

**Die Funktion der p21-aktivierten Kinase Mbt in
Neuroblasten während der Entwicklung des
zentralen Nervensystems von *Drosophila
melanogaster***

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

vorgelegt von

Juliane Melzer

aus Annaberg-Buchholz

Bonn, August 2013

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Raabe

Gutachter: Prof. Dr. Charlotte Förster

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Erklärung gemäß §4 Abs.3 S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999 in der Fassung vom 12. August 2009.

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich erkläre, daß die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich erkläre, daß ich außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich belegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 12. August 2013

Juliane Melzer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	p21-aktivierte Kinasen (PAKs)	4
1.1.1	Struktur und Regulation von Typ I PAKs	5
1.1.2	Struktur und Regulation von Typ II PAKs	7
1.1.3	Zelluläre und entwicklungsbiologische Funktionen von Typ I PAKs und ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten	9
1.1.4	Zelluläre und entwicklungsbiologische Funktionen von Typ II PAKs und ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten	15
1.2	Entwicklung des zentralen Nervensystems von <i>Drosophila melanogaster</i>	19
2	Fragestellung und Zielsetzung	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Enzyme	26
3.1.2	Reagenzien	26
3.1.3	Kits	27
3.1.4	Lösungen und Puffer	27
3.1.5	Primer	30
3.1.6	Antikörper	31
3.1.7	Fliegenstämme	33
3.2	Methoden	38
3.2.1	Klonierung der Armadillo-Transgene und Herstellung transgener Fliegen	38
3.2.2	Aufzucht von Larven und Puppen definierten Alters	38
3.2.3	Immunfluoreszenzfärbungen und konfokale Mikroskopie von larvalen, pupalen und adulten Gehirnen	39
3.2.4	Paraffinschnitte	40
3.2.5	Elektronenmikroskopie	41

Inhaltsverzeichnis

3.2.6	Kultur, Transfektion und Lyse von HEK293 Zellen	41
3.2.7	Immunpräzipitation	41
3.2.8	SDS-PAGE und Western Blot	42
3.2.9	2D-Gele	42
3.2.10	RupBS-Färbung	43
3.2.11	Massenspektrometrische Analyse	43
3.3	Software und Datenauswertung	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Lokalisation von Mbt in Neuroblasten des Zentralhirns	45
4.1.1	Mbt zeigt eine Zellzyklus-abhängige, apikale Anreicherung in Neuroblasten	45
4.1.2	Cdc42 reguliert apikale Mbt-Lokalisation	46
4.2	Charakterisierung von <i>mbt^{P1}</i> Neuroblasten	48
4.2.1	Der Verlust von Mbt beeinflusst asymmetrische Zellteilung nicht	48
4.2.2	Der Verlust von Mbt beeinflusst weder das Zytoskelett, noch das Zytoskelett-assoziierte Protein Armadillo, aber reguliert Canoe-Lokalisation	52
4.2.3	Mbt reguliert Neuroblastengröße, Proliferation und Apoptose . .	56
4.3	Regulation von Zellwachstum und mögliche Downstream-Effektoren von Mbt	66
4.3.1	Insulin- und TOR-Signalwege	66
4.3.2	c-Myc und nukleoläre Proteine	72
4.3.3	Klassischer MAPK-Signalweg	73
4.4	Identifizierung von Downstream-Effektoren mittels 2D-Gelen	77
5	Diskussion	84
5.1	Mbt ist Teil des apikalen Proteinkomplexes ohne den grundlegenden Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung zu beeinflussen	84
5.2	Mbt ist kein zentraler Regulator des Zytoskeletts, beeinflusst aber Canoe Lokalisation in Neuroblasten	85
5.3	Mbt reguliert Proliferation von Pilzkörperneuroblasten	87
5.4	Mbt beeinflusst das Überleben von Neuroblasten, nicht aber von Neuronen	88
5.5	Eine mögliche Rolle von Mbt im Regulationsnetzwerk von Zellgröße und Proliferation	89
5.6	Mbt ist möglicherweise am klassischen MAPK-Signalweg beteiligt . . .	93

Inhaltsverzeichnis

5.7	Bic und Hsp83 sind mögliche Downstream-Effektoren von Mbt	93
5.8	Fazit und Ausblick	94
6	Danksagung	95
7	Zusammenfassung	97
8	Summary	99
9	Publikationen und Konferenzen	100
10	Abkürzungen	101

1 Einleitung

1.1 p21-aktivierte Kinasen (PAKs)

P21-aktivierte Kinasen (PAKs) sind konservierte Serin/Threonin Kinasen, die abgesehen von Pflanzen in allen Eukaryoten vorkommen und zur Familie der Ste20 Kinasen gezählt werden (DELPIRE, 2009; HOFMANN ET AL., 2004; KUMAR ET AL., 2009; ZHAO & MANSER, 2012). Sie wurden ursprünglich als Interaktionspartner der kleinen RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 (p21 Proteine) identifiziert und zählen heute zu den am besten charakterisierten Effektoren von Guanosintriphosphat (GTP)-gebundenen, aktivierten RhoGTPasen ((MANSER ET AL., 1992), Übersichten in: (ARIAS-ROMERO & CHERNOFF, 2008; BOKOCH, 2003; ESWARAN ET AL., 2008; ZHAO & MANSER, 2012). Charakteristisch für alle PAKs ist neben der konservierten, C-terminalen Ser/Thr Kinasedomäne ein regulatorischer N-Terminus mit einer Bindungsstelle für kleine RhoGTPasen (p21-Bindungsdomäne, PBD) und einer teilweise damit überlappenden autoinhibitorischen Domäne (AID) (Abb.1) (ZHAO & MANSER, 2012). Aufgrund von strukturellen, regulatorischen und funktionellen Unterschieden werden PAKs in Vertebraten in zwei Gruppen unterteilt: Typ I und Typ II PAKs. Bei Säugetieren existieren je drei Gene für beide Gruppen. PAK1, PAK2 und PAK3 gehören zu den Typ I PAKs, während PAK4, PAK5 und PAK6 den Typ II PAKs zugeordnet werden. *Xenopus laevis* (*X. laevis*) besitzt auch sechs PAK-Gene, die Typ I PAKs PAK1, PAK2 und PAK3 und die Typ II PAKs PAK4, PAK5/7 und PAK6 (ZHAO & MANSER, 2012). *Xenopus* PAK5/7 ist in diesem Fall das eigentliche PAK4 Ortholog (ZHAO & MANSER, 2012). Die Gene für PAK4 und PAK6 sind bisher nur vorhergesagt (www.xenbase.org [2.8.5]). Bei Knochenfischen wie dem Zebrafisch (*Danio rerio*) und Medaka (*Oryzias latipes*) fehlt ein Ortholog für PAK3, dafür sind die Gene PAK1, PAK2 und PAK6 dupliziert (LAW & SARGENT, 2012). Bei Invertebraten sind Typ I und Typ II PAKs nur durch jeweils ein Gen vertreten (ZHAO & MANSER, 2012). PAK1 ist das Typ I PAK sowohl in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) als auch in *Drosophila melanogaster*. PAK2 ist das Typ II PAK bei *C. elegans* und Mbt ist das einzige Typ II PAK Protein in Fliegen. Darüber hinaus kodieren die Genome von *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* noch für ein weiteres PAK Protein, PAK3, in *C. elegans* auch als MAX-2 bezeichnet (LUCANIC

ET AL., 2006; MENTZEL & RAABE, 2005). Diese Gene werden einer dritten Gruppe von PAK Proteinen zugeordnet, deren Mitglieder nur in Invertebraten vorkommen und auch die etwas heterogeneren PAK Proteine der Protozoen umfassen (HOFMANN ET AL., 2004; LUCANIC ET AL., 2006; MENTZEL & RAABE, 2005; ZHAO & MANSER, 2012). Für die PAK Proteine der Protozoen wird hier auf die Übersichtartikel von ZHAO & MANSER (2012) und KUMAR ET AL. (2009) verwiesen. Im Folgenden soll nur auf klassische Typ I und Typ II PAKs eingegangen werden, welche es nur in Metazoen gibt.

1.1.1 Struktur und Regulation von Typ I PAKs

Typ I PAKs weisen im N-terminalen Bereich neben der PBD und der teilweise mit ihr überlappenden AID einige weitere charakteristische Motive auf (Abb. 1.1). Drei konservierte, Prolin-reiche Sequenzen dienen der Bindung von Src-Homology 3 (SH3) Domänen (BOKOCH, 2003; YU ET AL., 1994). Die Adapterproteine Nck und Grb2 binden an die beiden N-Terminal von der PBD gelegenen PXXP-Motive und zwischen PBD und Kinasedomäne liegt eine atypische SH3-Bindungsstelle für Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (Guanine Nucleotide Exchange Factors, GEFs) der PIX/Cool-Familie (BOKOCH ET AL., 1996; MANSER ET AL., 1998; PUTO ET AL., 2003). Basische Motive direkt vor der PBD und vor der Kinase-Domäne binden Phosphoinositide, die dadurch als Ko-Aktivatoren für PAKs wirken können (STROCHLIC ET AL., 2010). Die C-terminale Kinase-Domäne ist hochkonserviert innerhalb der Typ I PAKs (ZHAO & MANSER, 2012). Sequenzhomologien deuten darauf hin, dass in der Kinasedomäne eine Bindungsstelle für Integrine liegt (ZHANG ET AL., 2002). Es wurde jedoch bisher keine Bindung von Typ I PAKs an Integrine nachgewiesen. Ein konserviertes SSLXPL-Motiv am C-Terminus dient als Bindungsstelle für die $\beta\gamma$ -Untereinheit trimerer G-Proteine ($G_{\beta\gamma}$) (LEEUEW ET AL., 1998; LI ET AL., 2003).

Die Aktivierung von Typ I PAKs kann über die Bindung von Phospholipiden oder RhoGTPasen erfolgen (BOKOCH ET AL., 1998; STROCHLIC ET AL., 2010; MANSER ET AL., 1994). Für PAK2 wurde auch die proteolytische Prozessierung durch eine Caspase als Aktivierungsmechanismus beschrieben (LEE ET AL., 1997; RUDEL & BOKOCH, 1997). Die genaue molekulare Funktion der Lipidbindung bei der PAK-Aktivierung ist noch nicht geklärt. Im Gegensatz dazu ist der Mechanismus der RhoGTPase-vermittelten PAK Aktivierung bereits sehr detailliert beschrieben worden. Kleine RhoGTPasen im GTP-gebundenen, aktiven Zustand aktivieren die Kinase, indem sie mit einem Typ I

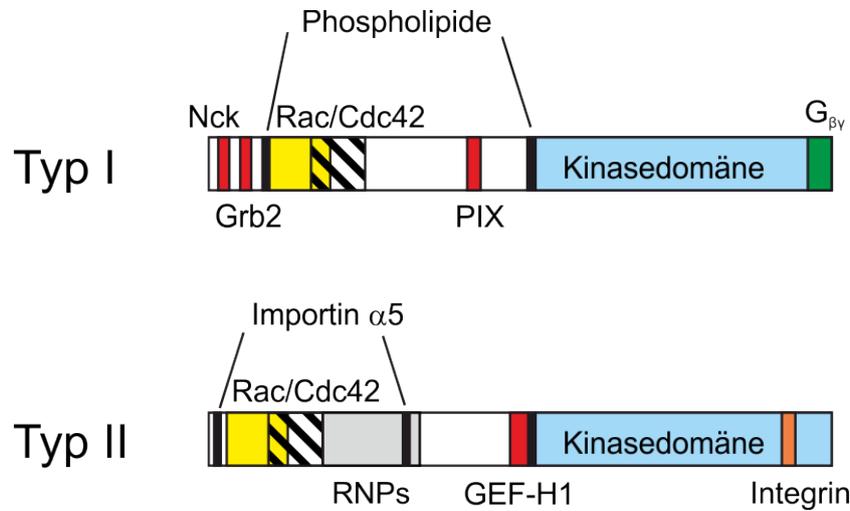


Abbildung 1.1. Schematische Domänenstruktur von p21-aktivierten Kinasen. rot: Bindungsstellen für SH3-Domänen, schwarz: basische Motive, gelb: PBD, schraffiert: AID, hellblau: Kinasedomäne, grün: Bindungsstelle für G $\beta\gamma$, grau: Interaktion mit ribosomalen und ribonukleären Proteinen (RNPs), orange: Integrin-Bindungsstelle.

PAK-spezifischen Autoinhibitionsmechanismus interferieren (ESWARAN ET AL., 2008; ZHAO & MANSER, 2012). In Abwesenheit von RhoGTPasen bilden Typ I PAKs Homodimere, bei denen die AID *in trans* die Kinasedomäne bindet (PARRINI ET AL., 2002; LEI ET AL., 2000). Die Interaktion der AID mit der Kinasedomäne zwingt die Kinasedomäne in eine Konformation, die das aktive Zentrum blockiert und verhindert dadurch sowohl Autophosphorylierung als auch Phosphorylierung von Substraten (LEI ET AL., 2000). Die Bindung von kleinen RhoGTPasen an die PBD induziert Veränderungen in der Konformation, welche die Dissoziation der Homodimere zur Folge haben (GIZACHEW ET AL., 2000; MORREALE ET AL., 2000). Die Dissoziation der AID von der Kinasedomäne erlaubt Konformationsänderungen, die ein funktionelles katalytisches Zentrum wiederherstellen (LEI ET AL., 2000). Es kommt daraufhin zur *trans* Autophosphorylierung eines zentralen Threoninrestes in der Aktivierungsschleife (T423 bei humanem PAK1), welche für die Aktivierung der Kinase erforderlich ist (YU ET AL., 1998). T423 ist die einzige Autophosphorylierungsstelle in der Kinasedomäne. Diese und weitere Autophosphorylierungen von regulatorischen Serinresten im N-Terminus aktivieren die Kinase, auch über die Bindungsdauer der RhoGTPase hinaus (CHONG ET AL., 2001; ZENKE ET AL., 1999). Die T423 Phosphorylierung dient der Stabilisierung der aktiven Konformation der Kinasedomäne (WANG ET AL., 2011). Eine Phosphorylierung von S144 im N-Terminus

erniedrigt wiederum die Affinität der AID für die Bindung an die Kinasedomäne und verhindert damit ein „Zurückspringen“ der Kinase in den inaktiven Zustand (CHONG ET AL., 2001). Die Phosphorylierung von T423 in der Aktivierungsschleife ist im inaktiven Homodimer nicht detektierbar und eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung der Kinase (GATTI ET AL., 1999; YU ET AL., 1998; ZENKE ET AL., 1999). Diese Phosphorylierung kann bei Typ I PAKs folglich als Sensor für Kinaseaktivierung verwendet werden.

1.1.2 Struktur und Regulation von Typ II PAKs

Die Domänenstruktur von Typ II PAKs ähnelt der von Typ I PAKs (Abb. 1, (WELLS & JONES, 2010)). Im N-terminalen Bereich liegt eine PBD, direkt gefolgt von einer AID. Die erst vor Kurzem identifizierte AID unterscheidet sich jedoch deutlich von der AID bei Typ I PAKs (BASKARAN ET AL., 2012; HA ET AL., 2012). Im Vergleich zu Typ I PAKs fehlen Typ II PAKs die beiden SH3-Bindungsstellen vor der PBD, da dieser Bereich bei Typ II PAKs viel kürzer ist und nur 10 Aminosäuren umfasst (Übersichten in: (JAFFER & CHERNOFF, 2002; WELLS & JONES, 2010)). Zwischen PBD und Kinasedomäne liegen einige potentielle SH3-Bindungsstellen, für die bisher jedoch keine Interaktionspartner beschrieben wurden. Es existieren zwei nachgewiesene, basische Kernlokalisationssequenzen (Nuclear Localisation Signals, NLS) bei PAK4 (LI ET AL., 2012). Eine liegt vor der PBD und umfasst die Aminosäuren vier bis sieben. Die Zweite liegt zwischen PBD/AID und Kinasedomäne und umfasst die Aminosäuren 158 bis 161 (LI ET AL., 2012). Beide binden Importin $\alpha 5$ (LI ET AL., 2012). Direkt vor der PBD liegt ein weiteres konserviertes basisches Motiv, welches bei Typ II PAKs eine Funktion als NLS erfüllt (COTTERET & CHERNOFF, 2006). Im Gegensatz dazu wurde dieses basische Motiv bei Typ I PAKs als Bindungsstelle für Phosphoinositide beschrieben (STROCHLIC ET AL., 2010). Möglicherweise erfüllt dieses Motiv also unterschiedliche Funktionen in den beiden PAK Untergruppen. Bei PAK4 wurde direkt auf die PBD folgend eine Domäne beschrieben, die mit ribosomalen und RNA-bindenden Proteinen interagiert (BALDASSA ET AL., 2010). Vor der Kinasedomäne wurde ebenfalls bei PAK4 eine auch in anderen Typ II PAKs konservierte Bindungsstelle für das GEF GEF-H1 beschrieben (CALLOW ET AL., 2005). Es wurden jedoch bisher keine weiteren Interaktionen von Typ II PAKs mit GEFs gezeigt. Die Kinasedomäne der Typ II PAKs ist innerhalb der Gruppe sehr gut konserviert, zu der Kinasedomäne der Typ I PAKs bestehen jedoch deutliche Unterschiede (ESWARAN ET AL., 2007; JAFFER & CHERNOFF, 2002; YANG ET AL., 2001). In

der Kinasedomäne von PAK4 liegt eine Bindungsstelle für Integrine (LI ET AL., 2010b; ZHANG ET AL., 2002). Sie umfasst die Aminosäuren 505 bis 533. Diese Bindungsstelle scheint innerhalb der PAK Proteine konserviert zu sein, eine Bindung anderer PAKs an Integrine wurde jedoch bisher nicht beschrieben (ZHANG ET AL., 2002).

Wie bei Typ I PAKs wird in der Kinasedomäne von Typ II PAKs nur eine einzige Aminosäure autophosphoryliert (ESWARAN ET AL., 2007). Bei Typ II PAKs liegt in der Aktivierungsschleife an der dem T423 entsprechenden Stelle ein Serin, bei PAK4 ist dies das S474 (ABO ET AL., 1998; JAFFER & CHERNOFF, 2002). Auch bei Typ II PAKs ist die Autophosphorylierung an dieser Stelle notwendig für die Aktivierung der Kinase (ABO ET AL., 1998). Im Unterschied zu beispielsweise T423 bei PAK1 ist S474 bei PAK4 jedoch konstitutiv phosphoryliert (BASKARAN ET AL., 2012; ESWARAN ET AL., 2007). Bis vor Kurzem wurden Typ II PAKs daher als konstitutiv aktive Kinasen angesehen. Die Kinasedomänen von Typ I und Typ II PAKs unterscheiden sich zudem deutlich in Sequenz und Struktur, was auf Unterschiede bei der Regulation der beiden PAK-Gruppen hindeutet (ESWARAN ET AL., 2007). Kürzlich wurde ein Autoinhibitionsmechanismus beschrieben, der die bisherige Sicht der Typ II PAKs als konstitutiv aktive Kinasen in Frage stellt (BASKARAN ET AL., 2012; HA ET AL., 2012). Ein konserviertes RPKP Motiv in der AID von PAK4 bindet als Pseudosubstrat an die Kinasedomäne in der aktiven Konformation und verhindert so Substratphosphorylierung (HA ET AL., 2012). Die Mutation des RPKP Motives führt zur Aktivierung der Kinase (BASKARAN ET AL., 2012; HA ET AL., 2012). Der Mechanismus der Aufhebung der Inhibition ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Src SH3-Domäne kann bei PAK4 *in vitro* eine geringe katalytische Aktivität induzieren (HA ET AL., 2012). Die Mutation des RPKP Motives führt allerdings zu einer viel stärkeren Aktivierung als die Src SH3-Domäne (HA ET AL., 2012). Es sind daher detailliertere Untersuchungen nötig, um eine mögliche Funktion von Src bei der Regulation von Typ II PAKs *in vivo* beurteilen zu können.

Die Ergebnisse von Untersuchungen zur Rolle von Cdc42 bei der Kinaseaktivierung sind kontrovers. Mehrfach wurde beschrieben, dass die Cdc42-Bindung nur geringe Auswirkungen auf die katalytische Aktivität von Typ II PAKs hat (ABO ET AL., 1998; HA ET AL., 2012; PANDEY ET AL., 2002; SCHNEEBERGER & RAABE, 2003). Allerdings weist die erhöhte Kinaseaktivität der katalytischen Domäne allein bzw. einer PBD-Mutante auf eine regulatorische Funktion des N-Terminus hin (ABO ET AL., 1998; BASKARAN ET AL., 2012; HA ET AL., 2012; SCHNEEBERGER & RAABE, 2003). Darüber hinaus zeigten BASKARAN ET AL. (2012), dass die Bindung von aktiviertem Cdc42 die Kinaseaktivität

steigert. Die große Varianz zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Studien lässt sich möglicherweise mit Unterschieden in den Methoden erklären. In allen Studien, in denen kein Einfluss von Cdc42 auf die Kinaseaktivität gefunden wurde, wurde Myelin Basic Protein (MBP) oder Histon H4 als Phosphorylierungs-Substrat eingesetzt. Nur BASKARAN ET AL. (2012) verwendeten ein Peptid mit Typ II PAK-spezifischer Substratsequenz (RENNEFAHRT ET AL., 2007). Auch eine kooperative Regulation von Typ II PAKs durch Src und Cdc42 wurde diskutiert (HA ET AL., 2012). Für PAK2 wurde eine kooperative Regulation der Kinaseaktivität durch Cdc42 und Src gezeigt (RENKEMA ET AL., 2002). Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Regulation von Typ II PAKs und einer möglichen Beteiligung von Cdc42 sind weitere Experimente notwendig.

1.1.3 Zelluläre und entwicklungsbiologische Funktionen von Typ I PAKs und ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten

PAK Proteine wurden mit der Regulation von zahlreichen zell- und entwicklungsbiologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Im Folgenden soll nur auf zentrale Funktionen und auf die für die vorliegende Arbeit besonders relevanten Publikationen eingegangen werden. Einige ausführliche Übersichtsartikel sind zu den zellulären, physiologischen und entwicklungsbiologischen Funktionen von PAKs sowie zu ihrer Rolle bei der Entstehung von Krebs und neurobiologischen Erkrankungen erschienen (BOKOCH, 2003; CHAN & MANSER, 2012; KREIS & BARNIER, 2009; MINDEN, 2012; YE & FIELD, 2012; ZHAO & MANSER, 2012).

Regulation von Migration, Adhäsion und polarem Zellwachstum

Viele biologische und entwicklungsbiologische Prozesse erfordern eine koordinierte, dynamische Modulation von Zellmigration und Adhäsion. Migrierende Zellen müssen bestehende Adhäsionskontakte auflösen, polare Migrations-Strukturen wie Lamellipodien und Filopodien auf- und wieder abbauen, sowie anschließend wieder Adhäsionskontakte aufbauen. PAK1 lokalisiert an aktinreichen Strukturen wie Lamellipodien, Filopodien und Fokalkontakten (Focal Adhesions) und kann nach Aktivierung die Bildung von Lamellipodien und Filopodien induzieren und dadurch Zellmigration regulieren (FROST ET AL., 1998; MANSER ET AL., 1997; SELLS ET AL., 1997, 1999, 2000). Die Aktivierung von PAK1 resultiert im Verlust von Stressfasern, Fokalkontakten und Adhärenzverbindungen (FROST ET AL., 1998; LOZANO ET AL., 2008; MANSER ET AL., 1997). Diese Effekte

scheinen jedoch zumindest teilweise zelltypspezifisch zu sein, da in endothelialen Zellen PAK-Aktivierung zur Bildung von Stressfasern führt (KIOSSES ET AL., 1999). Inzwischen sind zahlreiche Zytoskelett-assoziierte Proteine als Substrate von PAK Proteinen identifiziert worden. Ein Mechanismus, über den PAK1 das Aktinzytoskelett beeinflusst, ist die Phosphorylierung von T508 in der Aktivierungsschleife der Lim Kinase (LimK) (ARBER ET AL., 1998). LimK wiederum inaktiviert Cofilin, einen Aktin-Depolymerisationsfaktor, durch Phosphorylierung und stabilisiert damit F-Aktin (EDWARDS ET AL., 1999; YANG ET AL., 1998). Die PAK1-kontrollierte Aktivität von Cofilin ist für die räumlich-zeitliche Koordination von Migrationsbewegungen erforderlich (DELORME ET AL., 2007). Der Verlust von Stressfasern bei PAK1 Aktivierung wird begleitet von PAK1 Phosphorylierung der Myosin Light Chain Kinase (MLCK), welche zu geringerer Myosinaktivität und damit zu verringerter Stressfaserbildung führt (SANDERS ET AL., 1999). Darüber hinaus phosphoryliert PAK1 Filamin A, ein für die dreidimensionale Vernetzung von Aktin wichtiges Protein, das bei der Bildung von PAK1-induzierten Membrane Ruffles und Lamellipodien eine Rolle spielt (MACEYKA ET AL., 2008; VADLAMUDI ET AL., 2002). Ein Komplex aus Scrib, PIX, GIT1 und PAK1 wird an den Zellkortex rekrutiert, um dort Adhäsion zu regulieren (ADAM ET AL., 1998; MANSER ET AL., 1997; NOLA ET AL., 2008). PAK-vermittelte Phosphorylierung von Paxillin beeinflusst dessen Interaktion mit GIT1 und erhöht die positive Wirkung von Paxillin auf Zellmigration (NAYAL ET AL., 2006). Eine weitere Möglichkeit der Regulation von Adhäsion ergibt sich aus der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Snail durch PAK1. Die Repressorfunktion von Snail an den Promotoren von E-Cadherin und Occludin wird dadurch gefördert und Adhäsion herunterreguliert (YANG ET AL., 2005).

GEF-H1 bindet an Mikrotubuli und beeinflusst die Bildung der mitotischen Spindel (BAKAL ET AL., 2005). GEF-H1 ist somit ein PAK1-Substrat, das auch die Modulation des Mikrotubulizytoskeletts erlaubt. GEF-H1 aktiviert RhoA und induziert dadurch Veränderungen im Aktinzytoskelett (BIRKENFELD ET AL., 2008). GEF-H1-Aktivität hängt von seiner Bindung an Mikrotubuli ab und koppelt damit Veränderungen in der Mikrotubulidynamik mit Veränderungen in der Aktindynamik (KRENDEL ET AL., 2002). Die Phosphorylierung von GEF-H1 durch PAK1 induziert Assoziation mit dem Gerüstprotein 14-3-3 und eine Relokalisation an Mikrotubuli (ZENKE ET AL., 2004). Dieser Mechanismus erlaubt die Modulation RhoA-abhängiger Aktinpolymerisation und somit die Koordination von Rac-, Cdc42- und Rho-induzierten Veränderungen im Zytoskelett (BIRKENFELD ET AL., 2008).

Über die zellulären Funktionen von PAK2 und PAK3 ist weniger bekannt. Die Funktio-

nen von PAK1 und PAK2 sind zum Teil redundant. So wurde zum Beispiel eine Rolle von PAK2 bei der Migration von hämatopoetischen Stammzellen beschrieben (DORRANCE ET AL., 2013). Die genauen molekularen Mechanismen unterscheiden sich jedoch. PAK2 phosphoryliert wie PAK1 MLCK (GOECKELER ET AL., 2000). Im Gegensatz zu PAK1 phosphoryliert PAK2 zudem die Leichte Kette des Myosins (Myosin Light Chain, MLC) direkt (CHEW ET AL., 1998). PAK2 beeinflusst darüber hinaus PAK1 Phosphorylierung und wirkt somit auch über die Regulation von PAK1 Aktivität (BRIGHT ET AL., 2009). Für PAK2 wurde wie für PAK1 eine Assoziation mit PIX und Scrib gezeigt (FRANK ET AL., 2012). SHIN ET AL. (2002) beschrieben eine Rolle für PAK2 in Wachstumskegeln, was auf eine Funktion bei der axonalen Wegfindung hindeutet. PAK3 scheint über die Aktivierung von JNK die Migration von Fibroblasten zu beeinflussen (LIU ET AL., 2010).

Die Funktionen der Gruppe I PAKs sind evolutionär konserviert. *Xenopus* PAK1 kontrolliert Migration von cranialen Neurallinienzellen (Neural Crest Cells) (BISSON ET AL., 2012). Zebrafisch PAK1 ist an der Regulation von Adhärenzverbindungen während der Gastrulation beteiligt und ein PAK-PIX-GIT Komplex reguliert endotheliale Integrität (BUCHNER ET AL., 2007; LIU ET AL., 2007, 2012; TAY ET AL., 2010). *Drosophila* PAK1 reguliert das Aktinzytoskelett, apiko-basale Polarität, Zellmorphologie und die Integrität des follikulären Epithels (CONDER ET AL., 2007). Bei Fliegen existiert ein PAK-PIX-GIT Komplex, der während der Muskelentwicklung PAK Lokalisation steuert (BAHRI ET AL., 2009). VLACHOS & HARDEN (2011) zeigten genetische Interaktionen, die darauf hinweisen, dass PAK und Rho1 bei der Aktinpolymerisation entgegengesetzte Funktionen haben. Verlust von PAK resultiert in morphologischen und zytoskelettalen Veränderungen follikulärer Zellen und verstärkter Myosinphosphorylierung in Follikelzellen, die morphologische Veränderungen durchlaufen (VLACHOS & HARDEN, 2011). Das stimmt mit der Situation bei Wirbeltieren überein (SANDERS ET AL., 1999). Die Interaktion von PAK und Scrib ist ebenfalls konserviert. Kurz bevor sich während der Embryonalentwicklung das Epithel an der dorsalen Mittellinie schließt und neue Adhärenzverbindungen etabliert werden (Dorsal Closure), rekrutiert PAK Scrib an die Membran der führenden Epithelzellen (Leading Edge) (BAHRI ET AL., 2010). *Drosophila* PAK3 lokalisiert bei der Wundheilung Rac1-abhängig an der vorderen Membran der führenden Epidermis-Zellen (Leading Edge) (BAEK ET AL., 2012). Ein Verlust von PAK3 führt zum Verlust von F-Aktin in den führenden Zellen und zu Defekten bei der Wundheilung (BAEK ET AL., 2012). Im Gegensatz dazu führt ein Verlust von PAK3 zur Bildung von Lamellipodien und F-Aktinanreicherung und induziert Zellmigration

in einem Zellkulturmodell (ASANO ET AL., 2009). *Drosophila* PAK1 und PAK3 kooperieren bei der Fusion von Myoblasten während der Muskelentwicklung im Embryo (DUAN ET AL., 2012). PAK3 spielt in diesem Kontext eine zentrale Rolle bei der Aktinpolymerisation (DUAN ET AL., 2012). *C. elegans* PAK1 beeinflusst die Migration von P-Zellen und distalen Spitzenzellen (Distal Tip Cells, DTCs) (LUCANIC ET AL., 2006; LUCANIC & CHENG, 2008). Auch hier reguliert PAK1 die Migration von DTCs zusammen mit PIX-GIT (LUCANIC & CHENG, 2008). ZHANG ET AL. (2011) zeigten kürzlich, dass PAK1 in einem Mechanotransduktions-Signalweg agiert, der die Reifung von stabilen Hemidesmosomen steuert.

Regulation von Zellzyklus, Proliferation und Apoptose

Humanes PAK1 spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und beeinflusst Proliferation und Apoptose. PAK1 phosphoryliert Polo-like Kinase 1 (Plk1) und Aurora-A, zwei zentrale Zellzyklus-Regulatoren (MAROTO ET AL., 2008; ZHAO ET AL., 2005). Auf diese Weise beeinflusst PAK1 die Reifung von Centrosomen und den Fortgang des Zellzyklus sowie die korrekte Bildung der mitotischen Spindel (MAROTO ET AL., 2008; ZHAO ET AL., 2005). PAK1 aktiviert den Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Signalweg und fördert damit das Überleben und die Proliferation von Zellen. Beispielsweise wird die Aktivierung dieses Signalweges nach Stimulation mit dem Platelet Derived Growth Factor (PDGF) über PAK1 vermittelt (BEESER ET AL., 2005). PAK1 phosphoryliert die Proteinkinase Raf an S338 und beeinflusst Raf-Phosphorylierung an S445 (EDIN & JULIANO, 2005; TRAN & FROST, 2003; TRAN ET AL., 2005). Eine Kinase-inaktive PAK1-Mutante verhindert Raf-Phosphorylierung an S338 in COS7 Zellen (CHAUDHARY ET AL., 2000). Die Phosphorylierung an S338 reguliert die Translokation von Raf-1 an Mitochondrien, wo es wiederum BAD phosphoryliert und so zusätzlich anti-apoptotische Funktion ausübt (JIN ET AL., 2005). Auch PAK3 phosphoryliert Raf-1 (KING ET AL., 1998). PAK1 vermittelt die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt an S473 nach Stimulation mit PDGF (RIAZ ET AL., 2012). Außerdem beeinflusst PAK1 die Aktivierung von NF-kappaB positiv (FRIEDLAND ET AL., 2007; FROST ET AL., 2000). Desweiteren phosphoryliert PAK1 beta-Catenin an S475 und S663 und trägt damit zur Stabilisierung von beta-Catenin und Aktivierung von beta-Catenin-abhängiger Transkription bei (HE & BALDWIN, 2008; HE ET AL., 2012; PARK ET AL., 2012; ZHU ET AL., 2012). PAK1 scheint als Linker zwischen Insulin- und Wnt-Signalweg zu agieren, da mittels Insulinstimulation induzierte beta-Catenin-Phosphorylierung über PAK1 vermittelt wird (SUN ET AL., 2009). Über

beta-Catenin beeinflussen PAK1 und PAK2 beispielsweise die Expression von c-Myc und Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1 (HE ET AL., 2012; ZHOU ET AL., 2011).

Rolle von Typ I PAKs bei der Krebsentstehung

Aufgrund ihrer bedeutenden Funktionen bei der Regulation von Zellmigration, Proliferation, Überleben und Zelltod, wurden zahlreiche Hinweise für eine Rolle von PAK-Proteinen bei der Krebsentstehung gefunden (YE & FIELD, 2012). PAKs fördern beispielsweise Angiogenese und aufgrund der Aktivierung von MAPK- und Met-Rezeptor-Signalwegen adhäsionsunabhängiges Zellwachstum (KIOSSES ET AL., 1999; SHRESTHA ET AL., 2012). ErbB2 Aktivierung oder Überexpression kommt häufig bei Brustkrebs vor (SHALABY ET AL., 1992). Die Transformation durch ErbB2 erfordert funktionelles PAK1 (ARIAS-ROMERO ET AL., 2010). PAK1 spielt darüber hinaus eine Rolle im Östrogen-Rezeptor-Signalweg, der häufig bei Brustkrebs dereguliert ist (BOSTNER ET AL., 2010; KOK ET AL., 2011). Bei Darmkrebs wurde häufig eine Überexpression von PAK1 festgestellt (ZHU ET AL., 2012).

Funktionen von Typ I PAKs im Nervensystem

Oben genannte Mechanismen sind während der Gehirnentwicklung nicht nur für die Migration von Vorläuferzellen von Bedeutung, sondern auch für die Differenzierung von Neuronen und für die Funktion des adulten Gehirns. Stark polarisiertes Wachstum, bei dem Dendriten und Axone ausgebildet werden, erfordert die präzise Regulation von zytoskelettalen Strukturen und Adhäsionskontakten. Für PAK1 wurde im Zusammenhang mit dem Auswachsen des Axons eine Funktion bei der Etablierung von neuronaler Polarität beschrieben (JACOBS ET AL., 2007). Generell spielt PAK1 eine Rolle beim Auswachsen von Neuriten und deren Extension (DANIELS ET AL., 1998; MARLER ET AL., 2005). Die Regulation von PAK1 kann in diesem Kontext durch Src, das GTPase-aktivierende Protein (GAP) Noma-GAP oder die GEFs betaPIX und Alsin erfolgen (ROBLES ET AL., 2005; ROSÁRIO ET AL., 2007; TUDOR ET AL., 2005; ZA ET AL., 2006). Laminin-, Netrin-1- und Semaphorin-3A-induzierte Modulation von axonalen Wachstumskegeln wird über PAK1 vermittelt (AIZAWA ET AL., 2001; SANTIAGO-MEDINA ET AL., 2013; SHEKARABI ET AL., 2005). Neuriten-Wachstum scheint darüber hinaus auch PIX-abhängig von PAK3 beeinflusst zu werden (COBOS ET AL., 2007; OBERMEIER ET AL., 1998). Das hauptsächlich

im Gehirn exprimierte Adhäsionsmolekül Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM) bindet PAK1 und stimuliert dessen Aktivität (LI & GUAN, 2004).

Die PAK-abhängige Regulation von axonalem Wachstum ist in *C. elegans* und *Drosophila* konserviert. Netrin-abhängige axonale Wegfindung wird in *C. elegans* über PAK1 und MAX-2 vermittelt (LUCANIC ET AL., 2006). Bei Fliegen ist der Mechanismus der PAK-abhängigen axonalen Wegfindung gut untersucht. PAK steuert die Wegfindung von Photorezeptoraxonen in einem Signalweg, der von dem GEF Trio, Rac und dem SH2/SH3-Adapterprotein Dock (Nck in Vertebraten) aktiviert wird (HING ET AL., 1999; NEWSOME ET AL., 2000). Der gleiche Dock-Rac-PAK-Komplex vermittelt die repulsive Wirkung von Robo und Slit bei der axonalen Wegfindung im embryonalen Nervensystem (FAN ET AL., 2003). Ebenso verwenden olfaktorische Neurone diesen Mechanismus, um korrekte Projektionen in die Antennalloben zu bilden, was auf eine weitreichende Verbreitung dieses Mechanismus hinweist (ANG ET AL., 2003). *Drosophila* DSCAM reguliert axonale Wegfindung in Embryonen ebenfalls über Dock und PAK (SCHMUCKER ET AL., 2000).

PAK1 reguliert die Initiierung, Morphologie, Dichte und Anzahl von dendritischen Fortsätzen (Dendritic Spines), sowie Synapsenmorphologie im Gehirn (HAYASHI ET AL., 2004, 2007). PAK1 und PAK3 Knock-out Mäuse zeigen reduzierte synaptische Plastizität (ASRAR ET AL., 2009; MENG ET AL., 2005). Reduktion der Kinaseaktivität von PAK1 oder PAK3 oder Überexpression verursachen Veränderungen in der Dendritenmorphologie bzw. -anzahl und verringerte synaptische Plastizität in hippocampalen Neuronen (BODA ET AL., 2004; KREIS ET AL., 2007; ZHANG ET AL., 2005). Die Effekte der beiden PAK-Proteine sind jedoch unterschiedlich. Während eine Reduktion von PAK1 die Dendritenmorphologie nicht beeinflusst, resultiert die Reduktion von PAK3 in der vermehrten Ausbildung von unreifen Dendriten in Kulturen von hippocampalen Schnitten (BODA ET AL., 2008). Die Überexpression von PAK1 führt zu kleineren Dendriten, hingegen ruft die Überexpression von PAK3 keine Effekte hervor (BODA ET AL., 2008). Die Überexpression von PAK1 rettet den durch PAK3-Reduktion hervorgerufenen Dendritenphänotyp (BODA ET AL., 2008). Der Doppel-Knock-out von PAK1 und PAK3 führt zu kleineren Gehirnen mit stark vereinfachter Dendritenstruktur und Verlust von postnatalem Gehirnwachstum (HUANG ET AL., 2011). Die Lokalisation von PAK1 und PAK3 wurde in Dendriten nachgewiesen (CHEN ET AL., 2007; HAYASHI ET AL., 2004; PENZES ET AL., 2003; REX ET AL., 2007). Als ein möglicher Lokalisationsmechanismus für PAKs in Dendriten wurde eine vom Gerüstprotein Shank vermittelte Rekrutierung

des PIX-PAK-Komplexes vorgeschlagen (KIM ET AL., 2003; KREIS & BARNIER, 2009; PARK ET AL., 2003).

PAK1 und PAK3 wurden mehrfach mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Huntington in Verbindung gebracht (Übersicht in: (MA ET AL., 2012)). Unter anderem interagiert PAK3 mit dem Amyloid Vorläuferprotein (Amyloid Precursor Protein, APP) und PAK1 mit Huntingtin, wodurch neurotoxische Effekte verstärkt werden können (LUO ET AL., 2008; MCPHIE ET AL., 2003; NGUYEN ET AL., 2008). Darüber hinaus können bestimmte Mutationen in PAK3 beim Menschen mentale Retardierung hervorrufen (KREIS & BARNIER, 2009; MA ET AL., 2012). Dies stimmt überein mit gestörter Dendritenmorphologie und -dichte und verringerter Lernfähigkeit bei Verlust von PAK3 (KREIS ET AL., 2007; MENG ET AL., 2005). Darüber hinaus steht damit in Einklang, dass PAK3 die synaptische Signalübertragung in einem Komplex mit Nck2 beeinflusst (THÉVENOT ET AL., 2011). Bei *Drosophila* beeinflusst PAK3 die Funktion und Morphologie von Synapsen (OZDOWSKI ET AL., 2011).

1.1.4 Zelluläre und entwicklungsbiologische Funktionen von Typ II PAKs und ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten

Regulation von Migration und Adhäsion

Wie Typ I PAKs spielen auch Typ II PAKs eine Rolle bei der Regulation des Aktinzytoskeletts. PAK4 reguliert die Bildung von Filopodien und die Auflösung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten, letzteres wahrscheinlich über Phosphorylierung von GEF-H1 (ABO ET AL., 1998; QU ET AL., 2001; CALLOW ET AL., 2005). Aktiviertes PAK5 kann Filopodienbildung induzieren (DAN ET AL., 2002). Es sind Substrate für Typ II PAKs bekannt, über die sie das Aktinzytoskelett beeinflussen können. PAK4 verstärkt Aktin-Polymerisation über LimK1 auf zwei verschiedene Arten. Einerseits phosphoryliert und aktiviert PAK4 LimK1 direkt und stimuliert dadurch Cofilin-Phosphorylierung (DAN ET AL., 2001). Darüber hinaus inhibiert PAK4 Slingshot, eine LimK1 und Cofilin Phosphatase, und stimuliert dadurch Cofilin-Phosphorylierung indirekt (SOOSAIRAJAH ET AL., 2005). DGCRL ist ein PAK4-bindendes Protein, dass die PAK4-vermittelte Aktivierung von LimK1 noch verstärken kann (LI ET AL., 2010a).

Die PAK4 bzw. PAK5 Substrate p120-Catenin und β 5-Integrin ermöglichen die Regulation von Zell-Adhäsion (LI ET AL., 2010b; WONG ET AL., 2010). Die Phosphorylierung von β 5-Integrin an S759 und S762 ist notwendig für PAK4-induzierte Zellmigration (LI

ET AL., 2010b). Die Aktivierung der Met Rezeptortyrosinkinase (RTK) durch den Hepatocyte Growth Factor (HGF) induziert Zellmigration (PALIOURAS ET AL., 2009). PAK4 bindet das Hauptsubstrat des Met-Rezeptors, das Gerüstprotein Grb2-Associated Binder (Gab1), und vermittelt die Met-induzierte Zellmigration und Invasion (PALIOURAS ET AL., 2009). Überexpression von PAK4 stört sowohl Tight Junction Bildung bei 16HBE Zellen als auch die apiko-basale Polarität von iMMECs, einer murinen Zelllinie, die als Modell für Brustdrüsen genutzt wird (LIU ET AL., 2010; WALLACE ET AL., 2010). Der Verlust von PAK4 führt bei Knock-out Mäusen zu einem Verlust von Adhärenzverbindungen (TIAN ET AL., 2011). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde für PAK4 eine Rolle bei adhäsionsunabhängigem Wachstum von Fibroblasten beschrieben (QU ET AL., 2001).

Auch Funktionen von Typ II PAKs sind evolutionär konserviert. PAK5, das *Xenopus* PAK4 Ortholog, ist an der Regulation des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts beteiligt und beeinflusst Cadherin-abhängige Zelladhäsion während der Entwicklung von *Xenopus* (CAU ET AL., 2001; FAURE ET AL., 2005). Das *Drosophila* Typ II PAK Mbt beeinflusst Aktinpolymerisation über das *Drosophila* Cofilin Ortholog Twinstar. Mbt-Aktivität führt zu erhöhter Phosphorylierung von Twinstar (MENZEL ET AL., 2007). Mbt bindet und phosphoryliert LimK, stimuliert dadurch jedoch die Phosphorylierung von Twinstar nur schwach (MENZEL ET AL., 2007). Darüber hinaus zeigt das hypomorphe *mbt*-Allel *mbt^{P3}* mit dem Nullallel *D-LimK²* nur eine schwache genetische Interaktion (MENZEL ET AL., 2007). Diese Ergebnisse stellen eine Funktion der LimK als Haupteffektor von Typ II PAK-Aktivität bei *Drosophila* in Frage. Mbt reguliert zudem Cadherin-vermittelte Adhäsion, indem es die Stabilität von Adhärenzverbindungen beeinflusst (MENZEL ET AL., 2008).

Regulation von Proliferation und Überleben

Typ II PAKs regulieren den Zellzyklus und die mitotische Spindel. Ein Verlust von PAK4 beeinträchtigt den Abbau von p21 und verzögert damit den Ablauf des Zellzyklus (NEKRASOVA & MINDEN, 2011). PAK4 phosphoryliert die GTPase Ran, welche an der mitotischen Spindel lokalisiert (BOMPARD ET AL., 2010). PAK4 reguliert auch die Positionierung und Verankerung der mitotischen Spindel in HeLa-Zellen (BOMPARD ET AL., 2013). Ein weiteres Substrat für PAK4 und PAK5 ist c-Raf-1 (CAMMARANO ET AL., 2005; WU ET AL., 2008). PAK4-Expression in primären Fibroblasten führt zu vorzeitiger

Seneszenz, die über c-Raf-1 vermittelt wird (CAMMARANO ET AL., 2005). PAK5 phosphoryliert c-Raf-1 und reguliert dadurch c-Raf-1-Lokalisation an Mitochondrien (WU ET AL., 2008). Außerdem phosphoryliert PAK4 ebenso wie PAK1 S675 von beta-Catenin und stimuliert dadurch Tcf/Lef-abhängige Transkription (LI ET AL., 2012). PAK4 und PAK5 fördern das Überleben von Zellen auch unmittelbar durch Phosphorylierung des pro-apoptischen Proteins BAD (COTTERET ET AL., 2003; GNESUTTA ET AL., 2001). PAK4 verhindert außerdem die Aktivierung von Caspase 8 über den DISC-Komplex nach Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges (GNESUTTA & MINDEN, 2003).

Bedeutung von Typ II PAKs für die Krebsentstehung

Ihren zellulären Funktionen entsprechend spielen Typ II PAKs eine Rolle bei der Krebsentstehung. Sie beeinflussen die Proliferation und Migration von Zellen verschiedener Krebszelllinien (Übersicht in: (MINDEN, 2012)). Die Überexpression von wildtypischem PAK4 induziert bei Mäusen Tumore (LIU ET AL., 2008). Darüber hinaus sind Typ II PAKs häufig in Tumoren überexprimiert. Erhöhte PAK4 Proteinmengen wurden bei Magen-, Leber-, Brust- und Eierstockkrebs festgestellt (AHN ET AL., 2011; LIU ET AL., 2008; SIU ET AL., 2010). PAK5 Überexpression wurde in Darmkrebszelllinien beschrieben, PAK6 Überexpression in Proben von Prostata-Tumoren (GONG ET AL., 2009; KAUR ET AL., 2008). Interessanterweise sind im Gegensatz zu anderen Onkogenen, wie zum Beispiel der kleinen GTPase Ras, in der Regel keine aktivierenden Mutationen von Typ II PAKs mit Tumoren assoziiert, sondern eine Überexpression. PAK6, welches ein hohes Expressionsniveau in Testis und Prostata zeigt, bindet als Ko-Faktor an den Androgenrezeptor und reguliert darüber die Transkription von Zielgenen (LEE ET AL., 2002; SCHRANTZ ET AL., 2004; YANG ET AL., 2001).

Rolle von Typ II PAKs im Nervensystem

Typ II PAKs sind weiterhin wichtig für die Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems. PAK4 wird vorwiegend während der Entwicklung exprimiert und ist in adulten Geweben nur in geringen Mengen vorhanden. Die Deletion von PAK4 in Mäusen führt zu starker Beeinträchtigung der Angiogenese und embryonaler Lethalität (QU ET AL., 2003). Der Verlust von PAK4 verursacht außerdem Fehlentwicklungen des

Herzens und des Gehirns (QU ET AL., 2003). Die Fehlbildung im Herzen ist auf Veränderungen des Aktinzytoskeletts in der Herzmuskulatur zurückzuführen (NEKRASOVA & MINDEN, 2012). Die Untersuchung konditionaler PAK4 Knock-out Mäuse zeigte einen Verlust von Adhärenzverbindungen im Gehirn und eine Verringerung der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen (TIAN ET AL., 2011). Im Gegensatz zu PAK4 sind PAK5 und PAK6 im adulten Gehirn stark exprimiert (DAN ET AL., 2002; LEE ET AL., 2002). Doppel-Knock-out Mäuse für PAK5 und PAK6 sind lebensfähig und zeigen Defizite beim Lern- und Erinnerungsvermögen (NEKRASOVA ET AL., 2008). Es gibt Hinweise darauf, dass Typ II PAK-Proteine an Prozessen beteiligt sind, die ausschlaggebend für synaptische Plastizität sind. PAK5 phosphoryliert Pacsin1 und Synaptojanin1, zwei Proteine, die an der Endozytose und am Recycling von Neurotransmittern beteiligt sind (STROCHLIC ET AL., 2012). GEFT ist ein GEF, das im Gehirn, und dort besonders stark im Hippocampus, exprimiert wird und die Ausbildung von Dendriten fördert. PAK5 wird downstream von GEFT benötigt, um das Wachstum von Dendriten zu ermöglichen (BRYAN ET AL., 2004).

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Typ II PAKs mittlerweile mit neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass PAK5 die Proteinkinase MARK inhibiert, die Tau phosphoryliert und damit zu dessen Trennung von Mikrotubuli führt. Dies ist ein frühes Ereignis während der Neurodegeneration bei Alzheimer (MATENIA ET AL., 2005).

Auch bei Invertebraten sind Typ II PAKs für die Entwicklung des Nervensystems von Bedeutung. Bei *Drosophila* lokalisiert das Typ II PAK Mbt an Adhärenzverbindungen in Photorezeptorzellen und reguliert deren Morphogenese während der Augenentwicklung (SCHNEEBERGER & RAABE, 2003). In diesem Kontext agiert Mbt, wie PAK4, als Downstream-Effektor von Cdc42 und kooperiert mit dem LimK-Signalweg (SCHNEEBERGER & RAABE, 2003; MENZEL ET AL., 2007). Mbt-Aktivierung in Neuronen führt während der Augenentwicklung zu vollständiger Desorganisation des Aktinzytoskeletts (MENZEL ET AL., 2007). Darüber hinaus zeigen Mbt Nullmutanten, wie PAK4 Knock-out Mäuse, Defekte in der Gehirnentwicklung (MELZIG ET AL., 1998). Der Verlust von Mbt führt zu einer Verkleinerung des Gehirns, die hauptsächlich auf eine verringerte Neuronenzahl im Pilzkörperneuropil, einem Zentrum für olfaktorisches Lernen, zurückzuführen ist (MELZIG ET AL., 1998). Die Ursache für die verringerte Neuronenzahl in der *mbt*-Mutante war bislang ungeklärt.

1.2 Entwicklung des zentralen Nervensystems von *Drosophila melanogaster*

Das Gehirn von *Drosophila melanogaster* ist ein hochkomplexes Organ, das aus etwa hunderttausend Neuronen besteht (VENKEN ET AL., 2011). Das *Drosophila* Gehirn besitzt somit deutlich weniger Neurone als das menschliche Gehirn. Es enthält jedoch eine vergleichbare Anzahl neuronaler Zelltypen, die untereinander in vielschichtigen neuronalen Kreisläufen verschaltet sind, sensorische Informationen prozessieren und komplexe Verhaltensantworten generieren (VENKEN ET AL., 2011). Das zentrale Nervensystem der adulten Fliege gliedert sich in das Supraösophageal-, das Subösophageal- und das Ventralganglion (REICHERT & BOYAN, 1997). Das Supraösophagealganglion bildet das eigentliche Gehirn, das aus dem Zentralhirn mit seinen verschiedenen Neuropilen und den optischen Loben besteht. Zu den Neuropilen zählen die Antennalloben, die Pilzkörper, die Pars intercerebralis, die lateralen akzessorischen Loben und der Zentralkomplex (REICHERT & BOYAN, 1997). Das larvale Gehirn besteht aus zwei Hemisphären und dem Ventralganglion, das in thorakale und abdominale Segmente unterteilt wird. Die optischen Loben liegen zunächst an der basalen Oberfläche der Hemisphären und bedecken in späteren Larvenstadien die laterale Oberfläche der Hemisphären (HARTENSTEIN, 1993).

Das Nervensystem von *Drosophila melanogaster* wird durch Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen, sogenannten Neuroblasten, generiert. Neuroblasten werden während der Embryonalentwicklung im procephalischen und ventralen Neuroektoderm mittels lateraler Inhibition spezifiziert (Abb. 1.2A). Dabei schränken die neurogenen Gene des Notch Signalweges die Expression der proneuralen Gene des Achaete-Scute-Komplexes zunehmend ein (Übersicht in: (SKEATH & THOR, 2003; URBACH & TECHNAU, 2004)). In den Embryonalstadien 8 bis 11 delaminieren diese so spezifizierten Neuroblasten vom Neuroektoderm und beginnen daraufhin zu proliferieren (SKEATH & THOR, 2003; URBACH & TECHNAU, 2004) (Abb. 1.2A). Das ventrale Neuroektoderm bildet die Neuroblasten, die das Ventralganglion generieren. Das procephalische Neuroektoderm bringt die Neuroblasten hervor, die das Gehirn generieren (HARTENSTEIN, 1993). Jeder Neuroblast erwirbt eine eigene Identität, die durch die Position und den Zeitpunkt der Delamination bestimmt wird und sich in der Kombination der von ihm exprimierten Gene und der Bildung einer spezifischen neuronalen Zelllinie äußert (BOSSING ET AL., 1996; BROADUS ET AL., 1995; DOE, 1992; DOE & TECHNAU, 1993; SCHMIDT ET AL., 1997; URBACH & TECHNAU, 2003).

Die apiko-basale Polarität der neuroektodermalen Zellen bleibt in Neuroblasten erhalten. Sie teilen sich entlang der apiko-basalen Achse und durchlaufen asymmetrische Teilungen, wie sie typisch für Stammzellen sind (Abb. 1.2B). Dabei entsteht ein großer, sich selbst regenerierender Neuroblast mit einer großen Proliferationskapazität und eine kleinere Ganglionmutterzelle (ganglion mother cell, GMC). Die GMC durchläuft nur eine einzige Teilung, bei der zwei Neurone oder Gliazellen generiert werden. Das unterschiedliche Zellschicksal der beiden Tochterzellen resultiert aus der Segregation verschiedener Proteinkomplexe in die beiden Tochterzellen bei der Teilung (Übersichten in: (KNOBLICH, 2008, 2010) (Abb. 1.2B). Der Bazooka (Baz, in Vertebraten: PAR3)-PAR6-aPKC-Komplex bestimmt den apikalen Pol der Zelle und reguliert die basale Anreicherung von Zellschicksal-Determinanten wie Numb, Prospero (Pros) und Brain Tumor (Brat), die in der GMC Proliferation unterdrücken und Differenzierung fördern. Numb, Pros und Brat werden über zwei Adapterproteine, Partner of Numb (PON) und Miranda am basalen Zellkortex lokalisiert. Der basalen Anreicherung von Determinanten während der Zellteilung liegt asymmetrische Aktivierung von aPKC zugrunde. Während der Interphase bilden PAR6, aPKC und das zytoskelettale Protein Lgl (Lethal (2) giant larvae) einen Komplex. Zu Beginn der Mitose phosphoryliert AuroraA PAR6 und aktiviert damit aPKC (WIRTZ-PEITZ ET AL., 2008; YAMANAKA ET AL., 2003). aPKC phosphoryliert Lgl, das daraufhin den Komplex verlässt und durch PAR3 ersetzt wird. PAR3 fungiert als Adapter für Numb, das nun von aPKC phosphoryliert werden kann. Numb Phosphorylierung durch aPKC verhindert Numb Lokalisation am apikalen Zellpol, vermutlich indem die Interaktion von Numb mit Phospholipiden gestört wird (SMITH ET AL., 2007; WIRTZ-PEITZ ET AL., 2008). Auf ähnliche Weise reguliert aPKC auch die Lokalisation von Miranda (ATWOOD & PREHODA, 2009). Numb inhibiert den Notch-Signalweg und wirkt somit auf neuronale Differenzierung hin (LE BORGNE ET AL., 2005). Brat wirkt mit seiner Funktion als translationaler Repressor beispielsweise von Myc ebenfalls als Differenzierungsfaktor (HARRIS ET AL., 2011). Pros ist ein Transkriptionsfaktor, der im Neuroblast aufgrund seiner Membranassoziation nicht aktiv ist, in der GMC dann aber in den Zellkern wandert und die Transkription von Zellzyklusgenen inhibiert und neurogene Gene aktiviert (CHOKSI ET AL., 2006; SOUTHALL & BRAND, 2009). Ein weiterer apikaler Proteinkomplex ist notwendig, um die mitotische Spindel entlang der apiko-basalen Achse zu orientieren, damit die basalen Determinanten in die GMC segregiert werden. Diese Aufgabe erfüllt ein Komplex bestehend aus den Proteinen Pins, G α i und Mushroom body defective (Mud, in Vertebraten: NuMA). Dieser Proteinkomplex wird über Baz und das Adapter-Protein Inscuteable (Insc) am apikalen Zellkortex

verankert (SCHAEFER ET AL., 2000, 2001; YU ET AL., 2000). Pins wird mithilfe von Insc und G α i an die apikale Membran rekrutiert (NIPPER ET AL., 2007; SCHAEFER ET AL., 2000). Die Bindung von G α i an Pins ermöglicht außerdem die Bindung von Mud an Pins (BOWMAN ET AL., 2006; IZUMI ET AL., 2006; SILLER ET AL., 2006). Die Regulation der Spindelorientierung erfolgt dann möglicherweise durch eine Interaktion von Mud mit astralen Mikrotubuli (BOWMAN ET AL., 2006). Die Orientierung der mitotischen Spindel wird außerdem parallel über das Adapter-Protein Discs large (Dlg) und das an den Plus-Enden von Mikrotubuli lokalisierte Motorprotein Kinesin heavy chain 73 (Khc-73) reguliert (SIEGRIST & DOE, 2005). Die mitotische Spindel interagiert über Khc-73, das an astralen Mikrotubuli lokalisiert, mit am Kortex verankertem Dlg und wird dadurch entlang der apiko-basalen Polarität ausgerichtet (SIEGRIST & DOE, 2005). Über diesen Mechanismus induziert die mitotische Spindel die kortikale Anreicherung von Pins (SIEGRIST & DOE, 2005). Die Aktivierung dieses Signalweges erfolgt durch AuroraA-vermittelte Phosphorylierung von Pins (JOHNSTON ET AL., 2009).

Während der Neurogenese von *Drosophila* gliedert sich die Proliferation von Neuroblasten im Zentralhirn und im Ventralganglion in zwei Phasen. Während der ersten Proliferationsphase, die nach der Delamination beginnt und mit der Embryogenese endet, wird das embryonale und larvale Nervensystem gebildet. Der größte Teil des adulten Nervensystems wird hingegen während einer zweiten Proliferationsphase in der Larval- und Pupalentwicklung generiert. Entsprechend proliferieren die meisten Neuroblasten bis zum Ende der Embryogenese (Stadium 16) und treten dann in Quieszenz, ein nicht proliferatives, aber reversibles Stadium, ein (TRUMAN & BATE, 1988). Die Neuroblasten der abdominalen Segmente des Ventralganglions dagegen werden größtenteils am Ende der Embryogenese mittels Apoptose eliminiert (Abb. 1.2C) (ABRAMS ET AL., 1993; PETERSON ET AL., 2002; WHITE ET AL., 1994). In jungen Larven treten die Neuroblasten der thorakalen Segmente und des Procephalons wieder in den Zellzyklus ein und proliferieren linienabhängig bis in späte Larvenstadien. Neuroblasten beenden ihre proliferative Phase entweder durch terminale Differenzierung oder Apoptose (MAURANGE ET AL., 2008; TSUJI ET AL., 2008). Der Eintritt in die Quieszenz ist nicht nur durch die Einstellung der Proliferation, sondern auch durch bestimmte morphologische Veränderungen gekennzeichnet. Die Neuroblasten verringern vor Eintritt in die Quieszenz ihre Zellgröße und bilden einen Fortsatz in das Neuropil aus (TSUJI ET AL., 2008). Vor dem Wiedereintritt in den Zellzyklus nehmen Neuroblasten erneut an Zellgröße zu und bilden den Fortsatz zurück (CHELL & BRAND, 2010; TSUJI ET AL., 2008). Das

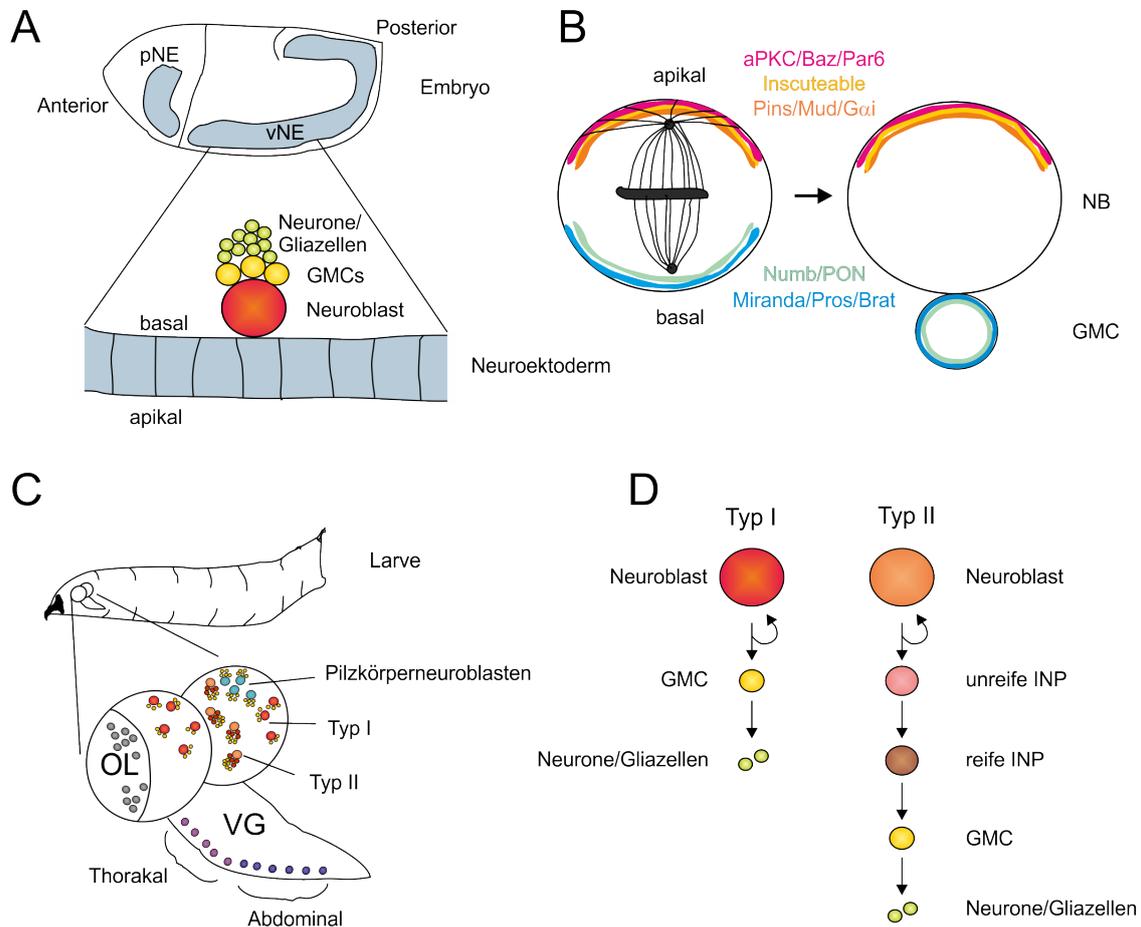


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung von Neuroblastendelamination, asymmetrischer Zellteilung und Neuroblastentypen während der Gehirnentwicklung von *Drosophila melanogaster*. (A) Neuroblasten delaminieren vom ventralen und procephalischen Neuroektoderm im Embryo und behalten die apiko-basale Polarität der neuroepithelialen Zellen. (B) Apikale und basale Proteinkomplexe segregieren bei der asymmetrischen Zellteilung jeweils in eine der beiden unterschiedlichen Tochterzellen. (C) Das Gehirn einer *Drosophila* Larve enthält verschiedene Neuroblastentypen. Die meisten Neuroblasten in den beiden Hemisphären zählen zu den Typ I Neuroblasten. Dorsomedial liegen in jeder Hemisphäre acht Typ II Neuroblasten. Im dorsalen Bereich liegen die vier Pilzkörperneuroblasten. Darüber hinaus existieren Neuroblasten in den thorakalen und abdominalen Segmenten des Ventralganglions sowie in den optischen Loben. (D) Teilungsmodi von Typ I und Typ II Neuroblasten. GMC: Ganglionmutterzelle, INP: intermediäre neurale Vorläuferzelle, NB: Neuroblast, OL: optische Loben, pNE: procephalisches Neuroektoderm, VG: Ventralganglion, vNE: ventrales Neuroektoderm, Verändert nach (HOMEM & KNOBLICH, 2012).

Wachstum der Neuroblasten und damit der Wiedereintritt von Neuroblasten in den Zellzyklus in jungen Larven wird über den Insulin-Signalweg gesteuert und ist abhängig vom Ernährungszustand der Larve (BRITTON & EDGAR, 1998; CHELL & BRAND, 2010; SOUSA-NUNES ET AL., 2011). Die Insulin-Abhängigkeit der Neuroblasten-Proliferation ist nur während einer sensiblen Phase im ersten Larvenstadium gegeben (BRITTON & EDGAR, 1998). Später wird der Insulin-Signalweg nicht mehr über den Insulinrezeptor aktiviert, sondern über Alk. Damit ist das Wachstum des Nervensystems, nachdem es einmal aktiviert worden ist, unabhängig von der Nahrungsaufnahme (CHENG ET AL., 2011). Alk wird von dem Liganden Jelly Belly aktiviert, der seinerseits von Gliazellen sezerniert wird (CHENG ET AL., 2011).

Die optischen Loben werden von neuroepithelialen Zellen generiert, die sich nach dem Schlüpfen des ersten Larvenstadiums symmetrisch teilen und damit die äußeren und inneren Proliferationszentren generieren (Übersicht in (EGGER ET AL., 2011)). Die neuroepithelialen Zellen der Proliferationszentren nehmen ab dem frühen dritten Larvenstadium nach und nach die Identität von Neuroblasten an und generieren Neurone mittels asymmetrischen Teilungen (EGGER ET AL., 2011). Der Übergang von Neuroepithelzellen zu Neuroblasten wird über den Notch-Signalweg reguliert (EGGER ET AL., 2011). Die Proliferationsphase der neuroepithelialen Zellen wird wie bei Neuroblasten des Zentralhirns über den Insulin-Signalweg reguliert und ist damit ernährungsabhängig (LANET ET AL., 2013). Sobald die Transition von neuroepithelialen Zellen zu Neuroblasten initiiert worden ist, erfolgt die Proliferation unabhängig vom Ernährungszustand der Larven (LANET ET AL., 2013).

Anhand ihres Proliferationsverhaltens werden verschiedene Typen von Neuroblasten im Zentralhirn von *Drosophila* unterschieden (Abb. 1.2C, D). Der größte Teil der Neuroblastenpopulation wird zu den Typ I Neuroblasten gezählt: Sie proliferieren nach oben beschriebenen Muster, d.h. sie generieren bei jeder Teilung einen Neuroblasten und eine GMC und durchlaufen beide Proliferationsphasen, unterbrochen von einer Phase der Quieszenz. Im dorsomedialen Bereich des sich entwickelnden Fliegengehirns existiert eine kleine Population von je acht Typ II Neuroblasten pro Hemisphäre, deren Proliferationsmuster sich grundlegend von demjenigen der Typ I Neuroblasten unterscheidet. Typ II Neuroblasten generieren bei jeder Teilung eine intermediäre Vorläuferzelle (Intermediate Neural Progenitor, INP), die ein zwar begrenztes, aber deutlich höheres Proliferationspotential als eine GMC besitzt (BELLO ET AL., 2008; BOONE & DOE, 2008; BOWMAN ET AL., 2008). Nach einem Reifungsprozess proliferieren diese INPs für

eine begrenzte Zeit wie Typ I Neuroblasten und generieren dabei eine INP und eine GMC. Im Vergleich zu Typ I Neuroblasten sind die Linien von Typ II Neuroblasten daher wesentlich größer. Das Typ II Proliferationsmuster ähnelt dem von neuronalen Stammzellen in Vertebraten, weshalb Typ II Neuroblasten ein interessantes Modellsystem darstellen (KNOBLICH, 2008). Typ I und Typ II Neuroblasten unterscheiden sich auch molekular in der Expression von Transkriptionsfaktoren. Während Typ I Neuroblasten *Deadpan* (*Dpn*), *Asense* (*Ase*) und *Pros* exprimieren, zeigen Typ II Neuroblasten nur *Dpn*-Expression (BELLO ET AL., 2008; BOONE & DOE, 2008; BOWMAN ET AL., 2008). Die von Typ II Neuroblasten generierten INPs exprimieren jedoch wie Typ I Neuroblasten *Dpn*, *Ase* und *Pros* (BAYRAKTAR ET AL., 2010; BELLO ET AL., 2008; BOONE & DOE, 2008; BOWMAN ET AL., 2008).

Eine dritte Gruppe von Neuroblasten bilden die vier dorsalen Pilzkörperneuroblasten in jeder Hemisphäre. Sie generieren den Pilzkörper, ein wichtiges Zentrum für olfaktorisches Lernen und Erinnerung im Fliegenhirn (DAVIS, 2011; HEISENBERG, 2003). Auch sie zeigen einen ungewöhnlichen Proliferationsmodus, da sie zwar wie Typ I Neuroblasten immer nur einen Neuroblast und eine GMC generieren, jedoch von der Delamination bis in späte Puppenstadien durchgehend proliferieren und keine Quieszenz zeigen. Auch sie generieren deshalb sehr große Linien (ITO & HOTTA, 1992; KUNZ ET AL., 2012). Für circa 90% aller Neuroblastenlinien im *Drosophila* Gehirn wurde mittlerweile eine klonale Analyse durchgeführt (ITO ET AL., 2013; YU ET AL., 2013). Noch immer sind jedoch die Linien der Pilzkörperneuroblasten die einzigen Neuroblastenlinien im *Drosophila* Gehirn, die von der Delamination im Embryo bis in den Imago detailliert charakterisiert sind. Aufgrund ihrer Lage im Gehirn und der Expression einer charakteristischen Kombination der Transkriptionsfaktoren *dachshund* (*dac*), *eyeless* (*ey*) und *Retinal homeobox* (*Rx*) können Pilzkörperneuroblasten individuell angesprochen werden (KUNZ ET AL., 2012). Die von Pilzkörperneuroblasten sequentiell generierten Neuronsubklassen (Kenyonzellen) bilden abhängig vom Zeitpunkt ihrer Geburt ein charakteristisches Projektionsmuster aus, anhand dessen sie identifiziert werden können (ITO ET AL., 1997; LEE ET AL., 1999; STRAUSFELD ET AL., 2003; TANAKA ET AL., 2008). Somit stellen Pilzkörperneuroblasten ein ideales Modellsystem dar, um Neuroblasten und ihr Proliferationsverhalten während der kompletten Gehirnentwicklung zu untersuchen.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Der Verlust von Mbt in der Nullmutante *mbt^{P1}* führt zu einem verkleinerten Gehirn im Vergleich zum Wildtyp. Dabei sind nicht alle Neuropile des adulten Gehirns im gleichen Ausmaß betroffen. Die stärkste Verkleinerung zeigen die Pilzkörper (MELZIG ET AL., 1998). Die verringerte Größe des Pilzkörpers ist auf eine verringerte Anzahl an Neuronen zurückzuführen (MELZIG ET AL., 1998). Dieser Verringerung der Neuronenanzahl in *mbt^{P1}* Gehirnen können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Es könnte eine Beeinträchtigung der Spezifizierung von Neuroblasten, ihrer Proliferation oder ihres Überlebens vorliegen. Zudem könnte die Proliferation oder das Überleben von GMCs gestört sein. Eine weitere Möglichkeit wäre neuronaler Zelltod.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob Mbt in Neuroblasten vorhanden ist, wo es in der Zelle lokalisiert und wie die subzelluläre Lokalisation reguliert wird. Ausgehend davon sollten die Neuroblasten in *mbt^{P1}* Gehirnen näher charakterisiert werden. Konkrete Fragestellungen waren eine mögliche Rolle von Mbt bei der asymmetrischen Zellteilung von Neuroblasten und Veränderungen im Zytoskelett. Darüber hinaus sollten mögliche Effekte von *mbt^{P1}* auf Neuroblastenproliferation und Apoptose analysiert werden. Weitere Ziele waren die Identifikation von Signalwegen, an deren Regulation Mbt möglicherweise beteiligt ist, sowie die Identifizierung von Downstream-Effektoren, die weitere Hinweise auf von Mbt beeinflusste Prozesse geben können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Enzyme

Wenn nicht anders angegeben wurden Verbrauchsmaterial von den Firmen Biozym, Eppendorf, Greiner und Sarstedt, Chemikalien von den Firmen Applichem, Biorad, Roche, Roth und Sigma und Enzyme von NEB bezogen.

3.1.2 Reagenzien

Reagenz	Verwendung	Hersteller	Endkonzentration
Antipain	Protease Inhibitor	Applichem	5 µg/ml
Aprotinin	Protease Inhibitor	Roth	10 µg/ml
Complete, Mini	Protease Inhibitor Cocktail	Roche	1x
Leupeptin	Protease Inhibitor	Applichem	5 µg/ml
Pepstatin A	Protease Inhibitor	Roche	0,7 µg/ml
Phalloidin-Rhodamin	Aktinfärbung	Sigma	1:30
PhosSTOP	Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche	1x
PMSF	Protease Inhibitor	Sigma	0,2 µg/ml
PolyFect	Transfektionsreagenz	Qiagen	-
Protein-G-Agarose	Immunpräzipitation	Roche	-

3.1.3 Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin®Extract II	Macherey-Nagel
Plasmid Mini-Prep	Qiagen
Plasmid Midi-Prep	Qiagen
Plasmid Maxi-Prep	Qiagen
QuikChange site-directed Mutagenesis	Stratagene

3.1.4 Lösungen und Puffer

Angegeben sind immer Endkonzentrationen, abgesehen von Natriumphosphat-Puffer und PLP.

Apfelsaftplatten

23%	Apfelsaft
2,54% (w/v)	Saccharose
2,3% (w/v)	Agar

Äquilibrierungspuffer 2D PAGE

50 mM	Tris HCl pH 8,8
6 M	Harnstoff
30% (v/v)	Glycerin (99%)
2%	SDS
0,002%	Bromphenolblau

Carnoy-Lösung

60%	Ethanol abs.
30%	Chloroform
10%	Essigsäure

Fixierlösung Elektronenmikroskopie

75%	Sörensen-Puffer
6,25% (v/v)	Glutaraldehyd (Applichem, EM-Grade)

3 Material und Methoden

Lysepuffer für 2D-Gele

8 M	Harnstoff
2%	CHAPS

Lysepuffer für HEK293-Zellen

25 mM	Tris pH 7,5
150 mM	Natriumchlorid
2 mM	EDTA
2 mM	EGTA
10%	Glycerol
0,1%	Nonidet P-40

Natriumphosphat-Puffer für PLP, pH 6,8

643 µl	0,5 M Di-Natriumhydrogenphosphat
537 µl	0,5 M Natrium-Dihydrogenphosphat

PBS (1x)

137 mM	Natriumchlorid
2,7 mM	Kaliumchlorid
8,1 mM	Di-Natriumhydrogenphosphat
1,8 mM	Kalium-Dihydrogenphosphat

PLP

720 µl	frisch angesetztes 8% PFA in 1x PBS
200 µl	0,1 M Natriumperiodat
1 ml	0,15 M DL-Lysin
120 µl	Natriumphosphat-Puffer, pH 6,8

SDS-Ladepuffer (4x)

70 mM	Tris pH 6,8
40%	Glycerin
5%	β-Mercaptoethanol
3%	SDS
0,05%	Bromphenolblau

3 Material und Methoden

SDS-PAGE Laufpuffer (1x)

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,1%	SDS

SDS-PAGE Sammelgelpuffer (4x)

0,5 M	Tris pH 6,8
0,4%	SDS

SDS-PAGE Trenngelpuffer (4x)

1,5 M	Tris pH 8,8
0,4%	SDS

Sörensen-Puffer

13 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
87 mM	Di-Natriumhydrogenphosphat

TBE-Puffer

0,89 M	Tris
0,89 M	Borsäure
4%	EDTA pH 8,0

TBST (1x)

10 mM	Tris pH 7,6
150 mM	Natriumchlorid
0,05%	Tween 20

Western-Blot Transferpuffer

25 mM	Tris pH 8,3
150 mM	Glycin
10%	Methanol

3.1.5 Primer

Primer	Sequenz	Verwendung
gArm_S561A_for	cttgcaacctgcagcaacgttccgcgatagccaccactgggtcacagcagcc	Mutagenese
gArm_S561A_rev	ggctgctgtgaaccagtgggtggctatcgcggaacgttgctgcaagggtgcaag	Mutagenese
gArm_S561E_for	cttgcaacctgcagcaacgttccgagatagccaccactgggtcacagcagcc	Mutagenese
gArm_S561E_rev	ggctgctgtgaaccagtgggtggctatctcggaacgttgctgcaagggtgcaag	Mutagenese
gArm_F1	gatgccggtggaatgcag	Sequenzierung

3.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Klon	Verdünnung	Anwendung	Kat.Nr.	Herkunft
α -Tubulin	Maus	DM1A	1:500	IF	T9026	Sigma
aPKC	Kaninchen	polyklonal	1:1000	IF	sc-216	Santa Cruz
Armadillo	Maus	N2.7A1	1:100	IF	-	DSHB
Canoe	Kaninchen	polyklonal	1:50 - 1:500	IF	-	D. Yamamoto, Sendai, Japan
Dac	Maus	mAbdac2-3	1:250	IF	-	DSHB
Dmef2	Kaninchen	polyklonal	1:750	IF	-	H. T. Nguyen, Erlangen
Dpn	Meerschweinchen	polyklonal	1:1000	IF	-	J. Skeath, St. Louis, MO, USA
Erk 2 (C-14)	Kaninchen	polyklonal	1:50	IF	sc-154	Santa Cruz
Fasciclin II	Maus	1D4	1:10	IF	-	DSHB
Fibrillarin	Maus	38F3	1:50	IF	sc-56676	Santa Cruz
Fibrillarin	Maus	72B9	1:20	IF	-	U. Scheer, Würzburg
Fibrillarin	Kaninchen	polyklonal	1:50 - 1:500	IF	5821	Abcam
γ -Tubulin	Maus	GTU-88	1:100	IF	T 6557	Sigma
GFP	Huhn	polyklonal	1:1000	IF	AB16901	Millipore
GFP	Kaninchen	polyklonal	1:1000	IF	A6455	MoBiTec/Molecular Probes
HA-Tag	Maus	F-7	1:1000	WB	sc-7392	Santa Cruz
Mbt	Kaninchen	polyklonal	1:675	IF	-	Eurogentec
Miranda	Maus	81-0	1:20	IF	-	F. Matsuzaki, Kobe, Japan
Mud	Maus	#57	1:50	IF	-	F. Matsuzaki
Mud	Kaninchen	polyklonal	1:200	IF	-	F. Matsuzaki

Antigen	Spezies	Klon	Verdünnung	Anwendung	Kat.Nr.	Herkunft
Myc-Tag	Maus	9E10	1:2000	WB	sc-40	Santa Cruz
Notch extrazelluläre Domäne	Maus	C458.2H	1:10	IF	-	DSHB
Notch intrazelluläre Domäne	Maus	C17.9C6	1:10	IF	-	DSHB
Numb	Meerschweinchen	polyklonal	1:1000	IF	-	J. Skeath
Phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen	D9E	1:75	IF	4060	Cell Signaling
Phospho-Histon 3 (Ser10)	Kaninchen	polyklonal	1:2500	IF	06-570	Millipore-Upstate
Phospho-ERK1/2 (p44/42 MAPK) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	D13.14.4E	1:150	IF	4370	Cell Signaling/NEB
Pins	Ratte	polyklonal	1:500	IF	-	F. Matsuzaki

Sekundäre Antikörper

Spezifität	Konjugat	Spezies	Verdünnung	Bestellnr.	Herkunft
Huhn	DyLight488	Ziege	1:200	103-485-155	Dianova
Kaninchen	Cy3	Ziege	1:150 - 1:200	111-165-144	Dianova
Kaninchen	Cy5	Ziege	1:150 - 1:200	111-175-144	Dianova
Maus	A488	Ziege	1:150 - 1:250	A-11001	Molecular Probes
Maus	Cy3	Ziege	1:150	115-166-003	Dianova
Maus	Cy5	Esel	1:150	715-175-151	Dianova
Maus	HRP	Ziege	1:2500	NA931	Amersham/GE Healthcare
Meerschweinchen	Cy3	Ziege	1:100	106-166-003	Dianova

3.1.7 Fliegenstämme

Mutationen

Die Sortierung der Fliegenstämme ist alphabetisch nach dem Name des untersuchten Gens bzw. der Defizienz.

Genotyp	Stocknr.	Herkunft	Verwendung/Bemerkung
FM7A	41	T. Raabe	Balancer
FM7A; TM2/TM6C, <i>Sb</i> ¹	45	B. Mentzel	Balancer
<i>arm</i> ³ , <i>w</i> P{neoFRT}19A / FM7a	11	für diese Arbeit auf <i>FRT19A</i> Chromosom rekombiniert, von BL 8558	Nullallel
<i>y</i> ¹ , <i>arm</i> ⁴ , <i>w</i> [*] P{neoFRT}19A / FM7a	16	für diese Arbeit auf <i>FRT19A</i> Chromosom rekombiniert, von BL 616	Nullallel
<i>Cdc42</i> ³ / FM7, <i>Act-GFP</i> JM3	151	R. Fehon, Chicago, IL, USA	Nullallel, Mbt-Lokalisation
<i>Cdc42</i> ⁴ / FM7, <i>Act-GFP</i> JM3	152	R. Fehon	Nullallel, Mbt-Lokalisation
CyO / <i>sna</i> ^{Sco}	43	B. Mentzel	Balancer
CyO / <i>sna</i> ^{Sco} ; MKRS / TM6B, <i>Tb</i> ¹	44	B. Mentzel	Balancer
<i>y</i> ¹ , <i>w</i> [*] ; CyO, <i>Ubi-GFP</i> / In(2LR)Gla, <i>wg</i> ^{Gla-1} <i>Bc</i> ¹	49	BL 4888	Balancer
<i>Df(3L)H99</i> , <i>kni</i> ^{ri-1} , <i>p</i> ^p / TM6B, <i>Tb</i>	8	umbalanciert von BL 1576	Blockierung von Apoptose
<i>dm</i> ⁴ / FM7, <i>Act-GFP</i> JM3	70	P. Gallant, Würzburg	Myc Nullallel
<i>dm</i> ⁴ , <i>mbt</i> ^{P1} / FM7, <i>Act-GFP</i> JM3	71	für diese Arbeit zusammenrekombiniert	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P1}
<i>dm</i> ⁴ , <i>mbt</i> ^{P3} / FM7, <i>Act-GFP</i> JM3	72	für diese Arbeit zusammenrekombiniert	Interaktion mit <i>mbt</i> ^{P3}

Genotyp	Stocknr.	Herkunft	Verwendung/Bemerkung
<i>y, w; ey-flp, gl-lacZ; P{neoFRT}82B, Dp110^{1C1}/TM6B, Tb, y⁺</i>	99	E. Hafen/H. Stocker, Zürich, Schweiz	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>y, w; Sp/CyO; P{neoFRT}82B, InR³⁰⁴/TM6B, Tb, y⁺</i>	92	E. Hafen/H. Stocker	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>w¹¹¹⁸, mbt^{P1}</i>	112	T. Raabe	Nullallel von <i>mbt</i>
<i>w¹¹¹⁸, mbt^{P1}, P{neoFRT}19A</i>	133	T. Raabe	MARCM-Analyse von <i>mbt^{P1}</i>
<i>w¹¹¹⁸, mbt^{P3}</i>	113	T. Raabe	Hypomorph von <i>mbt</i>
<i>y; Mkp3^{KG09109}/TM3, Ser, Sb</i>	-	BL 15160	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>P{neoFRT}82B, Mtl^{delta}/TM6B, Ubi-GFP, w⁺</i>	147	umbalanciert von BL 6676	Nullallel, Mbt-Lokalisation
<i>y, w; Sp/CyO, y⁺; PKB¹/TM6B, Tb</i>	102	E. Hafen/H. Stocker	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>y, w; P{neoFRT}40A, PTEN^{117.1}/CyO</i>	93	E. Hafen/H. Stocker	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>P{FRT(w^{hs})}2A, Rac1¹¹¹/TM6B, Ubi-GFP, w⁺</i>	145	umbalanciert von BL 6674	Nullallel, Mbt-Lokalisation
<i>Rac2^{delta}, ry⁵⁰⁶</i>	143	BL 6675	Nullallel, Mbt-Lokalisation
<i>rl¹</i>	A-163	T. Raabe	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>sev¹⁴, Ras^{e1B}/TM3, Sb</i>	-	BL 5689	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>sev¹⁴, Ras^{e2F}/TM3, Sb</i>	-	BL 5690	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>y, w; Sp/CyO; P{neoFRT}82BRheb^{2D1}/TM6B, Tb, y⁺</i>	97	E. Hafen/H. Stocker	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>y, w; Sp/CyO; P{neoFRT}82BRheb^{3M2}/TM6B, Tb, y⁺</i>	101	E. Hafen/H. Stocker	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>

Genotyp	Stocknr.	Herkunft	Verwendung/Bemerkung
<i>y, w; P{neoFRT}80B, dS6K^{83w2}/TM6B, Tb</i>	91	E. Hafen/H. Stocker	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>Sos^{R49} / CyO</i>	-	T. Raabe	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>TM3, Sb/TM6B, Tb</i>	42	B. Mentzel	Balancer
<i>y, w; Tor^{deltaP}/CyO; MKRS/TM6B, Tb, y⁺</i>	95	E. Hafen/H. Stocker	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>y, w; ey-flp, gl-lacZ; P{neoFRT}82B, Tsc1^{2X1}/TM6B, Tb, y⁺</i>	100	E. Hafen/H. Stocker	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>w; P{neoFRT}80B, Tsc2⁵⁶/TM6B, Tb,</i>	90	E. Hafen/H. Stocker	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>w; P{neoFRT}80B, 3L55/TM3, Sb, Ser, y⁺ (=Tsc2)</i>	98	E. Hafen/H. Stocker	Interaktion mit <i>mbt^{P1}</i>
<i>w¹¹¹⁸</i>	160	T. Raabe	Kontrolle

Transgene

Genotyp	Stocknr.	Herkunft	Verwendung/Bemerkung
<i>y¹, Mvas-int.DmZH-2A, w[*]; M3xP3-RFP.attPZH-86Fb</i>	-	BL 24749	Insertion der genomischen Armadillo-Konstrukte
<i>y, w; P{arm.attB}86Fb</i>	21	T. Valenta/K. Basler, Zürich, Schweiz	genomisches Armadillo-Konstrukt inseriert bei 86Fb
<i>y, w; P{arm^{S561A}.attB}86Fb/TM6B, Tb</i>	23	hergestellt für diese Arbeit	genomisches Armadillo-Konstrukt inseriert bei 86Fb

Genotyp	Stocknr.	Herkunft	Verwendung/Bemerkung
<i>y, w; P{arm^{S561E}.attB}86Fb/TM6B, Tb</i>	24	hergestellt für diese Arbeit	genomisches Armadillo-Konstrukt inseriert bei 86Fb
<i>y, w; P{arm^{S561/688A}.attB}86Fb/TM6B, Tb</i>	27	hergestellt für diese Arbeit	genomisches Armadillo-Konstrukt inseriert bei 86Fb
<i>y, w; P{arm^{S561/688E}.attB}86Fb/TM6B, Tb</i>	28	hergestellt für diese Arbeit	genomisches Armadillo-Konstrukt inseriert bei 86Fb
<i>y, w; P{arm^{S688A}.attB}86Fb/TM6B, Tb</i>	26	hergestellt für diese Arbeit	genomisches Armadillo-Konstrukt inseriert bei 86Fb
<i>y, w; P{arm^{S688E}.attB}86Fb/TM6B, Tb</i>	26	hergestellt für diese Arbeit	genomisches Armadillo-Konstrukt inseriert bei 86Fb
<i>Ubi-P-Myc::Cdc42</i>	-	R. Fehon	Rettungskonstrukt, Mbt-Lokalisation
<i>P{GawB}ey^{OK107}</i>	-	C. O'Kane, Cambridge, UK	Pilzkörper-spezifischer Treiber
<i>P{neoFRT}19A</i>	85	BL 1744	MARCM
<i>UAS-foxo::GFP</i>	89	A. Teleman, Heidelberg	Reporter für Insulin-Signalweg-Aktivierung
<i>hsFLP, tubP-GAL80, P{neoFRT}19A; UAS-mCD8::GFP</i>	109	BL 5134	MARCM
<i>UAS-mbt T67/TM6B, Tb</i>	116	T. Raabe/D. Schneeberger	Rettungskonstrukt
<i>UAS-mbt^{T525A} T2/CyO</i>	119	T. Raabe/D. Schneeberger	Rettungskonstrukt, Kinase-inaktiv
<i>UAS-mbt^{T525A} T4/CyO</i>	114	T. Raabe/D. Schneeberger	Rettungskonstrukt, Kinase-inaktiv
<i>UAS-mbt^{K397M} T5/CyO</i>	120	T. Raabe/D. Schneeberger	Rettungskonstrukt, Kinase-inaktiv
<i>UAS-mbt^{K397M} T13(2)/CyO</i>	121	T. Raabe/D. Schneeberger	Rettungskonstrukt, Kinase-inaktiv
<i>UAS-mbt^{H19,22L} T3/TM6B, Tb</i>	117	T. Raabe/D. Schneeberger	Rettungskonstrukt, PBD-bindungsdefizient

Genotyp	Stocknr.	Herkunft	Verwendung/Bemerkung
<i>UAS-mbt</i> ^{H19,22L} T10/TM6B, <i>Tb</i>	118	T. Raabe/D. Schneeberger	Rettungskonstrukt, PBD- bindungsdefizient
<i>UAS-mbt</i> ^{S492E,S520N} T3/CyO	115	T. Raabe/D. Schneeberger	Rettungskonstrukt, konstitutiv aktiv
<i>UAS-mbt</i> ^{S492E,S520N} T8b/CyO	122	T. Raabe/D. Schneeberger	Rettungskonstrukt, konstitutiv aktiv
<i>P{GawB}Mz1060</i>	-	J. Urban, Mainz	Neuroblasten-spezifischer Treiber
<i>UAS-p35</i>	-	R. Urbach, Mainz	Blockierung von Apoptose
<i>worniu-GAL4/CyO</i>	156	C. Doe, Eugene, OR, USA	Neuroblasten-spezifischer Treiber

3.2 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden wie in SAMBROOK ET AL. (1989) beschrieben durchgeführt. Für Klonierungen wurde der *E. coli* Stamm DH5 α , für DNS Gele TBE-Puffer verwendet.

3.2.1 Klonierung der Armadillo-Transgene und Herstellung transgener Fliegen

Für die Herstellung genomischer Armadillo-Transgene mit Punktmutationen für Phosphorylierungsstellen wurde ein wildtypisches, genomisches Armadillo-Konstrukt (T. Valenta, K. Basler) als Vorlage benutzt. Das Template lag in zwei Teilen in TOPO-Vektoren vor, sowie als komplettes Transgen in einem pattB Vektor (BISCHOF ET AL., 2007). Ein TOPO-Vektor enthielt den N-terminalen Teil des Armadillo-Konstruktes, der zweite den C-terminalen Teil. Die beiden von Mbt phosphorylierten Serine liegen im C-terminalen Teil. Dieser wurde als KpnI/NotI-Fragment ausgeschnitten und in einen pBluescript II SK (-) Vektor kloniert. Aus diesem Konstrukt wurde mit SpeI/SmaI ein 1,8 kb Fragment ausgeschnitten und wiederum in pBluescript II SK (-) subkloniert. In diesem Konstrukt wurden nach dem QuikChange Protokoll (Stratagene) die Codons S561 und S688 zu Alanin bzw. Glutamat mutagenisiert. Die mutagenisierten Fragmente wurden mit SpeI/SmaI in das C-terminale Fragment im pBluescript II SK (-) und als KpnI/NotI Fragment in den TOPO-Vektor zurück kloniert. Der C-terminale Teil des wildtypischen Armadillo im pattB-Vektor wurde mit den mutagenisierten Konstrukten als StuI/NotI Fragment ersetzt. Transgene Fliegen wurden von der Firma BestGene (Chino Hills, CA, USA) mittels Injektion von DNS einer Midi- oder Maxi-Präparation hergestellt. Die Armadillo Transgene wurden in den Bloomington Stamm 24749 mit dem Genotyp y^1 *Mvas-int.DmZH-2A w**; *M3xP3-RFP.attPZH-86Fb* injiziert (BISCHOF ET AL., 2007). Um stabile transgene Fliegenlinien zu etablieren, wurden die erhaltenen Fliegen mit dem Balancer-Stamm TM3, *Sb¹* / TM6B, *Tb* gekreuzt. Es wurden Linien mit dem Balancer-Chromosom TM6B etabliert.

3.2.2 Aufzucht von Larven und Puppen definierten Alters

Für Larven definierten Alters wurden mindestens zwei Tage alte Fliegen zur Eiablage für drei bis fünf Stunden auf dünn mit Hefe-Saccharose-Lösung bestrichene Apfelsaft-

platten gesetzt. Die Embryonen wurden mit Wasser in ein Embryonensieb abgespült, gründlich gewaschen und mit einem Pinsel auf eine frische Apfelsaftplatte ohne Hefe transferiert. Embryonen wurden bei Raumtemperatur oder 25°C bis zum Schlüpfen auf der Apfelsaftplatte inkubiert (ca. 22 Stunden). Sofort nach dem Schlüpfen der ersten Larven wurden mit einem Pinsel in 30 Minuten Intervallen frisch geschlüpfte Larven abgesammelt und anschließend auf frische, dick mit Hefe-Saccharose-Lösung bestrichene Platten mit Standardfliegenfutter transferiert. Es wurden 30 bis 40 Larven auf die Fliegenfutterplatten gesetzt. Bei 25°C wurden sie auf den Platten bis zum gewünschten Alter in Stunden nach dem Schlüpfen (Stunden After Larval Hatching, ALH) gehalten. Für Puppen definierten Alters wurden weiße Präpuppen abgesammelt und auf mit Wasser getränktem Filterpapier in Petrischalen bei 25°C bis zum gewünschten Alter in Stunden nach Puppenbildung (Stunden After Puparium Formation, APF) gehalten. Als Kontrolle wurde generell der Genotyp *w¹¹¹⁸* verwendet. Die 36 Stunden alten Larven waren vom Genotyp *UAS-mCD8::GFP, worGAL4/CyO* bzw. *mbt^{P1} UAS-mCD8::GFP, worGAL4/CyO*.

3.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen und konfokale Mikroskopie von larvalen, pupalen und adulten Gehirnen

Larvale, pupale und adulte Gehirne wurden in PBS bei Raumtemperatur präpariert und anschließend mit der Pinzette in frisches PBS in einer 60 Well-Platte (Nunc) auf Eis transferiert. Die Gehirne wurden maximal 20 Minuten in PBS gelagert, bevor sie für 25 Minuten in PLP auf Eis fixiert wurden. Anschließend wurden die Gehirne drei- bis viermal 10 Minuten in PBT mit 0,3 % Triton gewaschen und danach für mindestens 30 Minuten in 5 % NGS in PBT (0,3 % Triton) geblockt. Bei großen Chargen mit mehreren Fixierschritten wurden die Waschschrte zur Synchronisation genutzt. Die Gehirne wurden über Nacht mit dem primären Antikörper in Blocklösung im Kühlraum inkubiert. Nach drei, jeweils mindestens eine Stunde umfassenden, Waschschrten bei Raumtemperatur wurden die Gehirne in den sekundären Antikörper in PBT (0,3 % Triton) überführt und darin über Nacht im Kühlraum inkubiert. Es folgten drei weitere, jeweils mindestens eine Stunde umfassende Waschschrte bei Raumtemperatur und ein erneuter Transfer in frisches PBT mit 0,3 % Triton. Darin wurden die Gehirne im Kühlraum bis zu 14 Tage gelagert. Die Präparate wurden erst kurz vor dem Mikroskopieren in Vectashield H-1000 (Vector Laboratories) eingebettet.

Für Färbungen gegen alpha-Tubulin wurden die Gehirne nach der Präparation bei

Raumtemperatur in PBT mit 0,3 % Triton gelagert und anschließend mit 3,7 % PFA für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben weiterverfahren. Für Phospho-Erk-Färbungen wurden Gehirne auf Eis in PLP präpariert und nach dem Standardprotokoll gefärbt. Aktin wurde mit Phalloidin-Rhodamin gefärbt und in der Verdünnung 1:30 zusammen mit dem sekundären Antikörper zugegeben. Die Präparate wurden an einem inversen Leica SP5 oder Olympus FLUOVIEW 1000 IX 81 Mikroskop aufgenommen. Es wurden ein Olympus UAPON 20x Wasser-Objektiv, ein Leica HC PL APO 20x Öl/Wasser-Objektiv und ein Leica HCX PL APO 40x Öl-Objektiv benutzt. Aufnahmen mit dem 40er Objektiv wurden mit 100 Hz und 1024x1024 Pixel mit einer Pixelgröße von 108,1 nm aufgenommen.

3.2.4 Paraffinschnitte

Paraffinschnitte wurden nach HEISENBERG & BÖHL (1979) angefertigt. Die Fliegen wurden auf Krägen aufgefädelt und auf Eis gelagert. Die Krägen wurden mit Carnoy-Lösung überschichtet und für 4 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Die Fliegen wurden zweimal für 30 Minuten und anschließend einmal für eine Stunde mit Ethanol absolut entwässert. Über Nacht wurden die Fliegen in Methylbenzoat gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Krägen für eine Stunde bei ca. 58°C in einer 1:1 Paraffin-Methylbenzoat-Mischung (w:v) inkubiert und anschließend einparaffiniert. Dafür wurde das flüssige Paraffin achtmal alle 20 Minuten ausgewechselt. Danach wurden die Krägen mit flüssigem Paraffin eingesargt und für 10 bis 20 Minuten zum Erkalten auf Eis gestellt. Über Nacht wurden die Präparate bei 18°C ausgehärtet. Die Paraffinblöcke wurden mit einer Rasierklinge von den Krägen gelöst, auf 70°C warme Metallblöcke aufgeschmolzen, mit einer Rasierklinge zugetrimmt und am Mikrotom in 8 µm dicke Schnitte geschnitten. Für die Mikrotom-Schnitte wurden Objektträger dünn mit Kaiser's Glyceringelatine bestrichen und luftgetrocknet. Darauf wurden einige Tropfen Wasser gegeben, bevor die Objektträger auf einer Wärmeplatte auf 40°C erwärmt wurden. Anschließend wurden die Schnittserien mit Pinsel auf diese Objektträger transferiert. Die Objektträger wurden weitere 5 Sekunden bei 40°C belassen um die Schnitte zu glätten, anschließend wurde das Wasser abgekippt und die Objektträger für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden die Objektträger zweimal für mindestens 30 Minuten bei ca. 58°C in Roti-Histol (Roth) entparaffiniert. Daraufhin wurden die Objektträger in kaltes Xylol gestellt und mit Entellan (Merck) eingedeckelt. Die Präparate wurden mindestens über Nacht lichtgeschützt getrocknet und an einem Leica DM5000B Epifluoreszenzmikroskop

analysiert.

3.2.5 Elektronenmikroskopie

Die Fliegen wurden mit 10 ml Fixierlösung in eine 50 ml Spritze gegeben. Durch mehrfaches Herausziehen des Stempels bei verschlossener Spritze wurde ein Unterdruck erzeugt, um die Luftsäcke im Kopf der Fliegen zu entleeren. Die abgesunkenen Fliegen wurden mit der Fixierlösung in dicht schließende Schnappdeckelgläser transferiert und über Nacht im Kühlschrank fixiert. Die Fixierlösung wurde abgezogen und die Fliegen wurden fünf Mal mit jeweils 5 ml Sörensenpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Fliegen über eine Acetonreihe dehydriert: 15 Minuten in 30 % Aceton, 20 Minuten in 50 % Aceton, 30 Minuten in 75 % Aceton, 45 Minuten in 90 % Aceton und fünfmal je 30 Minuten in 100 % Aceton. Die Lagerung der Fliegen erfolgte in 100 % Aceton im Kühlschrank. Die Fliegen wurden in der Elektronenmikroskopie auf Tischchen aufgeklebt und mit Palladium/Gold bedampft. Aufgenommen wurden die Fliegen mit 200-facher Vergrößerung in der zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie der Universität Würzburg.

3.2.6 Kultur, Transfektion und Lyse von HEK293 Zellen

Humane embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney Cells, HEK293) wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. 6×10^5 Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät und 24 Stunden später mit 2 µg der angegebenen DNS-Konstrukte mit PolyFect (Qiagen) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in PBS geerntet und bei 4°C für 40 Minuten in Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren lysiert.

3.2.7 Immunpräzipitation

Von den Zell-Lysaten wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Gleiche Proteinmengen wurden mit 0,8 µg Myc-Antikörper (9E10) für 30 Minuten inkubiert. Für die Immunpräzipitation wurde den Proben 40 µg Protein-G-Agarose zugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation wurde die Protein-G-Agarose kurz abzentrifugiert, dreimal mit 1 ml Lysepuffer gewaschen, in SDS-Ladepuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.2.8 SDS-PAGE und Western Blot

Die Proteinproben wurden mit diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach U.K. Lämmli aufgetrennt (Lämmli, 1970). Es wurde das Biometra-System mit 7 bis 12 %igen Trenngelen verwendet. Im Sammelgel wurden die Proteine bei 50 V fokussiert und im Trenngel bei 120 bis 200 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine im Semidry-Verfahren (BioRad) auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll, 0,2 µm) geblottet. Die Transferzeit betrug je nach untersuchtem Protein zwischen 80 und 100 Minuten. Die Membran wurde mit 5 % Magermilchpulver in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in 5 % Milchpulver in TBST inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 Minuten wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären, HRP-konjugierten Antikörper in TBST inkubiert und wiederum dreimal gewaschen. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit dem ECL bzw. ECL Plus System nach Herstelleranweisung (GE Healthcare).

3.2.9 2D-Gele

Die 2D-Gel-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Stephanie Pütz durchgeführt. Es wurden Gehirne von wandernden L3 Larven verwendet. Pro Genotyp und Gel wurden circa 100 intakte Gehirne mit vollständigem Ventralganglion in PBS präpariert. Der Anteil von männlichen und weiblichen Gehirnen betrug jeweils circa 50 %. Die Gehirne wurden direkt nach der Präparation mit der Pinzette in 100 µl Lysepuffer, versetzt mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Complete und PhosStop, Roche), transferiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis aufbewahrt. Für die Lyse wurden die Proben sechs Mal jeweils erst 10 Sekunden in ein Ultraschallbad gehalten und anschließend 50 Sekunden auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert und mittels BCA-Assay (Roti-Quant Universal Kit, Roth) quantifiziert. Vor dem Beladen der IPG-Streifen (3-10NL, 18 cm, GE Healthcare) wurden 180 µg Proteinlysate mit Protease-Inhibitoren, IPG-Puffer (pH3-10NL, GE Healthcare, 0,5 % Endkonzentration) und DTT (200 mM Endkonzentration) versetzt und mit DeStreak-Rehydrations-Lösung (GE Healthcare) auf 250 µl Endvolumen aufgefüllt. Die IPG-Streifen wurden über Nacht mit den Proben rehydriert. Folgendes Programm wurde für die isoelektrische Fokussierung verwendet:

Step and Voltage Methode	Spannung (V)	Zeit in h:min
Step-n-Hold	150	2:00
Step-n-Hold	300	2:00
Gradient	500	2:00
Gradient	1000	3:00
Gradient	4000	3:00
Step-n-Hold	6000	6:40

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit einem Ettan IPGphor3 (GE Healthcare) durchgeführt. Nach der Fokussierung wurden die IPG-Streifen 15 Minuten in Äquilibriumspuffer mit 130 mM DTT auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten weitere 15 Minuten Inkubation mit Äquilibriumspuffer mit 280 mM Iodacetamid (GE Healthcare). Die IPG-Streifen wurden auf 10 % SDS-Trenngele gelegt. Ein in Agarosekügelchen immobilisierter Molekulargewichtsmarker wurde ebenfalls auf den Trenngelen aufgebracht. Anschließend wurde die SDS-PAGE wie oben beschrieben durchgeführt bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte. Die Gele wurden anschließend fixiert und gefärbt.

3.2.10 RupBS-Färbung

Die Gele wurden zunächst für 2 Stunden in 30 % Ethanol und 10 % Eisessig fixiert. Anschließend wurden sie zweimal für 30 Minuten in Wasser und weitere zweimal für 30 Minuten in 20 % Ethanol gewaschen. Die Gele wurden über Nacht in Rutheniumbathophenanthroline-disulfonat (RuBPs)-Lösung (0,8 μ M RuBPS in 20 % Ethanol, Armin Baack Bedarf und Technik für Labor und Medizin, Schwerin) gefärbt und für drei Stunden in 10 % Ethanol und 10 % Eisessig entfärbt. Danach wurden die Gele zwei- bis dreimal für 10 Minuten gewässert und mit einer Chemo Cam (Intas) eingescannt. Anschließend wurden differentielle Spots ausgestochen und bei -80°C eingefroren.

3.2.11 Massenspektrometrische Analyse

Die Spots wurden mittels Massenspektroskopie (PMF) analysiert und die S-Spektren mittels Datenbanksuche gegen flybase (Version r5.41, November 2011, <http://flybase.org>) ausgewertet. Die massenspektrometrische Analyse und Auswertung wurde unter der

Leitung von Dr. Jens Pfannstiel von der Serviceeinheit des Life Science Centers der Universität Hohenheim durchgeführt.

3.3 Software und Datenauswertung

Für die Auswertung der konfokalen Aufnahmen wurden die ImageJ Distribution Fiji (SCHINDELIN ET AL., 2012), Leica LAS AF (2.3.5) und Amira 4.0.01 (Mercury Computer Systems) verwendet. Neuroblastendurchmesser wurden mit Fiji bestimmt, indem der größte und der kleinste Durchmesser von Neuroblasten gemessen und daraus ein Mittelwert berechnet wurde.

Die statistische Auswertung wurde mit RStudio 0.95.263 durchgeführt. Für den Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test wurde das Paket „coin“ verwendet, um auch bei Bindungen in den Daten einen exakten p-Wert berechnen zu können.

4 Ergebnisse

4.1 Lokalisation von Mbt in Neuroblasten des Zentralhirns

4.1.1 Mbt zeigt eine Zellzyklus-abhängige, apikale Anreicherung in Neuroblasten

Um eine mögliche Rolle von Mbt während der Gehirnentwicklung zu untersuchen, wurden zunächst Gehirne von wandernden L3 Larven mit einem polyklonalen Antikörper gegen Mbt (SCHNEEBERGER & RAABE, 2003) gefärbt. Die Färbung zeigte ein deutliches apikales Mbt-Signal in Zellen, die anhand einer Ko-Färbung mit dem basalen Marker Miranda als Metaphase-Neuroblasten identifiziert werden konnten (Abb. 4.1A-A₂). Darüber hinaus zeigte die Färbung ein starkes Signal an Strukturen, die wahrscheinlich den inneren und äußeren Proliferationszentren der optischen Loben entsprechen (Daten nicht gezeigt). Entsprechende Färbungen einer Nullmutante, *mbt^{P1}*, wiesen kein Signal in Neuroblasten oder den Proliferationszentren auf, was die Spezifität des Signals und *mbt^{P1}* als Nullmutante bestätigt (Abb. 4.1B-B₂ und (MELZIG ET AL., 1998)). Mbt lokalisiert sowohl in den Proliferationszentren als auch in Neuroblasten an der Zellmembran. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Funktion von Mbt in Neuroblasten des Zentralhirns. Die Rolle von Mbt in den vermutlichen Proliferationszentren der optischen Loben wurde nicht weiter untersucht.

Phospho-Histon H3 ist ein charakteristischer Marker für Chromosomen während der Mitose und ermöglicht die Unterscheidung verschiedener Zellzyklusphasen. Eine Färbung gegen Mbt, Phospho-Histon H3 (PH3) und Miranda zeigte, dass Mbt immer am Zellkortex sitzt, die Verteilung des Mbt Proteins am Kortex jedoch Zellzyklus-abhängig ist (Abb. 4.1C-H). In der Interphase ist die Färbung von Mbt nur schwach und Mbt scheint gleichmäßig am kompletten Zellkortex verteilt zu sein (Abb. 4.1C). Oft ist eine etwas stärkere Färbung in Membranbereichen zu sehen, in denen der Neuroblast an von ihm generierte Ganglionmutterzellen angrenzt (Pfeil in Abb. 4.1D). Diese Mbt-Lokalisation ändert sich in der Prophase nicht (Abb. 4.1E). In der Prometa- und Metaphase war eine starke Anreicherung von Mbt am apikalen Zellkortex zu beobachten (Abb. 4.1F, G). In Anaphasen war wieder eine gleichmäßige Verteilung von Mbt am

4 Ergebnisse

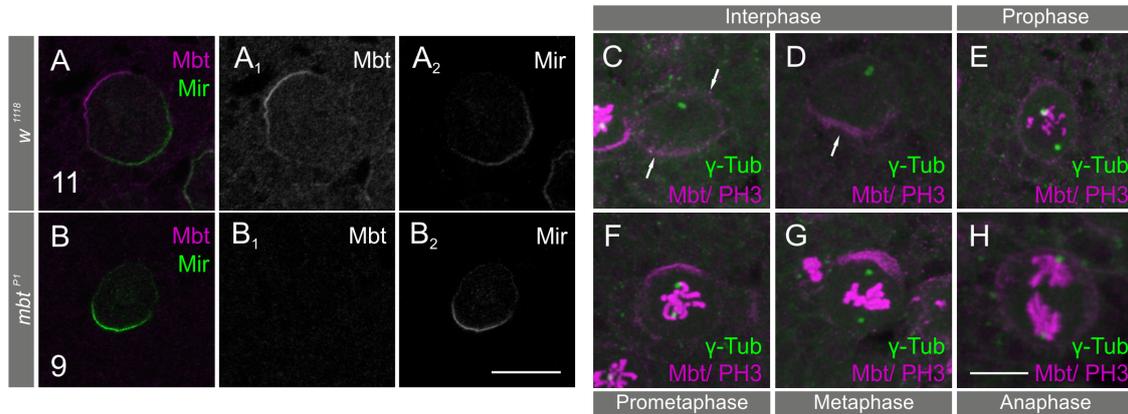


Abbildung 4.1. Die apikale Lokalisation von Mbt in Neuroblasten ist Zellzyklus-abhängig. Gehirne von wandernden L3 Larven der gezeigten Genotypen wurden gegen Mbt und Miranda (Mir) oder Phospho-Histon H3 (PH3), Mbt und γ -Tubulin gefärbt. Gezeigt werden Projektionen von konfokalen Bildern. (A-A₂) Mbt ist in Metaphase-Neuroblasten vorhanden und zeigt eine apikale Anreicherung. (B-B₂) In *mbt^{P1}* Neuroblasten ist mit dem Mbt Antikörper kein Signal detektierbar. (C-H) In der Inter- und Prophase lokalisiert Mbt am kompletten Zellkortex. In der Prometa- und Metaphase bildet Mbt einen Halbmond am apikalen Pol. In der Anaphase ist Mbt wieder am ganzen Kortex zu sehen. Die Zahlen in den einzelnen Bildern geben die Anzahl der analysierten Gehirne wieder. Für die Zellzyklus-abhängige Lokalisation von Mbt wurden 18 Hemisphären analysiert. Maßstab: 10 μ m.

Zellkortex zu sehen (Abb. 4.1H).

Mbt lokalisiert auch in den früheren Larvenstadien L1 und L2 in Neuroblasten und zeigt die charakteristische apikale Anreicherung (Daten nicht gezeigt). Desweiteren zeigt Mbt die apikale Anreicherung auch in embryonalen Neuroblasten (MELZER ET AL., 2013).

4.1.2 Cdc42 reguliert apikale Mbt-Lokalisation

Die Lokalisation von PAK Proteinen wird von kleinen RhoGTPasen gesteuert (ABO ET AL., 1998; MANSER ET AL., 1997; SCHNEEBERGER & RAABE, 2003). RhoGTPasen interagieren mit PAK Proteinen über deren PBD. Die Expression verschiedener *mbt*-Transgene in *mbt^{P1}* Neuroblasten mit der Neuroblasten-spezifischen Treiberlinie *wor-GAL4* zeigte, dass ein wildtypisches Mbt sowie zwei verschiedene Kinase-inaktive Mbt-Proteine (Mbt^{T525A} und Mbt^{K375M}) in mitotischen Neuroblasten am apikalen Zellkortex akkumulierten (Abb. 4.2A-C₂). Die Lokalisation der rekombinanten Proteine ist vergleichbar mit der Lokalisation von endogenem Mbt im Wildtyp und zeigt, dass die Kinase-Aktivität

für die apikale Lokalisation nicht notwendig ist (vgl. Abb. 4.1A-A₂). Eine Mutation der PBD verhindert die Bindung von RhoGTPasen an Mbt (SCHNEEBERGER & RAABE, 2003). Im Vergleich zu Kinase-inaktiven oder wildtypischen Transgenen resultierte die Expression eines Transgens mit mutierter PBD (*mbt*^{H19/22L}) in einer starken zytoplasmatischen Mbt-Färbung (Abb. 4.2D-D₂). Obwohl in diesen Neuroblasten ein schwaches kortikales Mbt-Signal detektiert wurde, war keine apikale Anreicherung mehr sichtbar (Abb. 4.2D-D₂). Die PBD ist folglich auch in Neuroblasten für die apikale Lokalisation von Mbt erforderlich.

In *Drosophila* wurden sechs Gene aus der Gruppe der kleinen RhoGTPasen beschrieben: Rac1, Rac2, Mtl, Cdc42, Rho1 und RhoL (HARDEN ET AL., 1995; HARIHARAN ET AL., 1995; LUO ET AL., 1994; MURPHY & MONTELL, 1996; NEWSOME ET AL., 2000). Cdc42 zeigt in Neuroblasten eine apikale Anreicherung und reguliert die asymmetrische Lokalisation der Zellschicksalsdeterminanten aPKC, PAR6 und Miranda (ATWOOD ET AL., 2007). Zudem interagieren PAK-Proteine vorzugsweise mit Mitgliedern der Rac- und Cdc42-Gruppe (ABO ET AL., 1998; DAN ET AL., 2002; PANDEY ET AL., 2002). Um zu untersuchen mit welchen RhoGTPasen Mbt interagiert, wurden mit einem Myc-Epitop markierte Konstrukte dieser sechs RhoGTPasen und mit einem HA-Epitop markiertes Mbt in HEK293 Zellen ko-exprimiert und anschließend Ko-Immünpräzipitationen durchgeführt. Cdc42 interagierte als einzige der getesteten RhoGTPasen spezifisch mit Mbt (Abb. 4.2E, H. Wecklein). Um zu überprüfen, ob Mbt auch *in vivo* mit Cdc42 interagiert, wurden Mbt-Färbungen von verschiedenen RhoGTPase-Mutanten durchgeführt. Mtl- und Rac2- defiziente Metaphase Neuroblasten zeigten eine mit dem Wildtyp vergleichbare apikale Anreicherung von Mbt (Abb. 4.2F-G₂, vgl. Abb. 4.2A-A₂). Eine Mbt-Färbung von Larvengehirnen einer *Cdc42*-Nullmutante zeigte, dass in *Cdc42*-defizienten Neuroblasten keine apikale Mbt-Anreicherung mehr stattfand (Abb. 4.2H-H₂). Mit der ubiquitären Expression eines wildtypischen *Cdc42*-Transgens konnte die apikale Anreicherung von Mbt wiederhergestellt werden (Abb. 4.2AI-I₂). Gleiche Ergebnisse wurden mit *Cdc42*⁴, einer zweiten *Cdc42*-Nullmutante, erhalten (Daten nicht gezeigt). Bei der Analyse von insgesamt sechs Gehirnen einer Rac1-Nullmutante wurde lediglich ein einziger Metaphase Neuroblast beobachtet, der kein Mbt Signal zeigte (Daten nicht gezeigt). Dies könnte möglicherweise ein sekundärer Effekt sein, da das untersuchte Allel *Rac1*^{I11} bereits in jungen Larvenstadien lethal ist und Neuroblasten zum untersuchten Zeitpunkt wahrscheinlich bereits stark in Mitleidenschaft gezogen sind und nicht mehr normal proliferieren. Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen schliessen, dass die

Lokalisation von Mbt in Neuroblasten von Cdc42 gesteuert wird.

4.2 Charakterisierung von *mbt^{P1}* Neuroblasten

4.2.1 Der Verlust von Mbt beeinflusst asymmetrische Zellteilung nicht

Die starke apikale Anreicherung von Mbt in mitotischen Neuroblasten legt eine Rolle von Mbt bei der Regulation der asymmetrischen Zellteilung nahe. Die asymmetrische Teilung von Neuroblasten wird durch vier große Proteinkomplexe, zwei apikale und zwei basale, gesteuert (KNOBLICH, 2008, 2010). Die beiden apikalen Proteinkomplexe sind der Baz-PAR6-aPKC- und der Pins-G α i-Mud-Komplex, die von dem großen Gerüstprotein Insc am apikalen Pol des Neuroblasten verankert werden. Die beiden basalen Komplexe sind der Numb-PON- und der Miranda-Pros-Brat-Komplex. Die beiden apikalen Proteinkomplexe erfüllen zwei verschiedene Funktionen. Die Proteine des Pins-G α i-Komplexes steuern die Orientierung der mitotischen Spindel entlang der apikobasalen Achse. Damit wird sichergestellt, dass die Proteine des Baz-PAR6-aPKC-Komplexes, die eine wichtige Rolle für die Proliferationsfähigkeit des Neuroblasten spielen, im Neuroblast verbleiben. Die beiden basalen Proteinkomplexe enthalten Proteine, die die Proliferationsfähigkeit der GMCs einschränken und die spätere Differenzierung der Tochterzellen in Neurone regulieren.

Aus jedem Proteinkomplex wurde die Lokalisation repräsentativer Proteine in der Metaphase untersucht. Es wurden Färbungen von aPKC, Pins, Miranda und Numb angefertigt. Färbungen mit einem PON-Antikörper zeigten kein spezifisches Signal. aPKC und Pins ko-lokalisieren im typischen Halbmond-förmigen Muster im Wildtyp und bei *mbt^{P1}* am apikalen Pol (Abb. 4.3A-B₁). Numb und Miranda waren in *mbt^{P1}* Neuroblasten genau wie im Wildtyp gegenüber von aPKC am basalen Pol angereichert (Abb. 4.3C-F). Die Lokalisation der apikalen und basalen Proteinkomplexe wies bei *mbt^{P1}* keine Überlappung auf (Abb. 4.3C-F). Keines der vier untersuchten Proteine zeigte folglich eine von der Kontrolle auffallend abweichende Lokalisation in *mbt^{P1}* Neuroblasten. Die Orientierung der mitotischen Spindel wurde in der Metaphase mithilfe einer γ -Tubulin Färbung von Zentrosomen analysiert. Die Spindelorientierung entlang der apikobasalen Achse zeigte in *mbt^{P1}* Neuroblasten keine auffallenden Veränderungen

4 Ergebnisse

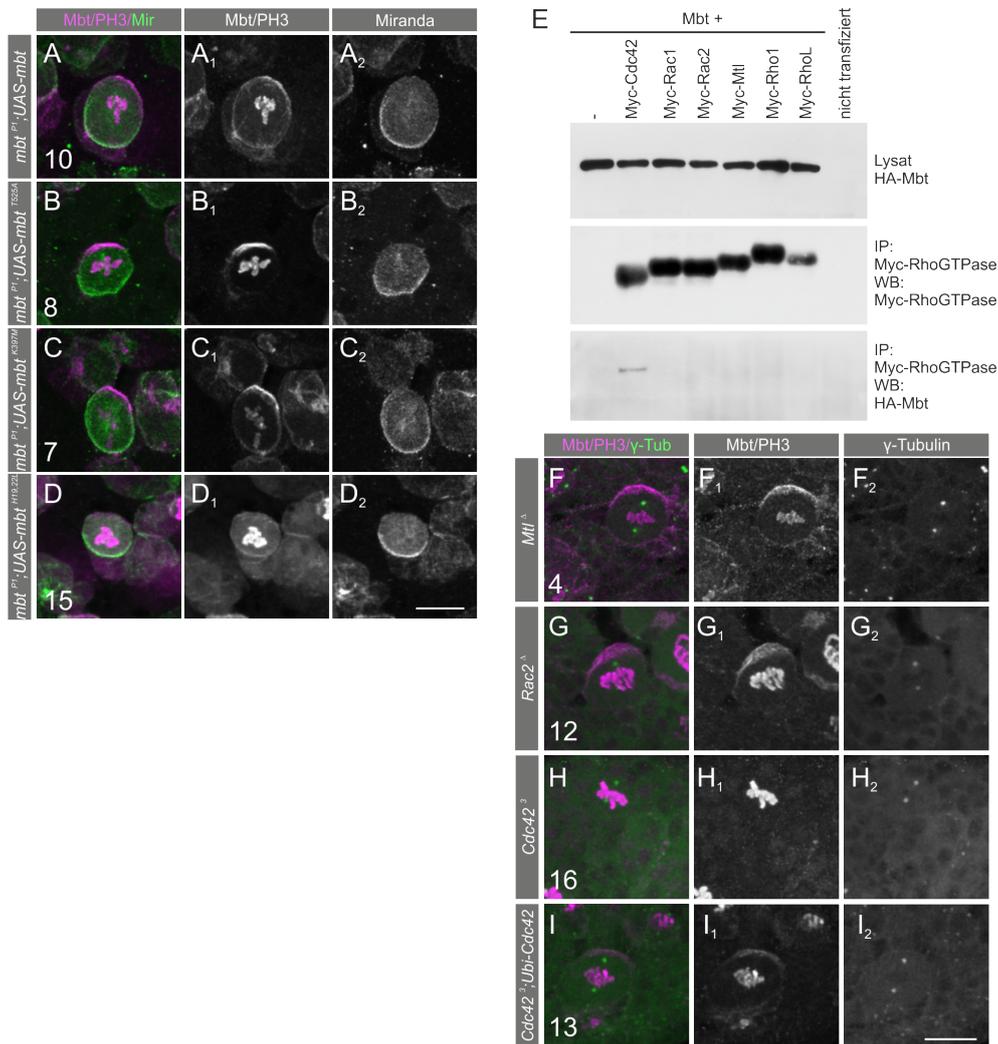


Abbildung 4.2. Die apikale Anreicherung von Mbt wird über Cdc42 reguliert. Larvale Gehirne wurden entweder gegen Mbt, phospho-Histon H3 (PH3) und Miranda (Mir) oder γ -Tubulin gefärbt. Es werden Projektionen von konfokalen Bildern gezeigt. (A-D₂) Die ausgewiesenen Transgene wurden im *mbt*^{P1} Hintergrund mit *wor-GAL4* exprimiert. Bei Expression von *mbt*, *mbt*^{T525A} und *mbt*^{K375M} war eine apikale Anreicherung in der Metaphase zu beobachten. Bei *mbt*^{H19/22L} trat eine starke Färbung im Zytoplasma auf. Eine apikale Anreicherung von Mbt^{H19/22L} wurde nicht detektiert. (E) Mit einem Myc-Epitop markierte Konstrukte der sechs *Drosophila* RhoGTPasen wurden mit einem mit HA-Epitop markiertem Mbt in HEK293 Zellen ko-exprimiert. Anschließend wurde eine Ko-Immunpräzipitation (IP) mit Myc-Antikörpern durchgeführt. Präzipitierte Proteine wurden im Western Blot (WB) mit HA und Myc-Antikörpern nachgewiesen. Mbt präzipitierte selektiv mit Cdc42. (F-I₂) Null-Mutanten verschiedener RhoGTPasen wurden gegen Mbt gefärbt. Mbt akkumulierte apikal in Neuroblasten von *Mtl*^{delta} und *Rac2*^{delta}. In *Cdc42*-Mutanten war kein Mbt-Signal in Neuroblasten detektierbar. Die ubiquitäre Expression eines *Cdc42*-Transgens im *Cdc42*-Nullhintergrund hatte eine apikale Anreicherung von Mbt in Neuroblasten zur Folge. Die Zahlen in den einzelnen Bildern geben die Anzahl der analysierten Gehirne wieder. Maßstab: 10 μ m.

(Abb. 4.3G, H). Auch die Asymmetrie bzgl. der Zellgröße, also die Generierung eines großen Neuroblasten und einer sehr viel kleineren GMC, unterschied sich in *mbt^{P1}* Neuroblasten nicht auffallend vom Wildtyp (Abb. 4.3I, J). Symmetrische Teilungen von Neuroblasten wurden nicht beobachtet.

Mud ist ein weiteres Protein, welches sowohl am apikalen Pol als auch an Zentrosomen lokalisiert. Mud-Lokalisation wurde von zwei unterschiedlichen Antikörpern an Zentrosomen und generell an der Plasmamembran detektiert. Eine apikale Anreicherung von Mud während der Mitose wurde hingegen nicht detektiert. Es wurde folglich ausschließlich die Lokalisation von Mud an Zentrosomen untersucht. Es wurden nur Neuroblasten mit deutlich sichtbarem basalem Miranda-Halbmond analysiert. Die basale Miranda-Anreicherung kennzeichnet Prometa-, Meta- und Anaphasen. Neuroblasten in diesen Phasen besitzen zwei Zentrosomen, so dass mögliche Veränderungen der Mud-Lokalisation in *mbt^{P1}* Neuroblasten an beiden Zentrosomen analysiert werden konnte. Wie im Wildtyp lokalisierte Mud auch in *mbt^{P1}* Neuroblasten immer an beiden Zentrosomen (Abb. 4.3K, L). Sowohl im Wildtyp als auch bei der *mbt^{P1}* Mutante wurde manchmal eine nur sehr schwache Färbung der Zentrosomen beobachtet, die bei der Mutante doppelt so häufig auftrat wie im Wildtyp (Abb. 4.3M, Pfeile; Wildtyp: 9 % der Neuroblasten, *mbt^{P1}*: 18 %, beide Genotypen n = 11 Neuroblasten in sechs Gehirnen). Desweiteren wurde die Lokalisation von Mud in Abhängigkeit von der Mbt-Aktivität getestet. Zu diesem Zweck wurden Transgene kodierend für wildtypisches (*UAS-mbt*), Kinase-inaktives (*UAS-mbt^{K397M}* und *UAS-mbt^{T525A}*) und aktiviertes Mbt (*UAS-mbt^{S492E,S520N}*) im *mbt^{P1}* Hintergrund exprimiert. Während bei der Expression des wildtypischen Konstruktes nur 75 % der untersuchten Neuroblasten zwei gut sichtbare Zentrosomen hatten, waren bei Kinase-inaktivem und aktiviertem Mbt immer zwei deutlich gefärbte Zentrosomen zu erkennen (Abb. 4.3N-P, *UAS-mbt* n = 12 Neuroblasten in fünf Gehirnen, *UAS-mbt^{K397M}* und *UAS-mbt^{T525A}* n = 10 bzw. 12 Neuroblasten in jeweils vier Gehirnen, *UAS-mbt^{S492E,S520N}* n = 11 Neuroblasten in fünf Gehirnen). Die Überexpressionsexperimente weisen darauf hin, dass die Kinaseaktivität von Mbt keinen maßgeblichen Einfluss auf die Lokalisation von Mud hat. Die Überexpression von Mbt-Transgenen resultierte in einer Verstärkung der Mud-Färbung an Zentrosomen 4.3K, N-O. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Mbt-Menge die Menge von Mud an Zentrosomen oder die Größe von Zentrosomen generell beeinflusst. Eine leichte Fehllokalisierung von Mud in *mbt^{P1}* Neuroblasten kann nicht ausgeschlossen werden.

4 Ergebnisse

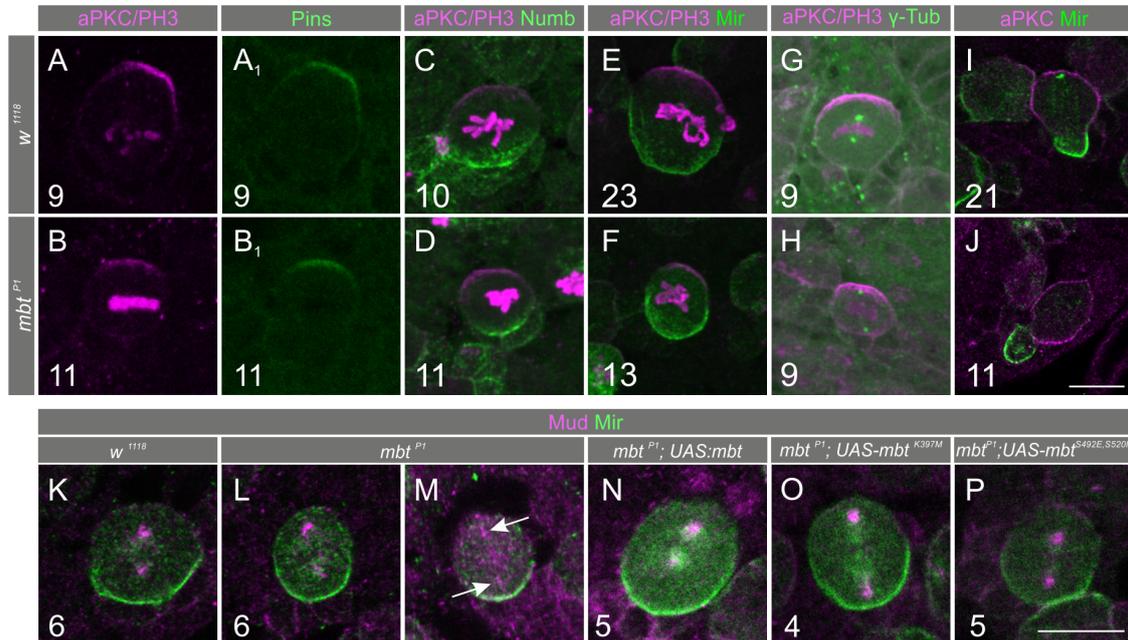


Abbildung 4.3. Verlust von Mbt beeinflusst asymmetrische Zellteilung nicht. Gezeigt werden Projektionen (A-J, M) oder einzelne Ebenen konfokaler Aufnahmen von Gehirnen wandernder L3 Larven, die mit den angegebenen Antikörperkombinationen gefärbt wurden. PH3: phospho-Histon 3, Mir: Miranda, γ-Tub: γ-Tubulin. (A-B₁) aPKC und Pins waren in *w¹¹¹⁸* und *mbt^{P1}* Neuroblasten am apikalen Pol angereichert. (C-F) Numb und Mir zeigten eine Anreicherung am basalen Pol gegenüber von aPKC in *w¹¹¹⁸* und *mbt^{P1}* Neuroblasten. (G, H) Die γ-Tubulin-Färbung zeigte eine Orientierung der mitotischen Spindel entlang der apiko-basalen Achse in beiden Genotypen. (I, J) Telophasen zeigten, dass auch die Teilung von *mbt^{P1}* Neuroblasten zur Bildung einer großen und einer kleinen Tochterzelle führt. (K) Mud lokalisierte in *w¹¹¹⁸* Neuroblasten an beiden Zentrosomen. (L) In den meisten *mbt^{P1}* Neuroblasten war eine deutliche Mud Lokalisation an beiden Zentrosomen erhalten. (M) Selten war nur eine sehr schwache Zentrosomenfärbung zu beobachten (Pfeile). (N-P) Die Expression von *UAS-mbt*, kinase-inaktivem *UAS-mbt^{K397M}* und konstitutiv aktivem *UAS-mbt^{S492E, S520N}* mit *wormiu-GAL4* im *mbt^{P1}* Hintergrund veränderte die Lokalisation von Mud an beiden Zentrosomen nicht. Die Zahlen in den einzelnen Bildern geben die Anzahl der analysierten Gehirne wieder. Maßstab: 10 µm.

Die Segregation des Notch-Inhibitors Numb in GMCs führt zu differentieller Regulation des Notch-Signalweges in Neuroblasten und GMCs (WANG ET AL., 2006). Die basale Lokalisation von Numb zeigte keine Veränderung in *mbt^{P1}* Neuroblasten. Um einen möglichen Einfluss von Mbt auf den Notch-Signalweg in Neuroblasten zu überprüfen, wurden von *mbt^{P1}* Gehirnen Färbungen gegen Notch angefertigt. Eine Färbung der extrazellulären Domäne (NECD) zeigte leichte Zellzyklus-abhängige Veränderungen der Notch-Lokalisation im Wildtyp. In der Interphase war ein deutliches Signal am

Zellkortex sichtbar, das teilweise an den Kontaktstellen von Neuroblast und GMC noch verstärkt war (Abb. 4.4A, A₁, Pfeilspitzen). Darüber hinaus wies die NECD Färbung im Zytoplasma zahlreiche größere und kleinere Punkte auf (Abb. 4.4A, A₁, Pfeile). In mitotischen Neuroblasten fiel eine leichte Anreicherung der NECD um die kondensierten Chromosomen herum auf, die in Interphase Neuroblasten nicht beobachtet worden war (Abb. 4.4B, B₁, offene Pfeilspitzen). Dieses Muster der NECD Lokalisation war bei *mbt^{P1}* Neuroblasten nicht auffallend verändert (Abb. 4.4C-D₁). Auch hier wurden in der Interphase zahlreiche Punkte im Zytoplasma und eine kortikale Anreicherung, sowie in der Metaphase eine Anreicherung um die Chromosomen, beobachtet (Abb. 4.4C-D₁). Die Färbung der intrazellulären Domäne (NICD) ergab ein ähnliches Lokalisationsmuster. In der Interphase waren Punkte im Zytoplasma und eine Anreicherung an der Zellmembran zu sehen, in der Metaphase eine verstärkte Lokalisation in der Peripherie der Chromosomen (Abb. 4.4E-F₁). Auch hier war in *mbt^{P1}* Neuroblasten keine Veränderung festzustellen (Abb. 4.4G-H₁). Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass der grundlegende Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung in *mbt^{P1}* Neuroblasten nicht gestört ist.

4.2.2 Der Verlust von Mbt beeinflusst weder das Zytoskelett, noch das Zytoskelett-assoziierte Protein Armadillo, aber reguliert Canoe-Lokalisation

PAK Proteine wurden als wichtige Regulatoren des Zytoskeletts beschrieben (CHAN & MANSER, 2012; MINDEN, 2012; YE & FIELD, 2012; ZHAO & MANSER, 2012). Um eine potenzielle Funktion von Mbt bei der Regulation des Zytoskeletts von Neuroblasten aufzudecken, wurden *mbt^{P1}* Larvengehirne gegen F-Aktin und α -Tubulin gefärbt. Die Verteilung von F-Aktin und α -Tubulin wurde in verschiedenen Zellzyklusphasen analysiert (Abb. 4.5). Im Wildtyp war F-Aktin während des kompletten Zellzyklus gleichmäßig am Zellkortex lokalisiert (Abb. 4.5A-C₁). Auffallend war eine Anreicherung von F-Aktin im Grenzbereich zwischen Neuroblast und GMC während der Interphase (Abb. 4.5A₁, Pfeil). Die F-Aktinlokalisierung in *mbt^{P1}* Neuroblasten unterschied sich nicht von der bei *w¹¹¹⁸* beobachteten Verteilung (Abb. 4.5D-F₁). Auch die Anreicherung von F-Aktin an der an GMCs angrenzenden Membran in der Interphase wurde in der Mutante beobachtet (Abb. 4.5D-F₁). α -Tubulin zeigte während der Interphase bei *w¹¹¹⁸* eine starke kortikale Lokalisation, bildete aber auch zahlreiche Strukturen im Zytoplasma (Abb. 4.5G, G₁). Während der Mitose lokalisierte α -Tubulin hauptsächlich an der mitotischen

4 Ergebnisse

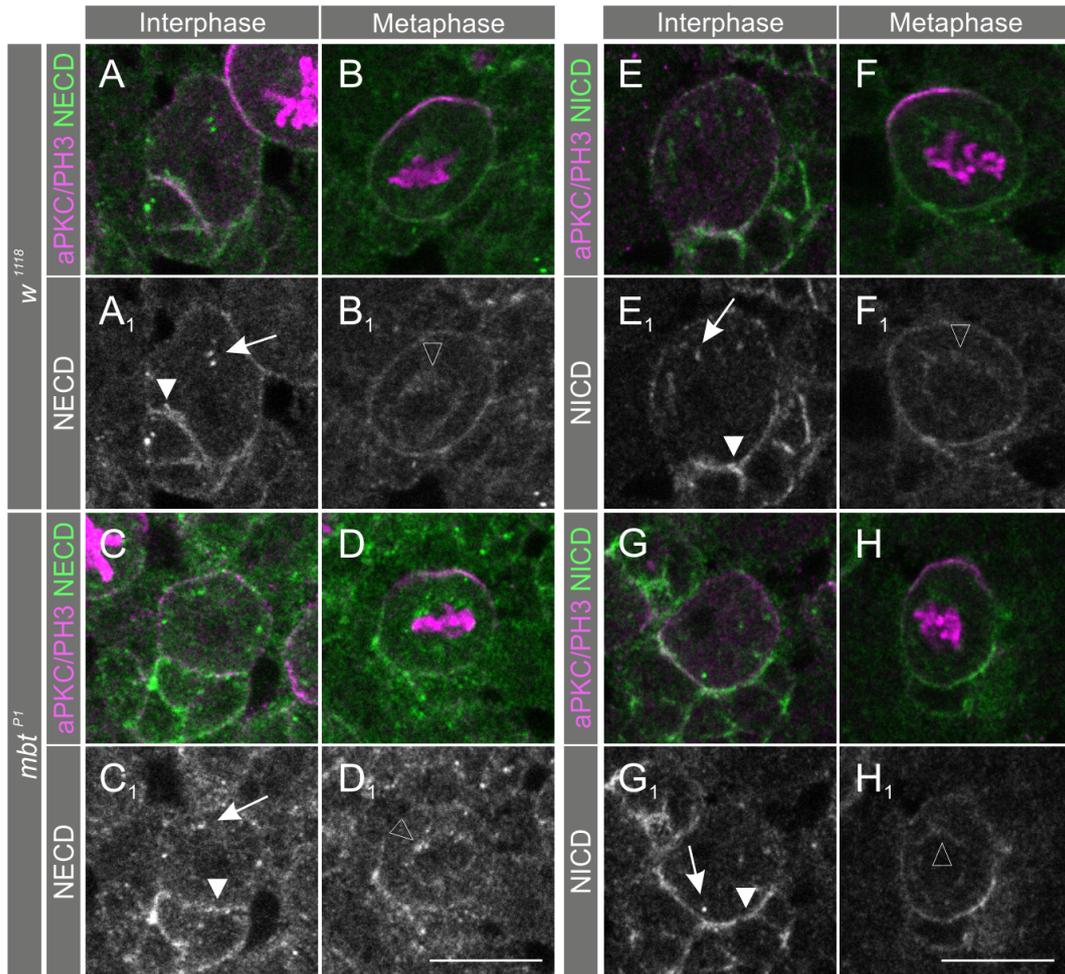


Abbildung 4.4. Verlust von Mbt beeinflusst asymmetrische Zellteilung nicht. Gezeigt werden einzelne Ebenen konfokaler Aufnahmen von Gehirnen wandernder L3 Larven, die mit den angegebenen Antikörperkombinationen gefärbt wurden. PH3: phospho-Histon 3, NECD: Notch extrazelluläre Domäne, NICD: Notch intrazelluläre Domäne. (A-B₁) Im Wildtyp lokalisierte die NECD in der Interphase am Zellkortex und in punktigen Strukturen im Zytoplasma. Während der Mitose war eine leichte Anreicherung der NECD um die Chromosomen herum zu beobachten. (C-D₁) Auch in der *mbt^{P1}* Mutante lokalisierte die NECD in der Interphase am Zellkortex und in punktförmigen Strukturen im Zytoplasma. Während der Mitose war ebenfalls eine schwache Anreicherung um die Chromosomen zu sehen. (E-H₁) Für die NICD war sowohl in wildtypischen als auch in *mbt^{P1}* Interphase Neuroblasten eine Anreicherung am Zellkortex und in zytoplasmatischen Punkten sichtbar. Während der Mitose zeigten Neuroblasten beider Genotypen eine geringe Anreicherung um die Chromosomen herum. Für die Lokalisation von Notch wurden mindestens fünf Gehirne pro Färbung und Genotyp analysiert. Maßstab: 10 µm.

4 Ergebnisse

Spindel (Abb. 4.5H-J₁). Die gleiche α -Tubulinverteilung wurde in mbt^{P1} Neuroblasten beobachtet (Abb. 4.5K-N₁). In der Interphase lokalisierte α -Tubulin kortial und bildete Filamente im Zytoplasma (Abb. 4.5K, K₁). Während der Mitose lokalisierte α -Tubulin fast ausschließlich an der Spindel (Abb. 4.5L-N₁). Auch astrale Mikrotubuli zeigten keine auffallenden Unterschiede zwischen w^{1118} und mbt^{P1} (Abb. 4.5, Ausschnitte in I₁, J₁ und M₁, N₁). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Mbt kein Hauptregulator des Zytoskeletts in Neuroblasten ist.

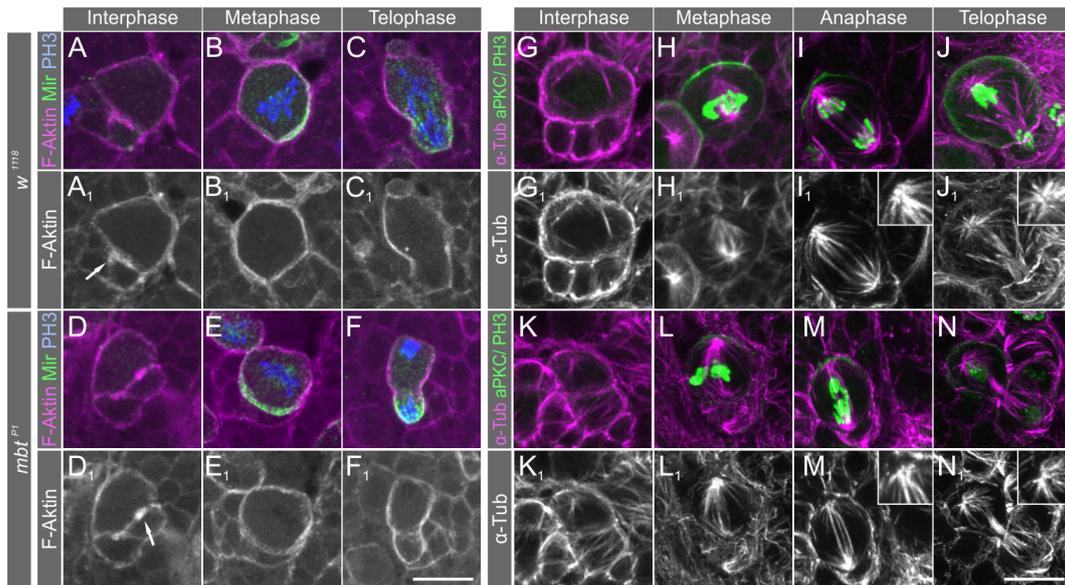


Abbildung 4.5. Verlust von Mbt beeinflusst weder das Aktin- noch das α -Tubulinzytoskelett. Gehirne wandernder L3 Larven wurden entweder gegen F-Aktin, Miranda (Mir) und phospho-Histon 3 (PH3) oder α -Tubulin (α -Tub), aPKC und PH3 gefärbt. Gezeigt werden Projektionen konfokaler Bilder von Neuroblasten. (A-C₁) In w^{1118} Neuroblasten lokalisierte F-Aktin während der Inter-, Meta- und Telophase gleichmäßig am Zellkortex. Der Pfeil in A₁ weist auf eine Anreicherung von F-Aktin an der an GMCs angrenzenden Membran hin. (D-F₁) mbt^{P1} Neuroblasten zeigten, abgesehen von der Anreicherung im Grenzbereich zu GMCs in der Interphase (Pfeil in D₁), auch eine gleichmäßige F-Aktinverteilung am Zellkortex während des Zellzyklus. (G-J₁) In der Interphase lokalisierte α -Tubulin kortial und bildete Filamente im Zytoplasma. In Meta-, Ana- und Telophase bildete α -Tubulin die mitotische Spindel. (K-N₁) Auch in mbt^{P1} Neuroblasten waren in der Interphase kortikale und zytoplasmatische Strukturen angefärbt. In Meta-, Ana- und Telophase war vorwiegend die Spindel gefärbt. Ausschnitte in I₁, J₁ und M₁, N₁ zeigen Vergrößerungen der apikalen astralen Mikrotubuli. Pro Färbung und Genotyp wurden mindestens 10 Gehirne gescannt und die komplette aufgenommene Neuroblastenpopulation analysiert. Gezeigt werden repräsentative Neuroblasten. Maßstab: 10 μ m.

Armadillo, das *Drosophila* beta-Catenin, ist ein mit dem Aktinzytoskelett assoziiertes

Protein, das sowohl bei der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion als auch im Wingless (Wg) Signalweg als Transkriptionsfaktor eine Rolle spielt (VALENTA ET AL., 2012). Die lethalen *armadillo*-Allele (*arm*) *arm*³ und *arm*⁴ wirken als Suppressor auf den rauhe Augen Phänotyp von *mbt*^{P1} (T. Raabe, Daten nicht gezeigt). Mbt phosphoryliert *in vitro* zwei Serine, S561 und S688, von Armadillo (MENZEL ET AL., 2008). Um den Zusammenhang zwischen Mbt und Armadillo *in vivo* detaillierter zu untersuchen, wurden Gehirne von wandernden L3 Larven gegen Armadillo gefärbt. In *w*¹¹¹⁸ Neuroblasten lokalisierte Armadillo während der Inter-, Meta- und Telophase am ganzen Zellkortex (Abb. 4.6A-C₁). Auffallend war, wie bei der Aktinfärbung, eine Anreicherung von Armadillo in Bereichen des Zellkortex, die an GMCs grenzten (Abb. 4.6A₁, B₁, Pfeile). Auch an der Grenze zwischen GMCs akkumulierte Armadillo (Abb. 4.6C₁, Pfeilspitzen). Die Lokalisation von Armadillo in *mbt*^{P1} Neuroblasten glich in allen untersuchten Zellzyklusphasen der Armadillo Verteilung bei *w*¹¹¹⁸ (Abb. 4.6D-F₁). Auch die Anreicherung von Armadillo an der Grenze zwischen Neuroblast und GMC bzw. zwischen GMCs war in der *mbt* Mutante vorhanden (Abb. 4.6D₁, E₁, Pfeile bzw. Pfeilspitzen). Nukleäres Armadillo wurde nicht detektiert. Dies deutet darauf hin, dass sich der Verlust von Mbt nicht auf die Lokalisation von Armadillo auswirkt.

Zur Untersuchung der physiologischen Rolle der Phosphorylierungsstellen S561 und S688 wurden genomische Armadillo Konstrukte hergestellt, bei denen eines der Serine oder beide zu Alanin oder Glutamat mutiert waren. Unabhängig von der Mutation retteten jedoch alle Transgene die Lethalität der beiden *arm* Allele *arm*³ und *arm*⁴ (Daten nicht gezeigt). Die Transgene mit den mutierten Phosphorylierungsstellen erzeugten keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Die Armadillo-Färbung von Larvengehirnen einer S561/688E Doppelmutante im *arm*⁴ Hintergrund zeigte keine auffallenden Lokalisationsunterschiede zum wildtypischen Transgen (Daten nicht gezeigt). Mit zwei Gehirnen war die Stichprobengröße jedoch sehr klein und es wurde kein Marker für Zellzyklus-Phasen mitgefärbt. Weitere Färbungen sind notwendig, um eine verlässlichere Aussage treffen zu können. *In vivo* konnte bisher also für die Phosphorylierungsstellen S561 und S688 keine Funktion festgestellt werden.

Canoe (Cno) ist ebenfalls ein mit dem Aktinzytoskelett assoziiertes Protein. Homozygot lethale Mutationen im *cno* Gen (*cno*⁰⁰⁹¹⁰⁵ und *cno*²) wurden als Verstärker des „rauhe Augen“ Phänotyps von *mbt*^{P3}, einem hypomorphen *mbt* Allel, identifiziert (MENZEL ET AL., 2007; SCHNEEBERGER, 2002). Um einen eventuellen Zusammenhang von Mbt und Canoe (Cno) in Neuroblasten zu untersuchen, wurden Cno-Färbungen von L3 Gehirnen angefertigt. In *w*¹¹¹⁸ Gehirnen zeigten mitotische Neuroblasten häufig eine

deutliche, apikale Anreicherung von Cno (Abb. 4.6G-G₂). Diese apikale Anreicherung von Cno in larvalen Neuroblasten ist vergleichbar mit derjenigen in embryonalen Neuroblasten (SPEICHER ET AL., 2008). In *mbt^{P1}* Larvengehirnen war kein apikales Cno-Signal detektierbar (Abb. 4.6H-H₂). Um den Einfluss der Mbt-Aktivität auf Cno-Lokalisation zu untersuchen, wurden in *mbt^{P1}* Neuroblasten Transgene exprimiert, die für wildtypisches oder Kinase-inaktives Mbt kodierten. Beide Transgene stellten die apikale Lokalisation von Cno wieder her (Abb. 4.6I-J₂). Sowohl wildtypisches als auch Kinase-inaktives Mbt verhindern also den Verlust von Cno vom apikalen Pol in *mbt^{P1}*. Demzufolge wird die apikale Anreicherung von Cno von Mbt reguliert. Relevant scheint jedoch dabei nur die Präsenz von Mbt zu sein, nicht dessen Kinase-Aktivität.

4.2.3 Mbt reguliert Neuroblastengröße, Proliferation und Apoptose

Mbt kontrolliert Neuroblastengröße

Beim Vergleich von wildtypischen und *mbt^{P1}* Larvengehirnen fiel besonders auf, dass die Neuroblasten in der *mbt^{P1}* Mutante eine kleinere Zellgröße aufwiesen. In 36, 48 und 72 Stunden alten Larven erschien die Neuroblastengröße in *mbt^{P1}* Gehirnen kleiner als in der Kontrolle (Abb. 4.7A-F). Um diesen Phänotyp zu quantifizieren, wurde die Neuroblastengröße bestimmt. Zu diesem Zweck wurde der geringste und der größte Durchmesser von Neuroblasten im Zentralhirn gemessen und daraus ein mittlerer Neuroblasten-Durchmesser berechnet. Die Zellzyklusphasen der Neuroblasten wurden bei der Messung nicht berücksichtigt. *mbt^{P1}* Neuroblasten waren zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant kleiner als wildtypische Neuroblasten (Abb. 4.7G). Während der Larvalentwicklung zeigten sowohl Kontroll- als auch *mbt^{P1}*-Neuroblasten eine Größenzunahme. In der Kontrolle nahmen Neuroblasten von 10,84 µm in 36 Stunden alten Larven auf 13,26 µm in 48 Stunden alten Larven zu. Bis zum Alter von 72 Stunden trat keine signifikante Veränderung der Neuroblastengröße mehr auf. *mbt^{P1}* Neuroblasten verhielten sich wie Kontrollneuroblasten. Nach einer Größenzunahme von 9 auf 10,63 µm von 36 auf 48 Stunden veränderte sich ihre Größe bis zum Alter von 72 Stunden nicht mehr signifikant. *mbt^{P1}* Neuroblasten erreichten nur 83 % der Größe von Kontrollneuroblasten im Alter von 36 Stunden. Die Größe von *mbt^{P1}* Neuroblasten fiel auf 80 % bei 48 Stunden und 77 % bei 72 Stunden. Der Größenunterschied zwischen Kontroll- und *mbt^{P1}* Neuroblasten war bereits im embryonalen Stadium 17 detektierbar (MELZER

4 Ergebnisse

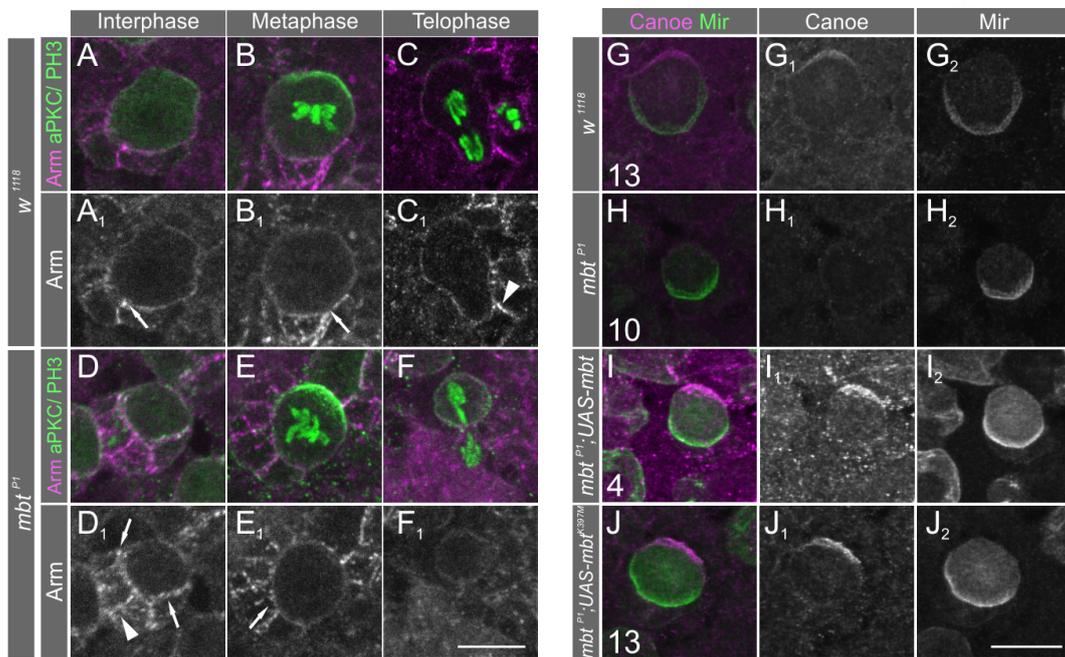


Abbildung 4.6. Verlust von Mbt beeinflusst Lokalisation von Canoe, nicht aber von Armadillo. Gehirne von wandernden L3-Larven wurden gegen Armadillo (Arm), aPKC und phospho-Histon 3 (PH3) oder Canoe und Miranda (Mir) gefärbt. Es werden Projektionen konfokaler Aufnahmen gezeigt. (A-C₁) Arm lokalisierte in *w¹¹¹⁸* Neuroblasten während der Inter-, Meta- und Telophase am Zellkortex. Pfeile zeigen Anreicherungen von Arm an der Grenze von Neuroblast und GMC an. Pfeilspitzen zeigen Arm-Anreicherung zwischen GMCs an. (D-F₁) In *mbt^{P1}* Neuroblasten zeigte Arm ebenfalls eine kortikale Lokalisation während der Inter-, Meta- und Telophase. Auch Arm-Akkumulation an Neuroblast/GMC-Grenzen (Pfeile) und GMC/GMC Grenzen (Pfeilspitzen) waren bei *mbt^{P1}* erhalten. (G-G₂) *w¹¹¹⁸* Neuroblasten zeigten eine apikale Anreicherung von Canoe in mitotischen Neuroblasten. (H-H₂) In *mbt^{P1}* Neuroblasten war kein apikales Canoe-Signal detektierbar. (I-J₂) Die *wor-GAL4*-getriebene Expression von Transgenen, die für wildtypisches (*mbt*) oder Kinase-inaktives (*mbt^{K397M}*) Mbt kodierten, stellten die apikale Lokalisation von Cno wieder her. Für Arm-Färbungen wurden mindestens 10 Gehirne pro Genotyp gescannt und die komplette aufgenommene Neuroblastenpopulation analysiert. Gezeigt werden repräsentative Neuroblasten. Für Cno-Färbungen ist die Anzahl der analysierten Gehirne in den Bildern angegeben. Maßstab: 10 µm.

ET AL., 2013).

Auch *mbt^{P1}* Neuroblasten von wandernden L3 Larven zeigten signifikant kleinere Neuroblasten (Abb. 4.7H, *w¹¹¹⁸*=10,8 µm, *mbt^{P1}*=9,16 µm). Hier betrug die Größe der *mbt^{P1}* Neuroblasten 85% der wildtypischen Neuroblastengröße. Dieser Zellgrößenphänotyp konnte mittels Expression eines wildtypischen *mbt* Transgens in wandernden L3 Larven

gerettet werden (Abb. 4.7H). Die Expression des wildtypischen Transgens im Wildtyp-hintergrund führte zu signifikant größeren Neuroblasten als im Wildtyp. Die Expression des PBD-bindungsdefizienten Transgens dagegen resultierte in einer geringen, jedoch signifikanten Neuroblastenvergrößerung (Abb. 4.7H). Im Vergleich zum wildtypischen Transgen hingegen wiesen diese Neuroblasten eine deutlich geringere Neuroblastengröße auf. Eine mögliche Erklärung für die beträchtlichen Unterschiede zwischen den absoluten Neuroblastengrößen, die in jüngeren und L3 Larven gemessen wurden, ist die unterschiedliche Fütterung von jüngeren und L3 Larven. Das Futter für jüngere Larven enthielt mehr Hefe, was möglicherweise zu verstärktem Zellwachstum führen könnte. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Mbt generell die Zellgröße von Neuroblasten reguliert und dass die über die PBD vermittelte, apikale Anreicherung von Mbt für das Erreichen der wildtypischen Neuroblastengröße notwendig ist.

Mbt reguliert Neuroblastenproliferation

Ein Zusammenhang zwischen Zellgröße und Proliferationsvermögen wurde bereits in mehreren Studien beschrieben. So durchlaufen Neuroblasten nach der Quieszenz zunächst eine Phase der Größenzunahme bevor sie mit der Proliferation beginnen (CHELL & BRAND, 2010). Die Reduktion der Proliferation von Neuroblasten in späten Larven- bzw. Puppenstadien wird von einer Verringerung der Neuroblastengröße begleitet (SIEGRIST ET AL., 2010). Um einen Effekt von Mbt auf die Proliferation von Neuroblasten im Zentralhirn zu untersuchen, wurden Gehirne von 36, 48 und 96 Stunden alten Larven gegen Phospho-Histon-3 und Miranda gefärbt. Aus der Anzahl der mitotischen Neuroblasten und der Neuroblastengesamtzahl pro Hemisphäre wurde ein mitotischer Index berechnet. Der prozentuale Anteil der mitotischen Neuroblasten in *mbt^{P1}* Larven unterschied sich an keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant vom Wildtyp (Abb. 4.8). Bei Betrachtung der Gesamtpopulation von Neuroblasten im Zentralhirn zeichnete sich demnach kein Einfluss von Mbt auf die Proliferation von Neuroblasten ab.

Verschiedene Neuroblastenlinien können sich stark in ihrem Proliferationspotential unterscheiden. Aus diesem Grund könnte eine linienspezifische Analyse mögliche Proliferationsdefekte von *mbt^{P1}* Neuroblasten aufdecken. *mbt* wird in Pilzkörperneuroblasten exprimiert und in adulten *mbt^{P1}* Gehirnen zeigt der Pilzkörper eine starke Größenreduktion, die eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Neuronenzahl zugrunde liegt

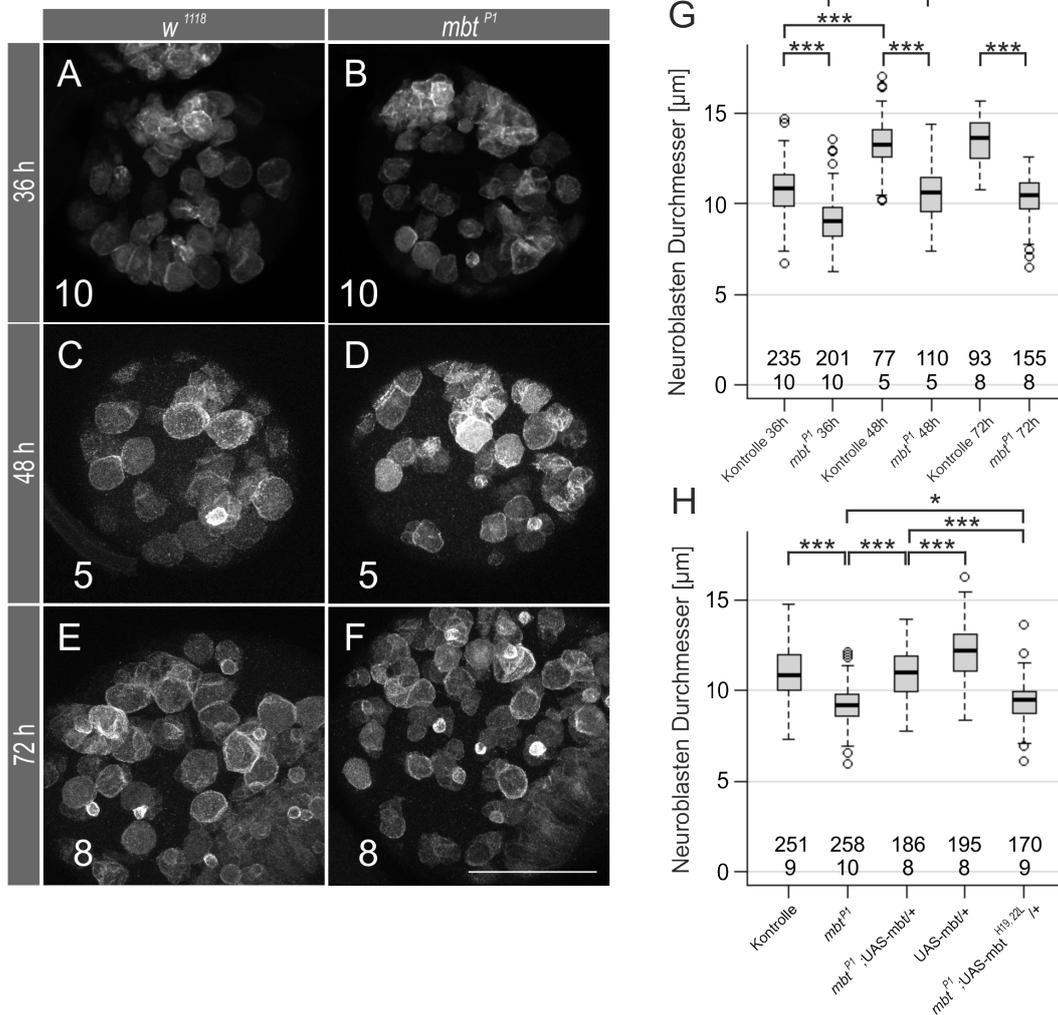


Abbildung 4.7. Mbt reguliert Neuroblastengröße. Gehirne von Larven im angegebenen Alter wurden gegen Miranda gefärbt. Das Larvenalter ist angegeben in Stunden (h) ALH. (A-F) Maximalprojektionen konfokaler Aufnahmen von *w¹¹¹⁸* und *mbt^{P1}* Larvengehirnen der angegebenen Alter. Anterior befindet sich links und medial oben. In allen Larvenstadien sind *mbt^{P1}* Neuroblasten kleiner als *w¹¹¹⁸* Neuroblasten. Zahlen geben die Anzahl der analysierten Gehirne an. (G) Quantifizierung der Zellgröße von Miranda-positiven Neuroblasten im Zentralhirn verschieden alter Larven. (H) Quantifizierung der Neuroblastengröße in Gehirnen von wandernden L3 Larven der angegebenen Genotypen. Die obere Zahlenreihe in den Boxplots gibt die Anzahl der ausgemessenen Neuroblasten an. Die untere Zahlenreihe gibt die Anzahl der ausgewerteten Gehirne an. Maßstab: 50 μm . * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,0001$.

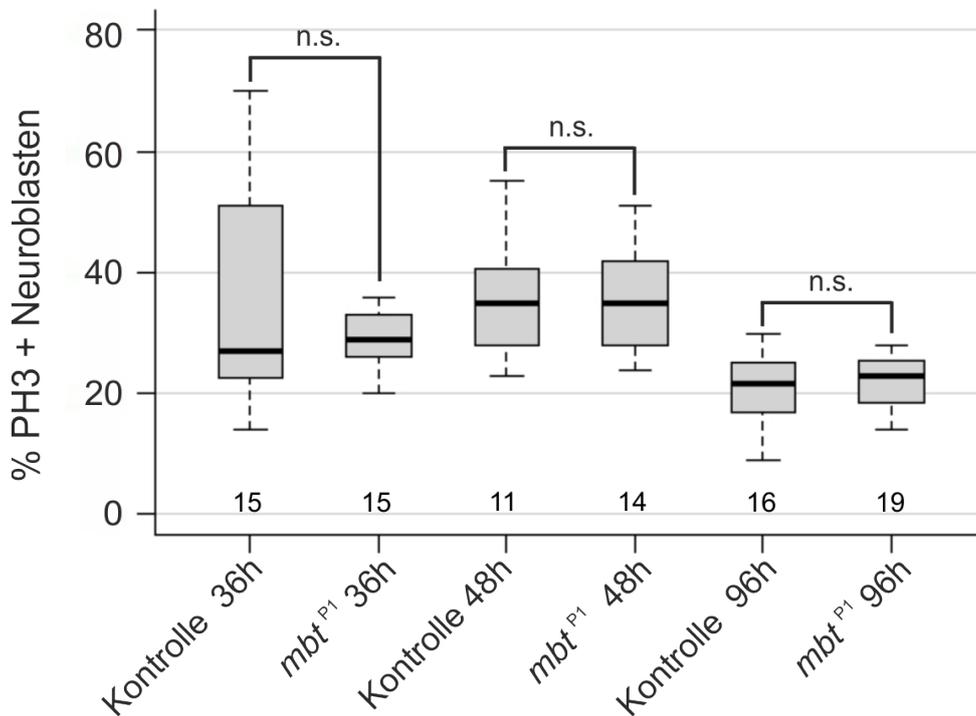


Abbildung 4.8. Mbt beeinflusst Neuroblastenproliferation auf Populationsebene nicht. Quantifizierung des prozentualen Anteils an Phospho-Histon 3 (PH3)-positiven Neuroblasten in *w¹¹¹⁸* und *mbt^{P1}* Gehirnen in verschiedenen Larvenstadien. Angegeben ist der Analysezeitpunkt in Stunden (h) nach dem Schlüpfen des ersten Larvenstadiums. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte unterschied sich der relative Anteil der PH3-positiven Neuroblasten in *mbt^{P1}* Gehirnen von der Kontrolle. Zahlen geben die Anzahl der ausgezählten Gehirne an. n.s.: nicht signifikant.

((MELZIG ET AL., 1998), und Daten nicht gezeigt). Beides spricht für eine Rolle von Mbt bei der Pilzkörperentwicklung. Darüber hinaus sind Pilzkörperneuroblasten ein ideales Modellsystem, da ihre Linien die einzigen Neuroblastenlinien sind, die vom Embryo bis in den Imago charakterisiert sind (KUNZ ET AL., 2012). Es existieren vier Pilzkörperneuroblasten pro Hemisphäre, welche sequentiell morphologisch unterschiedliche Typen von Pilzkörperneuronen, auch als Kenyonzellen bezeichnet, generieren (ITO & HOTA, 1992). Vom Embryo bis zur Mitte des dritten Larvenstadiums werden γ -Neurone gebildet. Es folgt eine kurze Periode bis zum Ende des dritten Larvenstadiums, in der α'/β' -Neurone geboren werden. Danach werden nur noch α/β -Neurone generiert. Diese drei Hauptneuronentypen des Pilzkörpers können anhand ihrer axonalen Projektionen unterschieden werden. Im adulten Gehirn projizieren γ -Neurone in den medialen γ -

Lobus. Die Axone von α'/β' - und α/β -Neuronen gabeln sich, wobei einer der beiden Arme in einem dorsal projizierenden α'/α Lobus und der zweite Arm in einem medial projizierenden β'/β Lobus endet ((ITO ET AL., 1997; LEE ET AL., 1999) und Abb. 4.9B). Bei einer klonalen Analyse mit dem MARCM (Mosaic Analysis with Repressible Cell Marker)-System können ab einem definierten Zeitpunkt alle von einem Neuroblasten generierten Neurone markiert werden. Aufgrund der sequentiellen Bildung morphologisch unterschiedlicher Kenyonzelltypen gibt eine klonale Analyse in diesem Fall folglich nicht nur Hinweise auf die absolute Proliferationskapazität einzelner Pilzkörperneuroblasten, sondern ermöglicht auch Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf der Proliferation während der Larven- und Puppenentwicklung. Kontrollklone bildeten alle drei Pilzkörperneuronentypen, erkennbar an den drei deutlich ausgebildeten Loben (Abb. 4.9B). mbt^{P1} Klone konnten in zwei Kategorien unterteilt werden. Klone der ersten Kategorie bildeten alle drei Loben, enthielten also alle drei Neuronentypen. Alle Loben waren jedoch kleiner als bei Kontrollklonen (Abb. 4.9C). Die Klone der zweiten Kategorie enthielten hauptsächlich γ -Neurone (Abb. 4.9D). α'/β' - und α/β -Neurone waren in diesen Klonen nur selten vorhanden (Abb. 4.9D). Entsprechend enthielten mbt^{P1} Klone signifikant weniger Neurone als Kontrollklone (Abb. 4.9E). Die Bildung von Neuroblastenklonen, die alle Kenyonzelltypen enthielten und solchen, die nur γ -Neurone enthielten, weist darauf hin, dass der Proliferationsdefekt bei mbt^{P1} Pilzkörperneuroblasten unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Manche Pilzkörperneuroblasten proliferieren während des kompletten Entwicklungszeitraumes, generieren somit alle Kenyonzelltypen, jedoch insgesamt weniger Neurone als Kontrollneuroblasten. Andere mbt^{P1} Neuroblasten proliferieren in jüngeren Larvenstadien, in denen sie γ -Neurone generieren, und stellen die Proliferation dann komplett ein. Mithilfe des MARCM-Systems können auch einzelne Neurone markiert werden. Weder bei Einzelzellklonen von γ -Neuronen noch bei α'/β' - und α/β -Neuronen wurden auffällige morphologische Unterschiede bezüglich der axonalen Projektionsmuster und der Anzahl der Dendritenabzweigungen zwischen Kontroll- und mbt^{P1} -Klonen beobachtet (Abb. 4.9F-I und Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass mbt^{P1} Neurone überleben und keinen Zelltod begehen. Vielmehr zeigen die Ergebnisse der klonalen Analyse, dass Pilzkörperneuroblasten der mbt^{P1} Mutante ein gestörtes Proliferationsverhalten aufweisen.

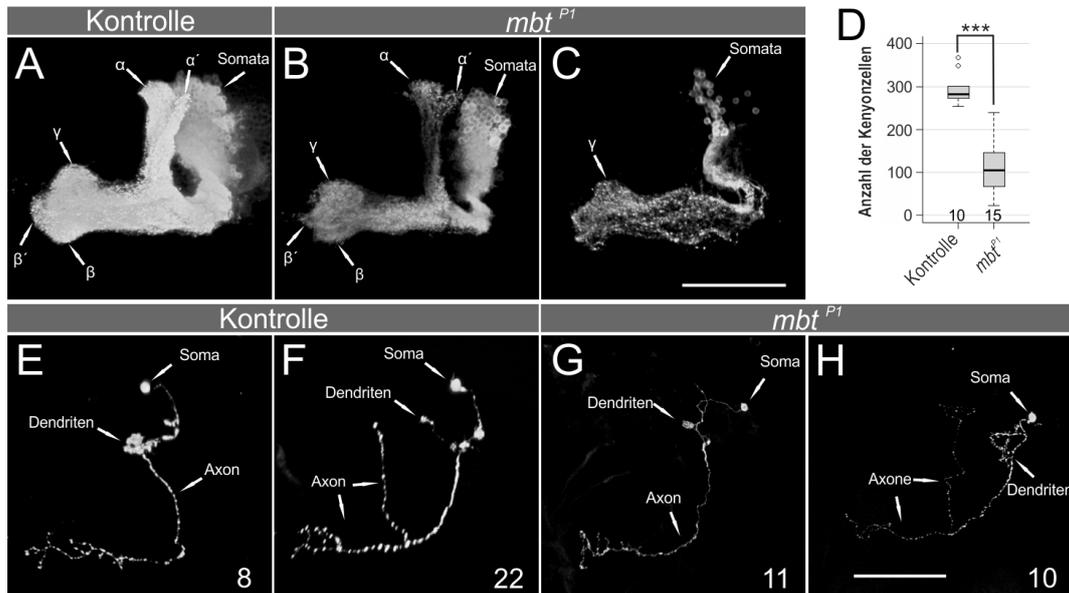


Abbildung 4.9. Mbt reguliert Proliferation von Pilzkörperneuroblasten. Alle Klone wurden mit *hsFLP/FRT*-vermittelter, mitotischer Rekombination erzeugt. Pilzkörper-Neuroblastenklone und γ -Einzelzellklone wurden im ersten Larvenstadium induziert, α/β -Einzelzellklone in wandernden L3 Larven. Die Neuroblasten- und Einzelzellklone wurden mittels *ey^{OK107}* getriebener *UAS-mCD8-GFP*-Expression markiert und mit GFP-Färbung sichtbar gemacht. Gezeigt werden Maximalprojektionen von einzelnen Kontroll- und mbt^{P1} Pilzkörper-Neuroblastenklonen (A-C) und Kontroll- und mbt^{P1} γ - und α/β -Einzelzellklonen (E-H). (A) Kontrollklone bildeten ein vollständiges Lobensystem bestehend aus γ -, α'/β' - und α/β -Loben aus. Die Soma der Kenyonzellen liegen im dorsalen Kortex. (B, C) mbt^{P1} Pilzkörper-Neuroblastenklone bilden entweder ein deutlich reduziertes Lobensystem aus (B) oder generieren nur γ -Neurone (C). (D) Quantifizierung der Kenyonzell-Anzahl pro Neuroblastenklon. mbt^{P1} Klone enthalten signifikant weniger Neurone als Kontrollklone. Zahlen geben die Anzahl der analysierten Neuroblastenklone an. (E-H) Die Morphologie und das Projektionsmuster von mbt^{P1} γ - (E, G) und α/β -Neuronen (F, H) war im Vergleich zur Kontrolle nicht auffallend verändert. Zahlen in Bildern geben die Zahl der analysierten Einzelzellklone an. Maßstab: 50 μ m. *** = $p < 0,0001$.

Mbt beeinflusst das Überleben von Neuroblasten

Infolge einer Reduktion der Zellgröße kommt es bei Neuroblasten zunächst zu einer Verringerung der Proliferation (MAURANGE ET AL., 2008; SIEGRIST ET AL., 2010). Im Extremfall wird die Proliferation durch terminale Differenzierung des Neuroblasten oder Apoptose beendet (ABRAMS ET AL., 1993; MAURANGE ET AL., 2008; PETERSON ET AL., 2002; SIEGRIST ET AL., 2010; WHITE ET AL., 1994). Zur Prüfung eines eventuellen Einflusses von Mbt auf die Anzahl der Neuroblasten im Zentralhirn, wurde 36, 48 und

96 Stunden ALH die Gesamtzahl der Miranda-positiven Neuroblasten pro Hemisphäre in *mbt^{P1}* Gehirnen bestimmt. Zunächst fiel die Anzahl der Neuroblasten zwischen 36 und 48 Stunden ALH sowohl in wildtypischen als auch in *mbt^{P1}* Gehirnen auf einen signifikant geringeren Wert (Abb. 4.10A). Zwischen 48 und 96 Stunden ALH veränderte sich die Anzahl der Neuroblasten bei beiden Genotypen nicht mehr (Abb. 4.10A). 36 Stunden ALH unterschied sich die Anzahl der Neuroblasten pro Hemisphäre zwischen Wildtyp und Mutante nicht signifikant. 48 und 96 Stunden ALH wurden in der *mbt^{P1}* Mutante signifikant weniger Neuroblasten gezählt als im Wildtyp (Abb.4.10A). In *mbt^{P1}* Gehirnen gingen folglich zwischen 36 und 48 Stunden ALH 10 % der Neuroblasten verloren, wohingegen im Wildtyp nur 7 % verschwanden (Abb. 4.10A). Eine in diesem Zusammenhang naheliegende Frage ist, ob die geringere Neuroblastenanzahl in *mbt^{P1}* Gehirnen durch programmierten Zelltod (Apoptose) verursacht wurde. Mit der Deletion *Df(3L)H99* kann Apoptose unterdrückt werden, da bei ihr die pro-apoptotischen Gene *grim*, *hid*, *rpr* und *sickle* fehlen. Für die Analyse von Apoptose in Neuroblasten wurde *Df(3L)H99* in den *mbt^{P1}* Hintergrund eingekreuzt und 96 Stunden ALH die Neuroblastenanzahl bestimmt. Die Anzahl Miranda-positiver Neuroblasten von *Df(3L)H99/+* im Wildtyp-Hintergrund unterschied sich nicht signifikant von der Anzahl in *mbt^{P1}; Df(3L)H99/+* Hemisphären (Abb. 4.10A). Die mit *Df(3L)H99* erhaltenen Werte für die Neuroblastenanzahl entsprachen ungefähr den Neuroblastenanzahl zum Zeitpunkt 36 Stunden ALH. Die Expression eines wildtypischen Transgens im *mbt^{P1}* Hintergrund resultierte ebenfalls in einer Neuroblastenanzahl ähnlich der Kontrolle bei 36 Stunden ALH (4.10A). Das PBD-bindungsdefiziente *Mbt*, das in Neuroblasten nicht mehr apikal lokalisiert, erhöht die Neuroblastenanzahl im Vergleich zu *mbt^{P1}*. Von einer vollständigen Rettung kann jedoch nicht gesprochen werden, da im Vergleich zum wildtypischen Transgen eine signifikant geringere Anzahl von Neuroblasten erreicht wird. Dies weist darauf hin, dass der Verlust von *Mbt* zu einem vorzeitigen Verlust von Neuroblasten aufgrund von Apoptose führt. Auch die Verringerung der Neuroblastenanzahl während der Larvalentwicklung im Wildtyp scheint durch Apoptose bedingt zu sein. Eine Überexpression von *mbt* in Neuroblasten unterdrückt Apoptose. Zudem ist auch die apikale Lokalisation von *Mbt* in Neuroblasten für das Überleben aller Neuroblasten notwendig. Da *Mbt* speziell die Proliferation von Pilzkörperneuroblasten beeinflusst, wurde die Anzahl von Pilzkörperneuroblasten in pupalen Gehirnen bestimmt. Pilzkörperneuroblasten sind die einzigen Neuroblasten, die in 48 Stunden alten Puppen noch existieren und proliferieren (ITO & HOTTA, 1992). Sie können daher zu diesem Zeitpunkt mit einem allgemeinen Neuroblastenmarker wie Deadpan (*Dpn*) eindeutig identifiziert

werden (Abb. 4.10B). Zusätzlich wurden mit Dachshund (Dac) Kenyonzellen gefärbt, um anhand der Lage der Dpn-positiven Neuroblasten ihre Identität als Pilzkörperneuroblasten zu bestätigen (Abb. 4.10B). Wildtypische Gehirne besitzen zu diesem Zeitpunkt insgesamt acht Dpn-positive Pilzkörperneuroblasten (Abb. 4.10B, D). In *mbt^{P1}* Gehirnen dagegen wurden zu diesem Zeitpunkt signifikant weniger Dpn-positive Neuroblasten gezählt als im Wildtyp (Abb. 4.10C, D). Die Einkreuzung von *Df(3L)H99* verhinderte die Reduktion der Pilzkörperneuroblastenzahl in *mbt^{P1}* Gehirnen (Abb. 4.10D). Stattdessen wiesen alle *mbt^{P1}; Df(3L)H99/+* Gehirne wieder die wildtypische Anzahl von acht Pilzkörperneuroblasten auf (Abb. 4.10D). Daher kann festgestellt werden, dass die Anzahl der Pilzkörperneuroblasten bei einem Verlust von Mbt vorzeitig reduziert und die Ursache hierfür Apoptose ist. Dies weist darauf hin, dass Mbt für das Überleben von Neuroblasten notwendig ist.

Blockierung apikaler Mbt Lokalisation oder Apoptose rettet den adulten *mbt^{P1}* Pilzkörperphänotyp nicht

Adulte *mbt^{P1}* Gehirne weisen einen stark verkleinerten Pilzkörper auf (Abb. 4.11A-B₁). Wie oben gezeigt ist apikale Lokalisation von Mbt in Neuroblasten notwendig, um in Larvengehirnen wildtypische Neuroblastengröße zu erreichen und Apoptose zu verhindern. Eine Blockierung von Apoptose kann in Larvengehirnen zumindest die Neuroblastenzahl retten. Um zu klären, ob apikale Mbt Lokalisation in Neuroblasten oder Apoptose von Neuroblasten auch die adulte Pilzkörperstruktur beeinflusst, wurden Rettungsexperimente in adulten Fliegen durchgeführt. Die neuroblastenspezifische Expression des wildtypischen Transgens im *mbt^{P1}* Hintergrund stellte die Struktur und Größe des adulten Pilzkörpers vollständig wieder her (Abb. 4.11C, C₁). Dies steht im Einklang mit der Wiederherstellung wildtypischer Neuroblastengröße durch die Expression dieses Transgens (Abb. 4.7H). Die Expression des *mbt*-Transgens im Wildtyp-Hintergrund, die größere Neuroblasten erzeugte (Abb. 4.7H), stellte ebenfalls Struktur und Größe des adulten Pilzkörpers wieder her (Abb. 4.11D, D₁). PBD-bindungsdefizientes Mbt zeigte, wie bei der Neuroblastengröße auch (Abb. 4.7H), einen partiellen Rettungseffekt (Abb. 4.11E, E₁). Dies deutet darauf hin, dass apikale Lokalisation von Mbt für normale Proliferation von Pilzkörperneuroblasten erforderlich ist. *Df(3L)H99/+* beeinflusste die Struktur des adulten Pilzkörpers im Wildtyp-Hintergrund nicht (Abb. 4.11F, F₁). Die Blockierung von Apoptose mittels *Df(3L)H99* zeigte auch in *mbt^{P1}* Gehirnen keinen Einfluss auf den Pilzkörper (Abb. 4.11G, G₁). Struktur und Größe des adulten Pilzkörpers

4 Ergebnisse

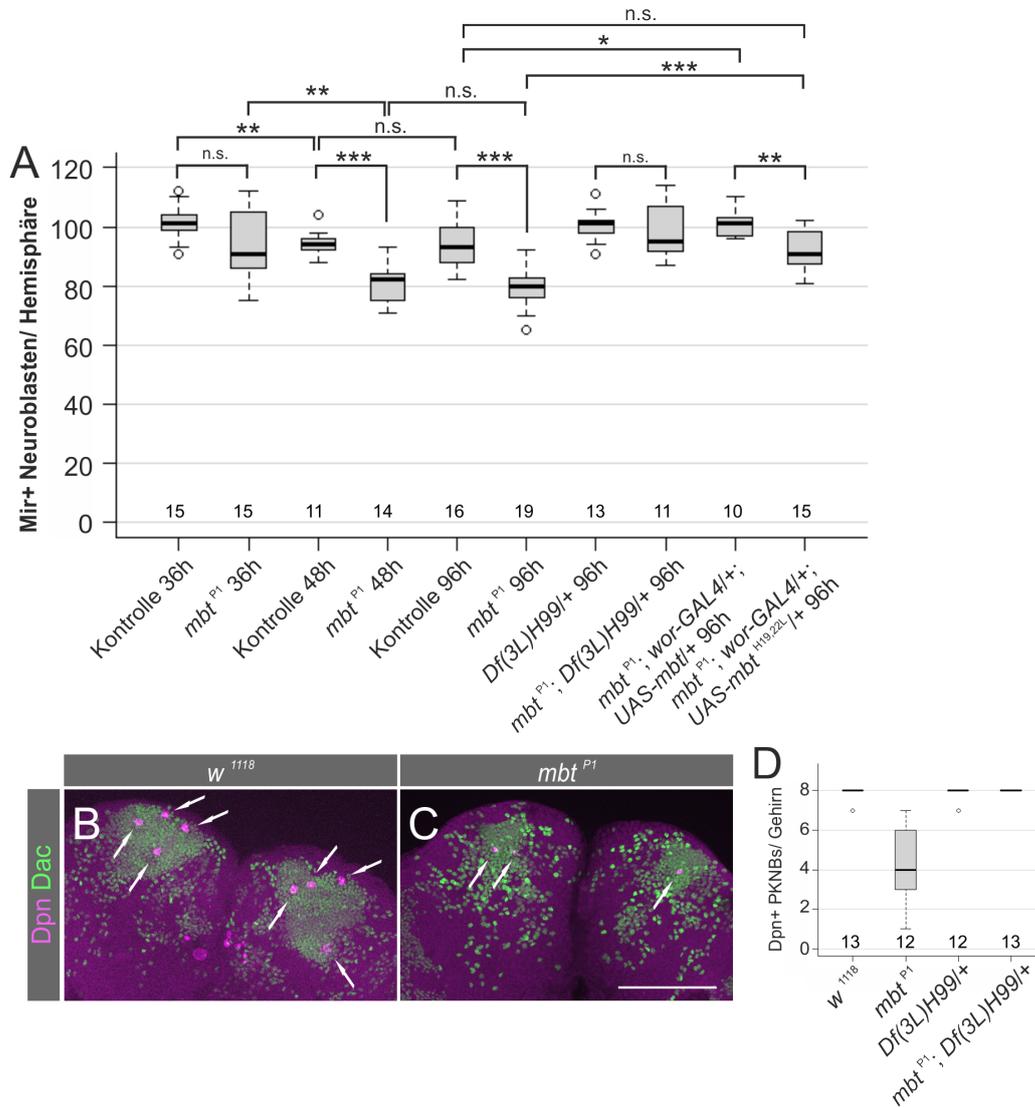


Abbildung 4.10. Der Verlust von Mbt führt zu Apoptose von Neuroblasten (A) Gehirne von Larven der angegebenen Genotypen wurden gegen Miranda (Mir) gefärbt und die Gesamtzahl Miranda-positiver Neuroblasten pro Hemisphäre bestimmt. Das Larvenalter ist angegeben in Stunden (h) ALH. **(B, C)** Maximalprojektionen von konfokalen Aufnahmen pupaler Gehirne 48 Stunden APF. Deadpan (Dpn) markiert Pilzkörperneuroblasten (magenta, Pfeile), Dachshund (Dac) Kenyonzellen im dorsalen Kortex (grün). Dorsal ist oben. **(D)** Quantifizierung der Anzahl Dpn-positiver Neuroblasten in pupalen Gehirnen 48 Stunden APF. Zahlen geben die Anzahl der analysierten Hemisphären bzw. Gehirne an. Maßstab: 100 μm . * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,0001$, n.s.: nicht signifikant, PKNBs: Pilzkörperneuroblasten.

von *mbt^{P1}; Df(3L)H99/+* Gehirnen waren vergleichbar mit denen von *mbt^{P1}* Gehirnen, obwohl die *Df(3L)H99/+* die wildtypische Anzahl von Neuroblasten wieder herstellt (Abb. 4.11G, G₁, vgl. Abb. 4.10A). Der Proliferationsdefekt und die Apoptose von *mbt^{P1}* Neuroblasten sind folglich trennbare Effekte und die Tatsache, dass die Blockierung von Apoptose den wildtypischen Pilzkörper nicht wieder herstellen kann, deutet möglicherweise an, dass Apoptose ein sekundärer Effekt ist.

Die Reduktion der Neuronenanzahl in *mbt^{P1}* Pilzkörpern könnte auch durch neuronalen Zelltod verursacht werden. Die Analyse von Einzelzellklonen deutete bereits an, dass Pilzkörperneurone in der *mbt^{P1}* Mutante überleben können. Die Analyse von Einzelzellklonen schließt jedoch nicht aus, dass ein Teil der Neuronenpopulation trotzdem aufgrund von Apoptose stirbt. Deshalb wurde durch Expression von *UAS-p35* in allen Pilzkörperneuronen Apoptose verhindert. Die Expression von *UAS-p35* mit *P{GawB}ey^{OK107}* beeinflusste den wildtypischen Pilzkörper nicht (Abb. 4.11H, H₁). Die Blockierung von Apoptose in Pilzkörperneuronen konnte den adulten Pilzkörperphänotyp in *mbt^{P1}* Gehirnen nicht retten (Abb. 4.11I, I₁). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass neuronaler Zelltod für den Phänotyp in adulten *mbt^{P1}* Gehirnen keine Rolle spielt.

4.3 Regulation von Zellwachstum und mögliche Downstream-Effektoren von Mbt

4.3.1 Insulin- und TOR-Signalwege

Die verringerte Zellgröße von *mbt^{P1}* Neuroblasten deutet darauf hin, dass Mbt an der Regulation von Zellgröße beteiligt ist. Ein zentraler Signalweg bei der Regulation von Zellgröße und Zellwachstum ist der Insulin-Signalweg. Die Aktivierung des Insulinrezeptors induziert die Aktivierung der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K), welche daraufhin an der Plasmamembran aus Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat (PIP₂) den Second Messenger Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat (PIP₃) generiert (Übersicht in: (FRANKE, 2008)). Die Lipid-Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue deleted on Chromosome 10) wirkt der PI3K-Aktivität entgegen, indem sie PIP₃ wieder dephosphoryliert. Sowohl Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1 (Phosphatidylinositol Dependent Kinase 1, PDK1) als auch Akt (Protein Kinase B, PKB)

4 Ergebnisse

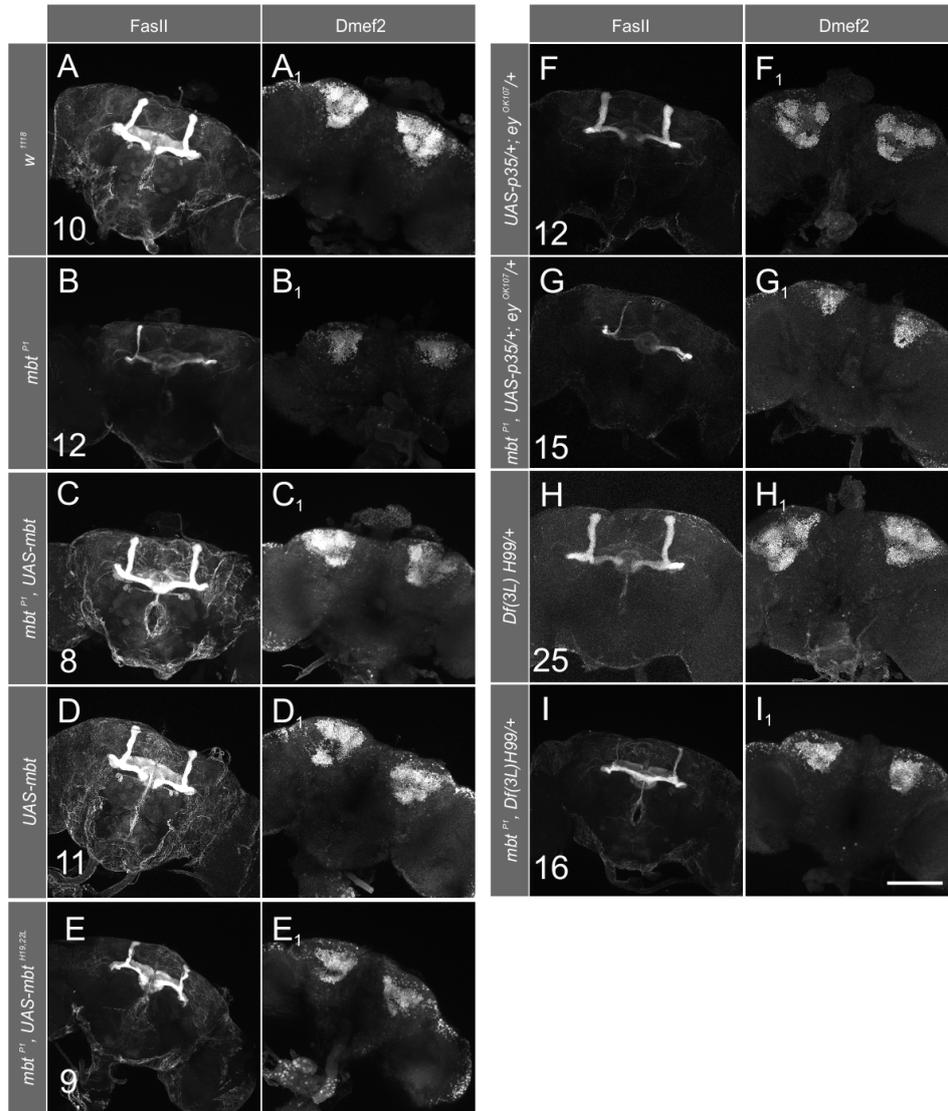


Abbildung 4.11. Blockierung von apikaler Mbt Lokalisation oder Apoptose rettet den adulten *mbt^{P1}* Pilzkörperphänotyp nicht. Adulte Gehirne der angegebenen Genotypen wurden gegen FasII und Dmef2 gefärbt. Gezeigt werden Maximalprojektionen konfokaler Ebenen im Bereich des Lobensystems, das mit FasII markiert ist, und im Bereich der Kenyonzellen im dorsalen Kortex, der mit Dmef2 markiert ist. (A-B₁) In *mbt^{P1}* Gehirnen ist das Lobensystem und der Bereich der Kenyonzellen im Vergleich zum Wildtyp stark verkleinert. Die α/β -Loben fehlen häufig ganz. (C-C₁) Neuroblastenspezifische Expression eines wildtypischen Transgens mit *wor-GAL4* im *mbt^{P1}* Hintergrund rettet den Pilzkörperphänotyp komplett. (D-D₁) Expression des *mbt*-Transgens im Wildtyp-Hintergrund beeinflusst den Pilzkörperphänotyp nicht. (E-E₁) Expression von *mbt^{H19/22L}* rettet den Phänotyp partiell. (F-G₁) *Df(3L)H99* verändert weder den adulten wildtypischen noch den *mbt^{P1}* Pilzkörper. (H-H₁) Postembryonale Expression von *UAS-p35* in Neuronen mit *P[GawB]ey^{OK107}* beeinflusst den Pilzkörper nicht. (I-I₁) Expression von *UAS-p35* rettet den *mbt^{P1}* Pilzkörperphänotyp nicht. Zahlen geben die Anzahl der analysierten Gehirne an. Maßstab: 100 μ m.

werden über ihre PIP₃-bindende Pleckstring Homology (PH)-Domäne an die Membran rekrutiert. Dort interagieren die beiden Kinasen und PDK1 phosphoryliert und aktiviert Akt (FRANKE, 2008). Akt phosphoryliert wiederum den Transkriptionsfaktor Foxo, was dessen Translokation in den Zellkern verhindert und stattdessen den Abbau von Foxo über das Ubiquitin-Proteasom-System zur Folge hat. Die Aktivierung des Signalweges inhibiert also Foxo-abhängige Transkription (TELEMAN, 2009). Foxo wirkt inhibitorisch auf Wachstum, unter anderem weil es die Transkription metabolischer Gene reguliert (TELEMAN, 2009). Der Insulin-Signalweg kommuniziert an mehreren Stellen mit anderen Signalwegen, unter anderem dem Target of Rapamycin (TOR)-Signalweg, um Zellwachstumsprozesse zu koordinieren. Akt beispielsweise phosphoryliert und inhibiert den Tuberous Sclerosis Complex 1 (Tsc1)-Tsc2-Komplex, der als GAP für die kleine GTPase Ras Homolog enriched in Brain Ortholog (Rheb) fungiert. Rheb wiederum aktiviert den TOR-Raptor Komplex (TOR-C1), der Informationen über die Nährstoffversorgung der Zelle erhält und integriert und diese Informationen in pro-Wachstumssignale, wie beispielsweise die Phosphorylierung des 4E-bindenden Proteins (4E-BP) und der ribosomalen Protein-S6-p70-Proteinkinase (S6K/RS6K), umsetzt (TELEMAN, 2009). *mbt^{P1}* Fliegen zeigen einen rauhe Augen Phänotyp. Zunächst wurde daher nach einer dominanten genetischen Interaktion von *mbt^{P1}* mit Komponenten des Insulin-TOR-Signalweges gesucht. Dafür wurden lethale Nullallele verschiedener an diesen Signalwegen beteiligter Gene in den *mbt^{P1}* Hintergrund eingekreuzt (Tab. 4.1).

Der rauhe Augen Phänotyp von *mbt^{P1}* wurde nur von einem einzigen Gen, dem Insulinrezeptor, *InR*, leicht beeinflusst. *mbt^{P1}/Y; InR³⁰⁴/+* Fliegen hatten relativ kleine, rauhe Augen im Vergleich zu *mbt^{P1}* Fliegen. Darüber hinaus wurden die Allele bezüglich einer Interaktion mit dem *mbt^{P1}* Pilzkörperphänotyp untersucht. Zu diesem Zweck wurden Paraffinschnitte angefertigt und die Calyxgrößen verglichen. Auch hier war die einzige auffallende Veränderung bei *InR³⁰⁴* zu beobachten. *mbt^{P1}/Y; InR³⁰⁴/+* Fliegen zeigten im Vergleich zu *mbt^{P1}* relativ kleine Calyces. Da *mbt^{P1}* allein bereits kleine Calyces zeigt, verstärkte *InR³⁰⁴* den Phänotyp nur leicht. Zusammengefasst wurde daher die mit *InR³⁰⁴* beobachtete Interaktion mit *mbt^{P1}* als eine relativ schwache Interaktion beurteilt.

Für eine aussagekräftigere Analyse einer möglichen Rolle von Mbt im Insulin-Signalweg wurden Gehirne von L3 Larven gegen Phospho-Akt (pAkt), einem Marker für die Aktivität des Insulin-Signalweges, gefärbt. Da viele Neuroblastenlinien im späten dritten Larvenstadium nicht mehr so stark proliferieren, wurden 72 Stunden alte Larven verwendet, um die Aktivierung des Insulin-Signalweges in Neuroblasten zu untersuchen.

Tabelle 4.1. Auf genetische Interaktion mit *mbt^{P1}* untersuchte Gene und Allele des Insulin-Tor-Signalweges

Signalweg	Gen	Funktion	Allel
Insulin	<i>Dp110</i>	katalytische Untereinheit der PI3K	<i>Dp110^{1C1}</i>
Insulin	<i>InR</i>	Insulinrezeptor	<i>InR³⁰⁴</i>
Insulin	<i>PKB</i>	Akt	<i>PKB¹</i>
Insulin	<i>PTEN</i>	Lipid-Phosphatase, dephosphoryliert PIP ₃	<i>PTEN^{117.1}</i>
TOR	<i>Rheb</i>	kleine GTPase, aktiviert TOR-C1	<i>Rheb^{2D1}</i>
TOR	<i>Rheb</i>	kleine GTPase, aktiviert TOR-C1	<i>Rheb^{3M2}</i>
TOR	<i>dS6K</i>	S6K	<i>dS6K^{83w2}</i>
TOR	<i>TOR</i>	Kinase, TOR	<i>TOR^{deltaP}</i>
TOR	<i>Tsc1</i>	GAP-Funktion für Rheb	<i>Tsc1^{2X1}</i>
TOR	<i>Tsc2</i>	GAP-Funktion für Rheb	<i>Tsc2⁵⁶</i>
TOR	<i>Tsc2</i>	GAP-Funktion für Rheb	<i>Tsc2^{3L55}</i>

pAkt zeigte verschiedene Lokalisationsmuster in Interphase Neuroblasten. Es wurde ausschließlich kortikale (Abb. 4.12A, A₁), kortikale und nukleäre (Abb. 4.12B, B₁) und ubiquitär zytoplasmatische pAkt Lokalisation (Abb. 4.12C, C₁) beobachtet. Sehr selten war ausschließlich nukleäre pAkt Lokalisation zu sehen (Daten nicht gezeigt). Auffallend war eine deutliche Lokalisation von pAkt an der Grenze von Neuroblast und GMC in Telophasen (Abb. 4.12D, D₁). Alle im Wildtyp beobachteten Lokalisationsmuster von pAkt waren auch in *mbt^{P1}* Gehirnen vorhanden (Abb. 4.12E - H₁). Die Quantifizierung der pAkt Lokalisation in Interphase Neuroblasten ergab, dass in *mbt^{P1}* Gehirnen prozentual weniger Neuroblasten eine rein kortikale pAkt Lokalisation zeigen als im Wildtyp (Abb. 4.12I, blau). Zudem war eine kortikale Lokalisation in der Mutante häufig schwerer zu erkennen, da sie sich vom Hintergrund oft schlecht abhob, das Signal also wahrscheinlich weniger stark war. Demzufolge zeigt das Verteilungsmuster der pAkt Lokalisation in *mbt^{P1}* Gehirnen geringe Veränderungen zum Wildtyp, was auf eine Veränderung im Insulin-Signalweg hinweisen könnte.

Weiterhin wurde zur Überprüfung der Signalweg-Aktivierung der Haupt-Effektor des Insulin-Signalweges, Foxo, untersucht. Da kein Antikörper gegen Foxo zur Verfügung stand, der in der Immunhistochemie eingesetzt werden konnte, wurde ein *UAS-foxo::GFP* Transgen mit der Neuroblasten-spezifischen Enhancer-Trap-Linie *P{GawB}Mz1060* in

4 Ergebnisse

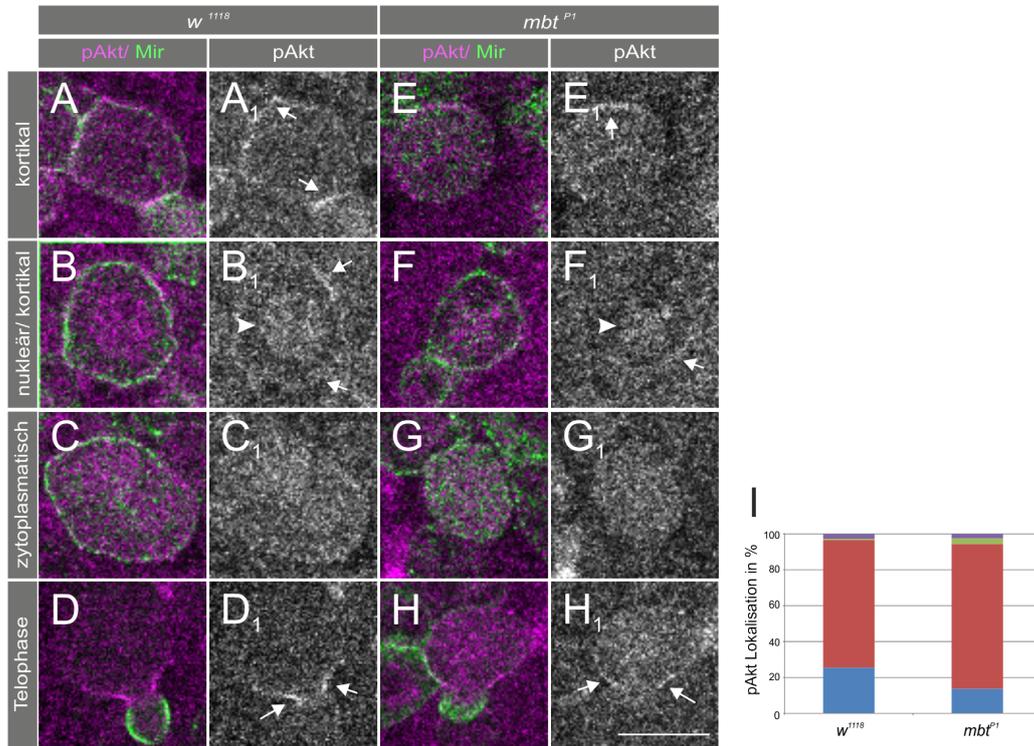


Abbildung 4.12. *mbt^{P1}* zeigt geringfügige Veränderungen der pAkt Lokalisation. Gehirne von L3 Larven wurden mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Abgebildet sind einzelne konfokale Ebenen. (A-C₁) Phospho-Akt (pAkt) lokalisiert in wildtypischen Neuroblasten entweder hauptsächlich kortikal, kortikal und nukleär oder ubiquitär zytoplasmatisch. (D-D₁) Auffallend ist eine starke kortikale Färbung in der Telophase an der Grenze zwischen Neuroblast und GMC. (E-H₁) Die Lokalisationsmuster von pAkt sind in *mbt^{P1}* Neuroblasten erhalten. (I) Quantifizierung der Lokalisation von pAkt in *w¹¹¹⁸* und *mbt^{P1}* Neuroblasten. blau = kortikal, rot = kortikal und nukleär, grün = nukleär, lila = ubiquitär zytoplasmatisch. $n_{w^{1118}} = 100$ Neuroblasten, 25 % kortikal, 71 % kortikal und nukleär, 1 % nukleär, 3 % ubiquitär, $n_{mbt^{P1}} = 106$, 14 % kortikal, 81 % kortikal und nukleär, 3 % nukleär, 2 % ubiquitär. Es wurden 9 Gehirne pro Genotyp ausgewertet. Pfeile zeigen kortikale Lokalisation, Pfeilspitzen nukleäre Lokalisation an. Maßstab: 10 µm.

mbt^{P1} Neuroblasten exprimiert und Foxo-GFP Lokalisation in Gehirnen von wandernden L3 Larven analysiert. Auch Foxo-GFP zeigte verschiedene Lokalisationsmuster in Neuroblasten. Im Wildtyp lokalisierte Foxo-GFP in 83 % der Neuroblasten hauptsächlich im Zytoplasma (Abb. 4.13A, A₁). In diesem Fall war der Zellkern vom Zytoplasma aufgrund eines starken Intensitätsunterschiedes in der GFP-Färbung deutlich abgegrenzt. Dies wurde mithilfe einer Ko-Färbung mit Lamin, einem Marker für die Kernmembran, bestätigt. In 11 % der Neuroblasten lokalisierte Foxo-GFP sowohl im Zytoplasma als

4 Ergebnisse

auch in Zellkern (Abb. 4.13B, B₁). In diesen Neuroblasten war der Zellkern in der GFP-Färbung nicht mehr klar vom Zytoplasma abgegrenzt (Vgl. Abb. 4.13A₁, B₁). Dieses Lokalisationsmuster wird im Folgenden als ubiquitär bezeichnet. 6 % der Neuroblasten zeigten eine starke Lokalisation von Foxo-GFP im Zellkern (Abb. 4.13C, C₁). *mbt^{P1}* Neuroblasten zeigten die gleichen Lokalisationsmuster von Foxo-GFP (Abb. 4.13D - F₁). Die Quantifizierung der Foxo-GFP Lokalisation ergab, dass der prozentuale Anteil von Neuroblasten mit ubiquitärer Foxo-GFP Lokalisation in *mbt^{P1}* Gehirnen mit 31 % deutlich erhöht war (Abb. 4.13G, rot). Der Anteil von Neuroblasten mit zytoplasmatischer oder nukleärer Foxo-GFP Lokalisation war in *mbt^{P1}* Gehirnen mit 67 und 2 % geringer als im Wildtyp (Abb. 4.13G, grün und blau). Insgesamt ist in *mbt^{P1}* Gehirnen folglich der Anteil von Neuroblasten, die Foxo-GFP im Zellkern enthalten, erhöht. Dies kann als Hinweis auf eine modulatorische Rolle von Mbt im Insulin-Signalweg gedeutet werden.

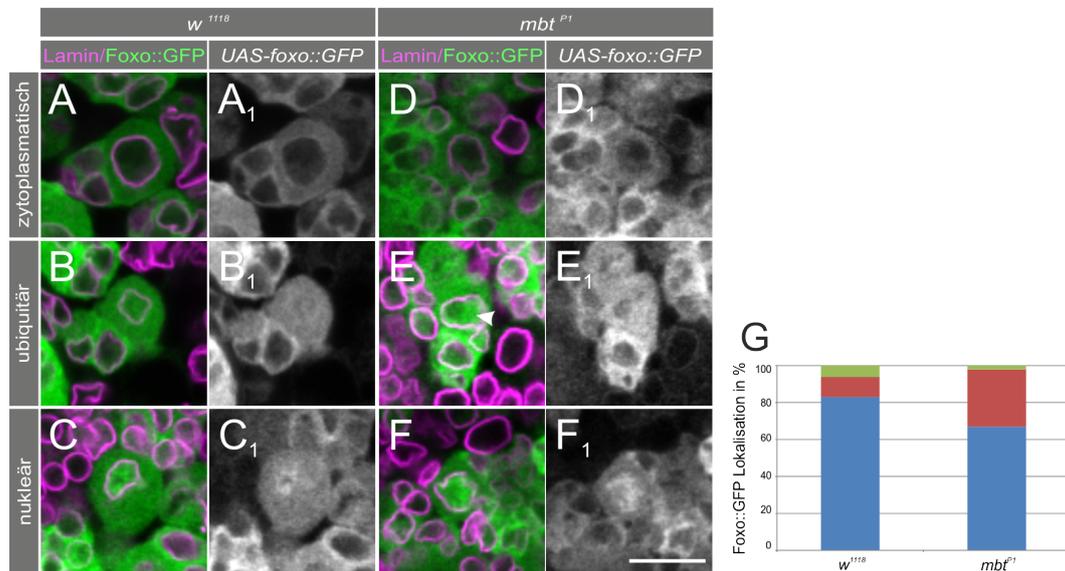


Abbildung 4.13. *mbt^{P1}* zeigt Veränderungen der Foxo-GFP Lokalisation. Ein *UAS-foxo::GFP* Transgen wurde mit *P{GawB}Mz1060* in Neuroblasten überexprimiert. Gehirne von L3 Larven wurden mit Antikörpern gegen Lamin, einem Marker für die Zellkernmembran, und GFP gefärbt. Abgebildet sind einzelne konfokale Ebenen. (A-C₁) Foxo-GFP lokalisiert in *w¹¹¹⁸* Neuroblasten entweder vorwiegend zytoplasmatisch, ubiquitär im Zytoplasma und Zellkern oder vorwiegend nukleär. (D-F₁) Die Lokalisationsmuster von Foxo-GFP treten auch in *mbt^{P1}* Neuroblasten auf. (G) Quantifizierung der Lokalisation von Foxo-GFP in *w¹¹¹⁸* und *mbt^{P1}* Neuroblasten. blau = zytoplasmatisch, rot = ubiquitär, grün = nukleär. $n_{w^{1118}} = 129$ Neuroblasten (5 Gehirne), $n_{mbt^{P1}} = 139$ Neuroblasten (4 Gehirne). Pfeilspitzen zeigen nukleäre Lokalisation an. Maßstab: 10 μ m.

4.3.2 c-Myc und nukleoläre Proteine

c-Myc ist ein zentraler Regulator von Zellgröße, Zellwachstum und Proliferation. Als Transkriptionsfaktor reguliert Myc unter anderem die Expression zahlreicher Gene, die an der Ribosomenbiogenese und Translationsregulation beteiligt sind (VAN RIGGELEN ET AL., 2010). Myc aktiviert vor allem die Expression von Genen, die für nukleoläre Proteine kodieren. Eine zentrale Funktion des Nukleolus ist die Ribosomenbiogenese (HENRAS ET AL., 2008). Zunächst wurde eine mögliche dominante, genetische Interaktion zwischen *mbt* und dem für *Drosophila* Myc kodierenden Gen *diminutive* (*dm*) überprüft. Die *mbt* Allele *mbt^{P1}* und *mbt^{P3}* wurden mit *dm⁴*, einem *dm* Nullallel, zusammen rekombiniert. Die Rekombinanten wurden auf Veränderungen des *mbt* rauhe Augen Phänotyps hin überprüft. Es wurden Weibchen analysiert, die heterozygot für *dm⁴* und homozygot für eines der beiden *mbt* Allele waren. *dm⁴* beeinflusste den rauhe Augen Phänotyp der beiden *mbt* Allele nicht. Außerdem wurden von diesen Fliegen Paraffinschnitte angefertigt, um einen möglichen Einfluss auf die Calyxgröße als Maß für die Pilzkörpergröße zu überprüfen. Auch die Pilzkörpergröße wurde von *dm⁴* nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Da von drei getesteten Antikörpern gegen Myc keiner eine spezifische immunhistochemische Färbung lieferte, konnte Myc-Lokalisation in Neuroblasten nicht untersucht werden.

Der Nukleolus hat als Ort der Ribosomenbiogenese große Bedeutung für das Zellwachstum. Es sollten deshalb mögliche Veränderungen des Nukleolus in der *mbt^{P1}* Mutante untersucht werden. Fibrillarin, eine Methyl-Transferase, die bei der Prozessierung von rRNA eine Rolle spielt, wird als gängiger Marker für den Nukleolus verwendet. Die Färbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen Fibrillarin zeigte eine überraschende Veränderung der Fibrillarinlokalisation in der *mbt^{P1}* Mutante. Während der Antikörper im Wildtyp eine punktförmige Lokalisation im Zellkern zeigte, war in *mbt^{P1}* Neuroblasten eine ausgeprägte Färbung im Zytoplasma zu beobachten (Abb. 4.14A-B₁). Eine Färbung mit einem monoklonalen Fibrillarin-Antikörper zeigte jedoch eine normale, punktförmige Lokalisation von Fibrillarin im Nukleolus sowohl in wildtypischen wie auch in *mbt^{P1}* Neuroblasten (Abb. 4.14C-D₁). Der polyklonale Antikörper erkennt folglich nicht Fibrillarin, sondern ein anderes Protein, dessen Lokalisation in der *mbt^{P1}* Mutante verändert ist. Eine Ko-Färbung des polyklonalen Fibrillarin Antikörpers mit dem monoklonalen Fibrillarin-Antikörper zeigte eine spezifische Lokalisation des unbekanntes Proteins im Nukleolus (Abb. 4.14E-E₂). Obwohl Fibrillarin also in der *mbt^{P1}* Mutante nicht fehllokalisiert, deuten diese Ergebnisse an, dass es in *mbt^{P1}* Neuroblasten

zu Veränderungen im Nukleolus kommt und zumindest ein Protein in seiner Lokalisation beeinträchtigt sein könnte.

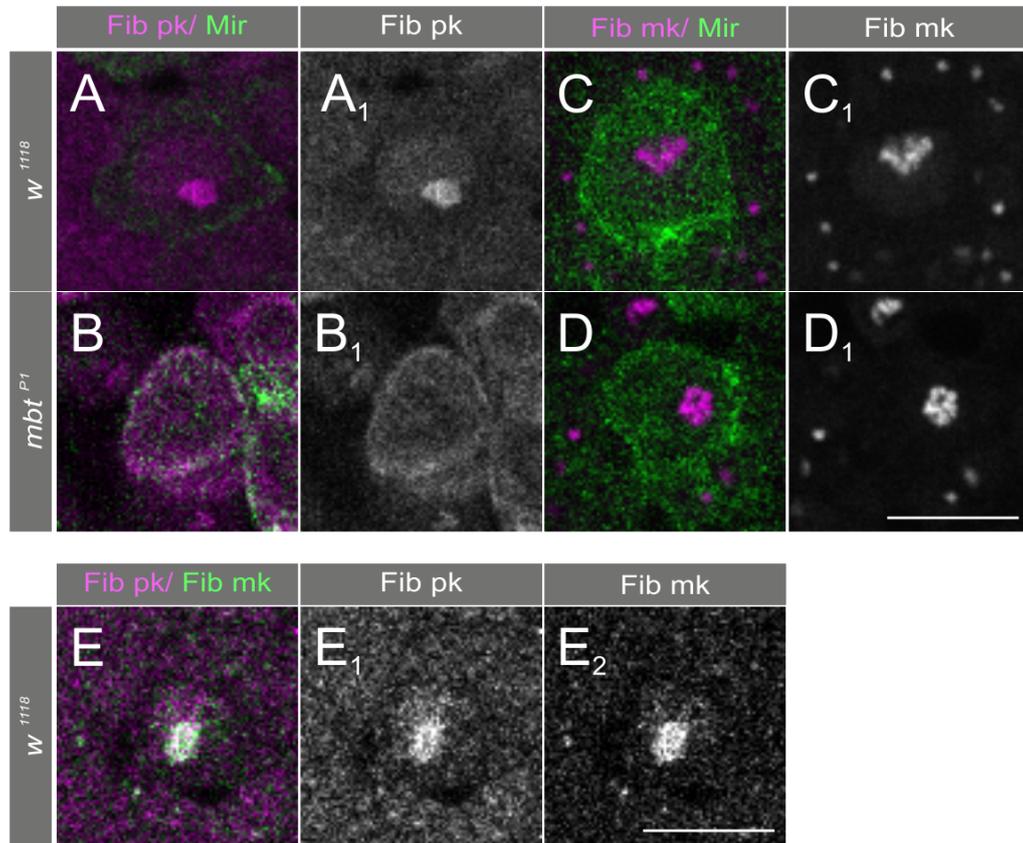


Abbildung 4.14. *mbt*^{P1} führt zu Veränderungen im Nukleolus. Gehirne wandernder L3 Larven wurden mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Abgebildet sind einzelne konfokale Ebenen. (A, A₁) Ein polyklonaler Antikörper gegen Fibrillarin zeigt eine nukleoläre Lokalisation in *w*¹¹¹⁸ Neuroblasten. (B, B₁) In *mbt*^{P1} Neuroblasten zeigt der gleiche Antikörper eine Lokalisation des Proteins im Zytoplasma und am Zellkortex. (C-D₁) Ein monoklonaler Antikörper gegen Fibrillarin zeigt eine nukleoläre Lokalisation von Fibrillarin in *w*¹¹¹⁸ und *mbt*^{P1} Neuroblasten. (E-E₂) Eine Ko-Färbung der beiden Antikörper zeigt, dass das von dem polyklonalen Antikörper erkannte unbekannte Protein in *w*¹¹¹⁸ Neuroblasten im Nukleolus lokalisiert. Maßstab: 10 µm.

4.3.3 Klassischer MAPK-Signalweg

Ein weiterer interessanter Signalweg im Zusammenhang mit Mbt ist der klassische MAPK-Signalweg. Er wurde bereits früher mit Mbt in Verbindung gebracht und steht

möglicherweise auch aufgrund der Regulation des Zellmetabolismus und Kreuzregulation des Insulin-Signalweges mit Zellgrößenregulation in Verbindung ((MENDOZA ET AL., 2011; SCHNEEBERGER, 2002) und T. Raabe, unveröffentlicht). Die klassische MAPK-Signalkaskade wird von RTKs aktiviert (Übersichten in: (MCKAY & MORRISON, 2007; SHAUL & SEGER, 2007)). RTK-Aktivierung resultiert in der Rekrutierung zahlreicher Signalweg-Komponenten an die Plasmamembran. Über das GEF Son of sevenless (Sos) wird die GTPase Ras aktiviert, welche dann Raf an die Membran rekrutiert und dessen Aktivierung initiiert. Raf phosphoryliert und aktiviert MEK, welche wiederum Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK, in *Drosophila* Rolled (Rl)) phosphoryliert und aktiviert. Aktive ERKs phosphorylieren Zielproteine im Zytoplasma und im Zellkern und werden durch Dephosphorylierung beispielsweise von MAPK Phosphatasen (MKPs) inaktiviert (SHAUL & SEGER, 2007). *mbt^{P1}* Fliegen zeigen einen rauhe Augen-Phänotyp (4.15A, G). Zunächst wurde daher im Auge nach genetischen Interaktionen zwischen *mbt^{P1}* und Mutationen in Genen des klassischen MAPK-Signalweges gesucht. Loss of function (lof) Mutationen von Genen aus dem MAPK-Signalweg wurden in den *mbt^{P1}* Hintergrund eingekreuzt. Es wurden Männchen analysiert, die hemizygot für *mbt^{P1}* und heterozygot für die jeweilige lof Mutation im MAPK-Signalweg waren. Einzige Ausnahme war das homozygot lebensfähige, hypomorphe Allel *rl¹*. Hier wurden Männchen analysiert, die hemizygot für *mbt^{P1}* und homozygot für *rl¹* waren, da dies die stärkste mögliche Allelkombination dieser beiden Gene war. Eine P-Element Insertion im ersten Intron von *MAPK Phosphatase 3 (Mkp3)* supprimierte den *mbt^{P1}* Augenphänotyp (Abb. 4.15B, H). Zwei *Ras*-Allele, *Ras^{e1B}* und *Ras^{E2F}*, zeigten eine leichte Verstärkung des rauhe Augen-Phänotyps (Abb. 4.15C, I und D, J). *Sos^{R49}* und *rl¹* erwiesen sich als deutliche Verstärker des *mbt^{P1}* Augenphänotyps (Abb. 4.15E, F, K, L). *mbt* wirkt somit im Auge als Positivregulator des MAPK-Signalweges.

Um zu überprüfen, ob die Interaktion mit dem MAPK-Signalweg auch im Larvengehirn existiert, wurden *rl¹* und *mbt^{P1}*; *rl¹* Gehirne von wandernden L3 Larven auf Neuroblastenzahl, Proliferation und Neuroblastengröße hin untersucht. Die Gesamtzahl der Neuroblasten in *rl¹* Gehirnen unterschied sich nicht signifikant vom Wildtyp (Abb. 4.15M). Wie *mbt^{P1}* Gehirne auch, enthielten *mbt^{P1}*; *rl¹* Gehirne signifikant weniger Neuroblasten als *rl¹* Gehirne (Abb. 4.15M). Gleichzeitig wurden in den Gehirnen der Doppelmutante jedoch signifikant mehr Neuroblasten als in *mbt^{P1}* Gehirnen gezählt (Abb. 4.15M). Dies entspricht einer leichten Suppression des *mbt^{P1}* Phänotyps bezüglich der Neuroblastenzahl. Zwischen dem prozentualen Anteil der mitotischen Neuroblasten in *w¹¹¹⁸*, *mbt^{P1}* und *rl¹* Gehirnen gab es keine signifikanten Unterschiede. Während

sich der mitotische Index von *mbt^{P1}; rl¹* Gehirnen nicht von dem in *mbt^{P1}* Gehirnen unterschied, war der Unterschied zwischen *mbt^{P1}; rl¹* und *rl¹* signifikant (Abb. 4.15N). Dies weist möglicherweise auf eine Interaktion von *mbt^{P1}* und *rl¹* bezüglich der Neuroblastenproliferation hin. Neuroblasten in *mbt^{P1}; rl¹* Gehirnen sind signifikant kleiner als *rl¹* Neuroblasten, welche eine wildtypische Neuroblastengröße aufweisen (Abb. 4.15O). Darüber hinaus waren *mbt^{P1}; rl¹* Neuroblasten auch kleiner als *mbt^{P1}* Neuroblasten. (Abb. 4.15O). Dies entspricht einer Phänotypverstärkung. Sie ist jedoch nur marginal, da der Durchmesser von 9,15 μm bei *mbt^{P1}* auf 8,61 μm bei der Doppelmutante fällt.

Die Aktivierung des klassischen MAPK-Signalweges führt zur Phosphorylierung von ERK an zwei Serinresten, die die Kinase aktivieren und damit eine Translokation in den Zellkern sowie die Phosphorylierung von Zielproteinen durch ERK induzieren. Als Maß für die Aktivierung des MAPK-Signalweges in der *mbt^{P1}* Mutante wurden daher Gehirne aus wandernden L3 Larven gegen ERK und Di-phospho-ERK gefärbt. ERK zeigte eine ubiquitär zytoplasmatische Lokalisation und allenfalls ein nur sehr schwaches Signal im Zellkern in wildtypischen und in *mbt^{P1}* Neuroblasten (Abb. 4.16A-D₂). Di-phospho-ERK zeigte in der Interphase sowohl im Wildtyp, als auch in der *mbt^{P1}* Mutante ein deutliches, punktförmiges Signal im Zellkern (Abb. 4.16E-F₂). Während der Mitose lokalisierte Di-phospho-ERK vorwiegend an beiden Zentrosomen (Abb. 4.16G-G₂). Neben der zentrosomalen Lokalisation war eine pErk-Färbung zwischen den beiden Zentrosomen zu beobachten, die möglicherweise auf eine Lokalisation von pErk an der mitotischen Spindel oder an Chromosomen hinweist (Abb. 4.16G-G₂). Grundsätzlich war in *mbt^{P1}* Neuroblasten keine Veränderung der Lokalisation von Di-phospho-ERK zu beobachten (Abb. 4.16H-H₂). Die genetische Interaktion im Auge weist auf eine Beteiligung von *mbt* am MAPK-Signalweg hin. Die in Neuroblasten mit *rl¹* beobachteten Effekte sind schwach bzw. scheinen widersprüchlich, da der Phänotyp bezüglich der Gesamtneuroblastenanzahl supprimiert, bezüglich der Anzahl mitotischer Neuroblasten hingegen verstärkt wird. In Neuroblasten konnte daher keine eindeutige Interaktion mit *rl¹* festgestellt werden. Auf Ebene der ERK-Aktivierung war ebenfalls kein Einfluss von *mbt^{P1}* verifizierbar.

4 Ergebnisse

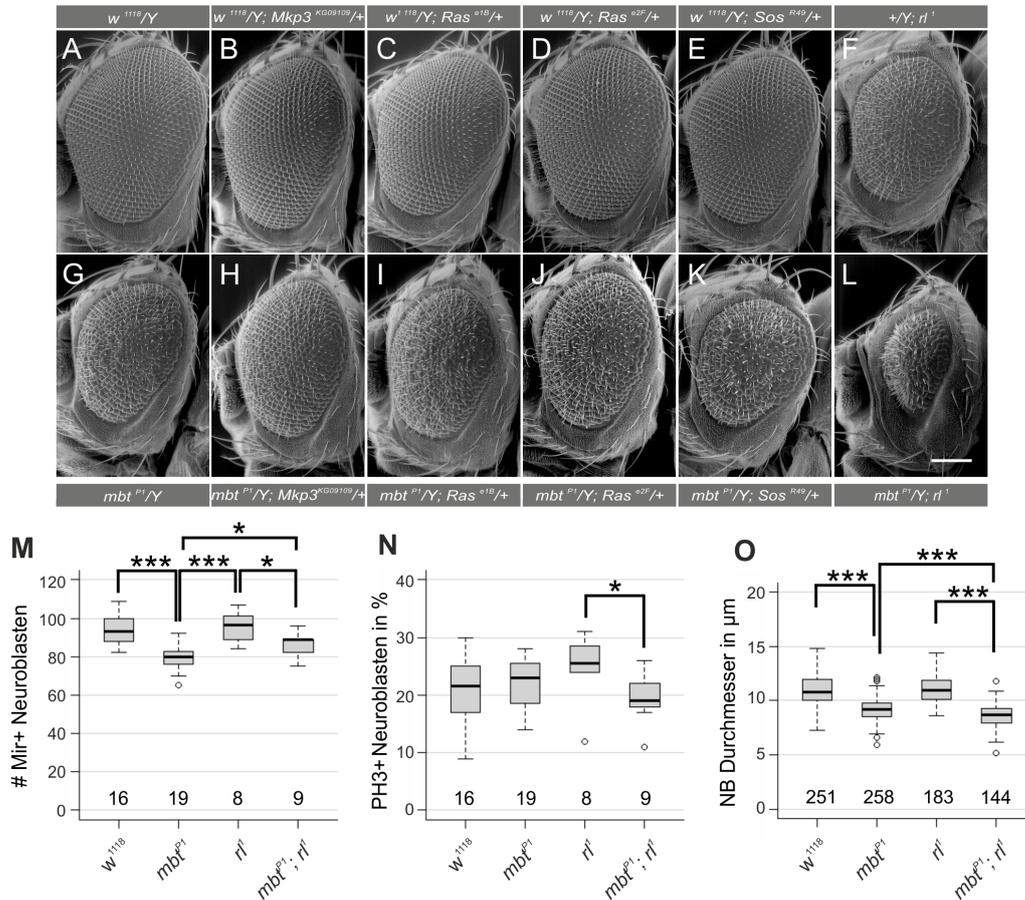


Abbildung 4.15. *mbt^{P1}* interagiert mit dem MAPK-Signalweg. (A-L) Lof Mutationen von Komponenten des klassischen MAPK-Signalweges wurden in den *mbt^{P1}* Hintergrund eingekreuzt. Die Abbildung zeigt Augen von männlichen Fliegen. (A-E) Die Reduktion der Gendosis von *Mkp3*, *Ras* und *Sos* beeinflusst das Fliegenauge nicht. (F) Die Reduktion der Gendosis von *rl* führt zu leicht rauhen Augen. (G) *mbt^{P1}* Fliegen haben rauhe Augen. (H) Einkreuzen von *Mkp3^{KG09109}* führt zu einer leichten Suppression des *mbt^{P1}* Phänotyps. (I, J) *Ras*-Allele verstärken den Phänotyp leicht. (K, L) *Sos^{R49}* und *rl¹* führen zu einer deutlichen Verstärkung des *mbt^{P1}* Phänotyps. (M-O) Gehirne von wandernden L3 Larven wurden gegen Miranda, aPKC und phospho-Histon 3 gefärbt. Die Gesamtanzahl der Neuroblasten und die Anzahl mitotischer Neuroblasten, sowie der Neuroblastendurchmesser wurde bestimmt. (M) Quantifizierung der Gesamtanzahl von Neuroblasten. (N) Quantifizierung der Anzahl mitotischer Neuroblasten. (O) Quantifizierung von Neuroblastengröße. Maßstab: 100 µm. * = p < 0,05, *** = p < 0,0001.

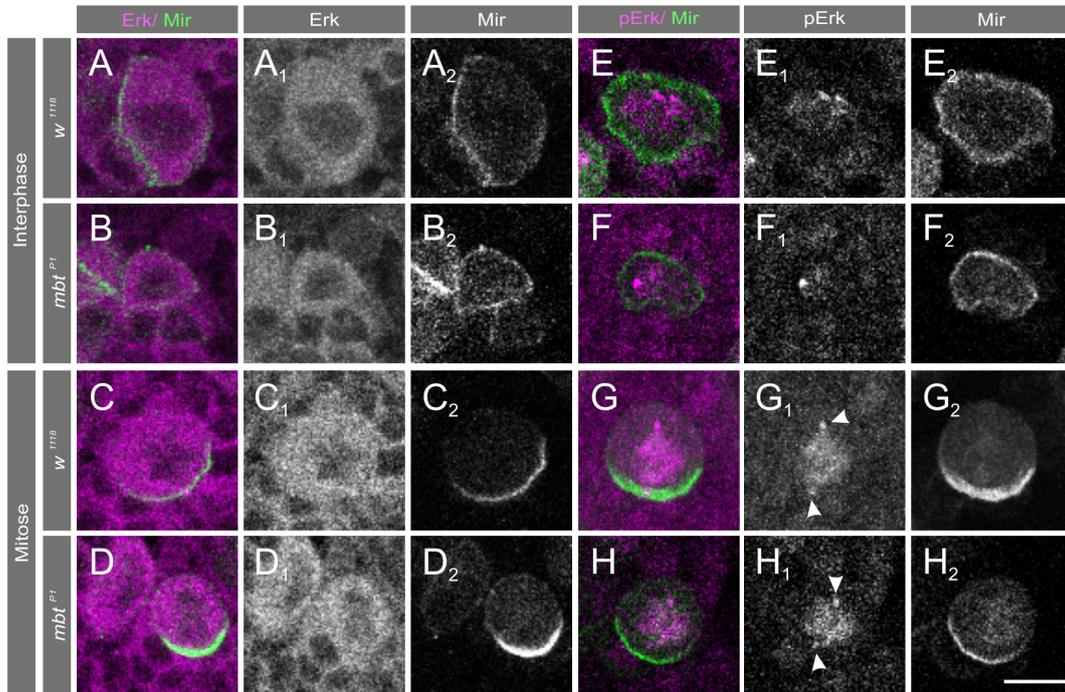


Abbildung 4.16. *mbt*^{P1} beeinflusst pERK nicht. Gehirne wandernder L3 Larven wurden gegen Miranda und ERK bzw. pERK gefärbt. Abgebildet sind einzelne konfokale Ebenen. (A-B₂) In der Interphase zeigen *w*¹¹¹⁸ und *mbt*^{P1} Neuroblasten eine starke zytoplasmatische ERK-Färbung. (C-D₂) Während der Mitose lokalisiert ERK in beiden Genotypen hauptsächlich im Zytoplasma. (E-F₂) pERK lokalisiert in der Interphase von wildtypischen und *mbt*^{P1} Neuroblasten in punktförmigen Strukturen im Zellkern. (G-H₂) Während der Mitose lokalisiert pERK in beiden Genotypen sowohl an beiden Zentrosomen (Pfeilspitzen) als auch zwischen den Zentrosomen an der mitotischen Spindel oder an Chromosomen. Maßstab: 10 µm.

4.4 Identifizierung von Downstream-Effektoren mittels 2D-Gelen

Zusätzlich wurde für die Suche nach Downstream-Effektoren von Mbt ein 2D-PAGE Ansatz gewählt, um systematisch nach durch Verlust von Mbt verursachten Veränderungen im Proteom zu suchen. Gehirne von wandernden L3 Larven wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stephanie Pütz mittels zweidimensionaler-Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurden die im Lysat der Gehirne enthaltenen Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt und in einem zweiten Schritt nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Nach Färbung der Gele wurden die Protein-Spotmuster auf Unterschiede hin analysiert um differentielle, also durch Verlust von Mbt beeinflusste, Spots zu finden. Diese Spots wurden ausgestochen und zur massenspektrometrischen Analyse geschickt. Bei drei

Wiederholungen waren vier Spots reproduzierbar verändert (Abb.4.17 Rahmen in A, B). Die Auswertung der massenspektrometrischen Daten ergab eine Liste möglicher Kandidatenproteine für jeden Spot (Tabellen 4.2, 4.3, 4.4, 4.5). In den Spots Nr. 1 und Nr. 3 wurden von vielen verschiedenen Proteinen relativ viele Peptide identifiziert, sodass hier eine eindeutige Zuordnung des regulierten Proteins nicht erfolgen konnte. Die wahrscheinlichsten Kandidatenproteine sind in den Tabellen 4.2 und 4.3 aufgeführt. Bei den Spots Nr. 4 und Nr. 12 konnten jedoch mit relativ großer Sicherheit die regulierten Proteine identifiziert werden. Diese sind Hsp83 in Spot Nr. 12 und Bicaudal (Bic) in Spot Nr. 4 (Abb.4.17A₂, B₃ und Tab. 4.4 und 4.5).

Für Bic existiert ein polyklonaler Antikörper mit dem Bic in larvalen Gehirnen, unter anderem in Neuroblasten, nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Das Protein Hsp83 ist ein interessantes Kandidatenprotein, da es im Zusammenhang mit der Regulation des MAPK-Signalweges beschrieben worden ist (VAN DER STRATEN ET AL., 1997). Bic und Hsp83 wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit in Gehirnen von *w¹¹¹⁸* und *mbt^{P1}* Larven näher charakterisiert (C. Alonso y Rudi). Bisher konnte jedoch keines der beiden Proteine eindeutig mit Mbt oder einem durch Mbt verursachten Phänotyp in Verbindung gebracht werden. Bei Betrachtung der biologischen Prozesse an denen die identifizierten Proteine beteiligt sind fällt auf, dass die drei identifizierten Proteine Bic, Nacalpa und Tropomyosin 1 (Tm1) alle die Lokalisation von Oskar mRNA beeinflussen (Tab. 4.6). Da Bic mit relativ großer Wahrscheinlichkeit ein von Mbt reguliertes Protein ist, könnte diese Koinzidenz möglicherweise auf eine Beteiligung von Mbt an Prozessen hinweisen, die mit der Lokalisation von mRNA assoziiert sind.

4 Ergebnisse

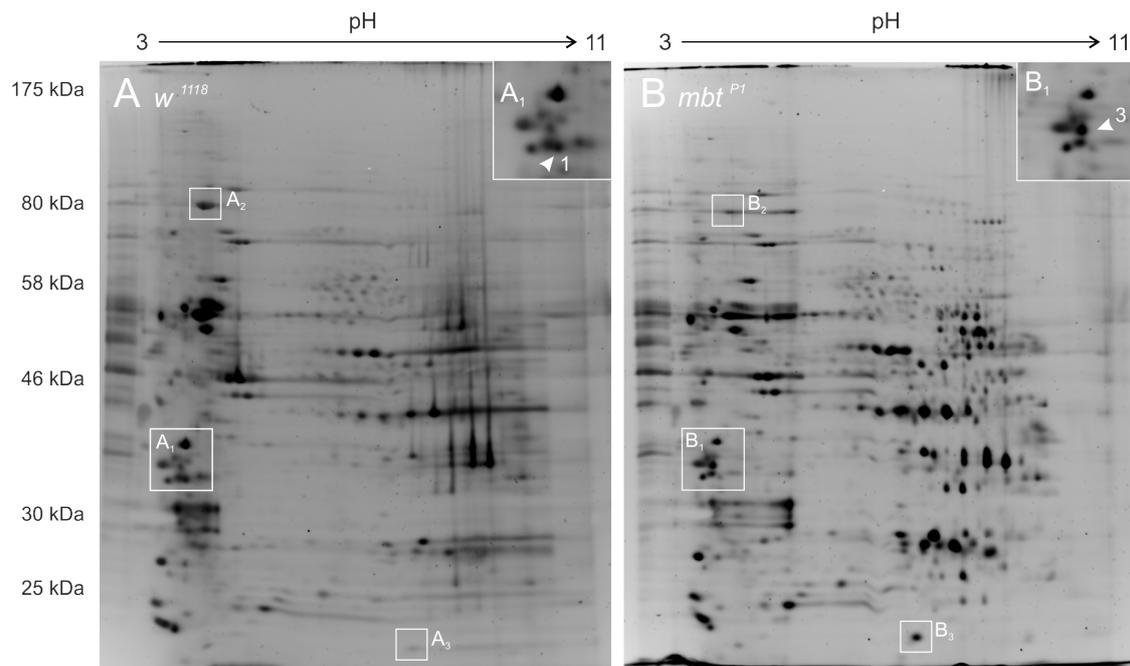


Abbildung 4.17. Der Verlust von Mbt führt zu Veränderungen im Proteom larvaler Gehirne. Gezeigt werden RuBPs-gefärbte 2D-Gele, auf denen Lysate von Gehirnen wandernder L3 Larven aufgetrennt wurden. Es wurden Proteine im pH-Bereich 3 - 11 aufgetrennt. (A) *w¹¹¹⁸*. (B) *mbt^{P1}*. (A₁, B₁) Spot Nr. 1 war im Wildtyp zu sehen und in der *mbt^{P1}* Mutante deutlich reduziert. Spot Nr. 3 dagegen war in der *mbt^{P1}* Mutante deutlich stärker sichtbar als im Wildtyp. (A₂, B₂) Spot Nr. 12 war in der Mutante sehr viel schwächer ausgeprägt als im Wildtyp. (A₃, B₃) Spot Nr. 4 zeigte eine deutliche Verstärkung in der Mutante.

Tabelle 4.2. Kandidatenproteine für Spot 1. Die Kandidatenproteine sind nach der Summe der Mascot-Scores aus den Einzelexperimenten sortiert. Es wurden nur Proteine in die Liste aufgenommen, die mindestens in einem Einzelexperiment einen emPAI von 0.5 erreichten. Spots aus verschiedenen Wiederholungen sind mit a, b und c gekennzeichnet. Seq gibt die Anzahl der identifizierten Peptide an.

Gen	emPAI 1a	emPAI 1b	emPAI 1c	Seq 1a	Seq 1b	Seq 1c	Score 1a	Score 1b	Score 1c
AnnX	0.60	1.38	2.49	7(6)	11(11)	15(14)	228	565	732
AnnIX	0.86	2.73	2.20	10(8)	17(17)	15(15)	296	656	451
CG10527	1.41	1.21	0.85	10(10)	9(9)	8(7)	322	289	294
Tm1	0.33	1.14	3.60	3(3)	9(8)	17(15)	84	281	458
mus209	0.33	1.85	1.14	5(3)	11(10)	8(8)	156	324	286
GstS1	0.35	1.24	1.48	3(3)	9(8)	9(9)	87	201	240
Clc	0.42	1.26	1.26	4(3)	7(7)	8(7)	75	185	169
RpS3A	0.10	0.73	0.32	1(1)	6(6)	3(3)	28	147	42

Tabelle 4.3. Kandidatenproteine für Spot 3. Die Kandidatenproteine sind nach der Summe der Mascot-Scores aus den Einzelexperimenten sortiert. Es wurden nur Proteine in die Liste aufgenommen, die mindestens in einem Einzelexperiment einen emPAI von 0.5 erreichten. Spots aus verschiedenen Wiederholungen sind mit a und b gekennzeichnet. Seq gibt die Anzahl der identifizierten Peptide an.

Gen	emPAI 3a	emPAI 3b	Seq 3a	Seq 3b	Score 3a	Score 3b
mus209	2.80	1.36	12(12)	9(9)	725	285
AnnX	1.55	0.48	13(12)	5(5)	597	301
CG10527	1.41	1.02	10(10)	8(8)	417	288
Cbp53E	1.56	0.60	10(10)	7(6)	468	209
epsilonCOP	1.43	1.24	11(11)	10(10)	350	261
Nacalpa	0.83	0.83	6(5)	5(5)	317	253
RpLP0	0.77	0.51	8(7)	7(5)	268	182
Clc	1.85	0.79	9(9)	6(5)	246	155

Tabelle 4.4. Kandidatenproteine für Spot 4. Die Kandidatenproteine sind nach der Summe der Mascot-Scores aus den Einzelexperimenten sortiert. Es wurden nur Proteine in die Liste aufgenommen, die mindestens in einem Einzelexperiment einen emPAI von 0.5 erreichten. Spots aus verschiedenen Wiederholungen sind mit b und c gekennzeichnet. Seq gibt die Anzahl der identifizierten Peptide an.

Gen	emPAI 4b	emPAI 4c	Seq 4b	Seq 4c	Score 4b	Score 4c
bic	9.07	12.70	16(13)	21(18)	387	526
RpL14	0.54	1.04	4(3)	5(5)	96	181
His2B:CG17949	0.81	0.81	3(3)	4(3)	104	101
RpL40	1.06	1.06	4(3)	4(3)	72	60

Tabelle 4.5. Kandidatenproteine für Spot 12. Die Kandidatenproteine sind nach der Summe der Mascot-Scores aus den Einzelexperimenten sortiert. Es wurden nur Proteine in die Liste aufgenommen, die mindestens in einem Einzelexperiment einen emPAI von 0.5 erreichten. Spots aus verschiedenen Wiederholungen sind mit b und c gekennzeichnet. Seq gibt die Anzahl der identifizierten Peptide an.

Gen	emPAI 12b	emPAI 12c	Seq 12b	Seq 12c	Score 12b	Score 12c
Hsp83	8.58	7.05	68(60)	63(55)	2762	4770
Gga	0.60	0.54	15(12)	13(11)	267	321

Tabelle 4.6. Biologische Prozesse, an denen die Kandidatenproteine beteiligt sind. Die Nomenklatur folgt Gene Ontology (GO)-Standards. Die Kandidatenproteine sind alphabetisch sortiert.

Gen	GO Biologische Prozesse
AnnX	-
AnnIX	wing disc dorsal/ventral pattern formation
bic	regulation of establishment of protein localization; regulation of pole plasm oskar mRNA localization; intracellular mRNA localization involved in anterior/posterior axis specification
Cbp53E	cellular calcium ion homeostasis
CG10527	-
Clc	neurotransmitter secretion; neurotransmitter transport; synaptic vesicle coating; neurotransmitter secretion; synaptic vesicle coating; intracellular protein transport
epsilonCOP	retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER
Gga	post-Golgi vesicle-mediated transport
GstS1	response to oxidative stress
His2B:CG17949	nucleosome assembly
Hsp83	cellular component organization or biogenesis; biological regulation; response to stress; organelle organization; cell cycle; multicellular organism reproduction; response to stimulus; response to temperature stimulus; cell cycle process; response to cold; gamete generation
mus209	DNA replication; mitotic spindle organization; eggshell chorion gene amplification; antimicrobial humoral response; DNA-dependent DNA replication; mismatch repair; nucleotide-excision repair; leading strand elongation; neurogenesis; regulation of DNA replication
Nacalpa	neurogenesis; regulation of pole plasm oskar mRNA localization; oogenesis
RpL14	centrosome organization; mitotic spindle elongation; negative regulation of neuron apoptotic process; mitotic spindle organization; centrosome duplication
RpL40	ubiquitin-dependent protein catabolic process; translation; cellular protein modification process
RpLP0	translation; DNA repair; translational elongation; ribosome biogenesis
RpS3A	mitotic spindle elongation; mitotic spindle organization; oogenesis; translation
Tm1	pole plasm oskar mRNA localization; muscle contraction; dendrite morphogenesis; pole plasm assembly; oogenesis; regulation of lamellipodium assembly

5 Diskussion

Der Verlust der p21-aktivierten Kinase Mbt führt zu einer Verkleinerung von Neuropilen im adulten Gehirn (MELZIG ET AL., 1998). Dabei zeigt der Pilzkörper die stärkste Größenreduktion (MELZIG ET AL., 1998). Diese geringere Größe wird durch eine verringerte Neuronenanzahl verursacht, welche durch einen Defekt in Neuroblasten, GMCs oder Neuronen verursacht werden könnte (MELZIG ET AL., 1998). In dieser Arbeit wurde die Rolle von Mbt in Neuroblasten des larvalen Zentralhirns untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Mbt eine Komponente des apikalen Proteinkomplexes in Neuroblasten ist und eine Rolle bei der Regulation der Zellgröße, der Proliferation und dem Überleben von Neuroblasten spielt. Es wurde eine mögliche Funktion von Mbt in verschiedenen, für Zellgrößen- und Proliferationsregulation relevanten Signalwegen und Prozessen getestet. Cno wurde als Downstream-Effektor von Mbt identifiziert.

5.1 Mbt ist Teil des apikalen Proteinkomplexes ohne den grundlegenden Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung zu beeinflussen

Mbt ist in Neuroblasten vorhanden und kolokalisiert mit den apikalen Baz-Par6-aPKC- und Pins-G*α*i-Mud-Komplexen in Abhängigkeit vom Zellzyklus. Die apikale Lokalisation von Mbt wird über Cdc42 reguliert. Dieser Cdc42-abhängige Lokalisationsmechanismus scheint die Lokalisation von Mbt generell zu regulieren, da er nicht nur in Neuroblasten existiert, sondern auch für die Lokalisation von Mbt an Adhärenzverbindungen in Photorezeptorzellen beschrieben wurde (SCHNEEBERGER & RAABE, 2003). Cdc42 akkumuliert am apikalen Pol von mitotischen Neuroblasten und ist ein wichtiger Regulator von asymmetrischer Zellteilung. Es steuert die apikale Lokalisation von aPKC und Par6 während der Mitose und damit auch die basale Anreicherung von Miranda (ATWOOD ET AL., 2007). Im Gegensatz zu Cdc42-defizienten Neuroblasten zeigten *mbt^{P1}* Neuroblasten keine auffällige Fehllokalisierung von Proteinen der apikalen oder basalen Komplexe. Somit ist Mbt offensichtlich kein zentraler Mediator dieser Cdc42-abhängigen

Prozesse, sondern erfüllt andere Funktionen als Cdc42 Downstream-Effektor. Da Mbt präferentiell an GTP-beladenes Cdc42 bindet, kann es als Sensor für lokale Aktivierung von Cdc42 angesehen werden (SCHNEEBERGER & RAABE, 2003). Die apikale Anreicherung von Mbt in Neuroblasten ist essentiell für die Funktion von Mbt in Neuroblasten, da ein Cdc42-bindungsdefizientes Mbt, welches hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert, den adulten Pilzkörperphänotyp nicht retten kann. Das Cdc42-bindungsdefiziente $Mbt^{H19/22L}$ verhindert jedoch den vorzeitigen Verlust von Neuroblasten und erzeugt leicht vergrößerte Neuroblasten im Vergleich zur Nullmutante. Neuroblasten mit Cdc42-bindungsdefizientem Mbt erreichen jedoch nicht die wildtypische Zellgröße. Dies steht im Einklang mit einer schwachen kortikalen Lokalisation von $Mbt^{H19/22L}$. Die kortikale Lokalisation von $Mbt^{H19/22L}$ könnte möglicherweise ein Effekt der Überexpression sein. Mbt und Par6 interagieren mit Cdc42 über die gleiche Bindungsstelle (ATWOOD ET AL., 2007). Eine weitere offene Frage ist daher, wie die Bindung von Mbt und Par6 an Cdc42 reguliert wird. Denkbar wäre, dass Par6 und Mbt gleichzeitig an unterschiedliche Subpopulationen von Cdc42 binden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Interaktion der beiden Proteine mit Cdc42 nacheinander stattfindet.

5.2 Mbt ist kein zentraler Regulator des Zytoskeletts, beeinflusst aber Cnoe Lokalisation in Neuroblasten

PAK-Proteine sind bekannt für ihre Rolle als Regulatoren des Zytoskeletts. mbt^{P1} Neuroblasten zeigten keine auffallenden Veränderungen des Aktin- oder α -Tubulin Zytoskeletts im Verlauf des Zellzyklus. Astrale Mikrotubuli zeigten keine auffallenden Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp und deuten somit einen funktionierenden Mechanismus zur Spindelorientierung an. Die asymmetrische Lokalisation apikaler und basaler Proteinkomplexe hängt vom Aktinzytoskelett ab (BROADUS & DOE, 1997; KNOBLICH ET AL., 1997). Fehlende Lokalisations-Defekte von Zellschicksaldeterminanten in mbt^{P1} Neuroblasten weisen auf ein intaktes Aktinzytoskelett hin.

Mbt reguliert die apikale Anreicherung des Aktin-assoziierten Proteins Cno in Neuroblasten über einen Kinase-unabhängigen Mechanismus. Cno bildet einen Komplex mit Pins und spielt eine Rolle bei der Rekrutierung von Mud durch Pins (SPEICHER ET AL., 2008; WEE ET AL., 2011). Der Verlust von Cno resultiert in embryonalen Neuro-

blasten in Spindelorientierungsdefekten und der Fehllokalisierung von Numb und Mud (SPEICHER ET AL., 2008). Die Lokalisation von Pins wird durch den Verlust von Mbt nicht beeinflusst. Obwohl Cno in *mbt^{P1}* Neuroblasten keine apikale Anreicherung mehr zeigt, wurden die für *cno* Mutanten beschriebenen Defekte bei der Numb-Lokalisation nicht beobachtet (SPEICHER ET AL., 2008). *mbt^{P1}* Neuroblasten zeigten leichte Lokalisationsdefekte von Mud an Zentrosomen. Dieser Phänotyp sollte jedoch in einer größeren Stichprobe genauer analysiert werden, um eine zuverlässige Aussage treffen zu können. Eine Möglichkeit um Mud-Lokalisation an Zentrosomen besser beurteilen zu können, wären Ko-Färbungen mit einem zentrosomalen Marker wie γ -Tubulin. Der Verlust von Cno führt auch zu einem Verlust der apikalen Anreicherung von Mud (SPEICHER ET AL., 2008). Da diese jedoch mit den verwendeten Antikörpern nicht detektiert wurde, kann über einen Effekt von Mbt auf apikale Mud-Anreicherung keine Aussage getroffen werden. Auffallende Defekte der Spindelorientierung wie eine Orientierung der mitotischen Spindel im 90° Winkel zur apikobasalen Achse wurden nicht beobachtet. Ob leichte Abweichungen auftreten ist in fixierten Präparaten schwer zu beurteilen, da sie nur Momentaufnahmen darstellen. Hier besteht die Möglichkeit, Spindelorientierung in *mbt^{P1}* Neuroblasten noch genauer zu untersuchen, beispielsweise über eine Quantifizierung der Abweichung der Spindelachse von der apikobasalen Achse durch Winkelmessungen. Auch Live-Imaging-Experimente könnten weiteren Aufschluss über leichte Abweichungen bei der Spindelorientierung geben, da sie die Verfolgung von Neuroblasten durch den kompletten Zellzyklus und die Analyse präzise definierter Zeitpunkte ermöglichen. SPEICHER ET AL. (2008) untersuchten Nullallele von *cno*. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die für Cno-Verlust beschriebenen Phänotypen in *mbt^{P1}* Neuroblasten nicht beobachtet wurden, wäre, dass Cno in *mbt^{P1}* Neuroblasten zwar keine starke Anreicherung mehr zeigt, grundsätzlich aber in den Neuroblasten noch vorhanden ist und dadurch seine Funktion zumindest teilweise noch erfüllen kann.

Das Aktin-assoziierte Protein beta-Catenin und sein *Drosophila*-Ortholog Armadillo wurden als Bindungspartner und Phosphorylierungssubstrate von PAK-Proteinen identifiziert (HE ET AL., 2008; LI ET AL., 2012; MENZEL ET AL., 2008). PAK1-abhängige Phosphorylierung von beta-Catenin stimuliert beta-Catenin-abhängige Transkription (HE ET AL., 2008; SUN ET AL., 2009). Die Phosphorylierung von beta-Catenin an S675 ist notwendig für Insulin-induzierte beta-Catenin-abhängige Transkription und Zellproliferation (SUN ET AL., 2009). Mbt phosphoryliert Armadillo an dem S675 entsprechenden S688 (MENZEL ET AL., 2008). Weder der Verlust von Mbt noch die Mutation

der beiden von Mbt phosphorylierten Serine S561 und S688 zu Alanin oder Glutamat beeinflussten die Lokalisation von Armadillo in Neuroblasten. Aufgrund der sehr kleinen Stichprobe sollte das Lokalisationsexperiment für die Armadillo-Mutanten jedoch wiederholt werden. Bisher wurde ausschließlich Lokalisation von Armadillo in Abhängigkeit von Mbt untersucht. Aussagekräftiger wäre die Analyse von Armadillo-Funktion, beispielsweise die Überprüfung der Transkription von Armadillo-Zielgenen oder ein Reporter-Konstrukt für Armadillo-Transkription. Dies wurde bisher nicht getestet, da ein geeignetes Zielgen in Neuroblasten nicht bekannt war bzw. kein Reporter-Konstrukt für Fliegen verfügbar war.

Der Verlust von murinem PAK4, dem Mbt Ortholog, ist lethal und führt zu starken Defekten bei der Neuralentwicklung (QU ET AL., 2003; TIAN ET AL., 2011). Kürzlich wurde auch eine Rolle für PAK4 in neuronalen Vorläuferzellen beschrieben (TIAN ET AL., 2011). In Mäusen führt der Verlust von PAK4 zu einem Verlust von Adhärenzverbindungen an der Oberfläche der Ventrikel. Dies beeinträchtigt die Proliferation von Vorläuferzellen und führt schließlich zu deren Verlust (TIAN ET AL., 2011). Obwohl Mbt genau wie das Vertebraten Ortholog eine Rolle bei der Gehirnentwicklung spielt, unterscheiden sich die molekularen Mechanismen demnach deutlich. *mbt^{P1}* Neuroblasten zeigen keine offensichtlichen Veränderungen der Armadillo-Lokalisation, was auf intakte Adhärenzverbindungen schließen lässt.

5.3 Mbt reguliert Proliferation von Pilzkörperneuroblasten

Pilzkörperneuroblasten in Embryonen der *mbt* Nullmutante *mbt^{P1}* exprimieren die charakteristische Kombination an Transkriptionsfaktoren und werden folglich richtig spezifiziert (KUNZ ET AL., 2012; MELZER ET AL., 2013). Die klonale Analyse der Pilzkörperneuroblasten zeigte, dass *mbt^{P1}* Neuroblasten alle Subtypen von Pilzkörperneuronen generieren können und diese nicht nur überleben, sondern auch richtig differenzieren und ihr charakteristisches, axonales Projektionsmuster ausbilden. Die unveränderte Kenyonzell-Morphologie weist darauf hin, dass Mbt, im Gegensatz zu Pak1, keine tragende Rolle bei der Differenzierung von Neuronen spielt (NG & LUO, 2004). Auch die Reorganisation der axonalen Projektionen von Pilzkörperneuronen während der Metamorphose scheint *mbt^{P1}* nicht zu beeinflussen. Stattdessen zeigen Pilzkörperneuroblasten der *mbt^{P1}* Mutante ein gestörtes Proliferationsverhalten. Die klonale Analyse erlaubte eine genaue Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Pilzkörperneuroblasten im zeitlichen Verlauf. Es konnte zwischen zwei Defekten unterschieden werden.

Einige Neuroblasten proliferierten während des kompletten normalen Entwicklungszeitfensters vom Embryo bis in die Puppe und generierten alle Kenyonzelltypen. Insgesamt produzierten sie jedoch weniger Neurone als der Wildtyp, was auf eine verlangsamte Proliferationsrate schließen lässt. Andere Neuroblasten proliferierten nur zu Beginn des Zeitfensters und stellten die Proliferation dann vorzeitig komplett ein. Beides zeigt eine verringerte Proliferationskapazität. Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Proliferationsphänotypen könnten Phänotypvariation oder ein unterschiedlicher Effekt von *mbt^{P1}* auf Subtypen der Pilzkörperneuroblasten sein (KUNZ ET AL., 2012).

Warum reguliert Mbt lediglich die Proliferation von Pilzkörperneuroblasten, jedoch nicht die anderer Neuroblasten im Zentralhirn? Neuroblastenlinien unterscheiden sich sehr stark in ihrem Proliferationsverhalten und es besteht die Möglichkeit, dass der Verlust von Mbt in unterschiedlichen Linien nicht die gleichen Auswirkungen zeigt und daher ein Einfluss von Mbt auf Proliferation erst bei einer linienspezifischen Analyse nachgewiesen werden kann. Zudem ist unklar, ob *mbt* in allen Neuroblasten exprimiert wird. Die Analyse weiterer Neuroblastenlinien wie beispielsweise Typ II Neuroblasten könnte über differentielle Effekte von Mbt Aufschluss geben. Typ II Neuroblasten generieren Teile des Zentralkomplexes (IZERGINA ET AL., 2009; JIANG & REICHERT, 2012). Die Neuropile des Zentralkomplexes sind in der *mbt^{P1}* Mutante zum Teil auch kleiner als im Wildtyp. Die Größenreduktion ist jedoch weniger stark ausgeprägt als beim Pilzkörper (MELZIG ET AL., 1998). Dies könnte auf eine geringere Expression von *mbt* oder einen geringeren Effekt von Mbt in Typ II Neuroblasten hinweisen.

5.4 Mbt beeinflusst das Überleben von Neuroblasten, nicht aber von Neuronen

Der Verlust von Mbt führt zu einem vorzeitigen Verlust von Neuroblasten durch Apoptose. Dieser Phänotyp war nicht nur bei der spezifischen Analyse von Pilzkörperneuroblasten sichtbar, sondern wurde für die komplette Neuroblastenpopulation des Zentralhirns bestätigt. Durch Inhibition von Apoptose kann zwar die wildtypische Anzahl der Neuroblasten wieder hergestellt werden, es kann jedoch nicht der adulte Pilzkörperphänotyp der *mbt^{P1}* Mutante gerettet werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Apoptose von *mbt^{P1}* Neuroblasten ein sekundärer Effekt ist.

Weiterhin bestand die Möglichkeit, dass der adulte Pilzkörperphänotyp in *mbt^{P1}* Mutanten nicht nur aufgrund von Defekten in Neuroblasten entsteht, sondern auch durch

Apoptose von Neuronen bedingt sein kann. Die Analyse einzelner Pilzkörper-Neurone in adulten Gehirnen zeigte jedoch keine auffallenden Anzeichen von Zelltod. Die genetische Unterdrückung von Apoptose in allen Zellen im Gehirn und spezifisch in den Pilzkörperneuronen konnte den adulten Pilzkörperphänotyp der *mbt^{P1}* Mutante nicht retten. Dies zeigt, dass das Überleben von Neuronen nicht von Mbt abhängt.

5.5 Eine mögliche Rolle von Mbt im Regulationsnetzwerk von Zellgröße und Proliferation

Mehrfach wurde für Neuroblasten gezeigt, dass Proliferation und Zellgröße positiv miteinander korreliert sind. Larvale Neuroblasten nehmen zunächst an Zellgröße zu, bevor sie nach der Quieszenz wieder mit der Proliferation beginnen (CHELL & BRAND, 2010; TRUMAN & BATE, 1988). Die genetische Hemmung des Neuroblastenwachstums verhindert den Wiedereintritt in die Proliferation (CHELL & BRAND, 2010). In einem Zellkultursystem wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit einer Zellteilung mit zunehmender Zellgröße steigt (TZUR ET AL., 2009). Dies weist auf die Existenz einer minimal notwendigen Zellgröße für Proliferation hin.

Weiterhin verlieren sowohl embryonale als auch larvale Neuroblasten an Zellgröße, bevor sie die Proliferation in späten embryonalen oder larvalen Stadien verringern und schließlich beenden (HARTENSTEIN ET AL., 1987; MAURANGE ET AL., 2008; SIEGRIST ET AL., 2010; TRUMAN & BATE, 1988). Einer Reduktion der Proliferation geht also immer eine Reduktion der Zellgröße voraus. Die Daten für *mbt^{P1}* Neuroblasten unterstützen diesen Zusammenhang, da sie kleiner sind als wildtypische Neuroblasten und zumindest Pilzkörperneuroblasten im Vergleich eine geringere Proliferationsfähigkeit besitzen (MELZER ET AL., 2013). *mbt^{P1}* Neuroblasten zeigen Größenwachstum während der Larvalentwicklung, sind jedoch immer kleiner als wildtypische Neuroblasten. Dies weist auf eine Störung der Regulationsmechanismen für Zellgrößenwachstum in Neuroblasten hin.

Wie könnte Mbt Zellwachstum und -proliferation regulieren? Die Insulin- und Tor-Signalwege sind zentrale Größen- und Wachstumsregulatoren von Zellen, Geweben und Organismen (GREWAL, 2009; TELEMAN, 2009). Der Insulin-Signalweg reguliert die Reaktivierung der Neuroblasten nach der Quieszenz und die rechtzeitige Beendigung der Proliferation (CHELL & BRAND, 2010; SIEGRIST ET AL., 2010). Während der Reaktivierung induzierte die Aktivierung des Insulin-Signalweges eine für den Proliferationsbeginn notwendige Zunahme der Neuroblastengröße (CHELL & BRAND, 2010).

Die Aktivierung des Insulin-Signalweges führte zusammen mit der gleichzeitigen Inhibition von Apoptose zu größeren Neuroblasten, einem verlängerten Proliferationszeitfenster und einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit von Neuroblasten (SIEGRIST ET AL., 2010). Bei Vertebraten wurde PAK1 als Verknüpfungspunkt zwischen dem Insulin- und dem Wnt-Signalweg beschrieben (SUN ET AL., 2009). Insulin-Stimulation von Zellen führte zu verstärkter Phosphorylierung von beta-Catenin an S675, erhöhter beta-Catenin-abhängiger Transkription und Proliferation. Knock-down von PAK1 verhinderte die Phosphorylierung von beta-Catenin, Transkription und Proliferation. Wie oben beschrieben wurden für Armadillo in der *mbt^{P1}* Mutante keine Veränderungen beobachtet. Es existieren keine phospho-spezifischen Antikörper für die beiden Mbt-Phosphorylierungsstellen, so dass der Phosphorylierungsstatus nicht analysiert werden konnte. *mbt^{P1}* zeigte keine eindeutige genetische Interaktion mit Genen der Insulin- und TOR-Signalwege. pAkt und Foxo-GFP zeigten geringfügige Veränderungen in *mbt^{P1}* Neuroblasten. Die Ergebnisse könnten auf eine modulatorische Rolle von Mbt in diesem Netzwerk hinweisen, sie sollten jedoch durch weitere Experimente ergänzt werden. Für Foxo-GFP wären Intensitätsmessungen im Zellkern möglich um eine Lokalisationsänderung zu belegen. Darüber hinaus könnte beispielsweise mit einem Reporter für PIP₃ die Aktivierung von PI3K in *mbt^{P1}* Neuroblasten analysiert werden (BRITTON ET AL., 2002). Die oberen Komponenten des Insulin-Signalweges wie Chico (*Drosophila* Insulin receptor Substrate, IRS), PTEN und PI3K beeinflussen sowohl Zellgröße als auch Proliferation (Abb. 5.1) (BÖHNI ET AL., 1999; GOBERDHAN ET AL., 1999; LEEVERS ET AL., 1996). Die weiter unten im Signalweg liegende S6K beispielsweise beeinflusst nur Zellgröße (MONTAGNE ET AL., 1999). Die Förderung der Proliferation durch den Insulin-Signalweg wird über PI3K, PDK1 und Akt, und schließlich über den Hippo (Hpo)-Warts (Wts)-Signalweg und dessen Downstream-Effektor Yorkie (Yki), einen Transkriptionsfaktor, vermittelt (Abb. 5.1) (STRASSBURGER ET AL., 2012). *mbt* beeinflusst Zellgröße und Proliferation, was folglich auf eine Beteiligung im oberen Teil des Insulin-Signalweges hinweisen könnte. Die Gabelung des Insulin-Signalweges auf der Ebene von PI3K/PDK1/Akt bezüglich der Regulation von Proliferation und Zellgröße deutet auf Einflüsse von Mbt oberhalb oder auf dieser Ebene hin. Ob der Insulin-Signalweg in Neuroblasten auch über PI3K/PDK1 und Yki agiert wurde allerdings bisher nicht gezeigt. Ein Defekt bei einem zentralen Zellgrößenregulator könnte über längere Zeit ebenfalls zu einem Proliferationsdefekt führen. Der TOR-C1-Komplex ist ein zentraler Größenregulator, der verschiedenste Aspekte des Zellmetabolismus und damit des Zellwachstums kontrolliert (TELEMAN, 2009). TOR-C1 selbst wird auch über den Insulin-Signalweg

reguliert (TELEMAN, 2009). Diese Kopplung der beiden Signalwege scheint gewebe-spezifisch zu sein (PALLARES-CARTES ET AL., 2012). TOR-C1 reguliert unter anderem Myc, ein wichtiges Protein, das die Proteinbiosynthese-Kapazität einer Zelle durch Regulation der Ribosomenbiogenese kontrolliert (VAN RIGGELEN ET AL., 2010). Die Ribosomenbiogenese findet im Nukleolus statt, der in der *mbt^{P1}* Mutante auch Veränderungen aufweist. Dies könnte ein Hinweis auf eine Rolle von Mbt bei der Regulation der Proteinbiosynthese-Kapazität von Neuroblasten sein, über die ebenfalls Zellgröße beeinflusst wird. Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt wäre folglich die Analyse der Ribosomenbiogenese in *mbt^{P1}* Neuroblasten. Verschiedenen Ebenen der Ribosomenbiogenese könnten untersucht werden, beispielsweise die Transkription und Prozessierung ribosomaler RNA, oder die Reifung und Assemblierung oder der Transport von ribosomalen Untereinheiten.

mbt^{P1} Neuroblasten wachsen während der Larvalentwicklung genau wie wildtypische Neuroblasten und erreichen in 96 Stunden alten Larven ihre maximale Größe (MELZER ET AL., 2013). Dennoch sind *mbt^{P1}* Neuroblasten immer kleiner als wildtypische Neuroblasten (MELZER ET AL., 2013). Die absoluten Neuroblastengrößen zwischen auf Fliegenfutter (wandernde L3 Larven) und auf Fliegenfutter mit frischer Hefe (jüngere Larvenstadien) gehaltenen Larven unterscheiden sich innerhalb eines Genotyps extrem (Vgl. Abb.4.7G und H). Da offensichtlich das Futter einen so starken Einfluss auf absolute Neuroblastengrößen hat, können in diesem Fall die Werte von wandernden L3 Larven nicht mit denen jüngerer Larvenstadien verglichen werden. Gleichzeitig deuten diese Daten darauf hin, dass *mbt^{P1}* Neuroblasten auf Umweltveränderungen wie beispielsweise die Futterzusammensetzung reagieren können und somit der grundsätzliche Mechanismus der Wahrnehmung von Nährstoffen funktioniert. Die Nullmutante auch eines wichtigen metabolischen Regulators kann jedoch auf Standardfutter keine Wachstumsdefekte zeigen, wie im Fall von 4E-BP. Eine Nullmutante für *Thor*, das *Drosophila* 4E-BP, erreicht auf Standardfutter normales Gewicht, zeigt allerdings auf Hungermedium eine geringere Überlebenskurve (TELEMAN ET AL., 2005). Eine weitere interessante Frage wäre daher, ob *mbt^{P1}* Larven auf kalorien- oder Aminosäure-reduzierten Medien Wachstumsdefekte im Gehirn zeigen würden.

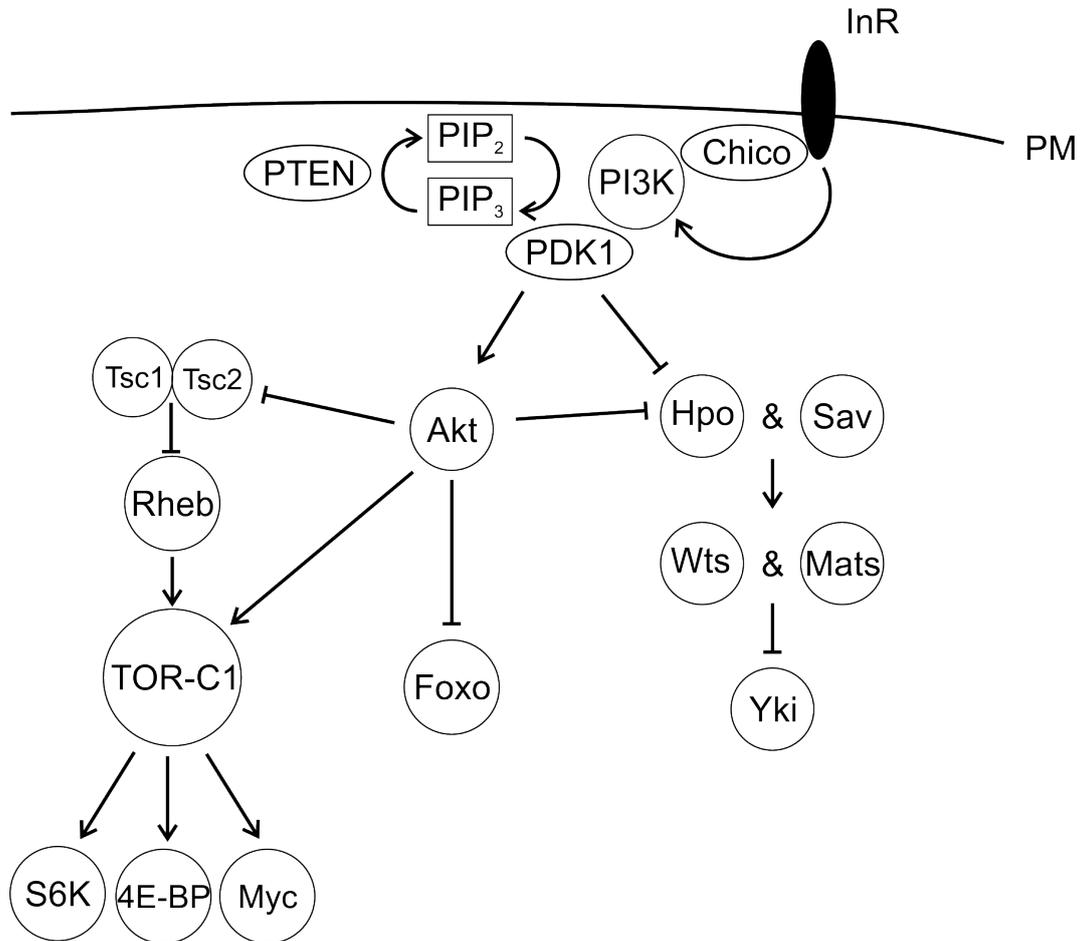


Abbildung 5.1. Schematische Darstellung des Insulin-Signalweges. Abbildung verändert nach STRASSBURGER ET AL. (2012) und TELEMANN (2009). Aktivierende Interaktionen zwischen Signalwegkomponenten sind mit Pfeilen dargestellt. Inhibitorische Interaktionen sind als Linien, die in einem Querbalken enden, abgebildet. Die Beziehungen zwischen den Signalwegkomponenten werden im Text beschrieben. PDK1: Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, 4E-BP: 4E-bindenden Proteins, hpo: Hippo, InR: Insulinrezeptor, Mats: mob as tumor-suppressor, PIP₂: Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat, PIP₃: Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat, PM: Plasmamembran, PTEN: Phosphatase and Tensin Homologue deleted on Chromosome 10, Rheb: Ras Homolog enriched in Brain Ortholog, S6K: S6-p70-Proteinkinase, Sav: Salvador, TOR: Target of Rapamycin, Tsc1: Tuberous Sclerosis Complex 1, Tsc2: Tuberous Sclerosis Complex 2, Wts: Warts, Yki: Yorkie.

5.6 Mbt ist möglicherweise am klassischen MAPK-Signalweg beteiligt

Der klassische MAPK-Signalweg reguliert unter anderem Überleben, Wachstum und Proliferation von Zellen. Außerdem interagiert der Signalweg an zahlreichen Stellen mit den Insulin- und Tor-Signalwegen (MENDOZA ET AL., 2011). Mbt zeigt im Auge eine starke Interaktion mit Genen des MAPK-Signalweges. Mbt und Erk gemeinsam beeinflussen Neuroblastenproliferation, die Erk-Aktivierung in *mbt^{P1}* Neuroblasten war jedoch nicht auffällig verändert. Die Beteiligung von Mbt am MAPK-Signalweg in Neuroblasten muss daher noch genauer untersucht werden, um eine sichere Aussage treffen zu können.

Eine Interaktion von *mbt^{P1}* mit dem MAPK-Signalweg ist auch im Hinblick auf Cno interessant. Cno wurde mehrfach mit dem MAPK-Signalweg in Zusammenhang gebracht. Unter anderem wurde eine Rolle von Cno downstream von Ras bei der Rotation von Ommatidien während der Augenentwicklung beschrieben (GAENGEL & MLODZIK, 2003). Bei der Spezifizierung von Herz- und Muskelvorläuferzellen liegt Cno jedoch oberhalb von Ras (CARMENA ET AL., 2006). In Neuroblasten wurde die Interaktion von Cno mit dem Ras-Signalweg noch nicht untersucht. Der Verlust von Cno führt zu Defekten bei der asymmetrischen Zellteilung, die in *mbt^{P1}* Neuroblasten nicht beobachtet wurden. Andererseits interagiert Mbt genetisch mit *rl*. Eine Analyse von *mbt^{P1}; rl¹* Neuroblasten könnte möglicherweise deutliche Defekte bezüglich asymmetrischer Zellteilung, Mud-Lokalisation oder Spindelorientierung aufdecken. Cno und Ras wurden darüber hinaus mit dem Notch-Signalweg in Verbindung gebracht (CARMENA ET AL., 2006). Notch reguliert Zellgröße und Neuroblastenproliferation und wäre damit ein weiterer möglicher Signalweg, an dem Mbt beteiligt sein könnte (SONG & LU, 2011; ZACHARIOUDAKI ET AL., 2012).

5.7 Bic und Hsp83 sind mögliche Downstream-Effektoren von Mbt

Die 2D-Gel-Analyse erbrachte für zwei Spots je ein eindeutiges Kandidatenprotein und für zwei weitere Spots jeweils eine Reihe von möglichen Kandidatenproteinen. Alle Kandidatenproteine müssen auf eine Interaktion mit Mbt hin getestet werden. Bic und Hsp83 sind die vielversprechendsten Kandidatenproteine, da sie eindeutig als regulierte Proteine identifiziert werden konnten. Hsp83 wurde als essentiell für die Funktion von Raf beschrieben und ist im Zusammenhang mit der genetischen Interaktion von

mbt^{P1} mit Komponenten des MAPK-Signalweges von besonderem Interesse (VAN DER STRATEN ET AL., 1997). Eine weitere Analyse wird durch fehlende Reagenzien wie beispielsweise spezifische Antikörper erschwert. Es existieren jedoch einige lof Allele von *Hsp83*, die für eine weitere Analyse genutzt werden können. Bic ist eine Komponente des heterodimeren Nascent Polypeptide Associated Complex (NAC), dem eine Rolle als Chaperon für neu synthetisierte Proteine zugeschrieben wird (PREISLER & DEUERLING, 2012). Dies wäre mit dem Wachstumsdefekt von *mbt^{P1}* Neuroblasten vereinbar. Für Bic existiert ein Antikörper, mit dem Bic in Neuroblasten nachgewiesen werden konnte. Eine lethale Insertion im regulatorischen Bereich von *bic* zeigte im Auge jedoch keine genetische Interaktion mit *mbt^{P1}*.

Weitere interessante Kandidatenproteine sind Nacalpa, die zweite Komponente des NAC neben Bic, und Tm1. Tm1 ist zusammen mit dem NAC an der Lokalisation von Oskar mRNA beteiligt, was möglicherweise auf eine Beteiligung von Mbt an diesem Prozess hinweist. Im Zusammenhang mit Mbt ist ebenfalls interessant, dass *Tm1* bereits in einem Screen als Verstärker des *mbt^{P1}* Augenphänotyps identifiziert wurde. Dieser Zusammenhang wurde jedoch nicht weiter analysiert, da verschiedene Mutationen in *Tm1* keine konsistenten Phänotypen erzeugten (SCHNEEBERGER, 2002). Hinzu kommt, dass die Analyse dieses Gens sehr aufwendig und kompliziert wäre, da 17 verschiedene Transkripte prognostiziert werden. Mit mus209 (PCNA) wurde ein Kandidatenprotein identifiziert, welches aufgrund seiner Funktion bei der Replikation der DNS eine tragende Rolle für die Proliferation spielt. Dies wiederum stünde im Einklang mit der Rolle von Mbt bei der Proliferation von Neuroblasten.

5.8 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine bisher unbekannte Funktion der p21-aktivierten Kinase Mbt in Neuroblasten des Zentralhirns charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass Mbt eine Rolle bei der Regulation von Zellgröße, Proliferation und dem Erhalt von Neuroblasten während des normalen Entwicklungszeitfensters spielt. Welche konkrete Funktion Cno als Effektor von Mbt ausübt ist noch unklar und daher ein möglicher Ausgangspunkt für weitere Experimente. Weitere Ansatzpunkte für eine detailliertere Analyse der Funktion von Mbt in Neuroblasten sind die Untersuchung des MAPK-Signalweges sowie des Insulin-Signalweges oberhalb der PI3K und mögliche Effekte von Mbt auf den Nukleolus und Ribosomen.

6 Danksagung

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Thomas Raabe für die Übernahme des Erstgutachtens und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich möchte mich bedanken für dieses spannende Thema, für sein kontinuierliches Interesse an dieser Arbeit, für seine Offenheit gegenüber Vorschlägen und die manchmal auch hitzigen Diskussionen, für die Zeit und Arbeit, die er in dieses Projekt investiert hat, und nicht zuletzt auch für die Möglichkeit, an so vielen internationalen Konferenzen teilnehmen zu dürfen.

Prof. Dr. Charlotte Förster danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Karoline Kraft und Rolf Urbach von der Universität Mainz danke ich für eine erstklassige, konstruktive, lehrreiche und sehr erfolgreiche Kooperation.

Ein großes Danke an Dr. Stephanie Pütz für die sehr tolle Zusammenarbeit bei den 2D-Gelen, all die spannenden fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen, Ermutigungen und das Korrekturlesen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Raabe, Viera Albertova, Katharina Beck, Anna Hovhanyan, Kirsten Langenbrink, Dr. Benjamin Mentzel, Dr. Felix Stark und Heike Wecklein. Vielen Dank für all die größeren und kleineren Dinge, ohne die eine Doktorarbeit sonst kläglich scheitern würde.

Danke an Gunther Tietsch für alle Kleinigkeiten, die oft vergessen werden.

Unendlich dankbar bin ich für die Unterstützung, die ich während der Zeit meiner Doktorarbeit in meinem Freundeskreis erfahren habe. Besonderer Dank gilt Susanne Hacker, Almut Jäck, Gerlinde Kern, Dr. Barbara Klotz, Rebekka Krumbach, Daniela Lieb, Josefina und Susanne Pascucci, Julia und Sebastian Pieper, Kathrin Przibylla, Eva Ruttinger, Marie-Isabell Schilk, Carina Schütz, Julia Schütz, Daniela Stock, Dr. Beatrice Trinca und Franziska Wekel. Es war so wichtig.

6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Meike Brömer, Rita Kerpen, Marcell Louis, Eva Aguado Roca und Dr. Dominic Teichert für die letzten fünf Monate.

Meinen Eltern danke ich für all das, was sie mir mitgegeben haben. Danke.

7 Zusammenfassung

p21-aktivierte Kinasen regulieren zahlreiche zelluläre Prozesse, die während der Entwicklung, aber auch beispielsweise bei der Krebsentstehung, von zentraler Bedeutung sind. Mbt, das einzige Typ II PAK-Protein von *Drosophila melanogaster*, spielt eine Rolle bei der Gehirnentwicklung. Eine Nullmutation von *mbt*, *mbt^{P1}*, bildet kleinere Gehirne mit stark verkleinerten Pilzkörpern aus. In dieser Arbeit wurde die Funktion von Mbt in Neuroblasten untersucht. Mbt wurde als Teil des apikalen Proteinkomplexes in Neuroblasten des Zentralhirns nachgewiesen. Die apikale Lokalisation von Mbt ist Zellzyklus-abhängig und wird über Bindung an Cdc42 reguliert. Sie ist essentiell für die Funktion von Mbt in Neuroblasten. Trotz apikaler Mbt-Lokalisation in Neuroblasten zeigte die *mbt* Nullmutante keine Defekte des basalen Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung. Mud zeigte geringfügige Lokalisationsveränderungen, die auf einen möglichen Einfluss von Mbt hinweisen. Obwohl PAKs zentrale Regulatoren des Zytoskeletts sind, zeigte die *mbt^{P1}* Mutante keine offensichtlichen Veränderungen des Aktin- und Tubulin-Zytoskeletts. Armadillo, ein Aktin-assoziiertes Mbt-Substrat, zeigte ebenfalls keine Lokalisationsveränderung in Neuroblasten. Mbt steuert jedoch die apikale Anreicherung von Cno, einem weiteren Aktin-assoziierten Protein, in Neuroblasten. Darüber hinaus beeinflusst Mbt die Zellgröße von Neuroblasten, sowie deren Proliferationspotenzial und Überleben. *mbt^{P1}* Neuroblasten sind kleiner als wildtypische Neuroblasten, haben ein geringeres Proliferationsvermögen und eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit. Der Zelltod von Neuroblasten ist jedoch ein sekundärer Effekt. Daher kann eine Blockierung von Apoptose den adulten Pilzkörperphänotyp nicht retten. Signalwege, die Zellgröße und Proliferation regulieren, wurden auf eine Beteiligung von Mbt hin analysiert. *mbt^{P1}* induzierte leichte Effekte im Insulin-Signalweg und die Delokalisation eines nukleolären Proteins. Eine genetische Interaktion von *mbt^{P1}* mit Mutationen in Genen des klassischen MAPK-Signalweges identifizierte *mbt* als Positivregulator dieses Signalweges im Auge. Ein ähnlicher, schwächerer Effekt wurde auch bzgl. der Proliferation und Größe von Neuroblasten beobachtet. Eine 2D-Gelanalyse von Larvengehirnen identifizierte Bic und Hsp83 als mögliche von Mbt regulierte Proteine. Diese Arbeit charakterisiert eine bisher unbekannte Funktion der p21-aktivierten Kinase

Mbt in neuronalen Stammzellen und liefert damit Ansatzpunkte für eine detaillierte Aufklärung der Funktionsmechanismen von Typ II PAKs bei der Regulation von Zellproliferation und Überleben.

8 Summary

p21-activated kinases regulate numerous cellular processes central not only during development, but also for example for cancer pathogenesis. Mbt, the only type II PAK in *Drosophila*, regulates brain development. The *mbt* null mutant *mbt^{P1}* exhibits reduced brain size, with the mushroom bodies showing the most pronounced reduction. In this work, the function of Mbt in neuroblasts was investigated. Mbt was identified as a component of the apical protein complex in central brain neuroblasts. The apical localization of Mbt was cell cycle dependent and regulated by binding to Cdc42, which is essential for Mbt function in neuroblasts. Despite apical localization of Mbt, the *mbt^{P1}* null allele showed no defects in the basic mechanism of asymmetric cell division in larval neuroblasts. However, Mud showed minor localization changes indicating a possible influence of Mbt. Even though PAKs are well-known regulators of the cytoskeleton, no obvious changes in the actin and tubulin cytoskeleton were observed in *mbt^{P1}* neuroblasts. The localization of Armadillo, an actin-associated Mbt substrate, was also undisturbed throughout the cell cycle. Mbt controls the apical enrichment of Cno, another actin-associated protein. Moreover, Mbt influences neuroblast cell size, proliferation potential and survival. *mbt^{P1}* neuroblasts were smaller than wildtype neuroblasts and showed reduced proliferation activity and survival. However, the apoptotic loss of *mbt^{P1}* neuroblasts is a secondary effect. Thus, the adult mushroom body phenotype cannot be rescued by blocking apoptosis. Signalling pathways known to regulate growth and proliferation were analyzed with respect to a possible participation of Mbt. *mbt^{P1}* induced slight effects in the insulin pathway and strongly influenced the localization of an unknown nucleolar protein. Genetic interactions of *mbt^{P1}* with mutations in genes involved in the classical MAPK pathway identified *mbt* as a positive regulator of the MAPK pathway. A similar effect was also observed with respect to neuroblast proliferation and size. A 2D gel analysis of larval brains identified Bic and Hsp83 as candidate proteins, that might be regulated by Mbt.

This work characterizes a novel function of the p21-activated kinase Mbt in neural stem cells. It provides starting points for a detailed analysis of the mechanisms of type II PAK functions in the control of cell growth, proliferation and survival.

9 Publikationen und Konferenzen

Publikationen

Melzer J.*, Kraft K.F.*, Urbach R., Raabe T. (2013) The p21-activated kinase Mbt is a component of the apical protein complex in central brain neuroblasts and controls cell proliferation. *Development* **140**, 1871-1881.

Menzel N.*, Melzer J.*, Waschke J., Lenz C., Wecklein H., Lochnit G., Drenckhahn D., Raabe T. (2008) The *Drosophila* p21-activated kinase Mbt modulates DE-cadherin-mediated cell adhesion by phosphorylation of Armadillo. *Biochem J* **416**, 231-241.

*equally contributing authors

Posterpräsentationen auf Konferenzen

Melzer J. and Raabe T. (2011) A role for Mbt in the proliferation of central brain neuroblasts. 22nd European *Drosophila* Research Conference, Lissabon, Portugal

Melzer J. and Raabe T. (2011) A role for Mbt in the proliferation of central brain neuroblasts. 52nd *Drosophila* Research Conference, San Diego, USA

Melzer J. and Raabe T. (2010) A role of type II PAKs in the proliferation of neuroblasts. Neurofly, 13th European *Drosophila* Neurobiology Conference, Manchester, UK

10 Abkürzungen

4E-BP	4E-bindendes Protein
AID	Autoinhibitorische Domäne
ALH	After Larval Hatching
APF	After Pupa-rium Formation
aPKC	A-typische Protein Kinase C
APP	Amyloid Precursor Protein
Ase	Asense
Baz	Bazooka
Bic	Bicaudal
Brat	Brain Tumor
Cno	Canoe
Dac	Dachshund
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dpn	Deadpan
DISC	Death Inducing Signaling Complex
Dlg	Discs large
Dmef2	<i>Drosophila</i> Myocyte enhancer factor 2
Dock	Dreadlocks
DSCAM	Down Syndrome Cell Adhesion Molecule
FasII	Fasciclin II
Gab1	Grb2-associated Binder
GAP	GTPase Activating Protein
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GMC	Ganglion Mother Cell
GO	Gene Ontology
Grb2	Growth factor Receptor-Bound Protein 2
GTPase	Guanosin Triphosphatase

10 Abkürzungen

Erk	Extracellular Signal Regulated Kinase
h	Hours
HGF	Hepatocyte Growth Factor
Hpo	Hippo
Hsp83	Heat Shock Protein 83
InR	Insulinrezeptor
Insc	Inscuteable
INP	Intermediate Neural Precursor
Khc-73	Kinesin Heavy Chain
Lef	Lymphoid Enhancer Factor
LimK1	Lim Kinase 1
lof	loss of function
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MARCM	Mosaic Analysis With A Repressible Cell Marker
Mats	Mob as Tumor Suppressor
MBP	Myelin Basic Protein
Mbt	Mushroom bodies tiny
Met	N-methyl-N'-nitroso-guanidine
Mir	Miranda
MKP	MAP Kinase Phosphatase
mRNA	messenger RNA
Mud	Mushroom body defective
NAC	Nascent Polypeptide Associated Complex
Nacalpha	NAC Protein Alpha Subunit
NuMA	Nuclear Mitotic Apparatus Protein
PAK	p21-aktivierte Kinase
pAkt	Phospho-Akt
PAR3	Partition defective 3
PAR6	Partition defective 6
PBD	p21-binding Domain
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK1	Phosphatidylinositol Dependent Kinase 1
pErk	Phospho-Erk
PH	Pleckstring Homology Domain

10 Abkürzungen

PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
Pins	Partner of Inscuteable
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat
PKB	Protein Kinase B
Plk1	Polo-like Kinase 1
PON	Partner Of Numb
Pros	Prospero
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue deleted on Chromosome 10
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Ran	Ras-like Nuclear
Ras	Rat Sarcomas
Rheb	Ras Homolog enriched in Brain Ortholog
<i>rl</i>	<i>rolled</i> , Gen kodierend für <i>Drosophila</i> Erk
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
RS6K	Ribosomale Protein S6 p70 Proteinkinase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S	Serin
S6K	Protein S6 p70 Proteinkinase
Ser	Serin
SH2	Src Homology Domain 2
SH3	Src Homology Domain 3
Sos	Son Of Sevenless
Sav	Salvador
T	Threonin
Tcf	T Cell Factor
Thr	Threonin
Tm1	Tropomyosin 1
TOR	Target Of Rapamycin
Tsc	Tuberous Sclerosis Complex
Wts	Warts

Literaturverzeichnis

- Abo, A., Qu, J., Cammarano, M.S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B. & Minden, A.** (1998) PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J* **17**, 6527–6540.
- Abrams, J.M., White, K., Fessler, L.I. & Steller, H.** (1993) Programmed cell death during Drosophila embryogenesis. *Development* **117**, 29–43.
- Adam, L., Vadlamudi, R., Kondapaka, S.B., Chernoff, J., Mendelsohn, J. & Kumar, R.** (1998) Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase. *J Biol Chem* **273**, 28238–28246.
- Ahn, H.K., Jang, J., Lee, J., Se Hoon, P., Park, J.O., Park, Y.S., Lim, H.Y., Kim, K.M. & Kang, W.K.** (2011) P21-activated kinase 4 overexpression in metastatic gastric cancer patients. *Transl Oncol* **4**, 345–349.
- Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y. & Yahara, I.** (2001) Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* **4**, 367–373.
- Ang, L.H., Kim, J., Stepensky, V. & Hing, H.** (2003) Dock and Pak regulate olfactory axon pathfinding in Drosophila. *Development* **130**, 1307–1316.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O. & Caroni, P.** (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**, 805–809.
- Arias-Romero, L.E. & Chernoff, J.** (2008) A tale of two Paks. *Biol Cell* **100**, 97–108.
- Arias-Romero, L.E., Villamar-Cruz, O., Pacheco, A., Kosoff, R., Huang, M., Muthuswamy, S.K. & Chernoff, J.** (2010) A Rac-Pak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells. *Oncogene* **29**, 5839–5849.

- Asano, Y., Jiménez-Dalmaroni, A., Liverpool, T.B., Marchetti, M.C., Giomi, L., Kiger, A., Duke, T. & Baum, B.** (2009) Pak3 inhibits local actin filament formation to regulate global cell polarity. *HFSP J* **3**, 194–203.
- Asrar, S., Meng, Y., Zhou, Z., Todorovski, Z., Huang, W.W. & Jia, Z.** (2009) Regulation of hippocampal long-term potentiation by p21-activated protein kinase 1 (PAK1). *Neuropharmacology* **56**, 73–80.
- Atwood, S.X., Chabu, C., Penkert, R.R., Doe, C.Q. & Prehoda, K.E.** (2007) Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6 aPKC. *J Cell Sci* **120**, 3200–3206.
- Atwood, S.X. & Prehoda, K.E.** (2009) aPKC phosphorylates Miranda to polarize fate determinants during neuroblast asymmetric cell division. *Curr Biol* **19**, 723–729.
- Baek, S.H., Cho, H.W., Kwon, Y.C., Lee, J.H., Kim, M.J., Lee, H. & Choe, K.M.** (2012) Requirement for Pak3 in Rac1-induced organization of actin and myosin during Drosophila larval wound healing. *FEBS Lett* **586**, 772–777.
- Bahri, S., Wang, S., Conder, R., Choy, J., Vlachos, S., Dong, K., Merino, C., Sigrist, S., Molnar, C., Yang, X., Manser, E. & Harden, N.** (2010) The leading edge during dorsal closure as a model for epithelial plasticity: Pak is required for recruitment of the Scribble complex and septate junction formation. *Development* **137**, 2023–2032.
- Bahri, S.M., Choy, J.M., Manser, E., Lim, L. & Yang, X.** (2009) The Drosophila homologue of Arf-GAP GIT1, dGIT, is required for proper muscle morphogenesis and guidance during embryogenesis. *Dev Biol* **325**, 15–23.
- Bakal, C.J., Finan, D., LaRose, J., Wells, C.D., Gish, G., Kulkarni, S., DeSepulveda, P., Wilde, A. & Rottapel, R.** (2005) The Rho GTP exchange factor Lfc promotes spindle assembly in early mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9529–9534.
- Baldassa, S., Calogero, A.M., Colombo, G., Zippel, R. & Gnesutta, N.** (2010) N-terminal interaction domain implicates PAK4 in translational regulation and reveals novel cellular localization signals. *J Cell Physiol* **224**, 722–733.
- Baskaran, Y., Ng, Y.W., Selamat, W., Ling, F.T.P. & Manser, E.** (2012) Group I and II mammalian PAKs have different modes of activation by Cdc42. *EMBO Rep* **13**, 653–659.

- Bayraktar, O.A., Boone, J.Q., Drummond, M.L. & Doe, C.Q.** (2010) Drosophila type II neuroblast lineages keep Prospero levels low to generate large clones that contribute to the adult brain central complex. *Neural Dev* **5**, 26.
- Beeser, A., Jaffer, Z.M., Hofmann, C. & Chernoff, J.** (2005) Role of group A p21-activated kinases in activation of extracellular-regulated kinase by growth factors. *J Biol Chem* **280**, 36609–36615.
- Bello, B.C., Izergina, N., Caussin, E. & Reichert, H.** (2008) Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in Drosophila brain development. *Neural Dev* **3**, 5.
- Birkenfeld, J., Nalbant, P., Yoon, S.H. & Bokoch, G.M.** (2008) Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis? *Trends Cell Biol* **18**, 210–219.
- Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F. & Basler, K.** (2007) An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3312–3317.
- Bisson, N., Wedlich, D. & Moss, T.** (2012) The p21-activated kinase Pak1 regulates induction and migration of the neural crest in Xenopus. *Cell Cycle* **11**, 1316–1324.
- Boda, B., Alberi, S., Nikonenko, I., Node-Langlois, R., Jourdain, P., Moosmayer, M., Parisi-Jourdain, L. & Muller, D.** (2004) The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J Neurosci* **24**, 10816–10825.
- Boda, B., Jourdain, L. & Muller, D.** (2008) Distinct, but compensatory roles of PAK1 and PAK3 in spine morphogenesis. *Hippocampus* **18**, 857–861.
- Böhni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B.F., Beckingham, K. & Hafen, E.** (1999) Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a Drosophila homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* **97**, 865–875.
- Bokoch, G.M.** (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* **72**, 743–781.
- Bokoch, G.M., Reilly, A.M., Daniels, R.H., King, C.C., Olivera, A., Spiegel, S. & Knaus, U.G.** (1998) A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids. *J Biol Chem* **273**, 8137–8144.

- Bokoch, G.M., Wang, Y., Bohl, B.P., Sells, M.A., Quilliam, L.A. & Knaus, U.G.** (1996) Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). *J Biol Chem* **271**, 25746–25749.
- Bompard, G., Rabeharivelo, G., Cau, J., Abrieu, A., Delsert, C. & Morin, N.** (2013) P21-activated kinase 4 (PAK4) is required for metaphase spindle positioning and anchoring. *Oncogene* **32**, 910–919.
- Bompard, G., Rabeharivelo, G., Frank, M., Cau, J., Delsert, C. & Morin, N.** (2010) Subgroup II PAK-mediated phosphorylation regulates Ran activity during mitosis. *J Cell Biol* **190**, 807–822.
- Boone, J.Q. & Doe, C.Q.** (2008) Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev Neurobiol* **68**, 1185–1195.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C.Q. & Technau, G.M.** (1996) The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol* **179**, 41–64.
- Bostner, J., Skoog, L., Fornander, T., Nordenskjöld, B. & Stål, O.** (2010) Estrogen receptor- α phosphorylation at serine 305, nuclear p21-activated kinase 1 expression, and response to tamoxifen in postmenopausal breast cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 1624–1633.
- Bowman, S.K., Neumüller, R.A., Novatchkova, M., Du, Q. & Knoblich, J.A.** (2006) The *Drosophila* NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev Cell* **10**, 731–742.
- Bowman, S.K., Rolland, V., Betschinger, J., Kinsey, K.A., Emery, G. & Knoblich, J.A.** (2008) The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in *Drosophila*. *Dev Cell* **14**, 535–546.
- Bright, M.D., Garner, A.P. & Ridley, A.J.** (2009) PAK1 and PAK2 have different roles in HGF-induced morphological responses. *Cell Signal* **21**, 1738–1747.
- Britton, J.S. & Edgar, B.A.** (1998) Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development* **125**, 2149–2158.
- Britton, J.S., Lockwood, W.K., Li, L., Cohen, S.M. & Edgar, B.A.** (2002) *Drosophila*'s insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Dev Cell* **2**, 239–249.

- Broadus, J. & Doe, C.Q.** (1997) Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Biol* **7**, 827–835.
- Broadus, J., Skeath, J.B., Spana, E.P., Bossing, T., Technau, G. & Doe, C.Q.** (1995) New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Mech Dev* **53**, 393–402.
- Bryan, B., Kumar, V., Stafford, L.J., Cai, Y., Wu, G. & Liu, M.** (2004) GEFT, a Rho family guanine nucleotide exchange factor, regulates neurite outgrowth and dendritic spine formation. *J Biol Chem* **279**, 45824–45832.
- Buchner, D.A., Su, F., Yamaoka, J.S., Kamei, M., Shavit, J.A., Barthel, L.K., McGee, B., Amigo, J.D., Kim, S., Hanosh, A.W., Jagadeeswaran, P., Goldman, D., Lawson, N.D., Raymond, P.A., Weinstein, B.M., Ginsburg, D. & Lyons, S.E.** (2007) pak2a mutations cause cerebral hemorrhage in redhead zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13996–14001.
- Callow, M.G., Zozulya, S., Gishizky, M.L., Jallal, B. & Smeal, T.** (2005) PAK4 mediates morphological changes through the regulation of GEF-H1. *J Cell Sci* **118**, 1861–1872.
- Cammarano, M.S., Nekrasova, T., Noel, B. & Minden, A.** (2005) Pak4 induces premature senescence via a pathway requiring p16INK4/p19ARF and mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Cell Biol* **25**, 9532–9542.
- Carmena, A., Speicher, S. & Baylies, M.** (2006) The PDZ protein Canoe/AF-6 links Ras-MAPK, Notch and Wingless/Wnt signaling pathways by directly interacting with Ras, Notch and Dishevelled. *PLoS One* **1**, e66.
- Cau, J., Faure, S., Comps, M., Delsert, C. & Morin, N.** (2001) A novel p21-activated kinase binds the actin and microtubule networks and induces microtubule stabilization. *J Cell Biol* **155**, 1029–1042.
- Chan, P.M. & Manser, E.** (2012) PAKs in human disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* **106**, 171–187.
- Chaudhary, A., King, W.G., Mattaliano, M.D., Frost, J.A., Diaz, B., Morrison, D.K., Cobb, M.H., Marshall, M.S. & Brugge, J.S.** (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol* **10**, 551–554.
- Chell, J.M. & Brand, A.H.** (2010) Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. *Cell* **143**, 1161–1173.

- Chen, L.Y., Rex, C.S., Casale, M.S., Gall, C.M. & Lynch, G.** (2007) Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. *J Neurosci* **27**, 5363–5372.
- Cheng, L.Y., Bailey, A.P., Leever, S.J., Ragan, T.J., Driscoll, P.C. & Gould, A.P.** (2011) Anaplastic Lymphoma Kinase Spares Organ Growth during Nutrient Restriction in *Drosophila*. *Cell* **146**, 435–447.
- Chew, T.L., Masaracchia, R.A., Goeckeler, Z.M. & Wysolmerski, R.B.** (1998) Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J Muscle Res Cell Motil* **19**, 839–854.
- Choksi, S.P., Southall, T.D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B.E., van Steensel, B., Micklem, G. & Brand, A.H.** (2006) Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell* **11**, 775–789.
- Chong, C., Tan, L., Lim, L. & Manser, E.** (2001) The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem* **276**, 17347–17353.
- Cobos, I., Borello, U. & Rubenstein, J.L.R.** (2007) Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* **54**, 873–888.
- Conder, R., Yu, H., Zahedi, B. & Harden, N.** (2007) The serine/threonine kinase dPak is required for polarized assembly of F-actin bundles and apical-basal polarity in the *Drosophila* follicular epithelium. *Dev Biol* **305**, 470–482.
- Cotteret, S. & Chernoff, J.** (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of Pak5 regulates its antiapoptotic properties. *Mol Cell Biol* **26**, 3215–3230.
- Cotteret, S., Jaffer, Z.M., Beeser, A. & Chernoff, J.** (2003) p21-Activated kinase 5 (Pak5) localizes to mitochondria and inhibits apoptosis by phosphorylating BAD. *Mol Cell Biol* **23**, 5526–5539.
- Dan, C., Kelly, A., Bernard, O. & Minden, A.** (2001) Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol Chem* **276**, 32115–32121.
- Dan, C., Nath, N., Liberto, M. & Minden, A.** (2002) PAK5, a new brain-specific kinase, promotes neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Mol Cell Biol* **22**, 567–577.
- Daniels, R.H., Hall, P.S. & Bokoch, G.M.** (1998) Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J* **17**, 754–764.

- Davis, R.L.** (2011) Traces of *Drosophila* memory. *Neuron* **70**, 8–19.
- Delorme, V., Machacek, M., DerMardirossian, C., Anderson, K.L., Wittmann, T., Han-
ein, D., Waterman-Storer, C., Danuser, G. & Bokoch, G.M.** (2007) Cofilin activity
downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium
and lamella actin networks. *Dev Cell* **13**, 646–662.
- Delpire, E.** (2009) The mammalian family of sterile 20p-like protein kinases. *Pflugers
Arch* **458**, 953–967.
- Doe, C.Q.** (1992) Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells
in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **116**, 855–863.
- Doe, C.Q. & Technau, G.M.** (1993) Identification and cell lineage of individual neural
precursors in the *Drosophila* CNS. *Trends Neurosci* **16**, 510–514.
- Dorrance, A.M., De Vita, S., Radu, M., Reddy, P.N.G., McGuinness, M.K., Harris, C.E.,
Mathieu, R., Lane, S.W., Kosoff, R., Milsom, M.D., Chernoff, J. & Williams, D.A.**
(2013) The Rac GTPase effector p21 activated kinase is essential for hematopoietic
stem/progenitor cell migration and engraftment. *Blood* **121**, 2474–2482.
- Duan, R., Jin, P., Luo, F., Zhang, G., Anderson, N. & Chen, E.H.** (2012) Group I PAKs
function downstream of Rac to promote podosome invasion during myoblast fusion
in vivo. *J Cell Biol* **199**, 169–185.
- Edin, M.L. & Juliano, R.L.** (2005) Raf-1 serine 338 phosphorylation plays a key role in
adhesion-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase by epidermal
growth factor. *Mol Cell Biol* **25**, 4466–4475.
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M. & Gill, G.N.** (1999) Activation of LIM-
kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics.
Nat Cell Biol **1**, 253–259.
- Egger, B., Gold, K.S. & Brand, A.H.** (2011) Regulating the balance between symmetric
and asymmetric stem cell division in the developing brain. *Fly (Austin)* **5**, 237–241.
- Eswaran, J., Lee, W.H., Debreczeni, J.E., Filippakopoulos, P., Turnbull, A., Fedorov,
O., Deacon, S.W., Peterson, J.R. & Knapp, S.** (2007) Crystal Structures of the p21-
activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active
group II PAKs. *Structure* **15**, 201–213.

- Eswaran, J., Soundararajan, M., Kumar, R. & Knapp, S.** (2008) UnPAKing the class differences among p21-activated kinases. *Trends Biochem Sci* **33**, 394–403.
- Fan, X., Labrador, J.P., Hing, H. & Bashaw, G.J.** (2003) Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* **40**, 113–127.
- Faure, S., Cau, J., de Santa Barbara, P., Bigou, S., Ge, Q., Delsert, C. & Morin, N.** (2005) *Xenopus* p21-activated kinase 5 regulates blastomeres' adhesive properties during convergent extension movements. *Dev Biol* **277**, 472–492.
- Frank, S.R., Bell, J.H., Frödin, M. & Hansen, S.H.** (2012) A β PIX-PAK2 complex confers protection against Scrib-dependent and cadherin-mediated apoptosis. *Curr Biol* **22**, 1747–1754.
- Franke, T.F.** (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* **27**, 6473–6488.
- Friedland, J.C., Lakins, J.N., Kazanietz, M.G., Chernoff, J., Boettiger, D. & Weaver, V.M.** (2007) α 6 β 4 integrin activates Rac-dependent p21-activated kinase 1 to drive NF- κ B-dependent resistance to apoptosis in 3D mammary acini. *J Cell Sci* **120**, 3700–3712.
- Frost, J.A., Khokhlatchev, A., Stippec, S., White, M.A. & Cobb, M.H.** (1998) Differential effects of PAK1-activating mutations reveal activity-dependent and -independent effects on cytoskeletal regulation. *J Biol Chem* **273**, 28191–28198.
- Frost, J.A., Swantek, J.L., Stippec, S., Yin, M.J., Gaynor, R. & Cobb, M.H.** (2000) Stimulation of NF κ B activity by multiple signaling pathways requires PAK1. *J Biol Chem* **275**, 19693–19699.
- Gaengel, K. & Mlodzik, M.** (2003) Egfr signaling regulates ommatidial rotation and cell motility in the *Drosophila* eye via MAPK/Pnt signaling and the Ras effector Canoe/AF6. *Development* **130**, 5413–5423.
- Gatti, A., Huang, Z., Tuazon, P.T. & Traugh, J.A.** (1999) Multisite autophosphorylation of p21-activated protein kinase gamma-PAK as a function of activation. *J Biol Chem* **274**, 8022–8028.
- Gizachew, D., Guo, W., Chohan, K.K., Sutcliffe, M.J. & Oswald, R.E.** (2000) Structure of the complex of Cdc42Hs with a peptide derived from P-21 activated kinase. *Biochemistry* **39**, 3963–3971.

- Gnesutta, N. & Minden, A.** (2003) Death receptor-induced activation of initiator caspase 8 is antagonized by serine/threonine kinase PAK4. *Mol Cell Biol* **23**, 7838–7848.
- Gnesutta, N., Qu, J. & Minden, A.** (2001) The serine/threonine kinase PAK4 prevents caspase activation and protects cells from apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 14414–14419.
- Goberdhan, D.C., Paricio, N., Goodman, E.C., Mlodzik, M. & Wilson, C.** (1999) *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev* **13**, 3244–3258.
- Goeckeler, Z.M., Masaracchia, R.A., Zeng, Q., Chew, T.L., Gallagher, P. & Wysolmerski, R.B.** (2000) Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J Biol Chem* **275**, 18366–18374.
- Gong, W., An, Z., Wang, Y., Pan, X., Fang, W., Jiang, B. & Zhang, H.** (2009) P21-activated kinase 5 is overexpressed during colorectal cancer progression and regulates colorectal carcinoma cell adhesion and migration. *Int J Cancer* **125**, 548–555.
- Grewal, S.S.** (2009) Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: a view from the fly world. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1006–1010.
- Ha, B.H., Davis, M.J., Chen, C., Lou, H.J., Gao, J., Zhang, R., Krauthammer, M., Halaban, R., Schlessinger, J., Turk, B.E. & Boggon, T.J.** (2012) Type II p21-activated kinases (PAKs) are regulated by an autoinhibitory pseudosubstrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 16107–16112.
- Harden, N., Loh, H.Y., Chia, W. & Lim, L.** (1995) A dominant inhibitory version of the small GTP-binding protein Rac disrupts cytoskeletal structures and inhibits developmental cell shape changes in *Drosophila*. *Development* **121**, 903–914.
- Hariharan, I.K., Hu, K.Q., Asha, H., Quintanilla, A., Ezzell, R.M. & Settleman, J.** (1995) Characterization of rho GTPase family homologues in *Drosophila melanogaster*: overexpressing Rho1 in retinal cells causes a late developmental defect. *EMBO J* **14**, 292–302.
- Harris, R.E., Pargett, M., Sutcliffe, C., Umulis, D. & Ashe, H.L.** (2011) Brat promotes stem cell differentiation via control of a bistable switch that restricts BMP signaling. *Dev Cell* **20**, 72–83.
- Hartenstein, V.**, Atlas of *Drosophila* development. No. 3 in The development of *Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993.

- Hartenstein, V., Rudloff, E. & Campos-Ortega, J.A.** (1987) The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's archives of developmental biology* **196**, 473–485.
- Hayashi, K., Ohshima, T., Hashimoto, M. & Mikoshiba, K.** (2007) Pak1 regulates dendritic branching and spine formation. *Dev Neurobiol* **67**, 655–669.
- Hayashi, M.L., Choi, S.Y., Rao, B.S., Jung, H.Y., Lee, H.K., Zhang, D., Chattarji, S., Kirkwood, A. & Tonegawa, S.** (2004) Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron* **42**, 773–787.
- He, H. & Baldwin, G.S.** (2008) Rho GTPases and p21-activated kinase in the regulation of proliferation and apoptosis by gastrins. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2018–2022.
- He, H., Huynh, N., Liu, K.H., Malcontenti-Wilson, C., Zhu, J., Christophi, C., Shulkes, A. & Baldwin, G.S.** (2012) P-21 activated kinase 1 knockdown inhibits β -catenin signalling and blocks colorectal cancer growth. *Cancer letters* **317**, 65–71.
- He, H., Shulkes, A. & Baldwin, G.S.** (2008) PAK1 interacts with β -catenin and is required for the regulation of the β -catenin signalling pathway by gastrins. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 1943–1954.
- Heisenberg, M.** (2003) Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* **4**, 266–275.
- Heisenberg, M. & Böhl, K.** (1979) Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means. *Z Naturforsch* **34c**, 143–147.
- Henras, A.K., Soudet, J., G erus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A. & Henry, Y.** (2008) The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2334–2359.
- Hing, H., Xiao, J., Harden, N., Lim, L. & Zipursky, S.L.** (1999) Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* **97**, 853–863.
- Hofmann, C., Shepelev, M. & Chernoff, J.** (2004) The genetics of Pak. *J Cell Sci* **117**, 4343–4354.
- Homem, C.C.F. & Knoblich, J.A.** (2012) *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development* **139**, 4297–4310.

- Huang, W., Zhou, Z., Asrar, S., Henkelman, M., Xie, W. & Jia, Z.** (2011) p21-Activated kinases 1 and 3 control brain size through coordinating neuronal complexity and synaptic properties. *Mol Cell Biol* **31**, 388–403.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. & Yamamoto, D.** (1997) The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761–771.
- Ito, K. & Hotta, Y.** (1992) Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **149**, 134–148.
- Ito, M., Masuda, N., Shinomiya, K., Endo, K. & Ito, K.** (2013) Systematic analysis of neural projections reveals clonal composition of the *Drosophila* brain. *Curr Biol* **23**, 644–655.
- Izergina, N., Balmer, J., Bello, B. & Reichert, H.** (2009) Postembryonic development of transit amplifying neuroblast lineages in the *Drosophila* brain. *Neural Dev* **4**, 44.
- Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T. & Matsuzaki, F.** (2006) *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat Cell Biol* **8**, 586–593.
- Jacobs, T., Causeret, F., Nishimura, Y.V., Terao, M., Norman, A., Hoshino, M. & Nikolic, M.** (2007) Localized activation of p21-activated kinase controls neuronal polarity and morphology. *J Neurosci* **27**, 8604–8615.
- Jaffer, Z.M. & Chernoff, J.** (2002) p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 713–717.
- Jiang, Y. & Reichert, H.** (2012) Programmed cell death in type II neuroblast lineages is required for central complex development in the *Drosophila* brain. *Neural Dev* **7**, 3.
- Jin, S., Zhuo, Y., Guo, W. & Field, J.** (2005) p21-activated Kinase 1 (Pak1)-dependent phosphorylation of Raf-1 regulates its mitochondrial localization, phosphorylation of BAD, and Bcl-2 association. *J Biol Chem* **280**, 24698–24705.
- Johnston, C.A., Hirono, K., Prehoda, K.E. & Doe, C.Q.** (2009) Identification of an Aurora-A/PinsLINKER/Dlg spindle orientation pathway using induced cell polarity in S2 cells. *Cell* **138**, 1150–1163.
- Kaur, R., Yuan, X., Lu, M.L. & Balk, S.P.** (2008) Increased PAK6 expression in prostate cancer and identification of PAK6 associated proteins. *Prostate* **68**, 1510–1516.

- Kim, M.D., Kamiyama, D., Kolodziej, P., Hing, H. & Chiba, A.** (2003) Isolation of Rho GTPase effector pathways during axon development. *Dev Biol* **262**, 282–293.
- King, A.J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S. & Marshall, M.S.** (1998) The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* **396**, 180–183.
- Kiosses, W.B., Daniels, R.H., Otey, C., Bokoch, G.M. & Schwartz, M.A.** (1999) A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J Cell Biol* **147**, 831–844.
- Knoblich, J.A.** (2008) Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**, 583–597.
- Knoblich, J.A.** (2010) Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 849–860.
- Knoblich, J.A., Jan, L.Y. & Jan, Y.N.** (1997) The N terminus of the Drosophila Numb protein directs membrane association and actin-dependent asymmetric localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13005–13010.
- Kok, M., Zwart, W., Holm, C., Fles, R., Hauptmann, M., Van't Veer, L.J., Wessels, L.F.A., Neefjes, J., Stål, O., Linn, S.C., Landberg, G. & Michalides, R.** (2011) PKA-induced phosphorylation of ER α at serine 305 and high PAK1 levels is associated with sensitivity to tamoxifen in ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **125**, 1–12.
- Kreis, P. & Barnier, J.V.** (2009) PAK signalling in neuronal physiology. *Cell Signal* **21**, 384–393.
- Kreis, P., Thévenot, E., Rousseau, V., Boda, B., Muller, D. & Barnier, J.V.** (2007) The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. *J Biol Chem* **282**, 21497–21506.
- Krendel, M., Zenke, F.T. & Bokoch, G.M.** (2002) Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol* **4**, 294–301.
- Kumar, A., Molli, P.R., Pakala, S.B., Bui Nguyen, T.M., Rayala, S.K. & Kumar, R.** (2009) PAK thread from amoeba to mammals. *J Cell Biochem* **107**, 579–585.
- Kunz, T., Kraft, K.F., Technau, G.M. & Urbach, R.** (2012) Origin of Drosophila mushroom body neuroblasts and generation of divergent embryonic lineages. *Development* **139**, 2510–2522.

- Lanet, E., Gould, A.P. & Maurange, C.** (2013) Protection of neuronal diversity at the expense of neuronal numbers during nutrient restriction in the *Drosophila* visual system. *Cell Rep* **3**, 587–594.
- Law, S.H.W. & Sargent, T.D.** (2012) Maternal pak4 expression is required for primitive myelopoiesis in zebrafish. *Mech Dev* **130**, 181–194.
- Le Borgne, R., Bardin, A. & Schweisguth, F.** (2005) The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* **132**, 1751–1762.
- Lee, N., MacDonald, H., Reinhard, C., Halenbeck, R., Roulston, A., Shi, T. & Williams, L.T.** (1997) Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13642–13647.
- Lee, S.R., Ramos, S.M., Ko, A., Masiello, D., Swanson, K.D., Lu, M.L. & Balk, S.P.** (2002) AR and ER interaction with a p21-activated kinase (PAK6). *Mol Endocrinol* **16**, 85–99.
- Lee, T., Lee, A. & Luo, L.** (1999) Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* **126**, 4065–4076.
- Leeuw, T., Wu, C., Schrag, J.D., Whiteway, M., Thomas, D.Y. & Leberer, E.** (1998) Interaction of a G-protein beta-subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* **391**, 191–195.
- Leevers, S.J., Weinkove, D., MacDougall, L.K., Hafen, E. & Waterfield, M.D.** (1996) The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *EMBO J* **15**, 6584–6594.
- Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M.C., Eck, M.J., Mayer, B.J. & Harrison, S.C.** (2000) Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* **102**, 387–397.
- Li, W. & Guan, K.L.** (2004) The Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) interacts with and activates Pak. *J Biol Chem* **279**, 32824–32831.
- Li, X., Ke, Q., Li, Y., Liu, F., Zhu, G. & Li, F.** (2010a) DGCR6L, a novel PAK4 interaction protein, regulates PAK4-mediated migration of human gastric cancer cell via LIMK1. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 70–79.

- Li, Y., Shao, Y., Tong, Y., Shen, T., Zhang, J., Li, Y., Gu, H. & Li, F. (2012) Nucleocytoplasmic shuttling of PAK4 modulates β -catenin intracellular translocation and signaling. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 465–475.
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A.V., Wu, G., Li, L., Liu, M., Huang, C.K. & Wu, D. (2003) Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* **114**, 215–227.
- Li, Z., Zhang, H., Lundin, L., Thullberg, M., Liu, Y., Wang, Y., Claesson-Welsh, L. & Strömblad, S. (2010b) p21-activated kinase 4 phosphorylation of integrin beta5 Ser-759 and Ser-762 regulates cell migration. *J Biol Chem* **285**, 23699–23710.
- Liu, J., Fraser, S.D., Faloon, P.W., Rollins, E.L., Vom Berg, J., Starovic-Subota, O., Laliberte, A.L., Chen, J.N., Serluca, F.C. & Childs, S.J. (2007) A betaPix Pak2a signaling pathway regulates cerebral vascular stability in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13990–13995.
- Liu, J., Zeng, L., Kennedy, R.M., Gruenig, N.M. & Childs, S.J. (2012) β Pix plays a dual role in cerebral vascular stability and angiogenesis, and interacts with integrin $\alpha v \beta 8$. *Dev Biol* **363**, 95–105.
- Liu, R.x., Wang, W.q., Ye, L., Bi, Y.f., Fang, H., Cui, B., Zhou, W.w., Dai, M., Zhang, J., Li, X.y. & Ning, G. (2010) p21-activated kinase 3 is overexpressed in thymic neuroendocrine tumors (carcinoids) with ectopic ACTH syndrome and participates in cell migration. *Endocrine* **38**, 38–47.
- Liu, Y., Xiao, H., Tian, Y., Nekrasova, T., Hao, X., Lee, H.J., Suh, N., Yang, C.S. & Minden, A. (2008) The pak4 protein kinase plays a key role in cell survival and tumorigenesis in athymic mice. *Mol Cancer Res* **6**, 1215–1224.
- Lozano, E., Frasa, M.A.M., Smolarczyk, K., Knaus, U.G. & Braga, V.M.M. (2008) PAK is required for the disruption of E-cadherin adhesion by the small GTPase Rac. *J Cell Sci* **121**, 933–938.
- Lucanic, M. & Cheng, H.J. (2008) A RAC/CDC-42-independent GIT/PIX/PAK signaling pathway mediates cell migration in *C. elegans*. *PLoS Genet* **4**, e1000269.
- Lucanic, M., Kiley, M., Ashcroft, N., L'Etoile, N. & Cheng, H.J. (2006) The *Caenorhabditis elegans* P21-activated kinases are differentially required for UNC-6/netrin-mediated commissural motor axon guidance. *Development* **133**, 4549–4559.

- Luo, L., Liao, Y.J., Jan, L.Y. & Jan, Y.N.** (1994) Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev* **8**, 1787–1802.
- Luo, S., Mizuta, H. & Rubinsztein, D.C.** (2008) p21-activated kinase 1 promotes soluble mutant huntingtin self-interaction and enhances toxicity. *Hum Mol Genet* **17**, 895–905.
- Ma, Q.L., Yang, F., Frautschy, S.A. & Cole, G.M.** (2012) PAK in Alzheimer disease, Huntington disease and X-linked mental retardation. *Cell Logist* **2**, 117–125.
- Maceyka, M., Alvarez, S.E., Milstien, S. & Spiegel, S.** (2008) Filamin A links sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate receptor 1 at lamellipodia to orchestrate cell migration. *Mol Cell Biol* **28**, 5687–5697.
- Manser, E., Huang, H.Y., Loo, T.H., Chen, X.Q., Dong, J.M., Leung, T. & Lim, L.** (1997) Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol* **17**, 1129–1143.
- Manser, E., Leung, T., Monfries, C., Teo, M., Hall, C. & Lim, L.** (1992) Diversity and versatility of GTPase activating proteins for the p21rho subfamily of ras G proteins detected by a novel overlay assay. *J Biol Chem* **267**, 16025–16028.
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S. & Lim, L.** (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**, 40–46.
- Manser, E., Loo, T.H., Koh, C.G., Zhao, Z.S., Chen, X.Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. & Lim, L.** (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* **1**, 183–192.
- Marler, K.J.M., Kozma, R., Ahmed, S., Dong, J.M., Hall, C. & Lim, L.** (2005) Outgrowth of neurites from NIE-115 neuroblastoma cells is prevented on repulsive substrates through the action of PAK. *Mol Cell Biol* **25**, 5226–5241.
- Maroto, B., Ye, M.B., von Lohneysen, K., Schnellzer, A. & Knaus, U.G.** (2008) P21-activated kinase is required for mitotic progression and regulates Plk1. *Oncogene* **27**, 4900–4908.
- Matenia, D., Griesshaber, B., Li, X.Y., Thiessen, A., Johne, C., Jiao, J., Mandelkow, E. & Mandelkow, E.M.** (2005) PAK5 kinase is an inhibitor of MARK/Par-1, which leads to stable microtubules and dynamic actin. *Mol Biol Cell* **16**, 4410–4422.

- Maurange, C., Cheng, L. & Gould, A.P.** (2008) Temporal transcription factors and their targets schedule the end of neural proliferation in *Drosophila*. *Cell* **133**, 891–902.
- McKay, M.M. & Morrison, D.K.** (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* **26**, 3113–3121.
- McPhie, D.L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K.J., Manly, S.P., Kozłowski, M.R., Neve, K.A. & Neve, R.L.** (2003) DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *J Neurosci* **23**, 6914–6927.
- Melzer, J., Kraft, K.F., Urbach, R. & Raabe, T.** (2013) The p21-activated kinase Mbt is a component of the apical protein complex in central brain neuroblasts and controls cell proliferation. *Development* **140**, 1871–1881.
- Melzig, J., Rein, K.H., Schafer, U., Pfister, H., Jackle, H., Heisenberg, M. & Raabe, T.** (1998) A protein related to p21-activated kinase (PAK) that is involved in neurogenesis in the *Drosophila* adult central nervous system. *Curr Biol* **8**, 1223–1226.
- Mendoza, M.C., Er, E.E. & Blenis, J.** (2011) The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* **36**, 320–328.
- Meng, J., Meng, Y., Hanna, A., Janus, C. & Jia, Z.** (2005) Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J Neurosci* **25**, 6641–6650.
- Mentzel, B. & Raabe, T.** (2005) Phylogenetic and structural analysis of the *Drosophila melanogaster* p21-activated kinase DmPAK3. *Gene* **349**, 25–33.
- Menzel, N., Melzer, J., Waschke, J., Lenz, C., Wecklein, H., Lochnit, G., Drenckhahn, D. & Raabe, T.** (2008) The *Drosophila* p21-activated kinase Mbt modulates DE-cadherin-mediated cell adhesion by phosphorylation of Armadillo. *Biochem J* **416**, 231–241.
- Menzel, N., Schneeberger, D. & Raabe, T.** (2007) The *Drosophila* p21 activated kinase Mbt regulates the actin cytoskeleton and adherens junctions to control photoreceptor cell morphogenesis. *Mech Dev* **124**, 78–90.
- Minden, A.** (2012) PAK4-6 in cancer and neuronal development. *Cell Logist* **2**, 95–104.
- Montagne, J., Stewart, M.J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S.C. & Thomas, G.** (1999) *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* **285**, 2126–2129.

- Morreale, A., Venkatesan, M., Mott, H.R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P.N. & Laue, E.D.** (2000) Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. *Nat Struct Biol* **7**, 384–388.
- Murphy, A.M. & Montell, D.J.** (1996) Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* **133**, 617–630.
- Nayal, A., Webb, D.J., Brown, C.M., Schaefer, E.M., Vicente-Manzanares, M. & Horwitz, A.R.** (2006) Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J Cell Biol* **173**, 587–589.
- Nekrasova, T., Jobes, M.L., Ting, J.H., Wagner, G.C. & Minden, A.** (2008) Targeted disruption of the Pak5 and Pak6 genes in mice leads to deficits in learning and locomotion. *Dev Biol* **322**, 95–108.
- Nekrasova, T. & Minden, A.** (2011) PAK4 is required for regulation of the cell-cycle regulatory protein p21, and for control of cell-cycle progression. *J Cell Biochem* **112**, 1795–1806.
- Nekrasova, T. & Minden, A.** (2012) Role for p21-activated kinase PAK4 in development of the mammalian heart. *Transgenic Res* **21**, 797–811.
- Newsome, T.P., Schmidt, S., Dietzl, G., Keleman, K., Asling, B., Debant, A. & Dickson, B.J.** (2000) Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. *Cell* **101**, 283–294.
- Ng, J. & Luo, L.** (2004) Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron* **44**, 779–793.
- Nguyen, T.V.V., Galvan, V., Huang, W., Banwait, S., Tang, H., Zhang, J. & Bredesen, D.E.** (2008) Signal transduction in Alzheimer disease: p21-activated kinase signaling requires C-terminal cleavage of APP at Asp664. *J Neurochem* **104**, 1065–1080.
- Nipper, R.W., Siller, K.H., Smith, N.R., Doe, C.Q. & Prehoda, K.E.** (2007) Galphai generates multiple Pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14306–14311.
- Nola, S., Sebbagh, M., Marchetto, S., Osmani, N., Nourry, C., Audebert, S., Navarro, C., Rachel, R., Montcouquiol, M., Sans, N., Etienne-Manneville, S., Borg, J.P. & Santoni, M.J.** (2008) Scrib regulates PAK activity during the cell migration process. *Hum Mol Genet* **17**, 3552–3565.

- Obermeier, A., Ahmed, S., Manser, E., Yen, S.C., Hall, C. & Lim, L. (1998) PAK promotes morphological changes by acting upstream of Rac. *EMBO J* **17**, 4328–4339.
- Ozdowski, E.F., Gayle, S., Bao, H., Zhang, B. & Sherwood, N.T. (2011) Loss of *Drosophila melanogaster* p21-activated kinase 3 suppresses defects in synapse structure and function caused by spastin mutations. *Genetics* **189**, 123–135.
- Paliouras, G.N., Naujokas, M.A. & Park, M. (2009) Pak4, a novel Gab1 binding partner, modulates cell migration and invasion by the Met receptor. *Mol Cell Biol* **29**, 3018–32.
- Pallares-Cartes, C., Cakan-Akdogan, G. & Teleman, A.A. (2012) Tissue-specific coupling between insulin/IGF and TORC1 signaling via PRAS40 in *Drosophila*. *Dev Cell* **22**, 172–182.
- Pandey, A., Dan, I., Kristiansen, T.Z., Watanabe, N.M., Voldby, J., Kajikawa, E., Khosravi-Far, R., Blagoev, B. & Mann, M. (2002) Cloning and characterization of PAK5, a novel member of mammalian p21-activated kinase-II subfamily that is predominantly expressed in brain. *Oncogene* **21**, 3939–3948.
- Park, M.H., Kim, D.J., You, S.T., Lee, C.S., Kim, H.K., Park, S.M., Shin, E.Y. & Kim, E.G. (2012) Phosphorylation of beta-catenin at serine 663 regulates its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* **419**, 543–549.
- Park, Y., Rangel, C., Reynolds, M.M., Caldwell, M.C., Johns, M., Nayak, M., Welsh, C.J., McDermott, S. & Datta, S. (2003) *Drosophila perlecan* modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division. *Developmental biology* **253**, 247–257.
- Parrini, M.C., Lei, M., Harrison, S.C. & Mayer, B.J. (2002) Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell* **9**, 73–83.
- Penzes, P., Beeser, A., Chernoff, J., Schiller, M.R., Eipper, B.A., Mains, R.E. & Huganir, R.L. (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* **37**, 263–274.
- Peterson, C., Carney, G.E., Taylor, B.J. & White, K. (2002) reaper is required for neuroblast apoptosis during *Drosophila* development. *Development* **129**, 1467–1476.
- Preissler, S. & Deuerling, E. (2012) Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. *Trends Biochem Sci* **37**, 274–283.

- Puto, L.A., Pestonjamas, K., King, C.C. & Bokoch, G.M.** (2003) p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *J Biol Chem* **278**, 9388–9393.
- Qu, J., Cammarano, M.S., Shi, Q., Ha, K.C., de Lanerolle, P. & Minden, A.** (2001) Activated PAK4 regulates cell adhesion and anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* **21**, 3523–3533.
- Qu, J., Li, X., Novitsch, B.G., Zheng, Y., Kohn, M., Xie, J.M., Kozinn, S., Bronson, R., Beg, A.A. & Minden, A.** (2003) PAK4 kinase is essential for embryonic viability and for proper neuronal development. *Mol Cell Biol* **23**, 7122–7133.
- Reichert, H. & Boyan, G.** (1997) Building a brain: developmental insights in insects. *Trends Neurosci* **20**, 258–264.
- Renkema, G.H., Pulkkinen, K. & Saksela, K.** (2002) Cdc42/Rac1-mediated activation primes PAK2 for superactivation by tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* **22**, 6719–6725.
- Rennefahrt, U.E., Deacon, S.W., Parker, S.A., Devarajan, K., Beeser, A., Chernoff, J., Knapp, S., Turk, B.E. & Peterson, J.R.** (2007) Specificity profiling of Pak kinases allows identification of novel phosphorylation sites. *J Biol Chem* **282**, 15667–15678.
- Rex, C.S., Lin, C.Y., Kramár, E.A., Chen, L.Y., Gall, C.M. & Lynch, G.** (2007) Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J Neurosci* **27**, 3017–3029.
- Riaz, A., Zeller, K.S. & Johansson, S.** (2012) Receptor-specific mechanisms regulate phosphorylation of AKT at Ser473: role of RICTOR in β 1 integrin-mediated cell survival. *PLoS One* **7**, e32081.
- Robles, E., Woo, S. & Gomez, T.M.** (2005) Src-dependent tyrosine phosphorylation at the tips of growth cone filopodia promotes extension. *J Neurosci* **25**, 7669–7681.
- Rosário, M., Franke, R., Bednarski, C. & Birchmeier, W.** (2007) The neurite outgrowth multiadapter RhoGAP, NOMA-GAP, regulates neurite extension through SHP2 and Cdc42. *J Cell Biol* **178**, 503–516.
- Rudel, T. & Bokoch, G.M.** (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* **276**, 1571–1574.

- Sambrook, J., Fritsch, E. & T., M.**, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- Sanders, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M. & de Lanerolle, P.** (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**, 2083–2085.
- Santiago-Medina, M., Gregus, K.A. & Gomez, T.M.** (2013) PAK-PIX interactions regulate adhesion dynamics and membrane protrusion to control neurite outgrowth. *J Cell Sci* **126**, 1122–1133.
- Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M. & Knoblich, J.A.** (2001) Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the Drosophila nervous system. *Cell* **107**, 183–194.
- Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Knoblich, J.A.** (2000) A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in Drosophila. *Curr Biol* **10**, 353–362.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A.** (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. & Technau, G.M.** (1997) The embryonic central nervous system lineages of Drosophila melanogaster. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* **189**, 186–204.
- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E. & Zipursky, S.L.** (2000) Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* **101**, 671–684.
- Schneeberger, D.** (2002) Molekulare und funktionelle Analyse der p21-aktivierten Kinase Mbt (mushroom bodies tiny) in der Augen- und Pilzkörperentwicklung von Drosophila melanogaster. Ph.D. thesis, Universität Würzburg, Am Hubland, 97074 Würzburg.
- Schneeberger, D. & Raabe, T.** (2003) Mbt, a Drosophila PAK protein, combines with Cdc42 to regulate photoreceptor cell morphogenesis. *Development* **130**, 427–437.
- Schrantz, N., da Silva Correia, J., Fowler, B., Ge, Q., Sun, Z. & Bokoch, G.M.** (2004) Mechanism of p21-activated kinase 6-mediated inhibition of androgen receptor signaling. *J Biol Chem* **279**, 1922–1931.

- Sells, M.A., Boyd, J.T. & Chernoff, J.** (1999) p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol* **145**, 837–849.
- Sells, M.A., Knaus, U.G., Bagrodia, S., Ambrose, D.M., Bokoch, G.M. & Chernoff, J.** (1997) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* **7**, 202–210.
- Sells, M.A., Pfaff, A. & Chernoff, J.** (2000) Temporal and spatial distribution of activated Pak1 in fibroblasts. *J Cell Biol* **151**, 1449–1458.
- Shalaby, M.R., Shepard, H.M., Presta, L., Rodrigues, M.L., Beverley, P.C., Feldmann, M. & Carter, P.** (1992) Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med* **175**, 217–225.
- Shaul, Y.D. & Seger, R.** (2007) The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1213–1226.
- Shekarabi, M., Moore, S.W., Tritsch, N.X., Morris, S.J., Bouchard, J.F. & Kennedy, T.E.** (2005) Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci* **25**, 3132–3141.
- Shin, E.Y., Shin, K.S., Lee, C.S., Woo, K.N., Quan, S.H., Soung, N.K., Kim, Y.G., Cha, C.I., Kim, S.R., Park, D., Bokoch, G.M. & Kim, E.G.** (2002) Phosphorylation of p85 beta PIX, a Rac/Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor, via the Ras/ERK/PAK2 pathway is required for basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem* **277**, 44417–44430.
- Shrestha, Y., Schafer, E.J., Boehm, J.S., Thomas, S.R., He, F., Du, J., Wang, S., Barretina, J., Weir, B.A., Zhao, J.J., Polyak, K., Golub, T.R., Beroukhi, R. & Hahn, W.C.** (2012) PAK1 is a breast cancer oncogene that coordinately activates MAPK and MET signaling. *Oncogene* **31**, 3397–3408.
- Siegrist, S.E. & Doe, C.Q.** (2005) Microtubule-induced Pins/Galphai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts. *Cell* **123**, 1323–1335.
- Siegrist, S.E., Haque, N.S., Chen, C.H., Hay, B.A. & Hariharan, I.K.** (2010) Inactivation of Both foxo and reaper Promotes Long-Term Adult Neurogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* **20**, 643–648.

- Siller, K.H., Cabernard, C. & Doe, C.Q.** (2006) The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol* **8**, 594–600.
- Siu, M.K.Y., Chan, H.Y., Kong, D.S.H., Wong, E.S.Y., Wong, O.G.W., Ngan, H.Y.S., Tam, K.F., Zhang, H., Li, Z., Chan, Q.K.Y., Tsao, S.W., Strömblad, S. & Cheung, A.N.Y.** (2010) p21-activated kinase 4 regulates ovarian cancer cell proliferation, migration, and invasion and contributes to poor prognosis in patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18622–18627.
- Skeath, J.B. & Thor, S.** (2003) Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 8–15.
- Smith, C.A., Lau, K.M., Rahmani, Z., Dho, S.E., Brothers, G., She, Y.M., Berry, D.M., Bonneil, E., Thibault, P., Schweisguth, F., Le Borgne, R. & McGlade, C.J.** (2007) aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J* **26**, 468–480.
- Song, Y. & Lu, B.** (2011) Regulation of cell growth by Notch signaling and its differential requirement in normal vs. tumor-forming stem cells in *Drosophila*. *Genes Dev* **25**, 2644–2658.
- Soosairajah, J., Maiti, S., Wiggan, O., Sarmiere, P., Moussi, N., Sarcevic, B., Sampath, R., Bamburg, J.R. & Bernard, O.** (2005) Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J* **24**, 473–486.
- Sousa-Nunes, R., Yee, L.L. & Gould, A.P.** (2011) Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in *Drosophila*. *Nature* **471**, 508–512.
- Southall, T.D. & Brand, A.H.** (2009) Neural stem cell transcriptional networks highlight genes essential for nervous system development. *EMBO J* **28**, 3799–3807.
- Speicher, S., Fischer, A., Knoblich, J. & Carmena, A.** (2008) The PDZ protein Canoe regulates the asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts and muscle progenitors. *Curr Biol* **18**, 831–837.
- Strassburger, K., Tiebe, M., Pinna, F., Breuhahn, K. & Teleman, A.A.** (2012) Insulin/IGF signaling drives cell proliferation in part via Yorkie/YAP. *Dev Biol* **367**, 187–196.
- Strausfeld, N.J., Sinakevitch, I. & Vilinsky, I.** (2003) The mushroom bodies of *Drosophila melanogaster*: an immunocytological and golgi study of Kenyon cell organization in the calyces and lobes. *Microsc Res Tech* **62**, 151–169.

- Strochlic, T.I., Concilio, S., Viaud, J., Eberwine, R.A., Wong, L.E., Minden, A., Turk, B.E., Plomann, M. & Peterson, J.R.** (2012) Identification of neuronal substrates implicates Pak5 in synaptic vesicle trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4116–4121.
- Strochlic, T.I., Viaud, J., Rennefahrt, U.E.E., Anastassiadis, T. & Peterson, J.R.** (2010) Phosphoinositides are essential coactivators for p21-activated kinase 1. *Mol Cell* **40**, 493–500.
- Sun, J., Khalid, S., Rozakis-Adcock, M., Fantus, I.G. & Jin, T.** (2009) P-21-activated protein kinase-1 functions as a linker between insulin and Wnt signaling pathways in the intestine. *Oncogene* **28**, 3132–3144.
- Tanaka, N.K., Tanimoto, H. & Ito, K.** (2008) Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J Comp Neurol* **508**, 711–755.
- Tay, H.G., Ng, Y.W. & Manser, E.** (2010) A vertebrate-specific Chp-PAK-PIX pathway maintains E-cadherin at adherens junctions during zebrafish epiboly. *PLoS One* **5**, e10125.
- Teleman, A.A.** (2009) Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem J* **425**, 13–26.
- Teleman, A.A., Chen, Y.W. & Cohen, S.M.** (2005) *Drosophila* Melted modulates FOXO and TOR activity. *Dev Cell* **9**, 271–281.
- Thévenot, E., Moreau, A.W., Rousseau, V., Combeau, G., Domenichini, F., Jacquet, C., Goupille, O., Amar, M., Kreis, P., Fossier, P. & Barnier, J.V.** (2011) p21-Activated kinase 3 (PAK3) protein regulates synaptic transmission through its interaction with the Nck2/Grb4 protein adaptor. *J Biol Chem* **286**, 40044–40059.
- Tian, Y., Lei, L. & Minden, A.** (2011) A key role for Pak4 in proliferation and differentiation of neural progenitor cells. *Dev Biol* **353**, 206–216.
- Tran, N.H. & Frost, J.A.** (2003) Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition. *J Biol Chem* **278**, 11221–11226.
- Tran, N.H., Wu, X. & Frost, J.A.** (2005) B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms. *J Biol Chem* **280**, 16244–16253.
- Truman, J.W. & Bate, M.** (1988) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **125**, 145–157.

- Tsuji, T., Hasegawa, E. & Isshiki, T.** (2008) Neuroblast entry into quiescence is regulated intrinsically by the combined action of spatial Hox proteins and temporal identity factors. *Development* **135**, 3859–3869.
- Tudor, E.L., Perkinson, M.S., Schmidt, A., Ackerley, S., Brownlees, J., Jacobsen, N.J.O., Byers, H.L., Ward, M., Hall, A., Leigh, P.N., Shaw, C.E., McLoughlin, D.M. & Miller, C.C.J.** (2005) ALS2/Alsin regulates Rac-PAK signaling and neurite outgrowth. *J Biol Chem* **280**, 34735–34740.
- Tzur, A., Kafri, R., LeBleu, V.S., Lahav, G. & Kirschner, M.W.** (2009) Cell growth and size homeostasis in proliferating animal cells. *Science* **325**, 167–171.
- Urbach, R. & Technau, G.M.** (2003) Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*. *Development* **130**, 3621–3637.
- Urbach, R. & Technau, G.M.** (2004) Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *Bioessays* **26**, 739–751.
- Vadlamudi, R.K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T.P. & Kumar, R.** (2002) Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol* **4**, 681–690.
- Valenta, T., Hausmann, G. & Basler, K.** (2012) The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J* **31**, 2714–2736.
- van der Straten, A., Rommel, C., Dickson, B. & Hafen, E.** (1997) The heat shock protein 83 (Hsp83) is required for Raf-mediated signalling in *Drosophila*. *EMBO J* **16**, 1961–1969.
- van Riggelen, J., Yetil, A. & Felsher, D.W.** (2010) MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer* **10**, 301–309.
- Venken, K.J.T., Simpson, J.H. & Bellen, H.J.** (2011) Genetic manipulation of genes and cells in the nervous system of the fruit fly. *Neuron* **72**, 202–230.
- Vlachos, S. & Harden, N.** (2011) Genetic evidence for antagonism between Pak protein kinase and Rho1 small GTPase signaling in regulation of the actin cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis. *Genetics* **187**, 501–512.
- Wallace, S.W., Durgan, J., Jin, D. & Hall, A.** (2010) Cdc42 regulates apical junction formation in human bronchial epithelial cells through PAK4 and Par6B. *Mol Biol Cell* **21**, 2996–3006.

- Wang, H., Somers, G.W., Bashirullah, A., Heberlein, U., Yu, F. & Chia, W. (2006) Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev* **20**, 3453–63.
- Wang, J., Wu, J.W. & Wang, Z.X. (2011) Structural insights into the autoactivation mechanism of p21-activated protein kinase. *Structure* **19**, 1752–1761.
- Wee, B., Johnston, C.A., Prehoda, K.E. & Doe, C.Q. (2011) Canoe binds RanGTP to promote Pins(TPR)/Mud-mediated spindle orientation. *J Cell Biol* **195**, 369–376.
- Wells, C.M. & Jones, G.E. (2010) The emerging importance of group II PAKs. *Biochem J* **425**, 465–473.
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K. & Steller, H. (1994) Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677–683.
- Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T. & Knoblich, J.A. (2008) Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization. *Cell* **135**, 161–173.
- Wong, L.E., Reynolds, A.B., Dissanayaka, N.T. & Minden, A. (2010) p120-catenin is a binding partner and substrate for Group B Pak kinases. *J Cell Biochem* **110**, 1244–1254.
- Wu, X., Carr, H.S., Dan, I., Ruvolo, P.P. & Frost, J.A. (2008) p21 activated kinase 5 activates Raf-1 and targets it to mitochondria. *J Cell Biochem* **105**, 167–175.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A. & Ohno, S. (2003) Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol* **13**, 734–743.
- Yang, F., Li, X., Sharma, M., Zarnegar, M., Lim, B. & Sun, Z. (2001) Androgen receptor specifically interacts with a novel p21-activated kinase, PAK6. *J Biol Chem* **276**, 15345–15353.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E. & Mizuno, K. (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**, 809–812.
- Yang, Z., Rayala, S., Nguyen, D., Vadlamudi, R.K., Chen, S. & Kumar, R. (2005) Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res* **65**, 3179–3184.

- Ye, D.Z. & Field, J.** (2012) PAK signaling in cancer. *Cell Logist* **2**, 105–116.
- Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X. & Chia, W.** (2000) Analysis of partner of inscuteable, a novel player of Drosophila asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* **100**, 399–409.
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. & Schreiber, S.L.** (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**, 933–945.
- Yu, H.H., Awasaki, T., Schroeder, M.D., Long, F., Yang, J.S., He, Y., Ding, P., Kao, J.C., Wu, G.Y.Y., Peng, H., Myers, G. & Lee, T.** (2013) Clonal development and organization of the adult Drosophila central brain. *Curr Biol* **23**, 633–643.
- Yu, J.S., Chen, W.J., Ni, M.H., Chan, W.H. & Yang, S.D.** (1998) Identification of the regulatory autophosphorylation site of autophosphorylation-dependent protein kinase (auto-kinase). Evidence that auto-kinase belongs to a member of the p21-activated kinase family. *Biochem J* **334**, 121–131.
- Za, L., Albertinazzi, C., Paris, S., Gagliani, M., Tacchetti, C. & de Curtis, I.** (2006) β PIX controls cell motility and neurite extension by regulating the distribution of GIT1. *J Cell Sci* **119**, 2654–2666.
- Zacharioudaki, E., Magadi, S.S. & Delidakis, C.** (2012) bHLH-O proteins are crucial for Drosophila neuroblast self-renewal and mediate Notch-induced overproliferation. *Development* **139**, 1258–1269.
- Zenke, F.T., King, C.C., Bohl, B.P. & Bokoch, G.M.** (1999) Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J Biol Chem* **274**, 32565–32573.
- Zenke, F.T., Krendel, M., DerMardirossian, C., King, C.C., Bohl, B.P. & Bokoch, G.M.** (2004) p21-activated kinase 1 phosphorylates and regulates 14-3-3 binding to GEF-H1, a microtubule-localized Rho exchange factor. *J Biol Chem* **279**, 18392–18400.
- Zhang, H., Landmann, F., Zahreddine, H., Rodriguez, D., Koch, M. & Labouesse, M.** (2011) A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature* **471**, 99–103.
- Zhang, H., Li, Z., Viklund, E.K. & Strömblad, S.** (2002) P21-activated kinase 4 interacts with integrin $\alpha v\beta 5$ and regulates $\alpha v\beta 5$ -mediated cell migration. *J Cell Biol* **158**, 1287–1297.

- Zhang, H., Webb, D.J., Asmussen, H., Niu, S. & Horwitz, A.F.** (2005) A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci* **25**, 3379–3388.
- Zhao, Z.S., Lim, J.P., Ng, Y.W., Lim, L. & Manser, E.** (2005) The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A. *Mol Cell* **20**, 237–249.
- Zhao, Z.S. & Manser, E.** (2012) PAK family kinases: Physiological roles and regulation. *Cell Logist* **2**, 59–68.
- Zhou, L., Ercolano, E., Ammoun, S., Schmid, M.C., Barczyk, M.A. & Hanemann, C.O.** (2011) Merlin-deficient human tumors show loss of contact inhibition and activation of Wnt/ β -catenin signaling linked to the PDGFR/Src and Rac/PAK pathways. *Neoplasia* **13**, 1101–1112.
- Zhu, G., Wang, Y., Huang, B., Liang, J., Ding, Y., Xu, A. & Wu, W.** (2012) A Rac1/PAK1 cascade controls β -catenin activation in colon cancer cells. *Oncogene* **31**, 1001–1012.