Funktion von Mbt in Augen- und Pilzkörperentwicklung

Cdc42 spielt eine Rolle in der Regulation des Cytoskeletts, während der Morphogenese von Epithelien und in Signalwegen während der *Drosophila* Entwicklung (Genova et al., 2000). In Säugerepithelzellen ist Cdc42 an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt (Erickson and Cerione, 2001). Diese Funktionen von Cdc42 beschränken sich auf Epithelien. Über eine mögliche ähnliche Rolle in neuronalen Zellen ist nichts bekannt, so dass über eine Funktion der Interaktion von Mbt und Cdc42 in den Pilzkörperneuroblasten oder -gangliumutterzellen während der Pilzkörperentwicklung nur spekuliert werden kann. Auf unterschiedliche Wirkungsweisen von Mbt während der Augen- und Pilzkörperentwicklung deuten unterschiedliche Effekte von Mutationen in *canoe* und *eip75b* auf den Augen- und Pilzkörperphänotyp des hypomorphen *mbt^{P3}* hin. Mutationen in *canoe* verstärken den Augen- und Pilzkörperphänotyp von *mbt^{P3}*, während Mutationen in *eip75b* den Augenphänotyp supprimieren und den Pilzkörperphänotyp schwach verstärken. Auch die apikal lokalisierten Polaritätsproteine Crumbs und Stardust sind an der Etablierung der Zellpolarität in Epithelien nicht aber in Neuroblasten beteiligt (Hong et al., 2001). Während der Augenentwicklung interagiert Crumbs mit Mbt. Es wäre möglich, dass Mbt in Epithelien und Neuroblasten zum Teil unterschiedliche Funktionen hat.

5.5 Kann Mbt Apoptose regulieren?

Der *mbt*-Phänotyp ist gekennzeichnet durch einen Verlust an Photorezeptor- und Kenyonzellen (Melzig et al., 1998). In der larvalen Augenscheibe kann kein Defekt bei Proliferation oder Differenzierung festgestellt werden, erst in der Puppe fehlen Photorezeptorzellen (Abb. 4-6). PAK1 und PAK4 können Bad, ein Mitglied der Bcl-2-Familie, phosphorylieren und so dessen proapoptotische Funktion hemmen (Tang et al., 2000; Schürmann et al., 2000; Gnesutta et al., 2001). In *Drosophila* existiert ein proapoptotisches Bcl-2-Protein, Debcl, das wie seine Wirbeltierverwandten über mitochondriales Cytochrom c Apoptose auslösen kann (Richardson and Kumar, 2002). Ein antiapoptotischer Effekt von Mbt durch Phosphorylierung von Debcl wäre denkbar, allerdings können durch Acridinorangefärbungen keine zusätzlichen toten Zellen in *mbt^{P1}*-Augenscheiben nachgewiesen werden. Da diese Färbung nur einmal versucht wurde, kann dies technische Ursachen haben und der Versuch sollte wiederholt werden. Zusätzliche Färbungen gegen Apoptosemarkern wie aktivierter

Caspase-3 sollten durchgeführt werden, um festzustellen, ob in *mbt^{P1}*-Augenscheiben Zellen durch Apoptose eliminiert werden.

5.6 CG8818 und CG14880 sind potentielle Interaktionspartner und Phosphorylierungssubstrate von Mbt

Um Mbt in einen Signalweg einordnen zu können, müssen Interaktionspartner gefunden werden. In einem Yeast-two-hybrid-Screen wurden drei direkte Interaktionspartner identifiziert. Es handelt sich um CG15370, CG8818 und CG14880, neuartige Proteine, die keine Homologe in anderen Spezies haben. Auch in *Drosophila* gibt es weder ähnliche Proteine noch beschriebene Mutanten für diese Gene. Außer einer putativen chitinbindenden Domäne in CG14880 und einem prolinreichen Motiv in CG15370 können keine weiteren Sequenzmotive vorhergesagt werden. Prolinreiche Sequenzmotive sind oft an Protein-Proteininteraktionen beteiligt, die für Signalmoleküle essentiell sind. Chitinbindedomänen kommen in Proteinen vor, die in der peritrophischen Membran sitzen, die den Insektendarm umgibt. Außerdem beinhalten auch Chitinasen solche Domänen (Terra, 2001). Ein direkter Zusammenhang der bis jetzt beschriebenen Funktion der Chitinbindedomäne mit der oben diskutierten Funktion von Mbt kann nicht postuliert werden. CG15370 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher charakterisiert.

Für CG8818 kann die Interaktion mit Mbt in einem Koimmunopräzipitationsexperiment bestätigt werden, jedoch bindet CG8818 ausschließlich an aktiviertes Mbt^{S520E}. CG14880 dagegen kann nicht mit Mbt kopräzipitiert werden (Abb. 14-18). CG8818 und CG14880 stellen Substrate für Phosphorylierung durch Mbt dar (Abb. 14-19). Es stellt sich die Frage, warum CG14880 im Interaktionstest in HEK293-Zellen nicht mit Mbt interagiert aber trotzdem durch gleichzeitige Expression eines aktivierten Mbt-Konstrukts phosphoryliert wird. Zum einen könnte Mbt^{S520E} eine andere, endogene Kinase aktivieren, die wiederum CG14880 phosphoryliert. Mit HEK293-Zellen handelt es sich um humane embryonische Nierenzellen, die kein Homolog von CG14880 besitzen. Daher scheint es unwahrscheinlich, dass es eine endogene Kinase geben soll, die CG14880 phosphorylieren kann, zumal alleine transfiziertes CG14880 nicht phosphoryliert wird. Zum anderen könnte Mbt^{S520E} transient, nur für die Dauer der Phosphorylierungsreaktion, mit CG14880 interagieren. Außerdem wurde CG14880 in

einem Interaktionsscreen als direkter Bindungspartner von Mbt entdeckt, deshalb wird die zweite Theorie als wahrscheinlicher angenommen.

Um CG8818 und CG14880 auch *in vivo* untersuchen zu können, sollen Antisera hergestellt werden. Die Unterschiede der Expression und Lokalisation der Proteine in wildtypischen und *mbt*-mutanten Geweben, sowie Kopräzipitationsexperimente mit den endogenen Proteinen könnten weiter Aufschluss geben über die Wechselwirkung von CG8818 und CG14880 mit Mbt. Um Aufschluss über die Prozesse zu erhalten, in die CG8818 und CG14880 involviert sind, wären mutante Linien wichtig.

5.7 Canoe und Eip75B sind genetische Interaktionspartner von Mbt

In einem genetischen Screen wurde nach Mutationen gesucht, die den Phänotyp der hypomorphen *mbt*^{P3}-Mutation verstärken oder supprimieren. Dadurch sollten Proteine identifiziert werden, die unterhalb von Mbt im gleichen Signalweg eine Funktion haben. Mutationen in *canoe* verstärken den *mbt*^{P3}-Augen- und Pilzkörperphänotyp, während Mutationen in *eip75b* den *mbt*^{P3}-Augenphänotyp supprimieren und den *mbt*^{P3}-Pilzkörperphänotyp leicht verstärken. Auf den *mbt*^{P1}-Phänotyp hatte keine der Linien einen Effekt (Abb. 4-22).

Über Eip75B ist wenig bekannt. Es ist eines von drei Produkten des Genlokus *eip75*. Exprimiert werden Eip75A, Eip75B und Eip75C während der Verpuppung. Sie werden nach Ausschüttung des Verpuppungshormons Ecdyson mittels des 20E/EcR/USP-Komplex (20 Ecdyson/Ecdysonrezeptor/Ultraspiracle) exprimiert und gehören somit zu den Erstantwortgenen. Aufgrund von Sequenzhomologie zählt Eip75B zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren. Diese Moleküle können direkt an Steroidhormone binden, in den Nukleus wandern und dort die hormoninduzierte Transkription von Zielgenen verursachen (Hemrich und Brown, 1995; Thummel, 2001). PAK6, wie Mbt ein Mitglied der PAK-Proteine der Unterfamilie II, kann an den Androgenrezeptor binden und durch dessen Phosphorylierung die androgeninduzierte Transkription regulieren (Yang et al., 2001). Die genetische Interaktion von Eip75B und Mbt könnte ein Hinweis auf eine ähnliche Funktion von Mbt während der Verpuppung sein.

Canoe besitzt N-terminal eine RA-Domäne („Ras-associating domain“; Kuriyama et al., 1996; Matsuo et al., 1997), die die Bindung zu Ras vermittelt und eine zentrale PDZ-Domäne (PSD-95/Dlg/ZO-1-Domäne), über die möglicherweise Protein-Protein-

Interaktionen vermittelt werden (Ponting et al., 1997). Zwischen diesen Sequenzmotiven beinhaltet Canoe eine kinesin-ähnliche Domäne und eine myosinV-ähnliche Domäne, die als Verbindung zum Cytoskelett dienen könnten (Takahashi et al., 2002). Tatsächlich bindet Canoe wie auch sein Säugerhomolog AF-6/Afadin an F-Aktin (zitiert in: Matsuo et al., 1999). Zusammen mit seinem Bindungspartner ZO-1 spielt Canoe während der dorsalen Schließung des *Drosophila* Embryos eine Rolle, einem morphogenetischen Prozeß, der von der Dynamik des Cytoskeletts abhängt. Dabei ist Canoe oberhalb oder parallel zu DRac in den JNK-Signalweg involviert (Takahashi et al., 1998). DPAK assoziiert zusammen mit DRac mit dynamischen Aktinstrukturen in den Saumzellen während der dorsalen Schließung des Embryos (Harden et al., 1996; Harden et al., 1999). Auch PAK4 und PAK5, wie Mbt Mitglieder der PAK-Unterfamilie II, aktivieren den JNK-Signalweg und spielen eine Rolle bei der Reorganisation des Cytoskeletts (Abo et al., 1998; Pandey et al., 2002; Dan et al., 2002). Eine Verbindung von Mbt als Regulator über Canoe zum Cytoskelett wäre denkbar. Allerdings spielt Mbt während der dorsalen Schließung des Embryos keine Rolle, so dass eine Wechselwirkung zwischen Canoe und Mbt während dieses Prozesses nicht wahrscheinlich ist (Raabe, pers. Mitteilung). Es konnte keine direkte Interaktion von Mbt und Canoe in Koimmunopräzipitationsexperimenten gezeigt werden, so dass anzunehmen ist, dass die Wechselwirkungen indirekt über einen Proteinkomplex verlaufen (Abb. 4-23). Mutationen in *canoe*, ähnlich wie Mutationen in *mbt*, verhindern die Morphogenese der Photorezeptorzellen während der morphogenetischen Umgestaltungsprozesse in der Pupalentwicklung (Matsuo et al., 1999; Abb. 4-7). Da Canoe, Mbt und Arm in AV in sich entwickelnden Photorezeptorzellen kolokalisieren, ist es möglich dass Canoe und Mbt so in unmittelbare Nähe gebracht werden und dann wechselwirken können (Matsuo et al., 1999; Abb. 4-3 und 4-4). Miyamoto et al. (1995) postulieren eine Beteiligung Canoes bei der Regulation von adhesiven Zell-Zellinteraktionen bei der Determination von Zellschicksalen in konservierten Entwicklungssignalwegen.

5.8 Slingshot und Twinstar bilden eine Verbindung von Mbt zum Cytoskelett

PAK4 kann LIMK1 phosphorylieren und aktivieren, wodurch das LIMK1-Substrat Cofilin verstärkt phosphoryliert wird. Dadurch wird das aktindepolymerisierende Cofilin inhibiert. Auf diese Weise kann PAK4 regulierend auf das Cytoskelett einwirken (Dan et al., 2001). Als Gegenspieler fungiert eine Serin/Threonin-Phosphatase, die Cofilin

dephosphorylieren kann und so den Umsatz von Aktinfilamenten zu monomerem Aktin begünstigt. In *Drosophila* sind sowohl für Cofilin (*twinstar*, *tsr*), als auch für die Phosphatase (*slingshot*, *ssh*) Mutanten isoliert (Edwards et al., 1994; Niwa et al., 2002). Beide Mutationen entpuppten sich als Suppressoren des *mbt^{P3}*-Phänotyps. Das ist konsistent mit der Beobachtung, dass in *tsr*-Mutanten aktindepolymerisierendes Cofilin fehlt und in *ssh*-Mutanten die Phosphatase fehlt, die Cofilin aktivieren kann, so dass in beiden Fällen die Menge an F-Aktin ansteigt (Edwards et al., 1994; Chen et al., 2001; Niwa et al., 2002). *Drosophila* LIMK ist als Inhibitor von Cofilin charakterisiert und könnte ein *in vivo* Substrat für Mbt darstellen (Ohashi et al., 2000). So könnte Mbt während der Morphogenese der Photorezeptorzellen regulierend auf das Cytoskelett einwirken. Ssh und Tsr sind nach Canoe weitere Interaktionspartner, die eine Verbindung von Mbt zum Cytoskelett vermuten lassen. Durch Färbungen von Augenscheiben mit Phalloidin-Rhodamin sollte ein Effekt von Mutationen in *mbt* auf das Aktincytoskelett untersucht werden. Kürzlich konnte in RNAi-Experimenten gezeigt werden, dass Tsr für das Auflösen des kontraktilen Rings in der Telophase und somit für eine normale Cytokinese nötig ist. Interessanterweise wird dieser Effekt auch in Zellen des larvalen Gehirns beobachtet (Somma et al., 2002). Larven von *mbt^{P1}*-Tieren zeigen manchmal weniger als vier Pilzkörperneuroblasten, und der *mbt^{P1}*-Pilzkörperphänotyp zeichnet sich durch den Verlust von Kenyonzellen aus (Melzig et al., 1998). Eventuell spielt Mbt in Verbindung mit Tsr in der Cytokinese während der Pilzkörperentwicklung eine Rolle.

5.10 Mbt und Crumbs spielen eine Rolle für die Adhärenzverbindungen während der Morphogenese der Photorezeptorzellen

In *mbt^{P1}*-Tieren sind AV defekt und die Morphogenese der Photorezeptorzellen ist gestört. Mbt lokalisiert während der Elongation der Photorezeptorzellen an AV. Das in Epithelien apikal lokalisierte Transmembranprotein Crumbs (Crb) ist essentiell für die Entwicklung und Erhaltung von AV während der Photorezeptorzellmorphogenese. Außerdem ist es auch für die Integrität der „stalk“-Membran, der Verbindung zwischen Rhabdomeren und Zellkörper, verantwortlich (Pellikka et al., 2002; Izaddoost et al., 2002). Crb lokalisiert in der „stalk“-Membran in direkter Nachbarschaft zu den AV und fungiert wahrscheinlich als Gerüst zum Andocken von AV-Molekülen während der Elongation der Photorezeptorzellen (Izaddoost et al.,

2002). Mutationen in *crb* supprimieren den *mbt^{P3}*-Phänotyp, was auf eine Rolle von Mbt oberhalb von Crb während der Morphogenese der Photorezeptorzellen schließen lässt. Karst (β _H-Spectrin) spielt eine Rolle unterhalb von Crb während Etablierung der „stalk“-Membran, ist aber nicht in AV-Aufbau involviert (Pellikka et al., 2002). Mutationen in *karst* haben keinen Effekt auf den *mbt^{P3}*-Augenphänotyp, das heißt Mbt und Karst wirken wahrscheinlich in zwei parallelen Signalwegen, die beide Crb benutzen, aber unterschiedliche Vorgänge steuern.

5.9 Modell für die Funktion von Mbt während der Augenentwicklung

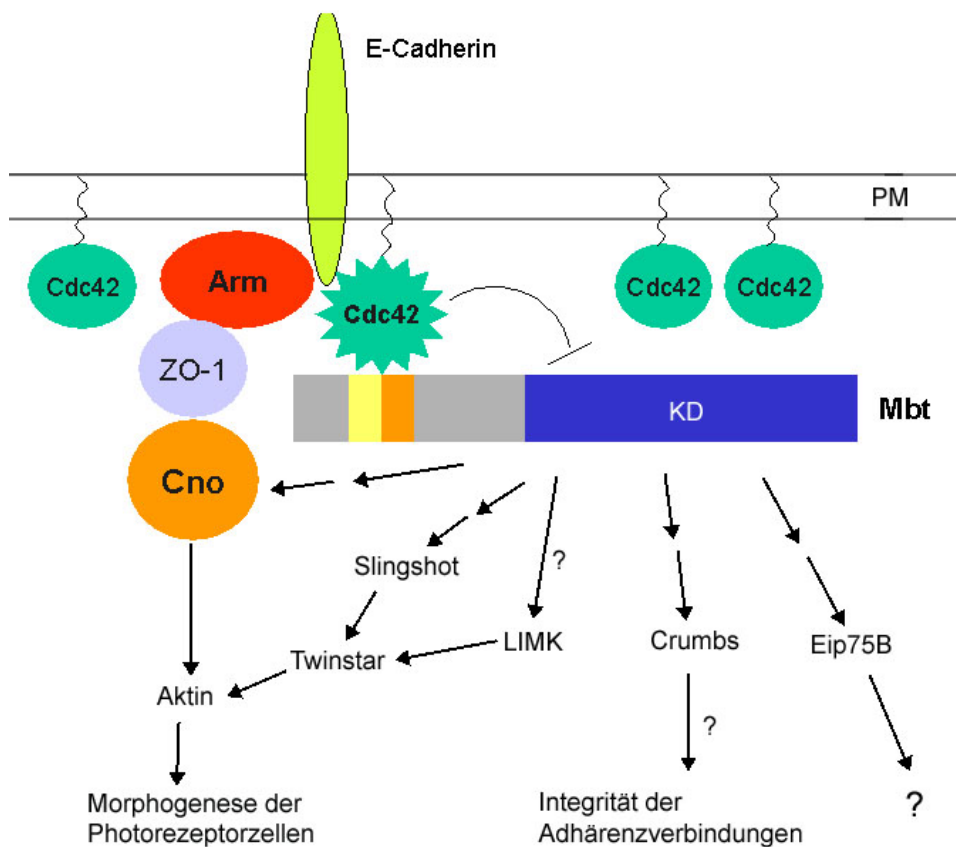


Abbildung 5-1: Modell für die Funktion von Mbt während der Augenentwicklung

Cdc42 (grün, rund) ist an der Plasmamembran (PM) lokalisiert. Lokale Aktivierung von Cdc42 (grün, gezackt) an den Adhärenzverbindungen (AV) könnte von DE-cadherin vermittelt werden, wodurch aktives Cdc42 Mbt über die p21-Bindungsdomäne (gelb in Mbt) an AV rekrutieren könnte. Dadurch würden Canoe (Cno) und Mbt in unmittelbare Nähe zueinander kommen, Mbt könnte Cno regulieren und so auf das Aktincytoskelett einwirken. Eine weitere Möglichkeit für Mbt das Cytoskelett zu beeinflussen wäre eine Wechselwirkung mit Regulatoren des aktindepolymerisierenden Proteins Twinstar, Slingshot und Lim-Kinase (LIMK). Die dynamische Regulation des Cytoskeletts könnte die treibende Kraft während der Morphogenese der Photorezeptorzellen sein. In Verbindung mit Crumbs könnte Mbt an der Erhaltung der Integrität der AV während der Photorezeptorzellmorphogenese beteiligt sein. Inwieweit die Regulation der Kinaseaktivität von Mbt durch Cdc42 in diesem Prozess eine Rolle spielt, muss noch untersucht werden (KD: Kinasedomäne). Die Funktion der Interaktion mit Eip75B ist nicht bekannt.

Pfeil: direkte Interaktion, unterbrochener Pfeil: möglicherweise indirekte Interaktion, Pfeil mit „?“: vermutete Interaktion

5.11 Hinweise auf eine Funktion von Mbt im Raf-MEK-Erk-Signalweg

PAK-Kinasen spielen eine Rolle im Raf-MEK-Erk MAPKinase-Signalweg. Raf-Aktivierung über Ras kann auf zwei Arten erfolgen: durch direkte Interaktion, oder über einen indirekten Mechanismus über Ras-PI3-Kinase-Cdc42/Rac-PAK-Raf. Raf kann auch von PAK2 direkt phosphoryliert werden (King et al., 1998). Außerdem kann PAK2 den Erk-Aktivator MEK phosphorylieren und so Einfluss auf die MAPK-Kaskade nehmen (King et al., 1998; Sun et al., 1999; King et al., 2001). Durch dominant negatives PAK4 kann Ras-vermittelte Transformation unterdrückt werden (Callow et al., 2001). Der JNK- und der p38-Signalweg können ebenfalls von PAK-Proteinen aktiviert werden (Abo et al., 1998; Dan et al., 2002; Kumar et al., 2002). Für eine Beteiligung von Mbt im Erk-Signalweg spricht, dass eine aktive Form von *Drosophila* Erk (*RI^{sem}*) den *mbt^{P1}*-Phänotyp verstärkt. Außerdem verringert in HEK293-Zellen transient exprimiertes katalytisch inaktives Mbt den Level an aktiviertem Erk, im Gegensatz zu wildtypischem Mbt. Auf JNK und p38 hat Mbt-Expression keinen Effekt. Während der Invagination des Augenfeldes in der Embryonalentwicklung spielt der Erk-Signalweg eine regulatorische Rolle. Durch Abschwächung der DE-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion wird dieser morphogenetische Prozess ermöglicht (Dumstrei et al., 2002). Es wäre möglich dass auch während der später in der Entwicklung stattfindenden Morphogenese der Photorezeptorzellen der Erk-Signalweg eine Rolle spielt. Dabei müsste die Erk-Aktivität fein reguliert werden und Mbt könnte ein solcher Regulator sein.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Mbt, einem hochkonservierten Signalmolekül aus der Familie der p21-aktivierten Kinasen (PAK) aus *Drosophila*, während der Augen- und Pilzkörperentwicklung. Mbt wird aufgrund von Sequenzhomologien der PAK Unterfamilie II (PAK4-6) zugeordnet. PAK4-6 binden präferentiell die aktivierten Rho-GTPasen Cdc42 und schwächer Rac, werden durch diese Bindung jedoch nicht aktiviert, sondern an bestimmte Zellkompartimente rekrutiert. In Struktur-Funktionsanalysen *in vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, dass Mbt ebenfalls fast ausschließlich mit aktiviertem Cdc42 und kaum mit aktiviertem Rac interagiert. Diese Interaktion führt nicht zur Aktivierung von Mbt, sondern eher zu einer Verringerung der Kinaseaktivität. Eine weitere Funktion der Interaktion von Cdc42 und Mbt ist die Rekrutierung von Mbt an die Adhärenzverbindungen (AV) in sich entwickelnden Photorezeptorzellen. Außerdem kann katalytisch inaktives Mbt im Gegensatz zu Cdc42-bindungsdefizientem Mbt partiell die Mbt-Funktion in *mbt^{P1}*-Fliegen übernehmen. Mbt hat also auch kinaseunabhängige Funktionen. Während der Pilzkörperentwicklung sind die Cdc42-Bindungsdomäne und die Kinasedomäne von Mbt ebenfalls essentiell, ob subzelluläre Lokalisation hier eine ähnlich wichtige Rolle spielt, wurde nicht untersucht.

Als Mbt-Interaktionspartner wurden in einem Yeast-two-Hybrid Screen drei neuartige Proteine identifiziert. Zwei davon, CG8818 und CG14880, können als Substrat von Mbt fungieren. Allerdings kann nur für CG8818 eine direkte Bindung spezifisch mit aktiviertem Mbt nachgewiesen werden. Die Interaktion mit CG14880 scheint transient zu sein und nur für die Zeit der Phosphorylierungsreaktion anzudauern. Gegen CG8818 wurde ein Antiserum hergestellt, das nach seiner Charakterisierung in biochemischen und histologischen Ansätzen zum Einsatz kommen soll.

In einem genetischen Screen wurden Mutationen in *canoe* als Verstärker und Mutationen in *eip75b* als Suppressor des *mbt^{P3}*-Augenphänotyps gefunden. Eip75B ist ein putativer Steroidhormonrezeptor und wird während der Verpuppung exprimiert, also zu dem Zeitpunkt, wenn sich der *mbt*-Phänotyp ausbildet. Interessanterweise haben Mutationen in *eip75b* keinen Effekt auf den *mbt^{P3}*-Pilzkörperphänotyp. Canoe ist wie Mbt an den AV von sich entwickelnden Photorezeptorzellen lokalisiert und spielt ebenfalls während deren Morphogenese eine Rolle. Canoe ist ein aktinbindendes Protein und könnte eine Verbindung von Mbt zum Cytoskelett

darstellen, das der dynamischen Regulation bedarf, um morphogenetische Prozesse voranzutreiben. Eine direkte Interaktion kann nicht nachgewiesen werden. Auch während der Pilzkörperentwicklung scheinen Mbt und Canoe im gleichen Signalweg aktiv zu sein. Genetische Interaktion mit *mbt^{P3}* während der Augenentwicklung konnte außerdem für Mutationen in *slingshot* und *twinstar* gezeigt werden, die beide in die Regulation des Cytoskeletts involviert sind. Das Transmembranprotein Crumbs scheint ebenfalls zusammen mit Mbt in der Photorezeptorzellmorphogenese eine Rolle zu spielen.

Außerdem weisen erste Experimente darauf hin, dass Mbt im ERK-MAP Kinase-Signalweg eine Rolle spielt.

Durch die Entdeckung der direkten und indirekten Interaktionspartner bietet sich nun die Gelegenheit, die Funktion und Wirkungsweise von Mbt weiter zu entschlüsseln. Damit kann ein wesentlicher Beitrag zur Aufklärung der Rolle von PAK-Proteinen während morphogenetischer Prozesse und der Regulation der Zellzahl in der Entwicklung geleistet werden.

7. Summary

In this work the function of Mbt, a highly conserved signaling molecule of the family of p21-activated kinases (PAK) from *Drosophila*, has been characterized during eye and mushroom body development. Based on sequence homology, Mbt was classified as a member of the PAK subfamily II (PAK4-6). PAK4-6 interact preferentially with activated Cdc42 and weakly with activated Rac. In contrast to PAK1-3 and DPAK this interaction does not lead to the activation of kinase activity but to the recruitment of PAK4-6 to specific cell compartments. A structure-function analysis *in vitro* and *in vivo* demonstrated that Mbt preferentially interacts with activated Cdc42 and weakly with Rac. This interaction does not lead to the activation but to the suppression of Mbt kinase activity. Furthermore, Cdc42 recruits Mbt to adherens junctions (AJ) in developing photoreceptor cells. In contrast to a Cdc42-binding deficient Mbt, a kinase dead Mbt protein can partially substitute for the loss of endogenous Mbt function in *mbt^{P1}*-mutant flies. Thus, Mbt has kinase independent functions. The kinase domain and the Cdc42-binding domain are also essential for Mbt function during mushroom body development. The subcellular localization of Mbt during mushroom body development was not investigated.

Three novel proteins were identified as Mbt interacting proteins in a yeast-two-hybrid screen. Two of them, CG8818 and CG14880, are phosphorylation substrates of Mbt. However, only for CG8818 a direct interaction specifically with activated Mbt could be confirmed. The interaction with CG14880 seems to be very transient and to last just for the time of the phosphorylation reaction. For CG8818 an antiserum was generated which awaits its characterization and employment in biochemical and histological approaches.

In a screen for modifiers of the *mbt^{P3}*-eye phenotype mutations in *canoe* were found to enhance and mutations in *eip75b* were found to suppress the *mbt^{P3}*-eye phenotype. *eip75b* encodes a putative steroid hormone receptor. It is expressed during puparium formation when the *mbt*-phenotype evolves. Interestingly, mutations in *eip75b* have no effect on the *mbt^{P3}*-mushroom body phenotype. Canoe and Mbt colocalize at AJ in developing photoreceptor cells and Canoe, like Mbt, plays a role in photoreceptor cell morphogenesis. Canoe is an actin binding protein and could provide a link between Mbt and the cytoskeleton which needs to be regulated dynamically to drive morphogenetic processes. However, a direct interaction could

not be shown. In mushroom body development Canoe and Mbt seem to function in the same developmental pathway. The *mbt^{P3}*-eye phenotype was also modified by mutations in *twinstar* and *slingshot*. These proteins are regulators of actin dynamics and therefore another link to the cytoskeleton. The transmembrane protein Crumbs seems to function together with Mbt during photoreceptor cell morphogenesis as well. Last but not least, preliminary experiments suggest that Mbt is involved in the Erk-MAP Kinase pathway.

These indirect and direct interaction partners await to be further characterized. Their identification offer a great opportunity to further gain insight into the processes regulated by Mbt.

8. Literatur

- Abo A., Qu J., Cammarano M.S., Dan C., Fritsch A., Baud V., Belisle B., Minden A.: Pak4, a novel effector for Cdc42 Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO*, **17(22)**, 6527-6540 (1998)
- Bagrodia S. and Cerione R.A.: PAK to the future. *Trends Cell Biol*, **9**, 350-355 (1999)
- Bagrodia S., Taylor S.J., Jordon K.A., van Aelst L., Cerione R.A.: A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem*, **273(37)**, 23633-23636 (1998)
- Blattner D.: Funktionelle Analyse der Mutante *mushroom bodies tiny (mbt)* in der Augen- und Pilzkörperentwicklung von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Institut für Genetik, Julius-Maximilians-Universität Würzburg (1999)
- Buchwald G., Hostinova E., Rudolph M.G., Kraemer A., Sickmann A., Meyer H.E., Scheffzek K., Wittinghofer A.: Conformational switch and role of phosphorylation in Pak activation. *Mol Cell Biol*, **21(15)**, 5179-5189 (2001)
- Callow M.G., Clairvoyant F., Zhu S., Schryver B., Whyte D.B., Bischoff J.R., Jallal B., Smeal T.: Requirement for Pak4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines. *J Biol Chem*, **277(1)**, 550-558 (2002)
- Casci T. and Freeman M.: Control of EGF receptor signalling: lessons from fruitflies. *Cancer Metastasis Rev*, **18(2)**, 181-201 (1999)
- Cau J., Faure S., Comps M., Delsert C., Morin N. : A novel p21-activated kinase binds the actin and microtubule networks and induces microtubule stabilization. *JCB*, **155(6)**, 1029-1042 (2001)
- Chen J., Godt D., Gunsalus K., Kiss I., Goldberg M., Laski F.A.: Cofilin/ADF is required for cell motility during *Drosophila* ovary development and Oogenesis. *Nature Cell Biol*, **3**, 204-209 (2001)
- Chong C., Tan L., Lim L., Manser E. : The mechanism of Pak activation. *J Biol Chem*, **276(20)**, 17347-17353 (2001)
- Dan C., Kelly A., Bernards O., Minden A.: Cytoskeletal changes regulated by the Pak4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and Cofilin. *J Biol Chem*, **276(34)**, 32116-32121 (2001)

- Dan C., Nath N., Liberto M., Minden A.: Pak5, a new brain-specific kinase, promotes neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Mol Cell Biol*, **22(2)**, 567-577 (2002)
- Dan I., Watanabe N.M. Kusumi A.: The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *TCB*, **11(5)**, 220-230
- Daniels R.H. and Bokoch G.M. : p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *TIBS*, **24**, 350-355 (1999)
- Daniels R.H., Hall P.S., Bokoch G.M.: Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (Pak1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO*, **17(3)**, 754-764 (1998)
- Daniels R.H., Zenke F.T., Bokoch G.M.: α -Pix stimulates p21-activated kinase activity through exchange factor-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, **274(10)**, 6047-6050 (1999)
- Deák P., Omar M.M., Saunders R.D.C., Pál M., Komonyi O., Szidonya J., Maroy P., Zhang Y., Ashburner M., Benos P., Savakis C., Siden-Kiamos I., Louis C., Boshakov V.N., Kafatos F.C., Madueno E., Modolell J., Glover D.M.: P-Element Insertion alleles of essential genes on the third chromosom of *Drosophila melanogaster*: correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics*, **147**, 1697-1722 (1997)
- Dechert M.A., Holder J.M., Gerthoffer W.T.: p21-activated kinase 1 participates in tracheal smooth muscle cell migration by signaling to p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C123-C132 (2001)
- Dharmawardhane S., Schürmann A., Sells M.A., Chernoff J., Schmidt S.L., Bokoch G.M.: Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol Biol Cell*, **11**, 3341-3352 (2000)
- Dumstrei K., Wang F., Shy D., Tepass U., Hartenstein V.: Interaction between EGFR signaling and DE-cadherin during nervous system morphogenesis. *Development*, **129**, 3983-3994, (2002)
- Edwards D.C., Sanders L.C., Bokoch G.M., Gill G.N.: Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biol*, **1**, 253-259 (1999)
- Edwards K.A., Montague R.A., Shepard S., Edgar B.A., Erikson R.L., Kiehart D.P.: Identification of *Drosophila* cytoskeletal proteins by induction of abnormal cell shape in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91(10)**, 4589-4593 (1994)

- Erickson J.W. and Cerione R.A.: Multiple roles for Cdc42 in cell regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, **13**, 153-157 (2001)
- Freeman M.: Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Dev*, **124**, 261-270 (1997)
- Gehring W.: The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int. J. Dev. Biol.*, **46**, 65-73 (2002)
- Genova J.L., Jong S., Camp J.T., Fehon R.G.: Functional analysis of Cdc42 in actin filament assembly, epithelial morphogenesis, and cell signaling during *Drosophila* development. *Dev Biol*, **221**, 181-194 (2000)
- Gnesutta N., Qu J., Minden A.: The serine/threonine kinase Pak4 prevents caspase activation and protects cells from apoptosis. *J Biol Chem*, **276(17)**, 14414-14419 (2001)
- Hall A.: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514 (1998)
- Harden N., Lee J., Loh H-Y., Ong Y-M., Tan I., Leung T., Manser E., Lim L.: A *Drosophila* homologue 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(5)**, 1896-1908 (1996)
- Harden N., Ricos M., Ong Y.M., Chia W., Lim L.: Participation of small GTPases in dorsal closure of the *Drosophila* embryo: distinct roles for Rho subfamily proteins in epithelial morphogenesis. *J Cell Science*, **112**, 273-284 (1999)
- Henrich V.C. and Brown N.E. : Insect nuclear receptors : a developmental and comparative perspective. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **25(8)**, 881-897 (1995)
- Hing H., Xiao J., Harden N., Lim L., Zipursky S.L.: Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell*, **97**, 853-863 (1999)
- Hong Y., Stronach B., Perrimon N., Jan L.Y., Jan Y.N.: *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature*, **414**, 634-638 (2001)
- Izaddoost S., Nam S-C., Bhat M.A., Bellen H., Choi K-W.: *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature*, **416**, 178-182 (2002)
- Kaffer Z-M. and Chernoff J.: p21-activated kinases: three more join the Pak. *IJBCB*, **34**, 713-171 (2002)

- Kim S.H., Li Z., Sacks D.B., E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J Biol Chem*, **275(47)**, 36999-37005 (2000)
- King A.J., Wireman R.S., Hamilton M, Marshall M.S.: Phosphorylation site specificity of Pak-mediated regulation of Raf-1 and cooperativity with Src. *FEBS*, **497**, 6-14 (2001)
- King A.J., Sun H., Diaz B., Barnard D., Miao W., Bagrodia S., Marshall M.S.: The protein kinase Pak2 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature*, **396**, 180-183, (1998)
- King C.C., Gardiner E.M.M., Zenke F.T., Bohl B.P., Newton A.C., Hemmings B.A., Bokoch G.M.: p21-activated kinase (Pak1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *J Biol Chem*, **275(52)**, 41201-41209 (2000)
- Kiosses W.B., Daniels R.H., Otey C., Bokoch G.M., Schwartz M.A.: A role for p21 activated kinase in endothelial cell migration. *J Cell Biol*, **147(4)**, 831-843 (1999)
- Kröning A-K.: Molekulare und biochemische Analyse der Pilzkörperstrukturmutanten *mushroom bodies tiny* und *mushroom bodies gnomish* von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Institut für Genetik, Julius-Maximilians-Universität Würzburg (1999)
- Kumar R. and Vadlamudi R.: Emerging functions of p21-activated kinases in human cancer cells. *J Cell Physiol*, **193**, 133-144 (2002)
- Leberer E., Dignard D., Thomas D.Y., Leeuw T.: A conserved G_β binding (GBB) sequence motif in Ste20/Pak family protein kinases. *Biol Chem*, **381**, 427-431, (2000)
- Lee S.R., Ramos S.M., Ko A., Masiello D., Swabson K.D., Lu M.L., Balk S.P.: AR and ER interaction with a p21-activated kinase (Pak6). *Mol Endocrinol*, **16(1)**, 85-99 (2002)
- Lee T. and Luo L.: Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron*, **22**, 451-461 (1999)
- Lei M., Lu W., Meng W., Parrini M-C., Eck M.J., Mayer B.J., Harrison S.C.: Structure of Pak1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell*, **102**, 387-397 (2000)
- Li W., Chong H., Guan K-L.: Function of the Rho family GTPases in Ras-stimulated Raf activation. *J Biol Chem*, **276(37)**, 34728-34737 (2001)

- Lu W. and Mayer B.J.: Mechanism of activation of Pak1 kinase by membrane localization. *Oncogene*, **18**, 797-806 (1999)
- Lu W., Katz S., Gupta R., Mayer B.J.: Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adapter protein Nck. *Curr Biol*, **7(2)**, 85-94 (1997)
- Luo L., Liao Y.J., Jan L.Y., Jan Y.N.: Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes dev*, **8**, 1787-1802 (1994)
- Manser E., Loo T-H., Koh C-G., Zhao Z-S., Chen X-Q., Tan L., Tan I., Leung T., Lim L.: Pak kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell*, **1**, 183-191 (1998)
- Master Z., Jones N., Tran J., Jones J., Kerbel R.S., Dumont D.J. : Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *EMBO*, **20(21)**, 5919-5928 (2001)
- Matsuo T., Takahashi K., Kondo S., Kaibuchi K., Yamamoto D.: Regulation of cone cell formation by Canoe and Ras in the developing *Drosophila* eye. *Development*, **124**, 2671-2680 (1997)
- Matsuo T., Takahashi K., Suzuki E., Yamamoto D.: The Canoe protein is necessary in adherens junctions for development of ommatidial architecture in the *Drosophila* compound eye. *Cell Tiss Res*, **298**, 397-404 (1999)
- Melzig J., Rein K-H., Schäfer U., Pfister H., Jäckle H., Heisenberg M., Raabe T.: A protein related to p21-activated kinase (Pak) that is involved in neurogenesis in the *Drosophila* adult central nervous system. *Curr Biol.*, **8**, 1223-1226 (1998)
- Miyamoto H., Nihonmatsu I., Kondo S., Ueda R., Togashi S., Hirata K., Ikegami Y., Yamamoto D.: *canoe* encodes a novel protein containing a GLGF DHR motif and functions with *Notch* and *scabrous* in common developmental pathways in *Drosophila*. *Genes Dev*, **9(5)**, 612-625 (1995)
- Newsome T.P., Schmidt S., Dietzl G., Keleman K., Åsling B., Debant A., Dickson B.J.: Trio combines with Dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. *Cell*, **101**, 283-294 (2000)
- Niwa R., Nagata-Ohashi K., Takeichi M., Mizuno K., Uemura T.: Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/Cofilin. *Cell*, **108**, 233-246 (2002)

- Noselli S.: JNK signaling and morphogenesis in *Drosophila*. TIG, **14(1)**, 33-38 (1998)
- Ohashi K., Hosoya T., Takahashi K., Hing H., Minzuno K.: A *Drosophila* homolog of LIM-kinase phosphorylates Cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization. Biochem Biophys Res Comm, **276**, 1178-1185 (2000)
- Pandey A., Dan I., Kristiansen T.Z., Watanabe N.M., Voldby J., Kajikawa E., Khosravi-Far R., Blagoev B., Mann M.: Cloning and characterization of Pak5, a novel member of mammalian p21-activated kinase-II subfamily that is predominantly expressed in the brain. Oncogene, **21**, 3939-3948 (2002)
- Pellikka M., Tanentzapf G., Pinto M., Smith C., McGlade C.L., Ready D.F., Tepass U.: Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. Nature, **416**, 143-149 (2002)
- Pirone D.M., Carter D.E., Borbelo P.D.: Evolutionary expansion of CRIB-containing Cdc42 effector proteins. TIGs, **17(7)**, 370-373 (2001)
- Ponting C.P., Phillips C., Davies K.E., Blake D.J.: PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. BioEssays, **19(6)**, 469-479 (1997)
- Qu J., Cammarano M.S., Shi Q., Ha K.C., de Lanerolle P., Minden A.: Activated Pak4 regulates cell adhesion and anchorage-independent growth. Mol Cell Biol, **21(10)**, 3523-3533 (2001)
- Raabe T.: The Sevenless signaling pathway: variations of a common theme. BBA, **1496**, 151-163 (2000)
- Richardson H. and Kumar S. : Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. J Imm Meth, **265**, 21-38 (2002)
- Rudel T. and Bokoch G.M.: Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of Pak2. Science, **276**, 1571-1574 (1997)
- Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E.F.: Molecular cloning, a laboratory manual 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)
- Sanders L.C., Matsumura F., Bokoch G.M., de Lanerolle P.: Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. Science, **283**, 2083-2085 (1999)
- Schmucker D., Clemens J.C., Shu H., Worby C.A., Xiao J., Muda M., Dixon J.E., Zipurky S.L.: *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. Cell, **101**, 671-684 (2002)

- Schürmann A., Mooney A.F., Sanders L.C., Sells M.A., Wang H.G., Reed J.C., Bokoch G.M.: p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist Bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol*, 453-461 (2000)
- Sells M.A., Boyd J.T., Chernoff J.: p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol*, **145(4)**, 837-849 (1999)
- Somma M.P., Fasulo B., Cenci G., Cundari E., Gatti M.: Molecular dissection of cytokinesis by RNA interference in *Drosophila* cultured cells. *Mol Biol Cell*, **13**, 2445-2460 (2002)
- Sun H., King A.J., Diaz H.B., Marshall M.S.: Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Curr Biol*, **10**, 281-284 (2000)
- Symons M.: Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *TIBS*, **21**, 178-181 (1996)
- Takahashi K., Hamada N., Yamamoto D.: Ras target protein Canoe is a substrate for Cdc2 and Cdk5 kinases. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **49**, 102-107 (2002)
- Tang Y., Yu J, Field J.: Signals from the Ras, Rac and Rho GTPases converge on the Pak protein kinase in Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **19(3)**, 1881-1891 (1999)
- Tang Y., Zhou H., Chen A., Pittman R.N., Fields J.: The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals, *J Biol Chem*, **275(13)**, 9106-9109 (2000)
- Terra W.R.: The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol*, **47(2)**, 47-61 (2001)
- Thummel C.S.: Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Dev Cell*, **1**, 453-465 (2001)
- Tu H. and Wigler M.: Genetic evidence for Pak1 autoinhibition and its release by Cdc42. *Mol Cell Biol*, **19(1)**, 602-611 (1999)
- Yang F., Li X., Sharma M., Zarnegar M., Lim B., Sun Z.: Androgen receptor specifically interacts with a novel p21-activated kinase, Pak6. *J Biol Chem*, **276(18)**, 15345-15353 (2001)
- Zenke F.T., Kings C.C., Bohl B.P., Bokoch G.M.: Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J Biol Chem*, **274(46)**, 32565-32573 (1999)

Zhao Z-S., Manser E., Lim L.: Interaction between Pak and Nck: a template for Nck targets and role of Pak autophosphorylation. *Mol Cell Biol*, **20(11)**, 3906-3917 (2000)

9.Anhang

9.1 Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Tm (°C)	Zweck
CAAX/Asp-R	ggggtacccaaaagaatagaccgagatagg	58(47,4)	Linker-PCR (pTW48)
CAAX/BglII-F	gaagatctcgatgagcaaggacggcaag	58(50,8)	Linker-PCR (pTW48)
cno/SgrAI-R	ccgtgttgagctgtcgcctccagttc	72,2(52,4)	Linker-PCR (LD24616)
cno-HA/EcoRI-F	ccggaattcacagtatgtcacatgataagaagat	69,4(53,5)	Linker-PCR (LD24616)
cno-myc/EcoRI-F	cccggaattccagtatgtcacatgataagaagatg	71,4(55,3)	Linker-PCR (LD24616)
dCDC42/E1-F	cggaattccatgcaaaccatcaagtgc	71,8(53,6)	Linker-PCR (pTW91)
dCDC42/E5-R	cccgatatcgagaattataagaattgac	69,1(53,3)	Linker-PCR (pTW91)
dCDC42/V12-F	gtcgtcggcgacgtagccgtggg	77,4	aktiviertes Cdc42
dCDC42/V12-R	cccacggctacgtcgccgacgac	77,4	aktiviertes Cdc42
dRAC1/E1-F	ggaattccatgcaggcgatcaag	69,0(54,9)	Linker-PCR (pTW92)
dRAC1/E5-R	cccggatatcctgtctaactcttttagagcagg	69,0(54,3)	Linker-PCR (pTW92)
dRAC1/V12-F	cggtggcgacgtagccgtgggaaag	79,5	aktiviertes Rac1
dRAC1/V12-R	cttcccacggctacgtcgcccacg	79,5	aktiviertes Rac1
dRHO1/E1-F	cggaattcaatgacgacgattcgc	70,6(52,9)	Linker-PCR (pTW94)
dRHO1/E5-R	cccgaatccttttagagcaaaaggcatc	69,6(54,2)	Linker-PCR (pTW94)
dRHO1/V14-F	gtcggcgacgtgcctgcgg	75,8	aktiviertes Rho1
dRHO1/V14-R	ccgcaggcaacgtcgccgac	75,8	aktiviertes Rho1
Gbeta-mut1	accgccggcgcgctggtgcgctgatgcg	70	Ablation der Gβ-bindungsdomäne (pTW77)
Gbeta-mut2	ttgcgcatcagcgcaaccagcgccggcggt	70	Ablation der Gβ-bindungsdomäne (pTW77)
H19,22L-1	caatlttgagcttctgtgtctcacgggctt	58	Mutation der p21-Bindungsdomäne
H19,22L-2	aagcccttgagcacacgaagctcaaattg	57	Mutation der p21-Bindungsdomäne
hPAK4/1	ccaggggtcctcaggagggc	57	sequ
hPAK4/Eco-F	ccgctcgagttaatgtttgggaagaggaag	58(40,8)	Linker-PCR (pDB22)
hPak612-R	cccctcgagtactcgggtaggtgtaaag	59(41,8)	-"
MBT/Eco-F	ccgaattccgagtcgctgaagatgttc	58	Linker-PCR (pTW77)
mbt/S492N-F	catcaagtcggacaacattctgctgg	69,9	aktiviertes Mbt
mbt/S492N-R	ccagcagaatgttgccgactgatg	69,9	aktiviertes Mbt
mbt/S520E-F	gaagcgcaaggagctggtgg	68,7	aktiviertes Mbt
mbt/S520E-F	ccaaccagctccttgcccttc	68,7	aktiviertes Mbt
MBT901-R	cacattggctaccgctgcactcgcgggcg	66	Linker-PCR (pTW77)
MBT-F1	tgccgaagaccctctcacg	47	PCR, Sequenzierung
MBT-F2	atagggcgagggctccacg	50	PCR, Sequenzierung
MBT-F3	aaggtctcgccgcccctg	52	PCR, Sequenzierung

MBT-R1	attgtccgtggcaatgc	43	PCR, Sequenzierung
MBT-R2	tcccgaccagcatccgg	52	PCR, Sequenzierung
MBT-R3	gatacggatggagaaacg	43	PCR, Sequenzierung
PAK1	atgtgtgccagccagaggagc	53	Sequenzierung
PAK2	tcgggaagaagtgtgtgctg	49	Sequenzierung
PAK3	aatctcgggtggcgtaatctc	49	Sequenzierung
PAK4	accatctcgatgacatg	50	Sequenzierung
PAK5	gtgggaatgattgcttc	41	Sequenzierung
PAK6	catcggttacacggcgggt	47	Sequenzierung
PCR2	tcactcagactcaatacgaca	53,8	Sequenzierung
pEGFP-MCS5'	ggcatggacgagcctgtac	47	Sequenzierung
PM001	cgttagaacgcggtacaat	60,1	Sequenzierung
pUAST-down	aaatcaactgcaactactgaa	52,3	Sequenzierung
pUAST-up	tctctgtaggtagttgtcca	52	Sequenzierung
Sp6	tagtgtcacctaaatg	36	Sequenzierung
T3	aattaaccctcactaaaggg	52,3	Sequenzierung
T525A-1	gcaagagtctggtggcgcgccgtattggatg	63	inaktives Mbt
T525A-2	catccaatacggcgcgccaaccagactcttg	63	inaktives Mbt
T7	gtaatacagactcactatagggc	52,2	Sequenzierung
XBA-FOR	ggcgagagagagagagagtacctcgagggagg	66	Insert mit BgIII/Asp
XBA-REV1	ccggtaccgggaagatctccaacaacggatggtgctc	65	Insert mit BgIII/Asp

9.2 Sequenzen

In den dargestellten cDNS-Sequenzen sind das Startcodon (ATG) und das Stoppcodon (TAG bzw. TAA) rot hervorgehoben. Ausgetauschte Aminosäuren sind in der Aminosäuresequenz hervorgehoben und jeweils im Einzelfall erklärt.

9.2.1 Mbt

mbt-cDNS-Sequenz

TTTCCCTAGGTTTATTATTTTTTTTGTAAAGCGAATTGCTTGTGCGCTCGTGCTGTCGCCA
 TAATGTGTGCAATGTGTGCCAGCCAGAGGAGCAAGTGGTGAAGGTGTATCGCTTGTGCGC
 ATCTCGATTTGTCCATCCATATCCAATTGAATCCCAGTTTCCCAGTCGCGTCCGCTGCTA
 TGCGTGTGTGTGTGCGTGCGTGCCCGTGTCCCTGCATGTGTGTGTGTGAGTGAGATCGGG
 AAGAAGTTGTGTGCTGTTGTTGTTGTTGTTTCTGTGCGGATTTGCCGTTGCCATCGTTTGT
 TGTTTGTGCATTTTCCATTGTGCGGGCAGCAACAAAAAGAAAAAATTACACATTA
 ATAGAGAGCAAGAGCGAGAGGGAAGGAGTGGTGTGGAGTGGAAAAGGGCGGTAAAAGGGC
 AGAAATTTGGAGCACGGGAAATCCGAGTCGCTGAAG**ATG**TTCTCGAAGAAGAAAAAGAAA
 CCGCTGATCTCGATGCCAGCAATTTTGTGATCGTGTGCACACGGGCTTCGACAAGCGG
 GAGAACAAATATGTTGGCCTGCCCTCCAATGGGCGTCCATTGTGGGCAACAATCAGATA
 CTCAAGTCCTCCAACCGCCCGCTGCCACTGGTTCGATCCCTCGGAGATTACGCCACCGAG
 ATTCTCGATCTGAAGACTATTGTGCGTCCGCATCACAAACAACAAGGCGGACACCACC
 TCGCTCAACAGCAGCAGCACAATGATGATGGGCTCAATGGCGCCGATGAATCCCATGGCA
 CCTGGCGCACACCCAATGATGAGCCATGGCCCCGGAATGATGATGCCACCCGAGACGGGC
 GGCATAGTCTGCCGAAGACCTCTCACGTGGCCAGATCCAATTCGCTGCGGAGTTCCAGT
 CCGCCGCGAGTGCACGGGTAGCCAATGTGCCGCCATCGGTGCCGGAGGAGGAGGGACCA
 CCGGCAGCTGGAACACCGGGAGTAGGTGGAGCTAGTAGCGGTGGCTTTAAGCCACCCGGT
 GCCCATCCCTCCCTGCTCTATAACAGTCAGCATGCGCACGCGAATGGAGCAACAGGACCA
 CTGGCCGTGCGCACGGATCAAACCAACCTGCAGCAGTATCGCAGCAATCTGGCCCCGCCA
 TCCGGCGGCTCCATGCCCCAGCAACAGCAGACTTCGCCCGTGGGTTCCGGTGGCCAGTGGC
 ACGCGATCCAATCACTCGCACACGAACAATGGCAACAGCGGCGGCAGCTATCTCCCATG
 TATCCACAAGCCATCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGGCCAAACAGGGTGGCGAT

CAGAACCAAAATCCTCTGCATCCGCATGCTCATCCGCATCCGCACCATCACCAACATTTG
 GCCAAGTCGGCGTCCAGGGCATCCAGTTCAGCGGGGAGCGAGCAGTGTGCCAGCAG
 GCGAGCGGCGCCAGTGGAGGAGCGGCGGGTTCAGCCAAAGCAGGACCAACGACTCACCCAC
 GAACAGTTCGGTCCCGCCCTTCAGATGGTGGTCTCCGCCGGTGATCCACGCGAGAACCTC
 GACCACTTTAACAAAATAGGCGAGGGCTCCACGGGCACCGTATGCATTGCCACGGACAAA
 TCCACAGGTGCCAGGTGGCCGTGAAGAAGATGGATCTGCGCAAACAGCAGCGACGGGAG
 CTGCTATTC AACGAGGTGCTCATCATGCGGGACTACCATCATCCCAATATCGTGGAGACA
 TACTCCAGCTTTCTGGTCAACGATGAGCTTTGGGTGGTGGTGGAGTACCTCGAGGGCGGC
 GCCCTCACCGATATTGTCACCCATTCGCGCATGGACGAGGAGCAGATAGCCACCGTCTGC
 AAGCAATGCTTGAAGGCTTTGGCCTATTTGCACTCACAGGGCGTTCATTCATCGCGACATC
 AAGTCGGACTCGATTCTGCTGGCCGCCGATGGTTCGCGTGAAGCTATCGGACTTTGGATTC
 TGCGCCAGGTGTCACAGGAGCTGCCGAAGCGCAAGAGTCTGGTTGGCACGCCGTATTGG
 ATGTCGCCGGAGGT CATATCGCGCCTGCCGTACGGCCGGAAGTGGATATCTGGTTCGCTG
 GGCATCATGGTTCATCGAGATGGTGGACGGCGAGCCGCCGTTCTTCAACGAACCGCCGCTG
 CAGGCGATGCGTGCATCCGTGACATGCAGCCGCCGAACCTGAAGAACGCGCACAAAGGTC
 TCGCCGCGCCTGCAGTCCCTCCTCGACCGGATGCTGGTTCGCGGATCCGGCGCAGCGTGCC
 ACCGCCGCCGAGCTGCTGGCCCATCCCTTCTCGCCAGGCAGGACCGCCGTCGCTGCTG
 GTTCCGCTGATGCGCAATGCGCGACACCATCCGT**TAG**TTGGATGCCACTGGACAACCCAGA
 CGATCCGGCTGCTCGATGAAAGCAATCATTTCCACAGACAACGGATCCCGGCCCGTGGGC
 ATCCATCTATTAAATTCTAGTATTAACATTCAGTTTGGCAGCTGTACTTAAATCCCCGGA
 GAATCCTCGAAACGTTGTAAAGTCATTTAAGCTCCGCACATCCATATCCATATCCATGCC
 CACTAACGTTCCAGAAGAGAACGCAATGTGCCTTTCACAAGCCTCGAAATCGAAATTGAA
 ATCGCATCCTGCAACCGATACGGATGGAGAAACGATATAGCATTATCTGCCCGAGAACC
 ACATTTTTATATATATATATATATATACATATATGAGTATTTACGATTTTGTCTCTGT
 CTCTTGTC AATATTGATTTGTGTGCGTGTGTGTTTGTATTTTTTTTAAACCAGCCATAAAA
 CATTGTTCGAATATATACATATATACGCTAAGAGCTAATGTTAAAAATCTATATATATAT
 ATATATACATATATTTTTTTATAAAAACAAATCCTAATTCTAAGCAAAGCGAAACAAC
 GAAGGTGTGAATCGAAGGGAGACAGAAAACGAAAGAGAAAGAGATAGCGTTAGGCGGAAG
 AGCATATACAATTTTCGACATAAATATTTTTTAAACATTTTACATTTTACATTTGGTGTGAA
 AAGTTTGTACGCTCCAGACATACATATGCATATATCTAAACACATTTCCCGATTTTCGAA
 AATATTTTAGAACTTTTAGCTTACATTTCTTTGTTCTGTTTTTTTTGATTTAACCCGTGTA
 TTATTAATTAATGAATAAACTTAAATGCGAAAATGTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Mbt-Aminosäuresequenz

MFSKKKKKPLI**SMPSNFEHRVHT**GFDFKRENKYVGLPLQWASIVGNNQILKSSNRPLPLVD
PSEITPTEILDLKTIVRPHHNNKADTTSLNSSSTMMMGSMAPMNPMPAGHPMMSHGPG
 MMMPPETGGIVLPKTSHVARSNSLRSSSPRRVRRVANVPPSVPEEEGPPAAGTPGVGGAS
 SGGFKPPGAHPSLLYNSQHAHANGATGPLAVRTDQTNLQQYRSNLAPPSGGSMPPQQQTS
 PVGSVASGTRSNHSHTNNGNSGGSYPPMYPTSHQQQQQQQQAQKQGGDQNDQNLPHPHAHP
 HPHHHQHLAKSASRASSSSGGASSAAQQASGASGGAAGQPKQDQRLTHEQFRAALQMVVS
 AGDPRENLDHFNKIGEGSTGTVCIA^{DK}STGRQVAV**K**KMDLRKQQRRELLFNEVVIMRDY
 HHPNIVETYSSFLVND^{EL}WVMEYLEGGALTDIVTHSRMDEEQIATVCKQCLKALAYLHS
 QGVIHRDIKSD**S**ILLAADGRVKLSDFGFCAQVSQELPKRK**SLVGT**PYWMSPEVISRLPYG
 PEVDIWSLIGIMVIEVDGEPFFNEPPLQAMRRIRDMQPPNLKNAHKVSPRLQSFDRML
 VRDPAQRATAAELLAHPFLRQAGPPSLLVPLMRNARHHP

Die p21-Bindungsdomäne ist rot, die Kinasedomäne blau gekennzeichnet. Für verschiedene Konstrukte ausgetauschte Aminosäuren sind unterstrichen und fettgedruckt. Mbt^{H19,22L}: rot (p21-bindungsdefizient), Mbt^{K397M}: blau, Mbt^{T525A}: blau (beide kinasetot), Mbt^{S492N/S520E}: grün (konstitutiv aktiv)

9.2.2 Cdc42

***cdc42*-cDNS-Sequenz (LD24752)**

AGCTCGCTGGAGAGAGAGAACGCTAACACAAAAGGAAATAGTAGTTTTCCGTACGTATCG
 AGCCCAGCCCAGAAAAGCGGAAAACCTAAACGGATTTCGACAGCGGTTGCAAATTTTAAATA
 ACTGAGTCATCACCCCTCTGCACAAC**ATG**CAAACCATCAAGTGCGTGGTTCGTTCGGCGACG
 GAGCCGTGGGTAAGACATGCCTGCTCATCTCGTATAACAACAAGTTCCCGTTCGGAGT
 ACGTGCCACGGTGTTTCGACAACCTATGCGGTCACTGTGATGATCGGCGGTGAGCCCTACA
 CACTGGGCCTGTTCGATACGGCCGGACAGGAGGACTACGATCGGCTGCGTCCGCTCTCCT
 ATCCGCAGACGGATGTCTTTCCTTGTCTGCTTTTCGGTGGTTCAGTCCCAGTTCCTTCGAGA
 ACGTCAAGGAGAAGTGGGTGCCCGAGATTACACACCATTGCCAAAAGACGCCGTTTCCTGC
 TGGTGGGCACACAGATTGATTTGCGCGACGAGAACAGCACGCTGGAGAAGCTGGCCAAGA
 ACAAGCAGAAGCCCATCACCATGGAGCAGGGCGAGAAGCTGGCCAAGGAGCTGAAGGCCG
 TCAAGTACGTGGAGTGCTCGGCCTTGACACAGAAGGGCCTGAAAAATGTATTTCGACGAGG
 CCATCCTGGCCGCCCTCGAGCCACCAGAGCCCACAAAGAAAAGGAAGTGCAAATTTCTTA**T**
AATTCTGCTTTTCCTCACACGCGGTATT

Cdc42-Aminosäuresequenz

MQTIKCVVVDG**G**AVGKTCLLISYTTNKFPSEYVPTVFDNYAVTVMIGGEPYTLGLFDTAG
 QEDYDRLRPLSYPQTDVFLVCFSVVSPSSFENVKEKWVPEITHHCQKTPFLLVGTQIDLR
 DENSTLEKLAKNKQKPIITMEQGEKLAKELKAVKYVECSALTQKGLKNVFDEAILAALEPP
 EPTKKRKCKFL

Cdc42^{G12V}: grün (aktiviert)

9.2.3 Rac1

***rac1*-cDNS-Sequenz (LD34268)**

AAAATTTACTTTTTTTTGTGAGAAAATTAGGGAAATTAACGCACAAAACGCGAGTTAAAG
 AGGCCAGAACGTAAGGCGCGATCATCAGTCGCCCCGAGGACCACAAGGCACTGGAAAAG
 GAGTCGCGCTTCCAGAGATAACCCCGCAAAGGACCCACGCAAGCAACAGTCCTCCGCCG
 CCGCCCCAAAAGAACCAAAAACGCCTGAAGAAGAAGCACCCCGCAATCAGAAATCTGC
 AATCTTCAATCTCCAATCTCTAGGCACATAGCACTCCAGTCCAGAAAGTCGAGGAAATCG
 AACCATGCAGGCGATCAAGTGCGTTCGTGGGCGACGGAGCCGTGGGAAAGACCTGCCT
 GCTGATCAGCTACACGACCAATGCCTTTCCCGGCGAGTACATACCCACCGTGTTCGACAA
 CTACTCGGCCAACGTGATGGTGGACGCCAAGCCCATCAACCTGGGCCTGTGGGATACGGC
 CGGGCAGGAGGACTACGACCGACTGAGGCCACTGTCTTATCCCAGACCGATGTCTTTCCT
 CATCTGCTTCTCGCTGGTGAATCCGGCATCGTTCGAGAACGTGCGGGCCAAGTGGTATCC
 GGAGGTGCGCCACCACTGCACCAGCACGCCATCATCCTGGTGGGCACA

Rac1-Aminosäuresequenz

MQAIKCVVVDG**G**AVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDAKPINLGLWDTAG
 QEDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLVNPASFENVRAKWYPEVRHHCPSTPIILVGTKLDLR
 DDKNITIEKLRDKKLAPITYPQGLAMAKEIGAVKYLECSALTQKGLKTVFDEAIRSVLCPV
 LQPKSKRKCA

Rac1^{G12V}: grün (aktiviert)

9.2.4 Rho1

***rho1*-cDNS-Sequenz (LD29467)**

GTGCTGAGTGTGTGAAATCACCAATATAAATTAATTTCCA**ATG**ACGACGATTTCGCAAGA
 AATTGGTAATTGTCGGCGACGGTGCCTGCGGTAAAACCTTGCCTTCTGATTGTCTTCAGCA
 AAGATCAGTTCCCCGAGGTCTATGTGCCACCGTATTTCGAGAATTATGTGGCCGACATCG
 AGGTGGATGGCAAACAGGTGGAGCTGGCCTTGTGGGATACGGCCGGGCAGGAGGACTACG
 ACAGACTACGACCGCTGAGCTATCCCGACACTGACGTCATACTGATGTGTTTCTCAGTGG
 ATTCACCCGATTTCGCTAGAAAATATTCTGAAAAATGGACCCAGAGGTCAAACACTTTT
 GTCCAAATGTTCCAATCATTTTGGTAGGAAATAAGAAAGATTTGCGAAATGATCCCAACA
 CAATTCGGGATCTAGCAAAAATGAAGCAGGAGCCGGTGAAGCCGCAGGAGGGTCGCGCCA
 TGGCCGAGAAGATTAATGCCTTTGCCTATTTGGAGTGTTTCGGCTAAGTCCAAGGAGGGTG
 TCGGAGATGTTTTCGAGACGGCAACTAGGGCCGCGCTGCAAGTCAAAAAGAGGAAGAAGA
 CCAGATGCCTTTTGTCT**TAA**AAGAGCAAATCAACAACATGAAAATCTTTGCCACACACAC
 ACACACACAGCAACAACAACAGCATAAACACACACACAAACACACATAACACACTTTTAC
 AACAATAACGAGCTGAACAACAACCACTCAACAACAACATCAAAAAAAAAAGTTGAATTCA
 AGCCGAACCTGGTACAGTTTGCCTACTTTAAGAAGGTGCTGGATAAGGATCGCCCCAGCAA
 GCGTCGTCGCAACAGCGGCTCCGATGCGGAGGATGACAACGGTGAGGCATCTAGCCAGCG
 CTCACCATGCGACGCTCCAAACGCACACGCACAGCGACCGTCCGGTCCGATAGCGATGAG
 GAGGATATTGAGCCACCACAGCCGGATGCTGGCGATTTGACGCGTGCGAAACGCGTCGTT
 CTCTGCCCGCTCGCTCGGTGCGCATGCTGATGGCCAGCCCCCTCCAGTGAGGAGCAGTCCG
 TGGCCACATCGACCACGGAGCCGGCCATCATTAGCGATCGCCGCTGGGCGAGTTCAAGA
 ACAATTTGCAGCGACTGTTTCGCGAGGCACGCGAACAGAGCTTGGCGCTGGCCAGGATCA
 CCACGGCCATCAACGTTGGCAGCCAGGAGCCGTTACCGCTGGCGAAATCGAGGCCGCCG
 TGCATCGCATGACCGAGGACAATCAGATCATGGTCGCCGACGATATAGTCTTTCTCATCT
 GATCGCGCATTCCAAGGAGCAACAATCGAACGAACGATTGCATCCATCAATCCATCCTTT
 ATCCATCAACCATCTAGCGCTTAAGTTGTCATTTTTGTTTTGTATTTATATAAAAAAAAA
 AAATAAACACTTTGGAACCTCCATTGC

Rho1-Aminosäuresequenz

MTTIRKKLVIVGD**G**ACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFNENYVADIEVDGKQVELALWDT
 AGQEDYDRLRPLSYPDVDVILMCFVSDSPDLENIPEKWTPEVKHFPCNPVPIILVGNKKD
 LRNDPNTIRDLAKMKQEPVKPQEGRAMAEKINAFAYLECSAKSKEGVRDVFETATRAALQ
 VKKRKKTRCLLL

Rho1^{G14V}: grün (aktiviert)

9.2.5 CG8818

CG8818-cDNS-Sequenz (GH04007)

CGGTAACACTGTTGAAAACAAAAAATATACACAACCTTATACAATCCGAGACAAAAACGGG
 GCAAAGGAGGCGTGTCTAGAAGAGCGGAGGACGCGGAGGTGACCCCAAGT**ATG**GCCATG
 CTGACGCGATTGACCAGCAGCGGCACCACCACGGTGGCCGGAGCACCCGGTTCACCCAAG
 GGCCTGCAGCGTTTCCAAAACACTACATCTCGGCCTTCTTGTGGCCGGGAACGCAGCGGCAA
 CGTCGGAAGTCCACACATCTCGATCCCATGGACTGTTTCACCAACGACTTGGTGACCAGA
 AAGACCCAAAAGTGGGAGGAGCTGCGCGATAGCCTGATAAAGAGGCCATCGTCCGGAAT
 CTGGAGGCGGACGCCAATTGCAATGTGGGAACGCAGCGAAAGGCTGGTAGTACCAGCTTT
 AGCCAGAACGTGGGTCTTATGTCCAAGGGCATGATGAGTGATCTGAAGGCGCTGCGCTCC
 CCCCAACTGGGACTGGATATCAGATCCCTGTCGCAGGCGCAGCTGGACAACCTGCTGATG
 GCCACGTTGGAGATCAAGAACAAGCTGGACTTTCTCTACCTGATACGTCAGTGATCCGC

TGCAACCTGTTGCCCTCCAACGAGGTCTTCGTGTCCTGTCTAAAGTATTTGAGCGCGCAG
 CGCAAGCTCCAGCAGTTGGAGGCACTGGCGGAGACCTGTTCGGCAGCTGGAGCACCCGTTTC
 TCACAGACCTACGCGGATCTGGCGCCCTTCCGCGCCATCGCCCTGTGGAACAATGGTAAC
 GCCGACGTGGCCCTGATGACGCTACATCGCGGTTACGGGGTAAGCATGACTTCGGAGGAG
 GGCAGGCGGATGGCGCGCTCCGCATTCCGCACCATTTCGGAGGAGACTCTGGCCCAGAAG
 AGTGAGGCGGTGCTAGTGTGCTGCTGGAGGTAGCGCGTGCCATTCACCGCGAGCACAAG
 GACATCTTTGTGGTGGCCTGTGTGTGGAAGCAATGCTTCGCTAGCGATTGGTTTTGCGAT
 CAAAAATCGGCTTCGGAACGTGTTTGAGCACTACAAGGAGCTGCAAGAGCTAGTGGAGAGG
 AGAGCCAGTTCTTTGTGCTCTTCATTTCTGGCCCGTAACAATGTTGATGCGGTGCATCGG
 CTAATCGAGGCGTTCTTGAGCACCAGCAGCGTTTGGCCTGCTCCAGCTGCCTCAGCTTG
 CTCTTTAACTATCAATATATGCGCAAGGATCTGCGAGCCTGCGCTGAGATTGTCAAATCC
 TGCAGTGAATTAGAGATGCCGCTAAATGAGCTGCAGAACGAACAGTTCCTCAGTCTGTTTC
 CTCGACCAGAGCGATCCTGTGGACTCTTCGGGAATGGCCAGCAAGTACAAGGCACCCAAG
 TCCTTCCAGTACAAGTTC**TAG**TCCCCAGTTTCCATCGTTAAGCCGTTGTCATCGTAGTTA
 CAGCACAAGTGTGTCACCATGAGCAATATTGCAAGCATCCCCATATTGCAAGCCCCCA
 CAAGGAATGTAGTGTCTCTTCAATAAATGTTATTTAATATCAAAAAAAAA

CG8818 Aminosäuresequenz

MAMLRLTSSGTTTVAGAPGSPKGLQRFQNYISAFLWPQTQRQRKSTHLDPMDCFNDL
 VTRKTQKWEELRDSLIIKRPSSGNLEADANCVGTQRKAGSTSFSSQNVGLMSKGMMSDLKA
 LRSPQLGLDIRSLSQAQLDNLLMATLEIKNKLDFLYLIRQCIRCNLLPSNEVFVSLKYL
 SAQRKLQOLEALAEQLEHPFSQTYADLAPFRAIALWNNGNADVALMTLHRGYGVSMT
 SEEGRRMARSASFRTISEETLAQKSEAVLVSLLEVARAIHREHKDIFVVACVWKQCFASDW
 FCDQKSASELFEHYKELQELVERRASSLCSFLARNNVDAVHRLIEAFLQHQQRLACSSC
 LSLLFNYQYMRKDLRACAEIVKSCSELEMPNLQNEQFLSLFLDQSDPVDSSGMASKYK
 APKSFQYKF

9.2.6 CG14880

CG14880-cDNS-Sequenz (RE15157)

AGTCTAAGACGCGACTTCGAACGAAGCGGTTGTGTTTTATCGGGCGAATTGCGAACCGTC
 AGATACAAGATACAAACCTGGATAAGTTTTATAGACGCGCTCCATTCGAAAAGGACTGTG
 AAATGATGTGCTAAAGTGTGATGGCATGTCTATATAGTATCAAAGCAAATAATTTATGC
 GAACCAATTCGGTTGCTGGCGTTGCGCGATTGCTCTTGACTTTGTTTTCAAGCCAATGCA
 ATTGCATTAGCTATCTGAGCTTGATGCACTCCGAGTGCTGCTGACATTTGATCTTTGCAA
 AGATCACATCGCACTGAATCACCAACTCGCATCGGATGTGTGAAAAGGTCCGCGACCATA
 TGGAATATATTTTAGCACACCACCTACGGCGACAATTAGTTTGTACAATTTAAGATACTC
 CGTCAACTGAAGACGCGGGCGAAGCTCAACATCGTGAGTTCCTCCCCTCCCAACAATCC
 CCAGTGCCACAGAGAACAATCGTCGAA**ATG**TTGGCACAAACGCAAATTATCCCAACGCCT
 TGGCGACTTTTGACCCTGGCTTTATTCTGCTCAGCTTTATTTTTGGCCAGTGAGGCTCAA
 AATGCCATCCCAAAAACGAATCCTGCCTCGCTGCTGATACAGAAGACATCCTTCTCCTGC
 GCCGGACGTCCAGCCGGATATTATGCGGATGTGGAGACGGGCTGCCAGGTGTACCACATG
 TCGGATGGCCTGGGTGCGCAGTTCAGCTACACCTGCCAAACACGACACTTTTCCAGCAG
 CGAATGCTTATCTGCGACCACTGGTACATGGTGAAGTGTCCAAGGCGGAGAGCAACTAT
 GCTGCCAATCTCCTAATTGGTCAGCGGGACAAGCCCTTCGTAAACGACGAGGAAAACAGC
 TTGCGCACTCCAAGACCCGATCTTCTGGATCGTCCTTATGCGCCCCGACTATTCCGGCGAG
 TCCTTCAGAAGCCAATATAAGCAGTTTACTTCCAACCAGAATCAGATACGTGATGAGTCC
 GTCAAAGGAGCCGGTGGGGTAAATCGGATCCCCAGATATCGCAGACGCGTTGGCGCATT
 CCACCACCCAGCCGGACGATCCTTCCACCGGCCTATGAACCGCAAATCGAGCTGCCCAGT
 GCCCAATCGGCCAAGCCCAGGATACCCATTATCACTAGCACACCACCAACTCGAGCG

ACCACCACCACCCGACCAACAACCACAACCTCGTGCCACCACCACAACAACAACCACTCGA
 AGACCTCCGGTAACCGCCAGGCCGAAGGAGGCCTTGCACAACAGGCGGCCAAATTTCCAG
 GAGCATGATATGGATGACTTGGGCACCAGCCACAGCACACGGTACAACACCTCGGCAGAC
 TTCAACTCGGCGGAGTCGCCGCTCCGTGAAACGAAACAGTCCAGCACCAAGCTGACCAAG
 TTCATCAAGCCGCGTCCAAGATCTATGAGCCACCCTTTGTGTACCCCATCTACAATCTA
 GAAGAGTCCCAGACCCAGAACCGCGGCAGTCGCCACCACACTGCGCACATCAACGGCGGCT
 CCTTTCAGTCTGTTCOAAGTCGCAAGGAGGTCAGCACCACAACCTCCACGACCACTGAGT
 CGACCGACGACCTTGGCCGGTGTACCCTTCTCCTCTGCCACACACCCAACACTACGGTTACG
 ACGGTCGGAGTACCGCCACGCAGCGATAATCGGACTCCAGCTCCGGCCCAGAGCTTCCGC
 CTGGCCACGCCACCAGCACTGCAGCACCACCATCGCGCCCAGGACAGTTGCCCTTCAAC
 GATTTACTGCCGCGTTCGTTGACTTTGTGCCCCACGATATAGCCACCACCCAAGGACCG
 CCTATCTATTACGAATGGAAGGTGCCCTCGAACGGTCTTGAGCCTCCCAAATTAGACCCA
 CCCATTGGTGTGGATGGACGTGAGTATCCCAGACCACTGGAGACTACGGGGTACCAGC
 AAGCAGGATGTATTCAACACCCGACTAAACGATATTGGAAGCCATCAAAGAAGCCAGTC
 CAGATAACCTCGCCGCTCCAACAGTCGAGCACAAGCCATCGTTTTGGCCATCTCGAGATCC
 ATTAAGCCCAAAGAGGAGCAGGAATCGGCACAGCGGCATCCGATGTGGTGGCCAGCTCC
 ACGGATATAAGCCATCTGCGCAAGCAATTCTCATTCCGGAGTACGCCTTCCCGCTGGAA
 ACCATTGGGCGCACGGGTTATGGTCTTGGTGCAGGAGCAGCGGCTGGGGGCTCCGGCTCC
 AGCAACGGCGATCTGTATAACTCGTTCCAGCTGAAGATCCCCGAGCAGCGCGCTAAGTGG
 TTCGGAGAGAACCCCAAGTGCCCGGAGTGCCATCCTTCGTTTCGTTCTGCCGGGCACCTGC
 GAGCCCTGCCTGCGCAGATAGTCCTGATTCCATATCCATTCCCGTCTCCGTCCGTCCCAT
 CGCCATTATCCGCATCCGCATCTGCTACTAGCCCTAGTATTAGCTTCCGCTGAGAAGTC
 CCGGAGTGAAGCATCCACGCATTTATTGTATATCCGCAGATTAATTATTAACTACACAA
 ATATGTTTGCAGAAAAAAAAAAAAAAAAA

CG14880 Aminosäuresequenz

MEVSAQNAIPKTNPASLLIQKTSFSCAGRPAGYYADVETGCQVYHMC DGLGRQFSYTCPN
 TTLFQQRMLICDHWMVNC SKAESNYAANLLIGLYYILTYHIRFDYKIYFTGQRDKPFVN
 DEENSLRTPRPDLLDRPYAPDYSGESFRS QYKQFTSNQNQIRDESVKGAGAGKSDPQISQ
 TRWRIPPPSRTILPPAYEPQIELPSAQSAKPRIPIITSTTTTTRATTTTRPTTTTTRATTT
 TTTTRRPPVTARPKEALHNRRPNFQEHMDDLGTSHSTRYNTSADFN SAESPLRETKQSS
 TKLTKFIKPPSKIYEPFVYPIYNLEESQTQNAAVATTLRTSTAAPFSPVPSRKEVSTTT
 PRPLSRPTTLAGVPFSSATHPTTVTTVGVP RSDNRT PAPAQSFRLATPTSTAAPSRPA
 QLPFNDLLPPFVDFVPHDIATTQGPPIYEWKVPSNGLEPPKLDPPIGVDGREYPETTDG
 YGVTSKQDVFNTRLNDIGSHQKPVQITSPLQQSS TSHRLAISRSIKPKEEQESAQRSD
 VVASSTDISHLRKQFLIPEYAFPLETIGRTGYGPGAGAAAGGSGSSNGDLYNSFQLKIPE
 QRAKWFGENPKCPECHPSFVLPGTCEPCLRR

9.3 Abkürzungen

Mbt	mushroom bodies tiny
PBD	p21-Bindungsdomäne
KD	Kinasedomäne
KID	Kinaseinhibitor domäne
AV	Adhärenzverbindungen
BSA	Bovines Serumalbumin
PAK	p21-activated kinase

NP-40

Nonidet P-40