

DISS. ETH Nr. 18640

**Characterization of *Drosophila* Lnk – An Adaptor
protein involved in growth control**

ABHANDLUNG

Zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER WISSENSCHAFTEN

der

ETH ZÜRICH

vorgelegt von

CHRISTIAN WERZ

Dipl. Biol.

Geboren am 13.02.1977

von

Neckarsulm, Deutschland

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Ernst Hafen

Prof. Dr. Konrad Basler

Prof. Dr. Markus Affolter

Zürich 2009

Summary

One of the essential and most tightly regulated processes an organism has to accomplish throughout development is the control of growth and proliferation in order to reach and maintain the appropriate size. Until today, the underlying mechanisms are still far from being fully understood.

It has previously been shown that, among other signaling cascades, the insulin signaling pathway plays a crucial role in controlling growth. In *Drosophila*, binding of either one of the seven Insulin like peptides initiates the autophosphorylation of the receptor, which in turn leads to subsequent phosphorylation of a variety of downstream signaling molecules such as Chico, PI3K, PKB and PDK1. As a result, the insulin signaling pathway regulates cellular growth, proliferation, apoptosis and transcription. Strikingly, mutants of positive core components of the insulin receptor pathway lead to common phenotypes such as decreased body size due to smaller and less cells, female sterility, developmental delay and increased total lipid levels.

In an unbiased screen for genes affecting organ size based on the *eyFLP-FRT* system, we found that mutations in a gene called *Ink* result in flies with a smaller head, suggesting a growth promoting role for *Ink*. The *Ink* gene encodes an adaptor protein, containing a PH-domain, an SH2-domain and a highly conserved C-terminal tyrosine phosphorylation site. The phenotypes of *Ink* mutant flies were reminiscent of the phenotypes observed in mutants of the insulin pathway, suggesting an important function for *Ink* in promoting the insulin signal.

In mammals, three proteins sharing the same protein structure to *Drosophila* *Ink* have been described, SH2B1, SH2B2 and SH2B3 referred to as the SH2B family of adaptor proteins. The members of this protein family have been shown to regulate receptor tyrosine pathways either by direct binding to the receptor or by interaction with one of the multiple signaling proteins such as Grb2, PI3K and c-Cbl.

In this work we present the characterization of *Drosophila* *Ink*. By analysing the mutant phenotypes displayed by homozygous *Ink* animals, genetic interaction experiments and molecular readouts for insulin signaling activity we were able to place *Ink* into the Insulin pathway between the receptor and *PI3K*.

Zusammenfassung

Während der Entwicklung eines mehrzelligen Organismus ist einer der grundlegendsten und am strengsten kontrollierten Prozesse die Regulation des Wachstums. Bisher sind wir jedoch noch weit davon entfernt, den Prozess der Wachstumskontrolle vollständig zu verstehen.

Der Insulinsignalweg nimmt, neben anderen wichtigen Signalkaskaden, eine entscheidende Rolle in der Regulierung von Zellwachstum und –proliferation ein. In *Drosophila* wird durch die Bindung von sogenannten ‚Insulin like peptides‘ die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors ausgelöst, was wiederum die Phosphorylierung einer Vielzahl von nachgeschalteten Signalmolekülen wie Chico, PI3K, PKB und PDK1 zur Folge hat. Der Insulinsignalweg reguliert neben der Zellgröße und Proliferation auch den programmierten Zelltod und die Transkription bestimmter Gene. Auffallender Weise bewirken Mutationen in den Hauptkomponenten des Insulinsignalwegs einheitliche Phänotypen, wie eine reduzierte Körpergröße, hervorgerufen durch kleinere und weniger Zellen, Sterilität der Weibchen, Entwicklungsverzögerung und erhöhte Lipidwerte. In einem auf dem *eyFLP-FRT* System basierenden Screen zur Identifikation von neuen Genen, welche die Organgröße beeinflussen, haben wir Mutationen im sogenannten *Ink* Gen gefunden. Diese Mutationen führen zu Fliegen mit einem kleineren Kopf, was darauf hindeutet, dass *Ink* Wachstum positiv beeinflusst. Das *Ink* Gen kodiert für ein Adaptorprotein, welches eine PH Domäne, eine SH2 Domäne und eine hochkonservierte C-terminalen Tyrosin-phosphorylierungsstelle aufweist. Die Phänotypen der *Ink* mutanten Fliegen gleichen denen, die bei Mutanten der Insulin Signalkaskade beobachtet werden konnten. Dies weist auf eine Funktion von *Ink* in der Signalkaskade unterhalb des Insulinrezeptors hin.

In Säugetieren weisen drei Proteine dieselbe Proteinstruktur wie *Drosophila* *Ink* auf: SH2B1, SH2B2 und SH2B3. Diese in der SH2B Adaptorproteinfamilie zusammengefassten Proteine regulieren Rezeptor-Tyrosin-Kinase Signalwege, indem sie entweder direkt an den Rezeptor binden oder mit einem Signalprotein, wie zum Beispiel Grb2, PI3K oder c-Cbl interagieren.

In der vorliegenden Arbeit wird die Charakterisierung des *Drosophila Ink* Gens beschrieben. Durch genetische Interaktionsstudien und molekulare Indikatoren für die Aktivität des Insulin Signalwegs konnten wir zeigen, dass Ink innerhalb der Insulinsignalkaskade zwischen dem Insulinrezeptor und *PI3K* einzuordnen ist.